



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS TABASCO

PROGRAMA PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

**ACTIVIDAD SIMBIÓTICA MICROBIANA CON *Clitoria sp.* y *Clitoria ternatea*
EN LA FITORREMEDIACIÓN DE SUELOS CON PETRÓLEO FRESCO**

MARIANA VALIER MAGO

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO

2020



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe **Mariana Valier Mago**, alumna de esta institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección de la Profesora **Dra. María del Carmen Rivera Cruz**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **Actividad simbiótica microbiana con *Clitoria sp.* y *Clitoria ternatea* en la fitorremediación de suelos con petróleo fresco**, y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la institución, la Consejera de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta institución.

H. Cárdenas, Tabasco, 5 de octubre de 2020.

Mariana Valier Mago

Firma

Dra. María del Carmen Rivera Cruz

Firma

La presente tesis, titulada: “**ACTIVIDAD SIMBIÓTICA MICROBIANA CON *Clitoria sp.* y *Clitoria ternatea* EN LA FITORREMEDIACIÓN DE SUELOS CON PETRÓLEO FRESCO**”, realizada por la alumna: **Mariana Valier Mago**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

POSGRADO EN PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

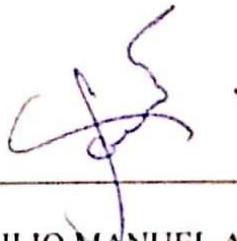
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA: _____



DRA. MARÍA DEL CARMEN RIVERA CRUZ

ASESOR: _____



DR. EMILIO MANUEL ARANDA IBÁÑEZ

ASESOR: _____



DR. GILBERTO MORALES GUZMÁN

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO A 5 DE OCTUBRE DE 2020

La presente tesis titulada **Actividad simbiótica microbiana con *Clitoria* sp. y *Clitoria ternatea* en la fitorremediación de suelos con petróleo fresco**, se realizó en el Laboratorio de Microbiología Agrícola y Ambiental, localizado en las instalaciones del Campus Tabasco, Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. La tesis fue dirigida por la Dra. María del Carmen Rivera Cruz, Profesora Investigadora Titular del Colegio de Postgraduados Campus Tabasco.

El presente estudio fue financiado en su totalidad con cargo a las claves 40018 y 40019, apoyo a investigación científica (AAA), que el *Campus* Tabasco Colegio de Postgraduados, asigna a sus profesores investigadores y estudiantes.

ACTIVIDAD SIMBIÓTICA MICROBIANA CON *Clitoria* sp. y *Clitoria ternatea* EN LA FITORREMEDIACIÓN DE SUELOS CON PETRÓLEO FRESCO

Mariana Valier Mago, MC
Colegio de Postgraduados, 2020

RESUMEN

En zonas petroleras de México y el mundo existen suelos contaminados con petróleo crudo (PC) que causan problemas de salud para los seres vivos, se requiere rescatar plantas y su asociación simbiótica microbiana que sobrevive al estrés ambiental, y generar tecnologías de fitorremediación. Este estudio se realizó durante 120 días en microtúnel con el objetivo de generar información básica de adaptación, hormesis y recuperación biológica de suelo contaminado con PC. Se estableció un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial (2x5x3) en Gleysols del trópico mexicano. Dos tipos de *Clitoria* (*Clitoria* sp y *Clitoria ternatea* L); cinco dosis de PC (0, 3, 10, 20 y 30 g/kg); tres tiempos de exposición (día 30, 75 y 120). Las variables evaluadas por tiempo fueron; degradación de hidrocarburos totales del petróleo (%) (HTP), longitud de planta (LP), tasa de crecimiento relativo (TCR), biomasa seca (radical, aérea, nódulos, flor y vaina), nódulos (número, diámetro, leghemoglobina y forma), proteína cruda aérea y vaina, poblaciones de *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Rhizobium* y estructura del hongo micorrízico arbuscular (HMA). En los días 30, 75 y 120 de exposición a PC la mayor cantidad (31) de curvas dosis petróleo-respuesta con tendencia en forma hormesis fueron en *Clitoria* sp, y 26 para *C. ternatea*. Las variables en *Clitoria* sp con hormesis (U-invertida y J) fueron; planta [LP, TCR, biomasa seca (aérea, nódulo), nódulos (número, diámetro, leghemoglobina), formas de nódulos (globosos, cilíndrico, abanico, rugoso) y proteína en vaina], y actividad simbiótica microbiana. La hormesis de *Clitoria* sp indica respuesta positiva a factores de estrés ambiental. A los días 30, 75 y 120 de exposición a PC la mayor degradación de HTP (43, 69 y 73.9% respectivamente) fue en suelo con 3 g de petróleo+*Clitoria* sp, con relación positiva con la colonización total, esporas extraradicales del HMA, *Azotobacter* y *Rhizobium*. Se recomienda el uso de *Clitoria* sp por su potencial hormético para fitorremediar PC de Gleysols del estado de Tabasco en corto, medio y largo tiempo.

Palabras claves: Hidrocarburos del petróleo, nódulos indefinidos, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Rhizobium* y hongo micorrízico arbuscular

MICROBIAL SYMBIOTIC ACTIVITY WITH *Clitoria* sp. And *Clitoria ternatea* IN FITORREMEDICATION OF SOILS WITH FRESH OIL

Mariana Valier Mago, MC
Colegio de Postgraduados, 2020

ABSTRACT

In oil areas of Mexico and the world there are soils contaminated with crude oil (PC) that cause health problems for living beings, it is necessary to rescue plants and their microbial symbiotic association that survives environmental stress, and generate phytoremediation technologies. This study was conducted for 120 days in a microtunnel with the aim of generating basic information on adaptation, hormesis and biological recovery of soil contaminated with PC. A completely randomized experimental design with factorial arrangement (2x5x3) was established in Gleysols from the Mexican tropics. Two types of *Clitoria* (*Clitoria* sp and *Clitoria ternatea* L); five doses of PC (0, 3, 10, 20 and 30 g/kg); three exposure times (days 30, 75 and 120). The variables evaluated by time were; degradation of total petroleum hydrocarbons (%) (TPH), plant length (PL), relative growth rate (RGR), dry biomass (root, aerial, nodules, flower and pod), nodules (number, diameter, leghemoglobin and shape), aerial crude protein and sheath, populations of *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Rhizobium* and structure of the arbuscular mycorrhizal fungus (AMF). On days 30, 75 and 120 of exposure to PC, the highest quantity (31) of oil dose-response curves with a hormesis trend were in *Clitoria* sp, and 26 for *C. ternatea*. The variables in *Clitoria* sp with hormesis (U-inverted and J) were; plant [PL, RGR, dry biomass (aerial, nodule), nodules (number, diameter, leghemoglobin), nodule shapes (globose, cylindrical, fan, rough) and pod protein], and microbial symbiotic activity. *Clitoria* sp hormesis indicates a positive response to environmental stressors. At days 30, 75 and 120 of exposure to PC, the greatest degradation of TPH (43, 69 and 73.9% respectively) was in soil with 3 g of oil + *Clitoria* sp, with a positive relationship with the total colonization, extra-radical spores of AMF, *Azotobacter* and *Rhizobium*. The use of *Clitoria* sp is recommended due to its horretic potential for phytoremedial PC from Gleysols from the state of Tabasco in a short, medium and long time.

Keywords: Petroleum hydrocarbons, undefined nodules, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Rhizobium* and arbuscular mycorrhizal fungus

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado para la realización de mis estudios de Maestría en Ciencias en Producción Agroalimentaria en el Trópico, lo cual forma parte de mi formación académica.

Al Colegio de Postgraduados en Campus Tabasco por la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría en Ciencias y llevar a cabo la investigación en sus instalaciones.

A la Dra. María del Carmen Rivera Cruz, Profesora Investigadora Titular del Campus Tabasco, Responsable del Laboratorio de Microbiología Agrícola y Ambiental, quien dedicó todo su apoyo, esfuerzo, paciencia y su tiempo para guiarme de principio a fin en esta valiosa investigación.

Al Dr. Emilio Manuel Aranda Ibáñez por su apoyo, consejos y sugerencias realizadas en el desarrollo de la investigación y documento de tesis.

Al Dr. Gilberto Morales Guzmán por su apoyo, disposición y valiosa aportación para el desarrollo de la investigación y documentación de tesis.

Al Dr. Antonio Trujillo Narcía por apoyarme en la colecta del suelo, brindarme sus valiosos consejos, sugerencias y motivación para la realización de estudios de la maestría. ¡Gracias por su amistad!

A dos grandes amigos, la Ing. Edith de los Ángeles Castillo Arias y el Ing. Gerardo Hernández Sánchez por su amistad incondicional, apoyo moral y compañerismo durante mi maestría y proyecto de investigación.

A mis compañeras del laboratorio de microbiología: Melina, Isabel, Celia, Isis, Mónica, Guadalupe, Yazmín y Ricarda por brindarme su amistad, apoyo, dedicación, trabajo y tiempo durante mi proyecto de investigación.

DEDICATORIA

Agradezco y dedico mi tesis de maestría principalmente a Dios por permitirme vivir esta etapa con salud, fuerza, voluntad y bendiciones para lograr culminar cada meta.

A mis padres: José Valier Alejo y Rosa Mago Murillo, por brindarme todo su apoyo, valiosos consejos y ser mi mayor ejemplo de que con dedicación, disciplina y trabajo se logran grandes cosas. ¡Papá te amo y te llevo siempre en mi corazón!

A mi hermana Nancy por tu apoyo y ser una pieza importante en mi vida.

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. El petróleo y composición química.....	4
2.2. Hidrocarburos saturados.....	5
2.2.1. Hidrocarburos aromáticos.....	6
2.2.2. Resinas	6
2.2.3. Asfáltenos	7
2.3. Definición y composición del suelo.....	8
2.3.1. Tipos de suelos en zonas petroleras.....	8
2.3.2. Microorganismos en el suelo.....	9
2.4. Definición e importancia de la rizosfera.....	10
2.5. Actividad microbiana simbiótica en la rizosfera de leguminosas.....	10
2.5.1. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal de vida libre.....	10
2.5.1.1. Bacterias del género <i>Azospirillum</i>	12
2.5.1.2. Bacterias del género <i>Azotobacter</i>	12
2.5.2. Asociación simbiótica <i>Rhizobium</i> -leguminosa.....	13
2.5.2.1. Bioquímica de asociación simbiótica <i>Rhizobium</i> -leguminosas.....	13
2.5.2.2. Tipos de nódulos y características.....	15
2.5.3. El mutualismo asociación planta-hongo.....	16
2.5.3.1. Definición y estructura de los hongos micorrícicos arbusculares (HMA).....	17
2.5.3.2. Bioquímica de colonización micorriza arbuscular-leguminosa.....	18
2.6. Efecto del petróleo en propiedades físicas y químicas del suelo.....	19
2.7. Teoría de toxicidad y hormesis a contaminantes.....	20
2.8. Efecto del petróleo en leguminosas.....	21
2.9. Efecto del petróleo en la microbiota del suelo.....	22
2.10. Tecnologías biológicas para recuperar suelos contaminados con hidrocarburos.....	23
2.10.1. Definición y características de la fitorremediación.....	25
2.11. Leguminosas en la fitorremediación.....	26
2.12. Bacterias y hongos en la degradación de hidrocarburos del petróleo.....	27

2.13. Procesos de óxido-reducción de hidrocarburos del petróleo.....	28
2.13.1. Proceso de degradación aeróbica de los hidrocarburos del petróleo	28
2.13.2. Degradación aeróbica de hidrocarburos saturados	29
Figura 13. Degradación aeróbica de los hidrocarburos (Das y Chandran, 2011).....	30
2.13.3. Degradación aeróbica de hidrocarburos aromáticos.....	30
CAPÍTULO III. OBJETIVOS	33
3.1. Objetivo general	33
3.2. Objetivo específicos	33
CAPÍTULO IV. HIPÓTESIS	34
4.1. Hipótesis general.....	34
4.2. Hipótesis específicas	34
CAPÍTULO V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
5.1. Etapa I. Campo.....	36
5.1.1. Colecta de suelo y procesamiento de suelo	36
5.1.2. Características, colecta de <i>Clitorias</i> y viabilidad de semillas.....	36
5.2. Etapa II. Microtúnel	37
5.2.1. Suelo contaminado y designación de experimento.....	37
5.2.1.1. Crecimiento vegetal	38
5.3. Etapa III. Laboratorio.....	38
5.3.1. Planta	38
5.3.2. Microorganismos	39
5.3.2.1. Población de <i>Rhizobium</i> y bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre.....	39
5.3.2.2. Hongo micorrízico vesículo arbuscular	40
5.3.2.3. Esporas extraradicales.....	41
5.3.3. Remoción de petróleo	41
5.4. Etapa IV. Análisis de datos	42
CAPÍTULO VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
6.1. Crecimiento de <i>Clitoria</i> sp y <i>C. ternatea</i> en dosis y tiempo de exposición a petróleo.....	43
6.1.1. Dosis de petróleo-respuesta del crecimiento de <i>Clitoria</i>	44
6.2. Biomasa vegetal seca de <i>Clitoria</i> sp y <i>C. ternatea</i> en dosis y tiempo de exposición a petróleo.....	47
6.2.1. Dosis de petróleo-respuesta de biomasa vegetal de <i>Clitoria</i>	48

6.3. Nódulos asociados a <i>Clitoria</i> sp y <i>C. ternatea</i> según dosis y tiempo de exposición a petróleo	51
6.3.1. Dosis de petróleo-respuesta de nódulos asociados a <i>Clitoria</i>	53
6.4. Forma de nódulos asociados a <i>Clitoria</i> expuesta a petróleo y fase fenológica	56
6.4.1. Dosis de petróleo-respuesta de forma de nódulos asociados a <i>Clitoria</i>	58
6.5. Proteína cruda aérea y vaina de <i>Clitoria</i> expuesta a petróleo por fase fenológica.....	62
6.5.1. Dosis de petróleo-respuesta de proteína cruda en <i>Clitoria</i>	63
6.6. Población de bacteria de vida libre asociadas a <i>Clitoria</i> según dosis y tiempo de exposición a petróleo	65
6.6.1. Dosis de petróleo-respuesta de bacterias de vida libre asociada a <i>Clitoria</i>	67
6.7. Población de <i>Rhizobium</i> en nódulos de <i>Clitoria</i> según dosis y tiempo de exposición a petróleo	68
6.7.1. Dosis de petróleo-respuesta de <i>Rhizobium</i> en nódulos de <i>Clitoria</i>	69
6.8. Hongos micorrícicos arbusculares en <i>Clitoria</i> según dosis y tiempo de exposición a petróleo	70
6.8.1. Dosis de petróleo-respuesta del hongo micorrícico arbuscular en <i>Clitoria</i>	71
6.9. Colonización total y esporas extraradicales del hongo micorrícico arbuscular en <i>Clitoria</i> según dosis y tiempo de exposición a petróleo.....	74
6.9.1. Dosis de petróleo-respuesta de la colonización total y esporas de hongos micorrícicos arbusculares en <i>Clitoria</i>	74
6.10. Efecto de <i>Clitoria</i> en población de bacterias y colonización micorrícica según tiempo de exposición a petróleo	76
6.11. Tendencias dosis de petróleo-respuesta en planta y actividad microbiana de <i>Clitoria</i> en cada tiempo de exposición	77
6.12. Degradación de hidrocarburos totales del petróleo en rizosfera de <i>Clitoria</i> según dosis y tiempo de exposición a petróleo	79
CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES	83
7.1. Conclusion general.....	83
7.1.1. Conclusiones particulares	83
CAPÍTULO VIII. LITERATURA CITADA	85

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Asociaciones <i>Rhizobium</i> -leguminosa.....	13
Cuadro 2. Efecto de los hidrocarburos en leguminosas.....	22
Cuadro 3. Efecto de los hidrocarburos en la microbiota del suelo.....	23
Cuadro 4. Leguminosas en la fitorremediación de hidrocarburos.....	26
Cuadro 5. Efecto de <i>Clitoria</i> en crecimiento, producción, nódulos y proteína por tiempo de exposición a petróleo.....	65
Cuadro 6. Efecto de dosis y tiempo de exposición a petróleo y <i>Clitoria</i> en bacterias rizosféricas reguladoras del crecimiento vegetal de vida libre.....	66
Cuadro 7. Efecto del petróleo en la población de <i>Rhizobium</i> según tiempo de exposición a petróleo	70
Cuadro 8. Estructura intraradicales del hongo micorrízico arbuscular asociado a <i>Clitoria</i> sp y <i>C. ternatea</i> según dosis y tiempo de exposición a petróleo...	73
Cuadro 9. Efecto del tiempo de exposición a petróleo en <i>Clitoria</i> sobre la población de bacterias y hongos micorrízicos arbusculares.....	76
Cuadro 10. Curva dosis-respuesta de variables de crecimiento, producción, nódulos y actividad microbiana de <i>Clitoria</i> sp y <i>C. ternatea</i> en tres tiempos de exposición a petróleo.....	78
Cuadro 11. Correlación Person's general, al día 30, 75 y 120 entre degradación y microorganismos rizosféricos.....	82

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Composición del petróleo	4
Figura 2.	Estructura química del metano y ciclopropano.....	5
Figura 3.	Estructura de hidrocarburos aromáticos policíclicos.....	7
Figura 4.	Estructura de resinas (a y b) y asfáltenos (c).....	7
Figura 5.	Composición del suelo.....	8
Figura 6.	Rizosfera y rizoplano. Los principales materiales orgánicos exudados por la raíz y los grupos de microbiota afectados.....	11
Figura 7.	Etapas de infección de <i>Rhizobium</i> en una leguminosa.....	14
Figura 8.	Bacteroide de nódulo radicular. Esquema de las principales reacciones metabólicas y de nutrientes para la fijación de N ₂	15
Figura 9.	Estructura de un nódulo indeterminado (a) y determinado (b).....	16
Figura 10.	Estructura y tipos de asociación micorrícica arbuscular. a) Tipo “Arum”; b) Tipo “Paris”	18
Figura 11.	Curva hormética bifásica dosis-respuesta. a: curva en forma de <<J>>. b: curva en forma de <<U>> invertida. c: detalle de la zona hormética en la curva <<U>> invertida.....	21
Figura 12.	Clasificación de tecnologías de remediación biológicas.....	24
Figura 13.	Degradación aeróbica de los hidrocarburos.....	30
Figura 14.	Degradación de un hidrocarburo alifático.....	31
Figura 15.	Degradación de un hidrocarburo aromáticos.....	32
Figura 16.	Flujograma del proceso de investigación.....	35
Figura 17.	Flor, vaina y semillas de <i>Clitoria</i> sp (a) y <i>Clitoria ternatea</i> (b).....	37
Figura 18.	Longitud de planta (a) y tasa de crecimiento relativo (b) de <i>Clitoria</i> sp y <i>Clitoria ternatea</i> por dosis y tiempos de exposición a petróleo	44
Figura 19.	Tendencia de longitud de planta al día 30 (a), 75 (b) y 120 (c), y tasa de crecimiento relativo al día 30 (d),75 (e), 120 (f) de <i>Clitoria</i> sp y <i>C. ternatea</i> expuesta a petróleo	46

Figura 20.	Biomasa seca radical (a) y aérea (b) de <i>Clitoria</i> sp y <i>Clitoria ternatea</i> según dosis y tiempo de exposición a petróleo	48
Figura 21.	Tendencia de biomasa seca radical al día 30 (a), 75 (b) y 120 (c), y biomasa seca aérea día 30 (d),75 (e), 120 (f) de <i>Clitoria</i> sp y <i>C. ternatea</i> expuesta a petróleo	50
Figura 22.	Tendencia de biomasa seca de flor (a) y vaina (b) de <i>Clitoria</i> sp y <i>C. ternatea</i> expuesta a petróleo	51
Figura 23.	Biomasa seca de nódulo (a), número (b), diámetro (c) y viabilidad (d) de nódulos en <i>Clitoria</i> sp y <i>Clitoria ternatea</i> según dosis y tiempo de exposición a petróleo	52
Figura 24.	Tendencia de biomasa de nódulos al día 30 (a), 75 (b) y 120 (c), y número de nódulos al día 30 (d),75 (e), 120 (f) de <i>Clitoria</i> sp y <i>C. ternatea</i> expuesta a petróleo	54
Figura 25.	Tendencia del diámetro de nódulos al día 30 (a), 75 (b) y 120 (c), y Leghemoglobina en nódulos al día 30 (d), 75 (e), 120 (f) de <i>Clitoria</i> sp y <i>C. ternatea</i> expuesta a petróleo	55
Figura 26.	Formas típicas de nódulos en <i>Clitoria</i> sp y <i>C. ternatea</i> . A. Globoso, B. Cilíndrico, C. Rugoso, D. Ramificado, E. Abanico	56
Figura 27.	Forma de nódulos de <i>Clitoria</i> sp y <i>C. ternatea</i> según dosis y tiempo de exposición a petróleo. a) Globoso, b) Cilíndrico, c) Ramificado, d) Abanico y e) Rugoso	57
Figura 28.	Tendencia de forma de nódulos globosos al día 30 (a), 75 (b) y 120 (c), cilíndrica al día 75 (d) y 120 (e) de <i>Clitoria</i> sp y <i>C. ternatea</i> expuesta a petróleo	60
Figura 29.	Tendencia de la forma de nódulo ramificado día 75 (a), 120 (b), abanico al día 75 (c) y 120 (d), y rugosa al día 75 (e) y 120 (f) de <i>Clitoria</i> sp y <i>C. ternatea</i> expuesta a petróleo	61
Figura 30.	Acumulación de proteína cruda en biomasa aérea (a) y vaina (b) de <i>Clitoria</i> sp y <i>Clitoria ternatea</i> según dosis y tiempo de exposición a petróleo	62

Figura 31.	Tendencia de proteína cruda aérea al día 30 (a), 75 (b) y 120 (c), y proteína en vaina (d) acumulada en <i>Clitoria</i> sp y <i>C. ternatea</i> expuesta a petróleo....	64
Figura 32.	Efecto de dosis y tiempo de exposición a petróleo en población de bacteria de vida libre asociadas a <i>Clitoria</i> sp y <i>C. ternatea</i> . a) <i>Azotobacter</i> ; b) <i>Azospirillum</i>	68
Figura 33.	Colonización total y esporas en suelo de hongo micorrícico arbuscular en <i>Clitoria</i> sp y <i>C. ternatea</i> según dosis y tiempo de exposición a petróleo. a) Colonización total y b) esporas en suelo	75
Figura 34.	Degradación de hidrocarburos totales del petróleo en rizosfera de <i>Clitoria</i> sp y <i>C. ternatea</i>	80
Figura 35.	Efecto de <i>Clitoria</i> en la degradación de hidrocarburos totales del petróleo en tiempos de exposición a petróleo.....	81

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

El petróleo es una de las principales fuentes de energía y materia prima de la industria química, por lo que se espera que incremente su demanda en los próximos años (Silva *et al.*, 2014; Dos Santos y Maranhão, 2018). México cuenta con 325 campos en producción, 7400 pozos productores, 275 plataformas marinas, nueve complejos procesadores de gas, seis complejos petroquímicos y seis refinerías (PEMEX, 2020). El desarrollo económico depende en gran parte del petróleo como combustible, sin embargo, el crecimiento de la industria petrolera ha dado como resultado el incremento de la contaminación del suelo, agua y aire (Pérez-Hernández *et al.*, 2013). Esta contaminación está presente en suelos debido a derrames accidentales que suceden durante actividades de perforación, extracción, transporte, almacenamiento y transformación del petróleo (Trujillo-Narcía *et al.*, 2012; Pinedo *et al.*, 2013).

La contaminación del suelo por hidrocarburos del petróleo es un problema mundial que afecta a las plantas y microorganismos, por lo que para hacer frente a la contaminación se han desarrollado varios métodos biológicos (Velasco y Volke, 2002). La remediación biológica es una tecnología que ha demostrado ser amigable con el ambiente, porque utiliza procesos metabólicos de bacterias y plantas nativas para la descontaminación (Pushpanathan *et al.*, 2014).

La fitorremediación es una tecnología que remueve hidrocarburos del suelo, sin embargo, requiere una maquinaria metabólica que colonice la rizosfera de plantas nativas y adaptadas a condiciones ambientales de estrés. En la búsqueda de plantas a usar en suelos con hidrocarburos del petróleo los resultados indican respuesta negativa, neutral y positiva. La negativa o tóxica se observa en algunas leguminosas señalándolas como sensibles e indicadoras de toxicidad (Rivera-Cruz *et al.*, 2005; Arias-Trinidad *et al.*, 2017), debido a que se induce un inadecuado desarrollo y disminución en la producción de ciclos metabólicos para superar las condiciones de estrés (Hernández-Valencia *et al.*, 2017; Pernía *et al.*, 2018). La respuesta neutral o adaptativa se reporta en las leguminosa *French serradella* en 10 g/kg y *Clitoria ternatea* en 3 g/kg petróleo crecen igual al testigo (Shahsavari *et al.*, 2013; Alarcón *et al.*, 2019), esto se atribuye a que la planta evita el estrés celular y asegura las funciones de señalización como son la multiplicación y muerte celular, a través de la regulación de las

moléculas reactivas de oxígeno que controlan la defensa antioxidante para evitar la toxicidad celular (Mittler, 2002). La respuesta positiva y/o hormética de la planta indica adaptación al estrés, es un fenómeno de dosis-respuesta en que ambas dosis bajas y altas estimulan a la planta (Calabrese, 2012), por ejemplo, el pasto *Leersia hexandra* es estimulado por dosis baja (7.9) y altas (238 g/kg) de petróleo, debido al aumento en el contenido de carbono degradado en el suelo (Orocio-Carrillo *et al.*, 2019).

La reacción de los diferentes órganos de la planta a la exposición a petróleo depende de los cambios en el tiempo del contenido de hidrocarburos en suelo, se ha reportado la capacidad de algunas leguminosas para la remoción de fracciones lábiles o menos tóxicas de petróleo (Yang *et al.*, 2014), por ejemplo, en un suelo que inicialmente contenía 30 g/kg de petróleo al día 90 y 120 disminuyeron en un 24 y 58 % respectivamente al estar presente la rizosfera (Arias-Trinidad *et al.*, 2017), por lo tanto, después de un tiempo determinado el suelo presenta menor toxicidad para las leguminosas (Alarcón *et al.*, 2019).

La rizosfera permite la proliferación de varios grupos microbianos cuya actividad favorece la degradación de hidrocarburos del petróleo en suelo (Pentreath *et al.*, 2015; Alarcón *et al.*, 2019). La rizosfera interactúa no solamente con las comunidades microbianas, sino también influyen positivamente en el crecimiento, adaptación y respuesta hormética de las plantas a los ambientes de estrés (Harrier y Watson, 2004; Hayat *et al.*, 2010). Muchos reportes describen el efecto positivo de la rizosfera de plantas sobre la biorremediación de hidrocarburos petrogénicos (Wang *et al.*, 2008; Peng *et al.*, 2009; Gaskin y Bentham, 2010). Por ejemplo, la presencia de *C. retusa* reduce significativamente la concentración de petróleo crudo desde 10 g/kg a 4.8 g/kg en suelos a los 90 días (Gamage *et al.*, 2020). Otros artículos reportan que la presencia de *Vigna unguiculata* en un suelo contaminado con 5% de hidrocarburos del petróleo remueven el 100% de hidrocarburos totales del petróleo a los dos meses (Tanee y Akonye, 2009), sin embargo, Muratova *et al.* (2005) menciona que en dos años la concentración de PAH en suelo cultivado con alfalfa se degrada un 74.5% de un suelo que contenía inicialmente 79.8 mg/kg.

En el sureste de México existen suelos con uso ganadero degradados por la contaminación con hidrocarburos del petróleo, las leguminosas *Clitoria* sp y *C. ternatea* crecen de manera natural en zonas tropicales, son de ciclo corto, son fuente de proteína en la alimentación del ganado

bovino (Cabrera *et al.*, 2010) y tienen una rizosfera abundante de bacterias y hongos simbióticos heterótrofos y diazotróficos. Sin embargo, su exposición en diferentes tiempos a petróleo fresco ha sido poco evaluada, se desconoce la respuesta adaptativa y bioestimuladora de la degradación de hidrocarburos del petróleo de *Clitoria* sp y *C. ternatea*. Elementos básicos para generar una tecnología biológica de recuperación de suelos contaminados con petróleo crudo.

CAPÍTULO II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. El petróleo y composición química

La palabra petróleo proviene del latín “petroleum” (*petra*: piedra y *óleum*: aceite), que significa aceite de piedra (Garrizt *et al.*, 2001). Al petróleo recién extraído del subsuelo se llama petróleo fresco, y es una mezcla heterogénea constituido principalmente de carbono (80-82%), hidrógeno (12-15%), azufre, nitrógeno y oxígeno; además de trazas de metales pesados como aluminio, cobre, hierro, níquel y vanadio (Botello *et al.*, 2005; Varjani, 2017). El principal compuesto orgánico del petróleo son los hidrocarburos, y estos se clasifican en cuatro fracciones: a) saturados (alifáticos), b) aromáticos (hidrocarburos anillados) c) resinas y d) asfáltenos (Maletic *et al.*, 2012; Varjani, 2017) (Figura 1).

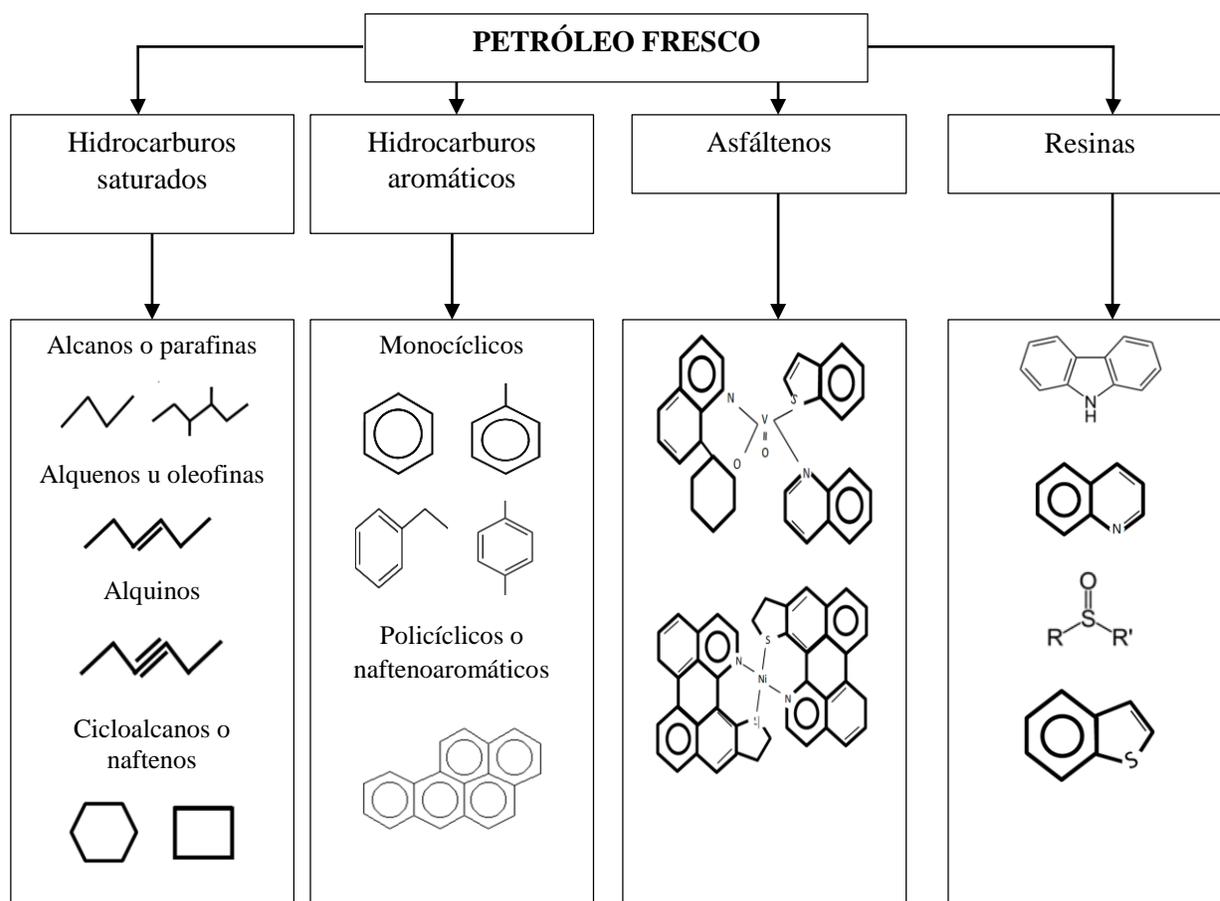


Figura 1. Composición del petróleo (Castillo-Rodríguez *et al.*, 2005; Chandra *et al.*, 2013; Rodrigues y Tótola, 2015; Varjani, 2017).

2.2. Hidrocarburos saturados

Los saturados se definen como hidrocarburos de cadena lineal saturada o insaturada también llamados alifáticos (Figura 2), con la fórmula general (C_nH_{2n+2}), y representan el más alto constituyente del petróleo crudo (Varjani, 2017). Se clasifican según sus estructuras químicas que incluyen cadenas lineales y alcanos ramificados (compuestos de parafina), alquenos y alquinos presentes solo en pequeñas cantidades, y cicloalcanos (compuestos nafténicos) (Chandra *et al.*, 2013; Maletic *et al.*, 2012; Rodrigues y Tótoła, 2015). Estos a temperatura y presión ambiente pueden presentarse en diferentes estados, las moléculas que contienen hasta cuatro átomos de carbono pueden existir en estado gaseoso (metano, etano, propano, butano) (Rodrigues y Tótoła, 2015); los hidrocarburos saturados que tienen entre cinco y diecisiete carbonos, e insaturados entre cinco y quince se encuentran en estado líquido (pentano, hexano, octano, pentadecano), mientras que saturados con más de dieciocho e insaturados con más de dieciséis átomos de carbono (Eicosano, Triacotano y Pentacontano) se presentan como sólidos (Rodrigues y Tótoła, 2015; Benito de Vega y Escibano, 2018).

Los hidrocarburos saturados se caracterizan por ser menos densos que el agua, el tamaño de la molécula es inversamente proporcional a su volatilidad y solubilidad, el punto de ebullición se incrementa de 20 a 30°C por cada átomo de carbono que se agrega a la cadena y son solubles en disolventes no polares como el benceno, éter y cloroformo (Botello *et al.*, 2005; Rodrigues y Tótoła, 2015). La exposición de a estos componentes tienen diversos efectos; N-heptano y el ciclohexano causa irritación en ojos y membranas mucosas; el n-hexano causa polineuropatía (daño a los nervios periféricos) después de una exposición repetida y prolongada (Chandra *et al.*, 2013).

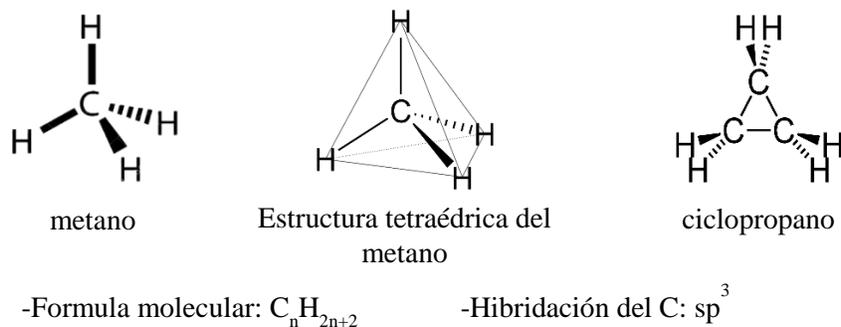


Figura 2. Estructura química del metano y ciclopropano (Marín *et al.*, 2012).

2.2.1. Hidrocarburos aromáticos

Los aromáticos son moléculas puras de hidrocarburos anillados, cuya estructura consta de uno o varios anillos bencénicos (Meckenstock *et al.*, 2016; Varjani, 2017). Estos compuestos tienen por lo menos, un anillo de 6 átomos de carbono, el cual presenta a su vez un sistema continuo de dobles enlaces conjugados. El benceno es el más conocido y estudiado de los hidrocarburos aromáticos, considerado como la base de los miembros de la familia de compuestos aromáticos (Botello *et al.*, 2005). Son principalmente divididos como hidrocarburos aromáticos monocíclicos (benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos) y los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) (Chandra *et al.*, 2013; Varjani, 2017). Los HAP tienen más de un anillo bencénico y los que están formados por dos o tres anillos cíclicos que forman (varias) cadenas hexagonales con enlaces dobles como naftaleno (dos anillos), fenantreno y antraceno (tres anillos) se denominan HAP ligeros. Los compuestos de cuatro anillos y superiores, como pireno y crisenos (cuatro anillos), fluoranteno y benzo [a] pireno (cinco anillos) se denominan HAP pesados (Figura 3) (Varjani, 2017).

Todos los hidrocarburos aromáticos son líquidos o sólidos a temperatura ambiente y sus puntos de ebullición están cercanos a los de cicloalcanos correspondientes. Su vida media varía de una semana a dos meses para ambientes acuáticos, de dos meses a dos años en suelos y de ocho meses a seis años en sedimentos. Algunos de estos compuestos se han investigado extensivamente con relación a sus propiedades cancerígenas como es el caso de 3-4 benzopireno (Botello *et al.*, 2005). Los componentes del petróleo crudo, específicamente los HAP, tienen el potencial de inducir tumores malignos que afectan principalmente la piel y otros tejidos epiteliales, ya que tienen una gran afinidad por el centro nucleófilo de las macromoléculas como el ARN, las proteínas y el ADN (Chandra *et al.*, 2013).

2.2.2. Resinas

Las resinas son moléculas con un fuerte carácter aromático, contienen numerosos grupos funcionales polares formados con N, S, O y metales traza (Ni, V, Fe) (Figura 4a y 4b) (Maletic *et al.*, 2012; Varjani, 2017). Son sólidos amorfos disueltos en aceite, constituidos por compuestos piridinicos, quinolinas, tiofenos, carbazoles, sulfóxidos y aminas (Fernández *et al.*, 2006). Son solubles en n-heptano y n-pentano, estructuralmente similares a las moléculas de superficie activa en el petróleo crudo y actúan como agentes peptizantes (Varjani, 2017).

2.2.3. Asfáltenos

Los asfáltenos son moléculas grandes dispersadas coloidalmente en aceite, al igual que las resinas contienen numerosos grupos funcionales polares (Maletic *et al.*, 2012; Varjani, 2017). Son moléculas de color marrón oscuro, compuestos viscosos, grandes y complejos que se dispersan coloidalmente en saturados y aromáticos (Varjani, 2017). Están constituidos por una acumulación de láminas poliaromáticas condensadas, unidas por cadenas saturadas (Figura 4c) (Wauquier, 2004). Incluyen en su estructura agregados poliaromáticos, fenoles, ácidos grasos, metaloporfirinas (Fernández *et al.*, 2006). Son solubles en hidrocarburos aromáticos ligeros como el benceno y el tolueno. Los agentes peptizantes, es decir, las resinas, mantienen a los asfáltenos en suspensión, promoviendo así la estabilidad del petróleo crudo (Varjani, 2017).

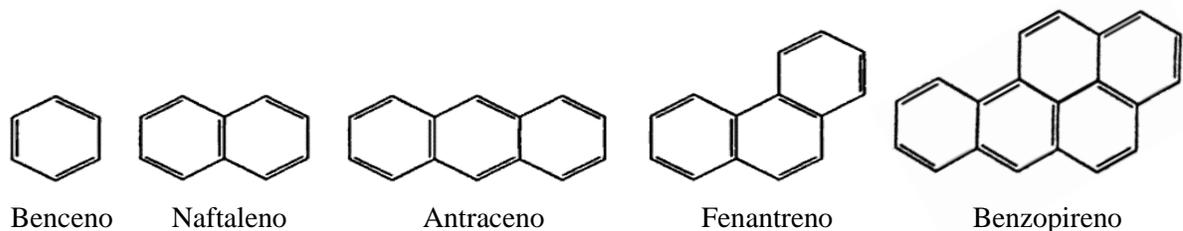


Figura 3. Estructura de hidrocarburos aromáticos policíclicos (De la Llata., 2005).

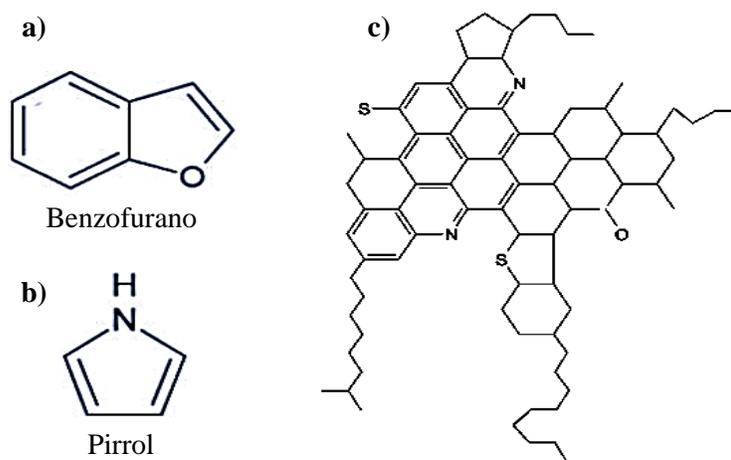


Figura 4. Estructura de resinas (a y b) y asfáltenos (c) (Largo-Pereda, 2010).

2.3. Definición y composición del suelo

El suelo es un cuerpo natural formado por sólidos (minerales y materia orgánica), líquidos y gases (Figura 5), que se produce en la superficie terrestre, ocupa espacio y que presenta una o ambas de las siguientes características: horizontes o capas que son distinguibles del material inicial como resultado de adiciones, pérdidas, transferencias y transformaciones de energía y materia; o, por la habilidad de soportar raíces de plantas en un entorno natural (Soil Survey Staff, 2014).

Los suelos con vegetación tienen al menos cuatro componentes: 1) materia mineral inorgánica, normalmente cerca del 40% del volumen del suelo; 2) materia orgánica, normalmente un 5%; 3) aire y agua, prácticamente el 50% y 4) microorganismos y macroorganismos, alrededor del 5% (Madigan *et al.*, 2015).

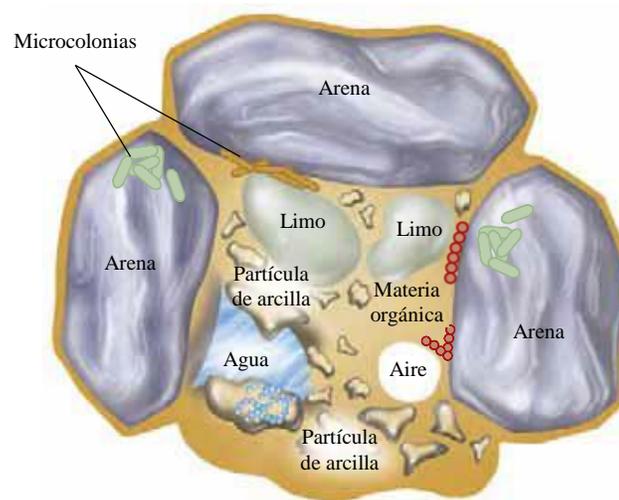


Figura 5. Composición del suelo (Madigan *et al.*, 2015).

2.3.1. Tipos de suelos en zonas petroleras

Dentro de los tipos de suelo encontrados en zonas petroleras de estado de Tabasco se encuentran los Fluvisols, Gleysols, Histosols y Vertisols (Zavala-Cruz *et al.*, 2007). Los Fluvisols son suelos que derivan de sedimentos fluviales, presentan estratificación de sus horizontes, alta permeabilidad, son profundos, de texturas medias o medias sobre gruesas, de poco desarrollo, ricos en nutrientes y materia orgánica, además de un buen drenaje superficial (IUSS, 2015). Los Histosols son suelos formados por materiales orgánicos (30% o más de materia orgánica) en más de la mitad de los primeros 80 cm de profundidad, son ricos

en nutrimentos, pero se forman en planicies palustres y lagunares bajo estado de anegamiento que no permite la mayor parte del año el oxígeno libre (IUSS, 2015). Los Vertisols son suelos arcillosos, ricos en nutrimentos y sus limitantes son el manto freático elevado, permeabilidad lenta y agrietamiento en la época de secas (IUSS, 2015).

Los Gleysols son suelos formados por materiales no consolidados, muestran propiedades hidromórficas dentro de los primeros 50 cm de profundidad, están saturados con agua durante parte del año y manifiestan procesos de reducción de hierro, observándose en el perfil presencia de colores gris-azulados o verdosos, tienen alto contenido de materia orgánica y de nutrimentos; carentes de salinidad elevada (FitzPatrick, 1987; IUSS, 2015). Son suelos que tienen una capa de ≥ 25 cm de espesor con propiedades gleyicas y condiciones reductoras, que comienza a ≤ 40 cm de superficie del suelo mineral (IUSS, 2015).

2.3.2. Microorganismos en el suelo

Los microorganismos son extraordinariamente abundantes, en el suelo las concentraciones de microorganismos cultivables pueden alcanzar 10^8 unidades formadoras de colonias por gramo de suelo seco (UFC g.s.s), aunque los recuentos directos son generalmente de uno o dos órdenes de magnitud más grandes (Pepper *et al.*, 2015). La distribución de estos microorganismos también depende de la textura y estructura del suelo. A medida que se forman los suelos, los microbios se unen a un sitio que es favorable para la replicación (Pepper *et al.*, 2015). Estos se dividen en mesofauna (0.1-2mm), microfauna (<0.1 mm) representada por los protozoarios, algunos nematodos, rotíferos y tardígrafos; la microflora está integrada por pelos radicales de plantas, algas, hongos, bacterias, cianobacterias y actinomicetos (Porta *et al.*, 2019). Las raíces de las plantas también se pueden considerar como organismos del suelo por su relación simbiótica y su interacción con otros componentes del suelo (FAO, 2020). Su importancia en su capacidad para descomponer materiales presentes en la materia orgánica del suelo, además de funciones cruciales en el ciclo de nutrientes, el mantenimiento de la fertilidad del suelo y el secuestro de carbono del suelo, además tienen efectos directos como indirectos sobre la salud de las plantas y los animales en los ecosistemas terrestres (Brady y Weil, 2008; Fierer, 2017).

2.4. Definición e importancia de la rizosfera

El término rizósfera [del griego, *rhiza* (raíz) y *sphere* (zona de influencia), que significa la influencia de una raíz en su entorno] se usó primero por Hilter (1904), para indicar la zona del suelo donde los exudados radicales pueden estimular, inhibir o no tener efecto en las actividades de los microorganismos del suelo (Pinton *et al.*, 2001). La rizosfera es el principal entorno ecológico del suelo para las interacciones planta-microbio, lo que resulta en la colonización de varios grupos microbianos cuya actividad fisiológica influye en la fertilidad, calidad y salud del suelo (Alarcón *et al.*, 2019). La rizosfera se ha caracterizado por tener tres componentes: 1) rizoplano, la superficie inmediata de la raíz; 2) rizosfera, el volumen de suelo que rodea el rizoplano que se ve afectado por la actividad de la raíz, y 3) suelo alejado de las raíces. En la rizósfera y el rizoplano, existe un número mayor de microorganismos específicos, las raíces de las plantas tienen una influencia directamente en la composición y en la densidad de la microbiota del suelo, porque las raíces excretan cantidades significativas de azúcares, aminoácidos, hormonas y vitaminas (Figura 6); a esta concentración se le denomina efecto rizosférico o efecto de la rizósfera. La cual se describe cuantitativamente por la relación R/S, donde R es el número de microorganismos en el suelo de la rizósfera y S el número de microorganismos en el suelo alejado de las raíces (Atlas y Bartha, 2002; Curl y Truelove, 2012). Las bacterias y los hongos forman microcolonias en la superficie de las raíces para tener un acceso rápido a estos nutrientes, siendo factores importantes para determinar la supervivencia y el crecimiento sostenible de la vegetación (Zhang *et al.*, 2011; Madigan *et al.*, 2015). Las bacterias y hongos establecen asociaciones positivas con la raíz; asociación de vida libre y simbiótica. La asociación de vida libre se establece con bacterias reguladoras del crecimiento vegetal de los géneros *Azospirillum* y *Azotobacter* (Ahemad y Kibret, 2013). La asociación simbiótica con *Rhizobium* (Khan *et al.*, 2013) y la mutualista con los hongos micorrícicos arbusculares (Ramírez y Rodríguez, 2012).

2.5. Actividad microbiana simbiótica en la rizosfera de leguminosas

2.5.1. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal de vida libre

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB, del inglés Plant Growth Promoting Bacteria) es un grupo de bacterias que interactúan con las plantas favoreciendo su crecimiento, incluyen aquellas que son de vida libre, aquellas que forman relaciones simbióticas específicas con las plantas y endófitos bacterianos que pueden colonizar parte o

una porción de los tejidos interiores de una planta (Glick, 2012; Ahemad y Kibret, 2013). Las PGPB pueden promover el crecimiento de las plantas directamente, por lo general, ya sea facilitando la adquisición de recursos o modulando los niveles hormonales de las plantas, o indirectamente al disminuir los efectos inhibitorios de varios agentes patógenos sobre el crecimiento y el desarrollo de las plantas, es decir, al actuar como bacterias de biocontrol (Glick, 2012). Entre los microorganismos con actividad PGPR más conocidos se encuentran especies de los géneros *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Rhizobium* (Glick, 2012).

Estas se deben caracterizar porque: (i) deben ser competentes para colonizar (ii) deben sobrevivir, multiplicarse y competir con otras microbiotas, al menos durante el tiempo necesario para expresar sus actividades de promoción/protección del crecimiento de las plantas, y (iii) deben promover el crecimiento de las plantas (Ahemad y Kibret, 2013). Somers *et al.* (2004) las clasifica en función de sus actividades funcionales como (i) biofertilizantes (aumentando la disponibilidad de nutrientes para las plantas), (ii) fitoestimulante (promoción del crecimiento de las plantas, generalmente a través de fitohormonas), (iii) rizoremediadores (degradación de contaminantes orgánicos) y (iv) bioplaguicidas (control de enfermedades, principalmente por la producción de antibióticos y metabolitos anti fúngicos).

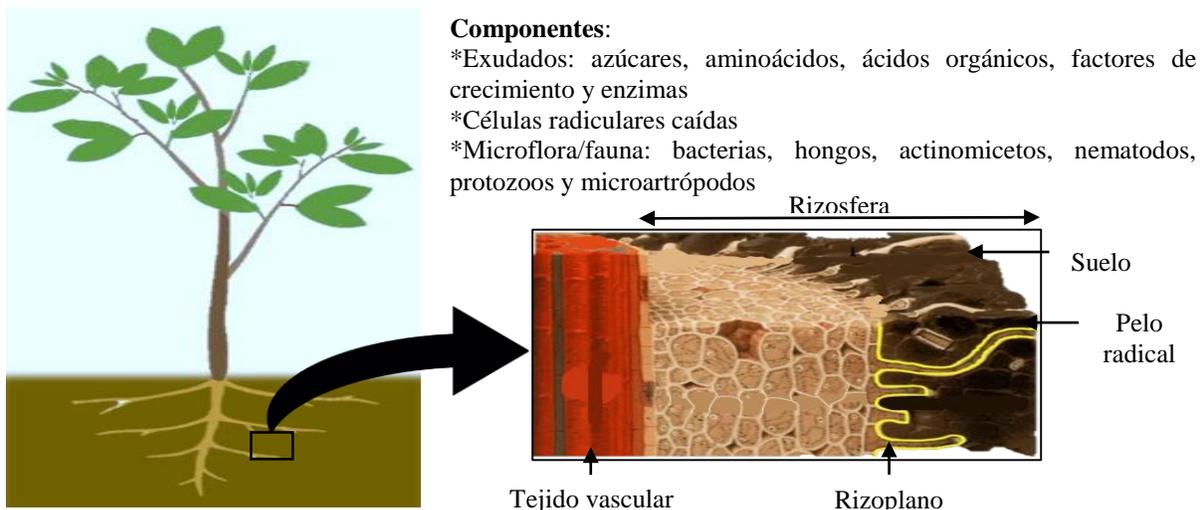


Figura 6. Rizosfera y rizoplano. Los principales materiales orgánicos exudados por la raíz y los grupos de microbiota afectados (Curl y Truelove, 2012).

2.5.1.1. Bacterias del género *Azospirillum*

El género *Azospirillum* está conformado por bacterias flageladas Gram negativas, diazotróficas de vida libre con capacidad de colonizar los tejidos internos y externos de las raíces (Puente y García, 2013; Pereg *et al.*, 2016). Son organismos aeróbicos capaces de fijar nitrógeno atmosférico en condiciones de microaerofilia (Montenegro-Gómez *et al.*, 2017). La primera especie de *Azospirillum* se aisló en Holanda a partir de suelos arenosos pobres en nitrógeno, y originalmente se la llamó *Spirillum lipoferum* (Döbereiner *et al.*, 1976).

Se han propuesto varios mecanismos para explicar la promoción por *Azospirillum*: (i) fijación biológica del nitrógeno, (ii) producción o metabolización de fitohormonas, dentro de estos compuestos están las auxinas especialmente ácido indol acético (AIA), giberelinas (GAs), citosinas (CA), etileno (E), así como de otras moléculas reguladoras del crecimiento vegetal en condiciones de estrés abiótico como el ácido abscísico (ABA) y la diamina cadaverina (CAD), (iii) incremento en el desarrollo radicular relacionado con los cambios hormonales que promueve una mayor capacidad de absorción de agua y nutrientes y (iv) la hipótesis aditiva, la cual propone la intervención de todos los mecanismos mencionados (Bashan y de-Bashan, 2010; Puente y García, 2013; Pereg *et al.*, 2016).

2.5.1.2. Bacterias del género *Azotobacter*

El género *Azotobacter* está constituido por bacilos rectos con borde redondeado, elipsoidales hasta cocos dependiendo la especie, Gram negativos, fijadoras de nitrógeno de vida libre que se encuentran generalmente en suelos con pH levemente ácido a alcalino (Rubio y Peticari, 2013). Son organismos aerobios estrictos, de crecimiento heterotrófico, altamente sensible a la acidez y aunque es capaz de sobrevivir a pH entre 4.5 - 9.0, su óptimo desarrollo lo consigue entre 6.5 – 7.5 (Montenegro-Gómez *et al.*, 2017).

La capacidad de estimular el crecimiento se da mediante diferentes mecanismos como la fijación de nitrógeno, la capacidad de solubilizar fosfatos, la producción de hormonas reguladoras del crecimiento, vitaminas, sideróforos y sustancias anti fúngicas. Se postula que el mecanismo principal que explicaría los efectos beneficios de *Azotobacter* es la producción de auxinas y otros reguladores del crecimiento; sin embargo, como ocurre con otras PGPB, la promoción sería consecuencia de la acción sinérgica de todos los mecanismos mencionados (Rubio y Peticari, 2013).

2.5.2. Asociación simbiótica *Rhizobium*-leguminosa

Las bacterias del género *Rhizobium* son bacilos Gram negativos, que tienen la capacidad de inducir en raíces de leguminosas la formación de estructuras llamadas nódulos radicales (Sharma *et al.*, 2017), dentro de los cuales el nitrógeno atmosférico (N₂), se reduce a iones amonio (NH₄⁺) (Marquina *et al.*, 2011). La asociación *Rhizobium*-leguminosa es considerado un proceso de alta eficiencia en fijación biológica de nitrógeno (Cuadro 1.), supone la cuarta parte del N₂ fijado anualmente en el planeta; se estima que mediante simbiosis la fijación varía de 24 a 584 kg ha⁻¹ y tiene la capacidad de abastecer hasta el 90% de las necesidades de la planta (Ángeles-Núñez y Cruz-Acosta, 2015; Madigan *et al.*, 2015). La planta proporciona un ambiente micro-aeróbico para el funcionamiento efectivo de la nitrogenasa, enzima que reduce el nitrógeno atmosférico (N₂) a amoníaco (NH₄⁺). A cambio, las bacterias fijan el nitrógeno atmosférico proporcionando a la planta compuestos nitrogenados orgánicos para satisfacer sus necesidades biológicas (Parmar y Dufresne, 2011).

Cuadro 1. Asociaciones *Rhizobium*-leguminosa.

Especie bacteriana	Planta huésped
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	<i>Pisum sativum</i> (chicharo), <i>Vicia faba</i> (haba), <i>Lens culinaris</i> (lenteja)
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	<i>Trifolium</i> (trébol)
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> (frijol), <i>Vicia faba</i> (haba)
<i>R. galegae</i>	<i>Galega officinalis</i> (galega)
<i>R. tropici</i>	<i>Vicia faba</i> (haba), <i>Medicago sativa</i> (alfalfa), <i>Phaseolus vulgaris</i> (frijol), <i>Leucaena leucocephala</i> (guaje)
<i>R. etli</i>	<i>Vicia faba</i> (haba), <i>Medicago sativa</i> (alfalfa), <i>Phaseolus vulgaris</i> (frijol)
<i>R. grahamii</i> sp.nov.	<i>Clitoria ternatea</i> (conchita azul), <i>Leucaena leucocephala</i> (guaje)
<i>R. mesoamericanum</i> sp.nov.	<i>Phaseolus vulgaris</i> (frijol), <i>Vigna unguiculata</i> (frijol chino), <i>Mimosa pudica</i> (dormilona)

Fuente: Anaya, 2003; Castillo-Rodríguez *et al.*, 2005; López - López *et al.*, 2012.

2.5.2.1. Bioquímica de asociación simbiótica *Rhizobium*-leguminosas

El proceso de simbiosis se lleva a cabo en una serie de etapas (Figura 7), que inicia con la atracción y reconocimiento de los rizobios de vida libre hacia la superficie radical, por efecto quimiotáctico de exudados radicales como ácidos orgánicos, aminoácidos, auxinas, azúcares, enzimas, flavonoides y vitaminas (Mukerji *et al.*, 2006; Madigan *et al.*, 2015). A continuación, los rizobios se adhieren a la superficie de los pelos radiculares mediante componentes de la superficie celular bacteriana como lipopolisacáridos, exopolisacáridos y la

ricadhesina; proteína que permite el anclaje de los rizobios a los pelos radiculares (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2007; Madigan *et al.*, 2015). Simultáneamente a la adhesión se produce el reconocimiento molecular; los flavonoides inducen la expresión de genes de nodulación (genes *nod*) en las bacterias, los cuales están involucrados en la biosíntesis y secreción de los factores de nodulación (factores *Nod*) (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2007). A su vez, las células vegetales realizan una serie de cambios en las células de la epidermis y del córtex de la raíz, que culminará con la formación del nódulo (Downie, 2010). En las células epidérmicas, los factores *Nod* inducen la curvatura de los pelos radiculares, que envuelven a los rizobios permitiendo su entrada mediante una degradación localizada de la pared celular y la invaginación de la membrana plasmática de la célula vegetal.

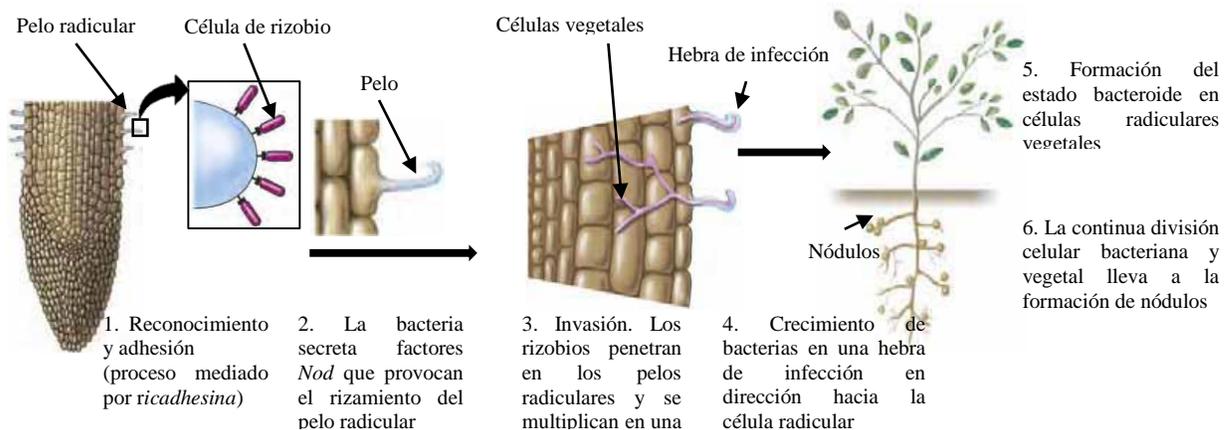


Figura 7. Etapas de infección de *Rhizobium* en una leguminosa (Madigan *et al.*, 2015).

La bacteria una vez dentro induce la formación, por la planta, de un tubo de celulosa llamado filamento de infección que protege a la bacteria y que crece hacia los tejidos internos de la raíz (Gage, 2004; Madigan *et al.*, 2015). Posteriormente, los rizobios se multiplican rápidamente en el interior de las células vegetales y continua la división celular, dando lugar a la aparición de los primeros primordios nodulares (Madigan *et al.*, 2015). El cordón de infección alcanza el centro del primordio nodular y libera los rizobios al citoplasma de las células corticales (Roth *et al.*, 1988). Las bacterias quedan englobadas por una membrana de origen vegetal, denominada membrana peribacteroidea, donde se transforman morfológica y fisiológicamente a bacteroides. Dando lugar a que cientos de bacteroides sean albergados en una sola célula vegetal, formando orgánulos capaces de fijar nitrógeno llamados simbiosomas. Los bacteroides una vez maduros, dejan de multiplicarse y empiezan el proceso de fijación de

nitrógeno (Roth *et al.*, 1988; Madigan *et al.*, 2015). La fijación de N_2 inicia con el intercambio de nutrientes como los azúcares, que son sintetizados en la fotosíntesis por la planta y que llegan al nódulo por el floema, siendo transportados a través de la membrana del simbiosoma y al interior del bacteroide, transformados a través del ciclo del ácido cítrico en ácidos orgánicos, para ser usados por los bacteroides generando ATP y nitrogenasa para la reducción del N_2 a NH_3 . En este proceso también participa la leghemoglobina, proteína que regula los niveles de O_2 en los nódulos y que garantiza un buen funcionamiento de la nitrogenasa. Finalmente, el N_2 fijado es transportado a través del xilema desde los nódulos al resto de la planta, en forma de amidas o ureidos (Figura 8) (Jones *et al.*, 2007, Madigan *et al.*, 2015).

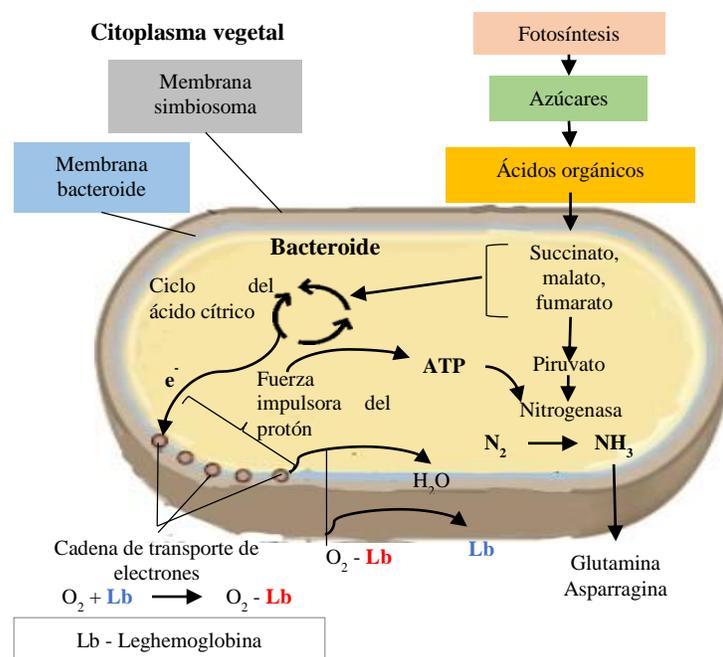


Figura 8. Bacteroide de nódulo radicular. Esquema de las principales reacciones metabólicas y de nutrientes para la fijación de N_2 (Madigan *et al.*, 2015).

2.5.2.2. Tipos de nódulos y características

Los nódulos se definen como estructuras protuberantes radiculares resultantes de la simbiosis entre la planta y la bacteria (Taiz y Zeiger, 2006). Dependiendo si el primordio nodular tiene origen en el córtex interno o externo de la raíz, las células meristemáticas mantendrán o no su actividad durante el desarrollo del nódulo, se clasifican en dos tipos principales y morfológicamente distintos; nódulos indeterminados y determinados (Figura 9) (Timmers *et al.*, 2000; Suzaki *et al.*, 2015). En los indeterminados el primordio nodular se forma en el

córtex interno dando lugar a nódulos de forma cilíndrica y las zonas del nódulo están bien establecida: meristemo, la zona de infección rizobial y la zona de fijación de nitrógeno desde las partes apicales a las basales de los nódulos (Suzaki *et al.*, 2015). La actividad del meristemo del nódulo permite el crecimiento semipermanente del nódulo asegurando el alargamiento del nódulo. En la zona de infección, se aprecian cuatro zonas (I – IV) con células, bacterias y bacteroides en diferentes etapas de diferenciación (Timmers *et al.*, 2000). En los determinados el primordio se forma en el córtex externo dando lugar a nódulos de forma esférica y las zonas del nódulo no se distinguen claramente. Sin embargo, al igual que en los indeterminados, hay células colonizadas por rizobios agrandadas en la región interna del nódulo, donde se produce la fijación simbiótica de nitrógeno, y células infectadas por rizobios aún no colonizadas en la región circundante (Suzaki *et al.*, 2015).

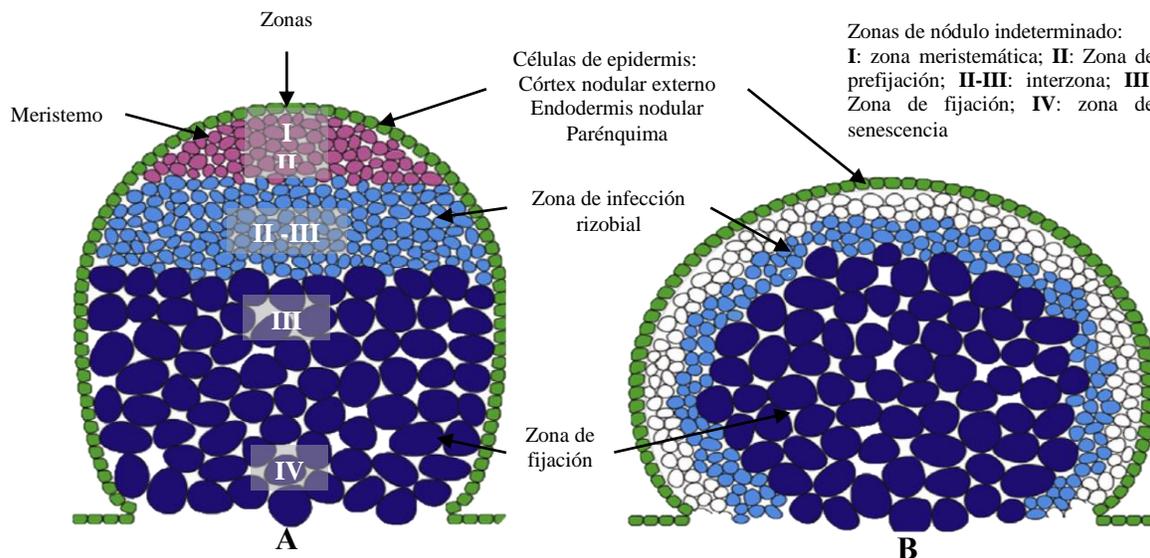


Figura 9. Estructura de un nódulo indeterminado (A) y determinado (B) (Timmers *et al.*, 2000; Suzaki *et al.*, 2015).

2.5.3. El mutualismo asociación planta-hongo

Todas las plantas viven en asociación más o menos prolongada con hongos, algunos viven como simbioses entre las células de la planta y se desarrollan, ya sea en armonía con ella (endófitos) o provocando enfermedades (fitopatógenos) (Bagnères y Martine, 2020). Se estima que aproximadamente el 85 a 95% de las especies vegetales conocidas viven en simbiosis con gran cantidad de hongos en el suelo (Molina *et al.*, 2005). La simbiosis más

importante establecida entre hongos y plantas, es conocida como *micorriza* (mikes=hongo, rhiza=raíz) (Curtis y Schnek, 2008). Esta suele considerarse como mutualista debido a que ambos organismos al interactuar se benefician mutuamente, ya que los nutrientes son transferidos en ambas direcciones (Madigan *et al.*, 2015). El hongo coloniza la raíz sin causar daño, la planta le proporciona compuestos carbonados procedentes de la fotosíntesis, protección y medio de propagación (Curtis y Schnek, 2008; Madigan *et al.*, 2015). La micorriza incrementa la superficie radical para la absorción de agua y elementos esenciales como N, P, K, Ca, Mg, Cu, Mn, produce mayor tolerancia a patógenos, longevidad de las raíces y degradan sustancias orgánicas, transformándolos en moléculas aprovechables (Carreón *et al.*, 2008; Muñoz-Márquez *et al.*, 2009). Los hongos micorrícicos arbusculares (HMA), se encuentran entre los simbioses mutualistas más estudiados e importantes de la rizosfera, por su amplia aplicación en ecosistemas, programas de restauración y mantenimiento de diversidad; como en agro-ecosistemas modernos en los cuales la producción vegetal debe ser sostenible y sustentable (Ramírez y Rodríguez, 2012).

2.5.3.1. Definición y estructura de los hongos micorrícicos arbusculares (HMA)

Los HMA se definen como organismos del suelo que realizan un tipo de asociación hongo-raíz por medio de la colonización intracelular de la corteza radical mediante estructuras especializadas denominados arbusculos (Aguilera *et al.*, 2007).

Estructuralmente presentan una hifa intracelular, arbusculos (ramificación fina de hifas que participan en la absorción de nutrientes), micelio extra-radical que conecta a la raíz con el suelo, esporas formadas en el micelio extra-radical y algunas especies forman vesículas, que son porciones de hifas que se llenan de cuerpos lipídicos (Camarena-Gutiérrez, 2012). El micelio extra-radical puede ser de tres tipos de acuerdo a su morfología y función: hifas infectivas, son las que indican los puntos de colonización en una o varias raíces; hifas absorbentes, que se encargan de explorar el suelo y extraer nutrientes, y las hifas fértiles que llevan las esporas. También se distinguen dos tipos de colonización, el tipo “Arum”, donde las hifas presentan crecimiento intercelular y los arbusculos se encuentran dentro de las células corticales de la raíz; y el tipo “Paris” en el que los arbusculos e hifas presentan crecimiento intracelular, presentando enrollamientos dentro de la célula (Figura 10). También se forma una estructura llamada apresorio construida antes de que el hongo penetre la raíz del

hospedero, por donde penetraran las hifas a las células corticales, derivando en la formación de arbusculos (Barrer, 2009).

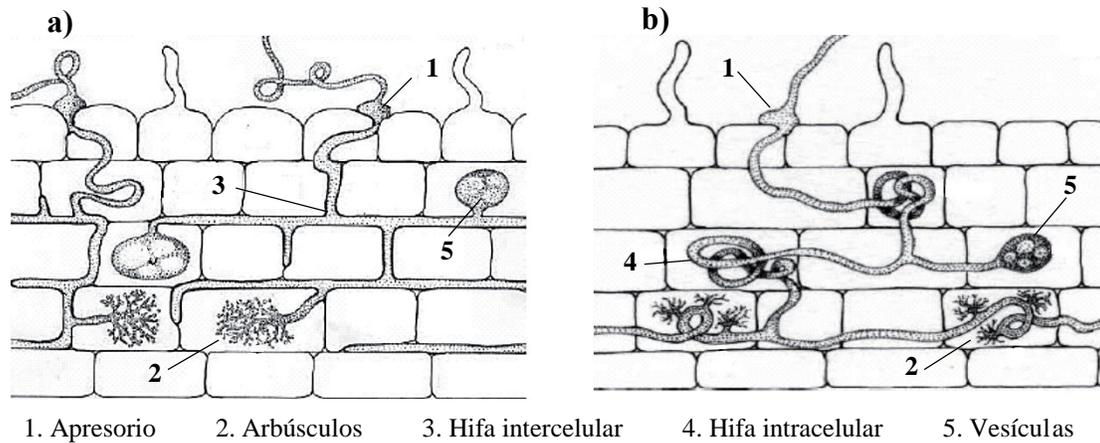


Figura 10. Estructura y tipos de asociación micorrízica arbuscular. a) Tipo “Arum”; b) Tipo “Paris” (Barrer, 2009).

2.5.3.2. Bioquímica de colonización micorriza arbuscular-leguminosa

La asociación HMA-leguminosa se basan en reciprocidad de señales de reconocimiento, que se dividen en las siguientes fases principales: fase asimbiótica, presimbiótica, formación de apresorio, colonización y la formación de arbusculos (Ramírez y Rodríguez, 2012). El proceso comienza con la germinación de las esporas en el suelo, que producen las hifas fértiles o germinativas. Estas reciben estimulación química de la planta hospedadora (Madigan *et al.*, 2015). Dentro de los compuestos secretados por la planta hospedadora se encuentra el CO₂, flavonoides y hormonas; considerados como la primera señal de interacción, que se lleva a cabo especialmente bajo condiciones de bajo fósforo (Pi) (Ramírez y Rodríguez, 2012). El CO₂ es fundamental para la germinación de esporas y el crecimiento de la hifa germinativa, ya que a pesar de que la espora tiene la capacidad de almacenar carbohidratos en forma de lípidos y azúcares, el CO₂ es una fuente de carbono necesario para el crecimiento de la hifa (Ramírez y Rodríguez, 2012). Los flavonoides y las hormonas son esenciales para la fase inicial ya que favorecen la ramificación de las hifas. La strigolactona es una hormona que realiza el estímulo necesario para que el hongo produzca los factores *Myc* (señalización lipoquitina-oligosacarido) y en la planta se lleva a cabo la expresión de genes ENDO11 (gen que permite a la planta localizar las células en las cuales la hifa tiene contacto) (Ramírez y Rodríguez,

2012; Madigan *et al.*, 2015). Esto permite la formación de un aparato de prepenetración (APP) llamado apresorio o hifopodio, que es una especie de camino intracelular a través de la cual la hifa ingresará entre las capas de células epidérmicas y de la corteza externa de la raíz (Madigan *et al.*, 2015). Una vez que el hongo penetra las células corticales se producen señales específicas para una reorganización celular, que permite la ramificación de la hifa para generar el arbúsculo y la membrana periarbuscular o apoplasto, cuya función es incrementar el área de intercambio de nutrientes entre la planta y el hongo (Ramírez y Rodríguez, 2012; Madigan *et al.*, 2015). El nitrógeno y fósforo son extraídos del suelo por micelios extra-radicales (asociados al suelo), siendo transformados en arginina y en polifosfatos para ser transportados a través de la red de micelios, para ser suministrados a la planta por el micelio intra-radical (asociado a las células vegetales). El amonio y el fosfato se regeneran en el micelio intra-radical para ser transferidos a la célula vegetal. A cambio del nitrógeno y el fósforo, la planta le proporciona carbono orgánico al hongo (Madigan *et al.*, 2015).

2.6. Efecto del petróleo en propiedades físicas y químicas del suelo

Los derrames de petróleo es una de las principales fuentes de contaminación de suelos, ya que ocasiona perturbaciones en los ecosistemas al afectar su estructura y bioprocesos (Zamora *et al.*, 2012). Entre las propiedades físicas del suelo que se ven más afectadas son: estructura del suelo, debido a la ruptura de los agregados, el aumento de la retención del agua en la capa superficial, disminución de la porosidad, reducción de intercambio gaseoso, reducción de la transmisión de luz y reducción el potencial hídrico ocasionada por la formación de una capa impermeable sobre la superficie del suelo (Ortíz *et al.*, 2003; Serrano *et al.*, 2013; Mena *et al.*, 2016; Jiménez-Ballesta, 2017). Las propiedades químicas más afectadas son: el aumento del carbono orgánico, debido a que el 75% del carbono del petróleo es oxidable, la disminución del pH, ocasionada por la acumulación de carbono orgánico y la generación de ácidos orgánicos, incremento de la conductividad eléctrica y capacidad de intercambio catiónico además del incremento en el porcentaje de saturación de bases (Zamora *et al.*, 2012; Jiménez-Ballesta, 2017). También se produce un desequilibrio en la disponibilidad de nutrientes como el N y P, debido al aumento de la relación C: N y C: P, ocasionada por la inmovilización de estos nutrientes por los microorganismos del suelo (Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2013).

2.7. Teoría de toxicidad y hormesis a contaminantes

Se denomina toxicidad a la actividad tóxica, concreta y específica, vinculada con una sustancia exógena al organismo (xenobiótico) por su interacción con moléculas endógenas (receptor) que puede producir un efecto nocivo sobre un ser vivo, y como la vida, tanto animal como vegetal, es una continua sucesión de equilibrios dinámicos; los tóxicos son los agentes químicos o físicos, capaces de alterar alguno de estos equilibrios (Bello y López de Cerain, 2001; Repetto y Repetto, 2009). La toxicidad en el ambiente se manifiesta en la variación y/o reducción de la productividad del componente vivo, así como de los organismos que habitan en él (Sánchez, 2003). Sin embargo, se han identificado una serie de procesos durante los cuales una dosis baja o subletal de una sustancia o estímulo estresante es capaz de activar una respuesta adaptativa que incrementa la resistencia de una célula u organismo frente a un estrés severo, a este efecto se le conoce como hormesis (Calabrese y Baldwin, 2003; López-Díazguerrero *et al.*, 2013).

La hormesis es un fenómeno dosis-respuesta que se caracteriza por la estimulación de dosis bajas de un agente químico o bien un factor ambiental, que es dañino a dosis altas, lo cual induce una respuesta adaptativa y/o un efecto benéfico en la célula o el organismo (Calabrese y Blain, 2009; López-Díazguerrero *et al.*, 2013). Es decir, es una relación dosis-tiempo-respuesta en la cual hay una dosis inicial dependiente de una respuesta tóxica, seguida por una respuesta compensadora/rebote (Calabrese *et al.*, 2012). Así mismo, la dosis hormética a la cual responde una célula u organismo puede variar dependiendo del individuo y sus características (Kouda e Iki, 2010). Como consecuencia de ello, las curvas horméticas son bifásicas y no monotónicas, y se representan en forma de «J» o bien como una «U» invertida (Figura 10). La curva en forma de «J» representa una disfunción biológica o daño tóxico (Figura 10a), mientras que la curva en forma de «U» invertida representa una función biológica normal como el crecimiento de un organismo o la proliferación celular (Figura 10b). La zona hormética (zona rayada) muestra una frecuencia menor que la que ocurriría de manera espontánea sin exposición al agente hormético (Figura 10c) (López-Díazguerrero *et al.*, 2013).

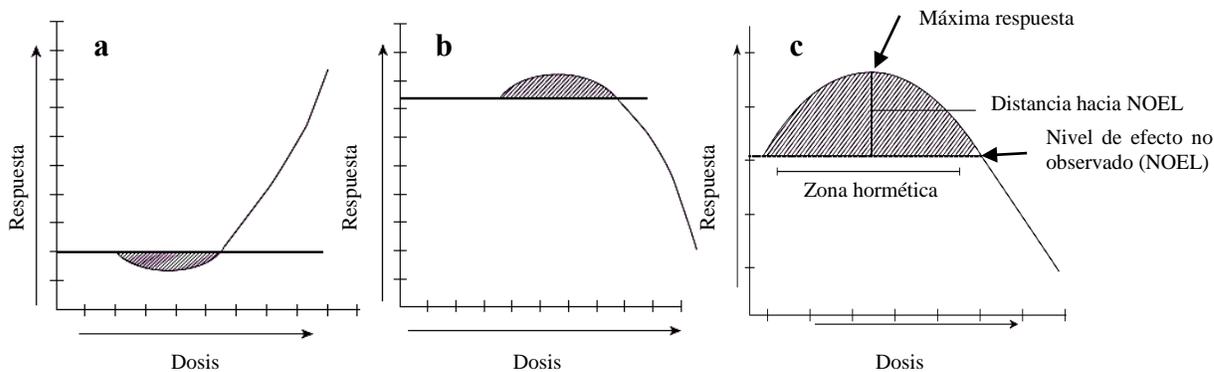


Figura 11. Curva hormética bifásica dosis-respuesta. a: curva en forma de «J». b: curva en forma de «U» invertida. c: detalle de la zona hormética en la curva «U» invertida (López-Díazguerrero *et al.*, 2013).

2.8. Efecto del petróleo en leguminosas

La fitotoxicidad del petróleo ocurre en las diferentes etapas fenológicas de la planta, siendo los estadios de germinación y crecimiento inicial de las plántulas las más sensibles a los contaminantes (Pernía *et al.*, 2018). El efecto se manifiesta al retardar la germinación de semillas, reduce la altura de la planta, induce un inadecuado desarrollo y comportamiento de la raíz, disminuye la densidad de tallos, provoca clorosis y amorfismo de hojas, necrosis de follaje y raíz, ocasionando una disminución en la tasa fotosintética, reducción de biomasa aérea y radical, e incluso la muerte de la planta (Méndez-Natera *et al.*, 2004; Hernández-Valencia *et al.*, 2017; Pernía *et al.*, 2018; Morales-Guzmán *et al.*, 2020). Diversos investigadores reportan efectos negativos en parámetros de crecimiento y producción de leguminosas (Cuadro 2).

Cuadro 2. Efecto de los hidrocarburos en leguminosas.

Planta	HTP (mg/kg)	Efecto	Autor
<i>Crotalaria</i> sp. (Chipilin silvestre)	25 000	Negativo en altura de planta, biomasa seca, número de nódulos y Leghemoglobina	Rivera-Cruz <i>et al.</i> , 2005
<i>Mimosa pigra</i> (Zarza) <i>Crotalaria incana</i> (cascabelillo)	20 000	Negativo en emergencia, altura, longitud radicular y materia seca	Vázquez-Luna <i>et al.</i> , 2010
<i>Leucaena leucocephala</i> (guaje) <i>Medicago sativa</i> (alfalfa)	5 000	Negativo en germinación, biomasa aérea y radical	Minoui <i>et al.</i> , 2015
<i>Phaseolus vulgaris</i> (frijol)	3 000	Negativo en emergencia, longitud radical y biomasa total	Arias-Trinidad <i>et al.</i> , 2017
<i>Mimosa pigra</i> (Zarza)	14 303	Negativo en producción de raíz, hojas, tallos y ramas, cantidad de nódulos y de su viabilidad.	Chávez-Álvarez <i>et al.</i> , 2019
<i>Clitoria ternatea</i> (conchita azul)	39 000	Negativo en biomasa seca aérea, radical y total	Morales-Guzmán <i>et al.</i> , 2020

HTP: Hidrocarburos totales del petróleo

2.9. Efecto del petróleo en la microbiota del suelo

Los microorganismos del suelo son alterados por la presencia de hidrocarburos, provocando un desequilibrio en las poblaciones microbianas, importantes en la asimilación y reciclado de nutrientes (Vázquez-Luna *et al.*, 2011; Pentreath *et al.*, 2015). Hay poblaciones que se ven disminuidas por metales pesados presentes en el petróleo como cadmio (Cd), cobre (Cu), hierro (Fe), plomo (Pb) y zinc (Zn) (Khan *et al.* 2013). Las comunidades de microorganismos tolerantes a la presencia de hidrocarburos, inducen la selección de poblaciones resistentes al contaminante, y desapareciendo o disminuyendo las especies menos resistentes (Cuadro 3) (Pentreath *et al.*, 2015). Estos microorganismos utilizan a los hidrocarburos como una nueva fuente de carbono y aumentan su actividad enzimática y metabólica, para sobrevivir a estas condiciones de estrés (Labud *et al.*, 2007). Estos atributos propician las fluctuaciones poblacionales de los hongos y bacterias autóctonos y realizan, de manera natural, la degradación química del petróleo presente en el suelo (Rivera-Cruz *et al.*, 2002).

Cuadro 3. Efecto de los hidrocarburos en la microbiota del suelo.

Microorganismo	Hidrocarburos del petróleo	Efecto	Autor
<i>Gigaspora margarita</i>	25 - 100 µg/mL HAP	Negativo, en la germinación de esporas en un 42.8%	Alarcón <i>et al.</i> , 2006
<i>Azospirillum brasilense</i> SR80	15 g/kg HAP	Negativo. Disminuyó la población entre un 30-41%	Muratova <i>et al.</i> , 2010
<i>Azotobacter</i> sp.	5000-5200 mg/kg HTP	Negativo. Disminución de la población por la limitación de nitrógeno	John <i>et al.</i> , 2011
<i>Rhizobium meliloti</i>	10124 µg/kg HAP	Positivo, en la biomasa microbiana y la actividad de la deshidrogenasa	Teng <i>et al.</i> , 2011
<i>Glomus claroideum</i> <i>Glomus diaphanum</i> y <i>Glomus albidum</i>	7500 mg/kg HTP	Positivo, en la colonización en los primeros cuatro días de exposición Negativo, en la colonización después del quinto al día 60	Hernández-Ortega <i>et al.</i> , 2012
<i>Glomus intraradices</i>	7500 mg/kg HTP	Negativo, en la colonización de raíces	Díaz-Martínez <i>et al.</i> , 2013
BVLFN, BSP, Rizobios nativos y HMA	12000 mg/kg HTP	Negativo, en la población de BVLFN, BSP, nódulos de rizobios y esporas de HMA.	Alarcón <i>et al.</i> , 2019

BVLFN: Bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno; BSP: Bacterias solubilizadoras de fósforo; HMA: Hongos micorrizicos arbusculares; HAP: Hidrocarburos aromáticos policíclicos; HTP: Hidrocarburos totales del petróleo.

2.10. Tecnologías biológicas para recuperar suelos contaminados con hidrocarburos

Las tecnologías biológicas o biorremediación se define como procesos para reducir, eliminar, transformar o degradar contaminantes o sustancias nocivas mediante mecanismos bioquímicos y metabólicos de organismos vivos (plantas, hongos, bacterias) (Abubakar, 2015). El uso de tecnologías de biorremediación depende de la capacidad de biodegradación de los microorganismos, las características fisicoquímicas del suelo y de las características químicas del contaminante (Singh y Chandra, 2013). En el caso especial de los hidrocarburos, estas tecnologías son utilizados para acelerar el proceso de degradación de los compuestos susceptibles a la biodegradación (Velasco y Volke, 2003).

La biorremediación puede emplear organismos propios del sitio contaminado (autóctonos) o de otros sitios (exógenos), puede realizarse en el sitio sin necesitar excavar el material contaminado (*in situ*), o bien escavándolo para ser tratado en el sitio (*on site*) o fuera de él (*ex situ*), en condiciones aerobias (en presencia de oxígeno) o anaerobias (sin oxígeno) (Velasco y

Volke, 2003). Estos se clasifican dependiendo de las características y las necesidades del proceso de descontaminación (Figura 12) en:

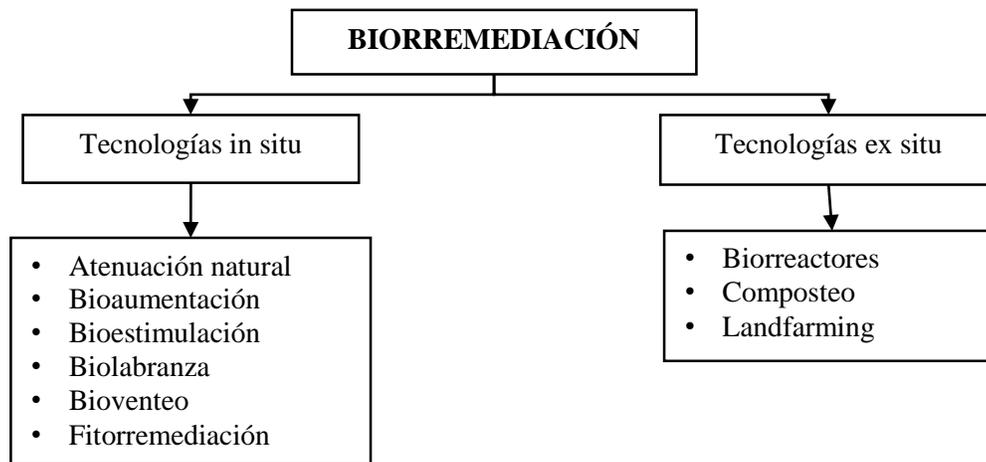


Figura 12. Clasificación de tecnologías de remediación biológicas (Velasco y Volke, 2003; Tomei y Daugulis, 2013)

Tecnologías *in situ*

Atenuación natural: Proceso natural de descontaminación pasiva que depende de mecanismos de advección, dispersión, absorción, transformación bióticos y abióticos, para reducir y eliminar los contaminantes sin alterar las condiciones del suelo (Chiu *et al.*, 2013; Kuppusamy *et al.*, 2019).

Bioaumentación: Inoculación de consorcios o cepas vivas enriquecidas y aclimatadas en sitios donde la microflora nativa son insuficientes para degradar eficientemente los contaminantes, logrando el aumento de las poblaciones microbianas para una mayor capacidad de degradación (Tomei y Daugulis, 2013; Szulc *et al.*, 2014; Kuppusamy *et al.*, 2019).

Bioestimulación: Adición de nutrientes apropiados (nitrógeno, fósforo, oligoelementos) a microorganismos autóctonos para proporcionar un entorno de reacción favorable al desarrollo de vías metabólicas que aumenten la biodegradación de contaminantes (Tomei y Daugulis, 2013; Souza *et al.*, 2014; Kuppusamy *et al.*, 2019).

Biolabranza: Remoción del suelo contaminado para ser mezclado con agentes de volumen, nutrientes y suelo limpio, movidos periódicamente para favorecer la aireación y optimizando la velocidad de degradación (Velasco y Volke, 2003).

Bioventeo: Consiste en estimular la biodegradación en condiciones aerobias suministrando gases como el oxígeno en el sitio contaminado a través de pozos de extracción, por movimiento forzado (extracción o inyección), con bajas velocidades de flujo, con el fin de mantener la actividad microbiana (Velasco y Volke, 2003; Kuppusamy *et al.*, 2019).

Fitorremediación: Utilización de plantas con la capacidad de absorber, acumular, metabolizar o estabilizar contaminantes (orgánicos e inorgánicos) en suelos y sedimentos (Delgadillo-López *et al.*, 2011).

Tecnologías *ex situ*

Biorreactores: Consiste en excavar el suelo contaminado e introducirlo en un reactor donde se mezcla constantemente con agua, nutrientes y microorganismos, en la que la degradación se lleva a cabo en la fase acuosa por microorganismos en suspensión o inmovilizados en la fase sólida. Si el proceso tiene éxito, el suelo se devuelve y los líquidos son tratados como aguas residuales (Velasco y Volke, 2003).

Composteo: Proceso biológicamente controlado, por el cual se tratan suelos y sedimentos contaminados con compuestos o materia orgánica, gracias a la acción de diversos microorganismos en condiciones termófilas (Kumar *et al.*, 2011).

Landfarming (siembra en tierra): consiste en la dispersión de suelo contaminado en una capa delgada a través de un terreno destinado a tal fin. Los minerales, nutrientes, humedad y aire que se agregan a la delgada capa de tierra contaminada estimula la actividad microbiana (Kuppusamy *et al.*, 2019).

2.10.1. Definición y características de la fitorremediación

La fitorremediación es definida como la capacidad de ciertas plantas de utilizar procesos físicos, químicos y biológicos, para absorber, acumular, degradar, eliminar, estabilizar, metabolizar y volatilizar contaminantes presentes en el ambiente (Delgadillo-López *et al.*, 2011; Kuppusamy *et al.*, 2019). La fitorremediación aplicada a suelos contaminados con elementos o compuestos inorgánicos, incluye técnicas de: fitoextracción o fitoacumulación, fitoestabilización, rizodegradación y fitovolatilización (Marrero-Coto *et al.*, 2012).

Los principales mecanismos involucrados en la fitorremediación de hidrocarburos del petróleo son la fitoestabilización y rizodegradación, que consisten en la inmovilización de los contaminantes a través de su absorción y acumulación en las raíces o precipitación en la rizosfera, lo que ocasiona una disminución en su movilidad y permite una mejor biodisponibilidad para otras plantas y microorganismos (Marrero-Coto *et al.*, 2012; Khan *et al.*, 2013). En la rizosfera se produce un microambiente propicio, para que las plantas puedan beneficiarse de la actividad de microorganismos que poseen vías y capacidades metabólicas para la degradación de hidrocarburos del petróleo; obteniéndose agua, dióxido de carbonos y productos menos tóxicos que el original (Wolicka *et al.*, 2009; Fester *et al.*, 2014).

2.11. Leguminosas en la fitorremediación

La fitorremediación como técnica biológica permite llevar a cabo la descontaminación de suelos, debido a la capacidad restauradora de algunas plantas (Velásquez, 2017). Las leguminosas se han estudiado por diversos autores por su habilidad de fitorremediar suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo (Cuadro 4.), las cuales presentan niveles de tolerancia a dosis bajas de hidrocarburos en el suelo, y hospedan comunidades microbianas que utilizan como fuente de carbono y energía a los hidrocarburos (Hall *et al.*, 2011).

Cuadro 4. Leguminosas en la fitorremediación de hidrocarburos.

Especie	Autores	Observaciones
<i>Medicago sativa</i> L.	Wei y Pan, 2010	Mostro eficiencia para la eliminación de HAP en cinco niveles que oscilaron entre 0 y 322 mg/kg
<i>Leucaena leucocephala</i>	Maldonado-Chávez <i>et al.</i> , 2010	Promovió la degradación de los hidrocarburos mediante la interacción de rizosfera, microorganismos y fertilizantes
<i>Medicago sativa</i> L.	Teng <i>et al.</i> , 2011	Eliminó 37.2% de HAP en suelo con concentración inicial de 4 916 a 8 620 µg/kg
<i>Medicago sativa</i> L.	Liu <i>et al.</i> , 2012	Degradó un 37.93% de un suelo contaminado con 10 000 mg/kg HTP
<i>Leucaena leucocephala</i>	Rivera-Cruz <i>et al.</i> , 2012	Sobrevivió a una concentración de 78456 mg/kg de petróleo intemperizado
<i>Sorghum sativa</i> <i>Onobrychis sativa</i>	Baneshi <i>et al.</i> , 2014	Eliminó 22 y 16 % de pireno y fenantreno respectivamente, de suelo con un rango de 1 000 a 6 000 mg/kg HAP
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Nwoko, 2014	Mostró una alta descomposición HTP de suelo contaminado con 2%, 4% y 8%
<i>Medicago falcata</i> L.	Panchenko <i>et al.</i> 2017	

<i>Phaseolus vulgaris</i>	Arias-Trinidad <i>et al.</i> , 2017	(v/w) en asociación con HMA Redujo un 18% de HTP con suelo contaminado en un rango 0.2 a 49 g/kg Expuso a concentraciones de 1 500 a 9 000 mg/kg de HTP, encontrando que esta especie puede ser utilizada como bioindicadora
<i>Clitoria ternatea</i> cv. Pailin	Somtrakoon <i>et al.</i> , 2018	Eliminó un 76% y 63% de un suelo contaminado con concentraciones iniciales de 86.3 mg kg ⁻¹ de antraceno y 74.1 mg kg ⁻¹ de pireno respectivamente.

HAP: Hidrocarburo aromático policíclico; HMA: Hongo micorrícico arbuscular; HTP: Hidrocarburos totales del petróleo

2.12. Bacterias y hongos en la degradación de hidrocarburos del petróleo

Los hidrocarburos en el medio ambiente se biodegradan principalmente por bacterias, levaduras y hongos (Das y Chandran, 2011). La degradación de los hidrocarburos por poblaciones nativas de bacterias y hongos es bien conocida, ya que estos utilizan los hidrocarburos como fuente de energía y carbono, a través de diferentes actividades enzimáticas extracelulares e intracelulares (Marchand *et al.*, 2017). Las bacterias funcionan como degradadores primarios del petróleo, incluso se sabe que hay bacterias que se alimentan exclusivamente de hidrocarburos conocidas como hidrocarbonoclastas (Das y Chandran, 2011). Bacterias de los géneros *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Brevibacterium*, *Cellulomonas*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Marinobacter*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomaonas* y *Vibrio* se catalogan como degradadores de hidrocarburos. Los hongos de los géneros *Aspergillus*, *Amorphoteca*, *Fusarium*, *Graphium*, *Neosartoria*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Sporobolomyces*, *Talaromyces* y levaduras de los géneros *Candida*, *Pichia*, *Pseudozyma* *Rhodotorula* y *Yarrowia* desempeñan un papel vital en la degradación de los contaminantes de hidrocarburos de petróleo (Varjani, 2017). Sin embargo, determinar el potencial de degradación de los microorganismos sigue siendo un desafío, ya que los contaminantes más recalcitrantes se degradan más lentamente que los componentes lábiles, además las poblaciones nativas se ven afectadas por factores abióticos o que la población que pueden tolerar, en ocasiones se encuentran en una abundancia muy baja y limitan la degradación completa de los hidrocarburos (Marchand *et al.*, 2017).

2.13. Procesos de óxido-reducción de hidrocarburos del petróleo

El petróleo es una rica fuente de materia orgánica y, por ello, los microorganismos usan rápidamente los hidrocarburos cuando el petróleo se pone en contacto con el aire y la humedad, los microorganismos lo usan como fuente de energía y carbono por diferentes vías metabólicas para su desarrollo, este proceso es denominado mineralización. Este proceso se puede llevar a cabo tanto de manera aeróbica como anaeróbica (Leung *et al.*, 2007; Madigan *et al.*, 2015). Los microorganismos consumen el petróleo al oxidarlo a CO₂ y metabolitos intermedios. Las bacterias oxidantes del petróleo crecen con rapidez después de un vertido, en las condiciones ideales, se puede oxidar hasta el 80% de los componentes no volátiles del petróleo, pero algunas fracciones del petróleo, como las que contienen los hidrocarburos policíclicos y los ramificados, permanecen en el ambiente por mucho tiempo. Estas fracciones pueden ser oxidadas por bacterias del grupo *Azospirillum* (Huang *et al.*, 2004; Muratova *et al.*, 2005; Gałazka *et al.*, 2012), *Azotobacter* (Acuña *et al.*, 2010; John *et al.*, 2011) y *Rhizobium* (Johnson *et al.*, 2004; Teng *et al.*, 2011), también los hongos micorríclicos (Alarcón *et al.*, 2006) pueden consumir los hidrocarburos. El éxito de este proceso depende si la temperatura, nivel de oxígeno, concentración de nutrientes como N y P, actividad enzimática y población microbiana son óptimas (Meckenstock y Mouttaki, 2011; Madigan *et al.*, 2015).

2.13.1. Proceso de degradación aeróbica de los hidrocarburos del petróleo

El catabolismo aerobio de los hidrocarburos es un proceso rápido debido a la ventaja metabólica de disponer de O₂ como aceptor de electrones. La etapa inicial de la oxidación de los hidrocarburos requiere oxígeno molecular (O₂) como reactivo, uno de cuyos átomos se incorpora, esta reacción es catalizada por oxigenasas y peroxidasas. El proceso de degradación se lleva a cabo por diferentes vías metabólicas que convierten a los contaminantes en productos intermedios del metabolismo intermediario central (Figura 13). La biosíntesis de la biomasa celular se produce a partir de los metabolitos precursores centrales. El producto final de la secuencia de reacción es acetil-CoA, que se cataboliza en el ciclo del ácido cítrico (en el cual el acetil-CoA es transformado en malato, que a su vez se puede convertir en oxalacetato, para hacer de esqueleto carbonado para los aminoácidos o se puede convertir en glucosa), junto con la producción de electrones para la cadena de transporte de electrones. Los azúcares requeridos para diversas biosíntesis y el crecimiento se sintetizan mediante gluconeogénesis. La secuencia se repite para degradar progresivamente las cadenas de hidrocarburos y en

muchos casos el hidrocarburo se oxida completamente a CO₂ (Fritsche y Hofrichter, 2008; Das y Chandran, 2011; Madigan *et al.*, 2015). La degradación de los hidrocarburos depende gran parte de su composición, por lo que la degradación microbiana se da en el siguiente orden: saturados lineales > saturados ramificados > cicloalcanos/ aromáticos con uno o dos anillos > aromáticos policíclicos con más de dos anillos (Peng *et al.*, 2009).

2.13.2. Degradación aeróbica de hidrocarburos saturados

La ruta consiste en la oxidación del grupo metilo terminal hasta carboxilo, se convierte en un compuesto hidrofóbico, ácido graso que se puede asimilar por β -oxidación. La oxidación es secuencial, pasando de metilo a alcohol, aldehído, y que queda activado en forma de acetil-coenzima A (Figura 14) (Castillo-Rodríguez *et al.*, 2005). El primer paso requiere un átomo del O₂, en un átomo de carbono terminal catalizada por una monooxigenasa. El producto final de la secuencia de reacciones es un ácido graso, el cual es oxidado mediante β -oxidación, una serie de reacciones en las que se separan dos carbonos del ácido graso en cada paso. Durante la β -oxidación se forman NADH que se oxidan en la cadena de transporte de electrones para generar energía. Un solo ciclo de β -oxidación libera acetil-CoA más un nuevo ácido graso con dos átomos de carbono menos que el original. El proceso se repite y se libera otra molécula de acetil-CoA. El acetil-CoA formado por β -oxidación es oxidado a través del ciclo del ácido cítrico o se utiliza para producir nuevo material vegetal (Castillo-Rodríguez *et al.*, 2005; Madigan *et al.*, 2015).

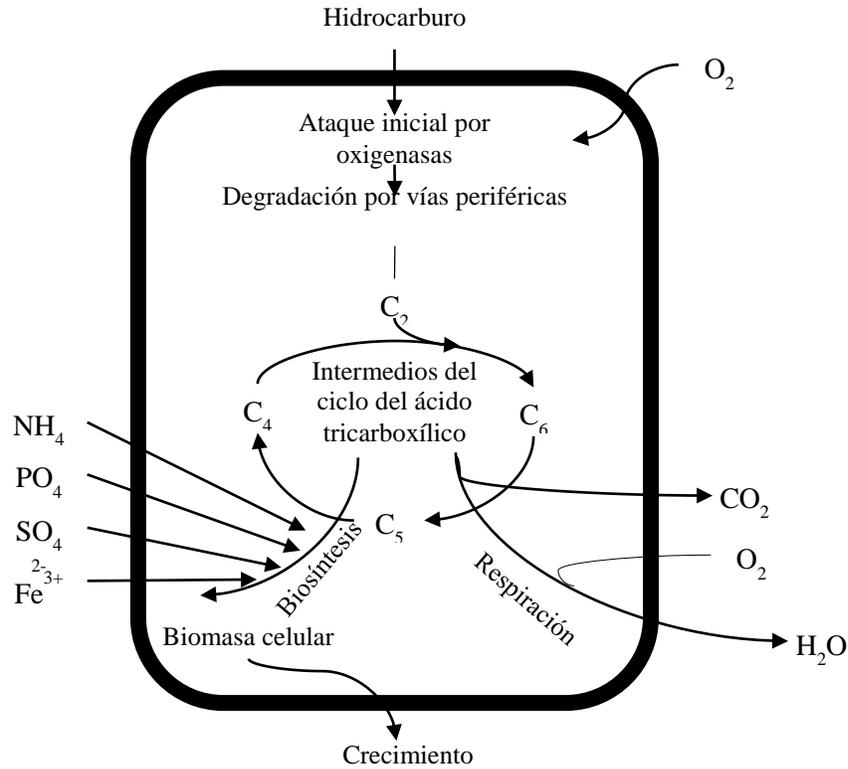


Figura 13. Degradación aeróbica de los hidrocarburos (Das y Chandran, 2011).

2.13.3. Degradación aeróbica de hidrocarburos aromáticos

Los hidrocarburos aromáticos son componentes del petróleo que presenta mayor persistencia en el medio ambiente debido a su estabilidad, por lo que su degradación transcurre a través de los intermediarios catecol y protocatecuato, que posteriormente son catalizadas por oxigenasas. Una vez que se forma el catecol se puede cortar y degradar en compuestos que entran en el ciclo de Krebs tales como succinato, acetil-CoA y piruvato (Castillo-Rodríguez *et al.*, 2005; Madigan *et al.*, 2015). Varias etapas del catabolismo aeróbico de los hidrocarburos aromáticos son catalizadas por oxigenasas, como la dioxigenasa que cortan un anillo (Figura 15a) o hidroxila un anillo (Figura 15b). El proceso finaliza con la oxidación completa de los hidrocarburos aromáticos a CO_2 y los electrones entran en la cadena de transporte de electrones o se usan para elaborar nuevo material celular (Madigan *et al.*, 2015).

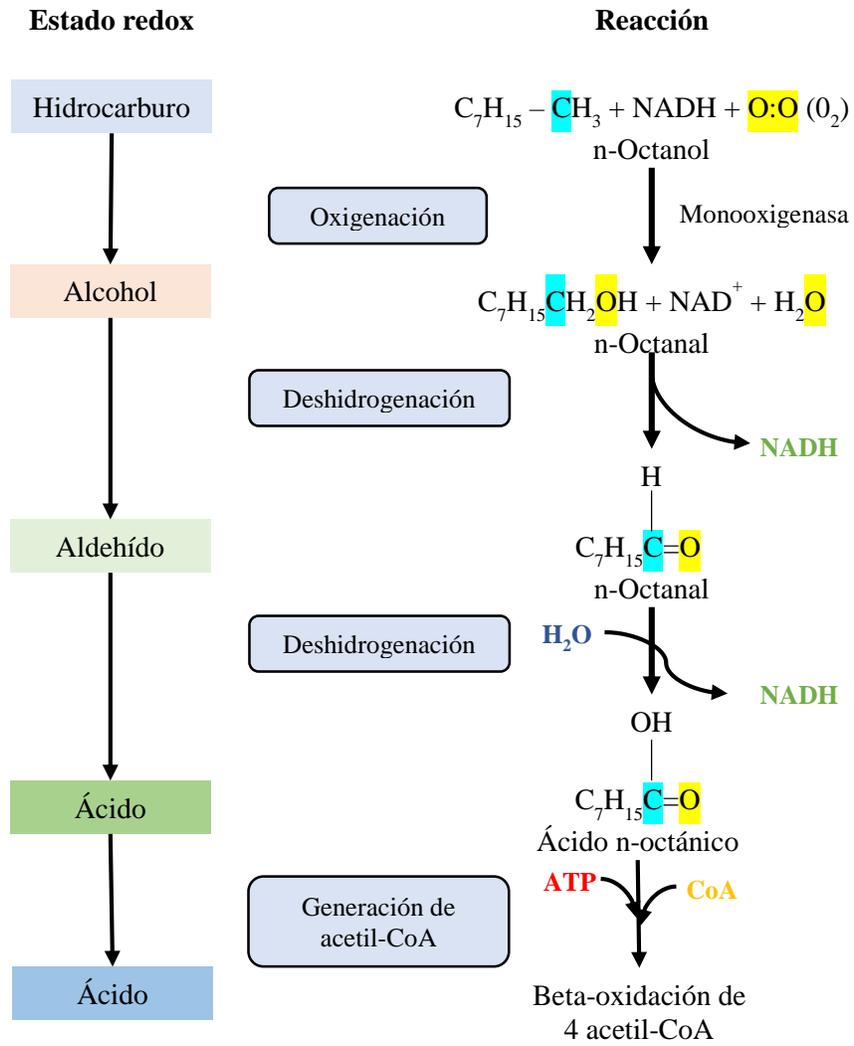


Figura 14. Degradación de un hidrocarburo alifático (Madigan *et al.*, 2015).

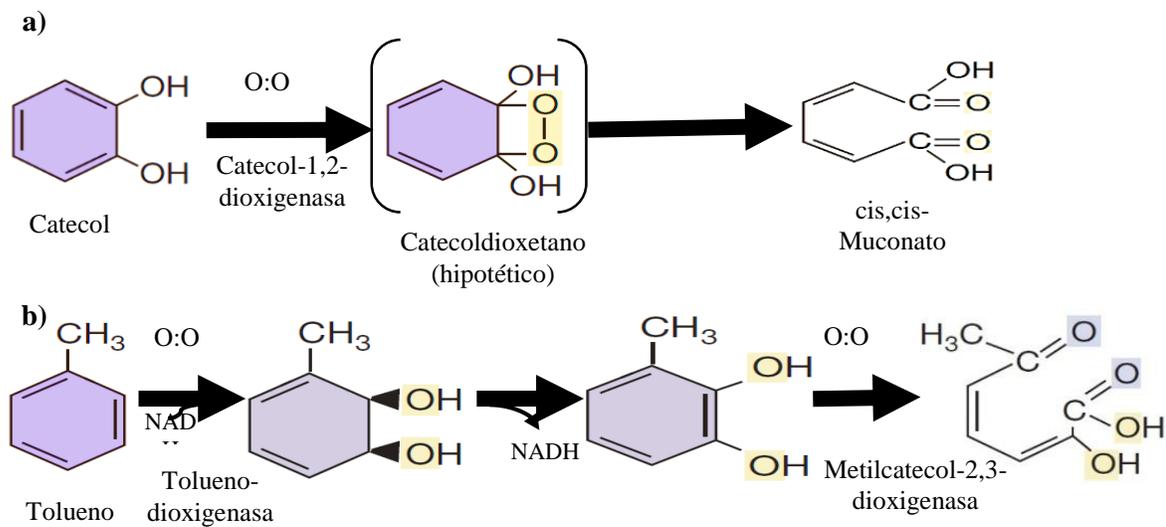


Figura 15. Degradación de un hidrocarburo aromáticos (Madigan *et al.*, 2015).

CAPÍTULO III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Definir la combinación *Clitoria*-dosis-tiempo de exposición a petróleo crudo bioestimuladora de la degradación de hidrocarburos totales del petróleo y la tendencia hormética a dosis de petróleo del crecimiento, producción, proteína cruda y actividad microbiana simbiótica, recomendable para integrar una tecnología de fitorremediación de Gleysols contaminados del estado de Tabasco.

3.2. Objetivo específicos

1. Obtener la combinación *Clitoria*-dosis-tiempo de exposición a petróleo que afecta la respuesta en crecimiento, biomasa, número, diámetro, formas de nódulos, acumulación de proteína cruda aérea y vaina, población de *Azotobacter*, colonización intraradical de estructuras del hongo micorrícico arbuscular en *Clitoria*.
2. Comparar la respuesta de *Clitoria* sp y *C. ternatea* a diferentes dosis y tiempos de exposición a petróleo en 26 variables de crecimiento, producción, proteína cruda, nódulos, población de *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Rhizobium* y estructuras del hongo micorrícicos arbuscular.
3. Determinar el efecto de *Clitoria* en variables de crecimiento, producción, proteína cruda, nodulación, población de bacterias *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, estructuras del hongo micorrícicos arbuscular y degradación de hidrocarburos totales del petróleo en diferentes tiempos de exposición a petróleo.
4. Explicar que factores y variables se relacionan con la degradación de hidrocarburos totales del petróleo fresco según la combinación *Clitoria*-dosis-tiempo de exposición, tipo de *Clitoria* y tiempo de exposición a petróleo.

CAPÍTULO IV. HIPÓTESIS

4.1. Hipótesis general

La tecnología de fitorremediación *ex situ* para Gleysols del estado de Tabasco depende del sistema rizosférico de *Clitoria*, dosis y tiempo de exposición a petróleo que bioestimele la degradación de hidrocarburos totales del petróleo, así mismo de la sensibilidad del crecimiento, producción, nodulación, proteína y actividad microbiana simbiótica de *Clitoria* para inducir respuestas de adaptación a condiciones de estrés derivadas de la contaminación.

4.2. Hipótesis específicas

1. *C. ternatea* es una especie que combinada con dosis y tiempo de exposición a petróleo induce una mejor respuesta que *Clitoria* sp, en crecimiento, biomasa, número, diámetro, formas de nódulos, acumulación de proteína cruda aérea y vaina, así como en población de *Azotobacter* y colonización intraradical de estructuras del hongo micorrízico arbuscular.
2. La leguminosa nativa de zonas petroleras del estado de Tabasco *Clitoria* sp expuesta a diferentes dosis y tiempo de exposición a petróleo genera curvas dosis-respuesta horméticas en el mayor número de variables de crecimiento, producción, nodulación, proteína, población de *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Rhizobium* y estructuras del hongo micorrízicos arbuscular, mientras que *C. ternatea* es menor esta respuesta.
3. *Clitoria* sp respecto a *C. ternatea* induce una mejor respuesta en variables de crecimiento, producción, proteína cruda, nodulación, población de bacterias *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, estructuras del hongo micorrízicos arbuscular y degradación de hidrocarburos totales del petróleo en diferentes tiempos de exposición a petróleo.
4. La degradación de hidrocarburos totales del petróleo en sistema rizosférico de *Clitoria* presenta relación positiva significativa con la colonización de hongos micorrízicos arbusculares y negativa con bacterias reguladoras de crecimiento vegetal, pero esta relación es diferente según el tipo de *Clitoria* y tiempo de exposición a petróleo.

CAPÍTULO V. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología Agrícola y Ambiental del Colegio de Postgraduados Campus Tabasco, que se localiza en el municipio de Cárdenas, Tabasco, México. El experimento se desarrolló en seis etapas secuenciales: Etapa I. Etapa de campo, Etapa II. Microtúnel, Etapa III. Laboratorio y Etapa IV. Análisis estadístico (Figura 16).

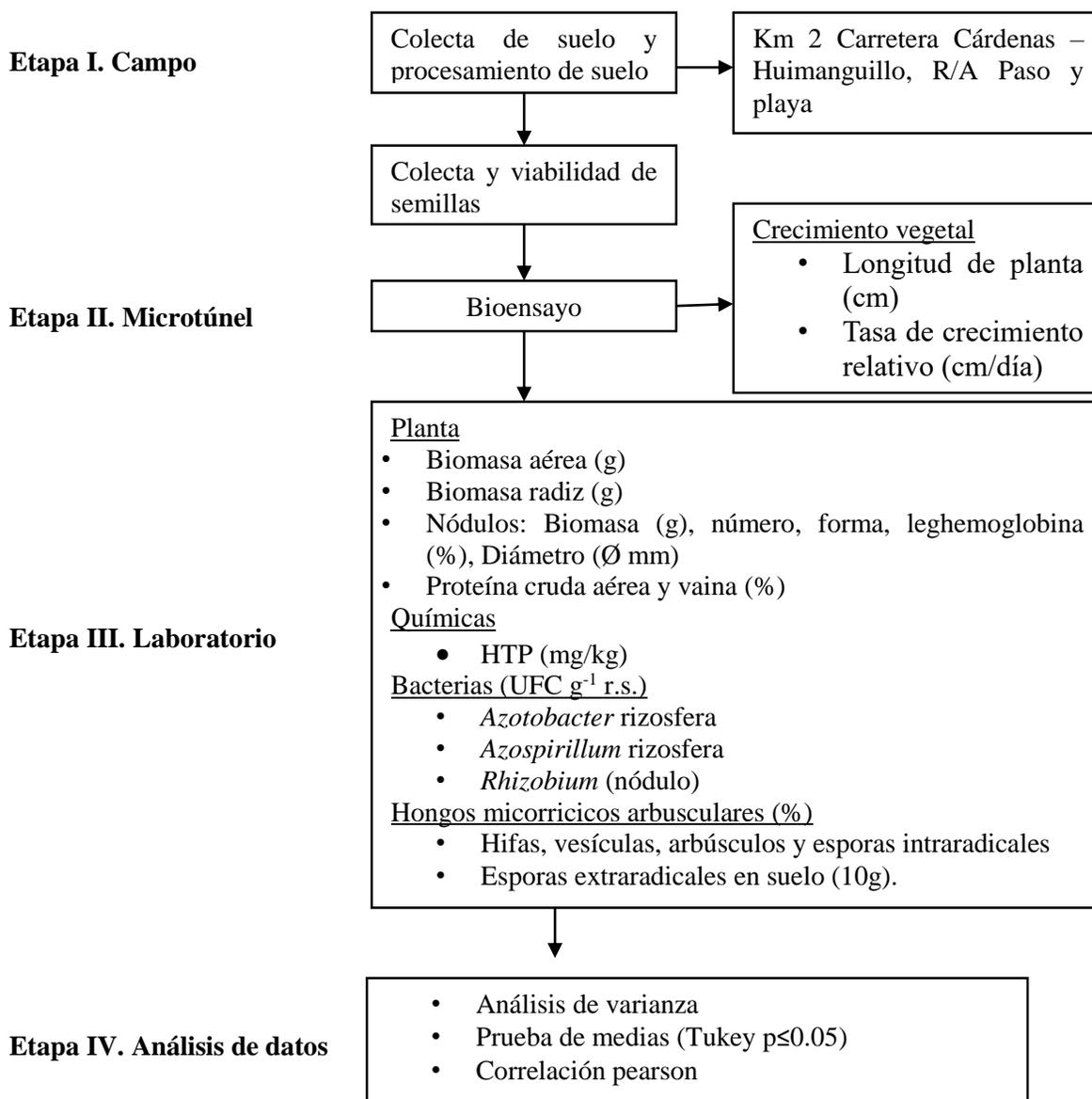


Figura 16. Flujograma del proceso de investigación.

5.1. Etapa I. Campo

5.1.1. Colecta de suelo y procesamiento de suelo

Un suelo Gleysols sin impacto de contaminación fue colectado en el ejido Paso y playa, municipio de Cárdenas, Tabasco (UTM: 0461719 y 1985998 15 Q). El suelo (800 kg) fue colectado en marzo 2019 desde un punto en el horizonte superficial (0-30 cm). El suelo fue secado bajo techo, se tamizó a través de malla (5 mm abertura) y se determinó las propiedades químicas de una muestra compuesta antes de establecer la mezcla con diferentes concentraciones de petróleo fresco. Las propiedades del suelo no contaminado fueron: Textura arcilloso (método del hidrómetro; Bouyoucos 1962); pH moderadamente ácido (6.4); contenido de materia orgánica extremadamente rico (6.5%) (Walkley and Black, 1934); N inorgánico alto (55 ppm) (micro-Kjeldahl, arrastre de vapor, DOF, 2002); capacidad de intercambio de cationes baja (9.62 cmol/kg) (método acetato de amonio 1N pH 7.0, DOF, 2002).

5.1.2. Características, colecta de *Clitorias* y viabilidad de semillas

Clitoria sp y *Clitoria ternatea* L. fueron seleccionadas; la primera por ser una especie que crece silvestre en área de influencia de las emisiones particuladas y gaseosas de la fosa de quema de la Batería Paredón, Ranchería Los Naranjos, 1a. sección, Huimanguillo, Tabasco, mientras que la segunda fue colectada en el municipio de Acayucan Veracruz en donde se utiliza como fuente de proteína para el ganado bovino. Se colectó semilla de las dos especies y se transportaron al campo experimental del Colegio de Postgraduados, ubicado en H. Cárdenas, Tabasco México para su multiplicación bajo condiciones controladas y producir la semilla a utilizar en esta investigación

La morfología de las dos *Clitorias* es: planta bianual o perenne de vida corta, semiarborescente y trepadora, alcanza una altura de 60 a 70 cm. Sus tallos son finos de 0.5 a 3 m de largo, hojas pinadas de cinco a siete folíolos oblongo-lanceolados de 1.5 a 7.0 cm de largo y de 0.3 a 4.0 cm de ancho, ligeramente pubescentes. Flores simples o pareadas, con pedicelos gemelos ubicados a 180° y con forma de embudo invertido, blancas o azuladas de 2.5 a 5.0 cm de longitud. Las vainas son alargadas y planas, de 6 a 12 cm de largo y de 0.7 a 1.2 cm de ancho, con más de 10 semillas (negras, verde olivo, café o moteadas) de 4.7 a 7.0 mm de largo y 3 mm de ancho, sus raíces son fuertes y profundas (Villanueva *et al.*, 2004). Algunas diferencias

son diámetro de la base del tallo (3.14 ± 0.15 para *Clitoria* sp y 2.60 ± 0.23 para *C. ternatea*) y semillas (color café para *Clitoria* sp y negro para *C. ternatea*) (Figura 17).

La prueba de viabilidad de semillas se realizó en el laboratorio de Microbiología Agrícola y Ambiental del Colegio de Postgraduados Campus Tabasco. Las semillas de ambas especies recibieron un tratamiento de escarificación con agua caliente por inmersión (agua a 80°C por tres minutos, se retiró y se dejó secar) (Sierra, 2005).



Figura 17. Flor, fruto y semillas de *Clitoria* sp (a) y *Clitoria ternatea* (b). (Fotografía cortesía Rivera-Cruz, 2020).

5.2. Etapa II. Microtúnel

5.2.1. Suelo contaminado y designación de experimento

El petróleo crudo mediano usado en este experimento contiene similares características que indica Orocio-Carrillo *et al.* (2019): petróleo crudo mediano de 10.8° (API), gravedad específica 0.84 g cm^{-3} , 56.4, 23.7 y 14 % de fracción alifático, aromática y polares+resinas y asfaltenos, respectivamente. El petróleo se obtuvo del campo petrolero "Cinco Presidentes" La Venta, Tabasco, México ($18^{\circ} 12' 11.8'' \text{ N}$ y $94^{\circ} 08' 37.8'' \text{ O}$). En total fueron 30 tratamientos con 3 repeticiones [dos leguminosas (*Clitoria* sp, y *C. ternatea*), cinco concentraciones de petróleo (0, 3, 10, 20 y 30 g/kg) y tres tiempos de exposición a petróleo que coinciden con las fases fenológicas de la planta (crecimiento al día 30, floración al día 75, fructificación al día 120)]. Los 30 tratamientos (T) se establecieron en microtúnel a una temperatura ambiental de $34 \pm 12^{\circ}\text{C}$, pero el tiempo de permanencia fueron; 10 T por 30, 10 T por 75 y 10 T 120 días.

La inicial concentración de petróleo (g) en la unidad experimental (UE) fue de manera secuencia: 6, 20, 40 y 60 g de petróleo fresco en 2000 g de suelo seco con tamaño de diámetro de partícula de 5 mm. El suelo y el petróleo fue manualmente homogenizado con una barrilla de vidrio. Cada UE consistió de un vaso de vidrio (17.5 cm diámetro y 22.3cm alto) con 2000g de suelos seco y plantado con *Clitoria* sp o *Clitoria ternatea*. Las 90 UE con planta fueron regadas cada 24 horas con agua potable, manteniendo humedad a capacidad de campo.

5.2.1.1.Crecimiento vegetal

El crecimiento de *Clitoria* sp y *C. ternatea* fue evaluado en tres diferentes tiempos de exposición a petróleo (días 30, 75 y 120) se cuantificó longitud de planta (LP) y tasa de crecimiento relativo (TCR). La LP se midió desde la base del tallo hasta el ápice usando una regla graduada (cm). La LP fue usada para determinar la TCR, aplicando la fórmula de Morales *et al.*, 2015):

$$TCR = \frac{\ln w_2 - \ln w_1}{t_2 - t_1} \dots \dots \dots (1)$$

Donde In: logaritmo natural. w: altura (cm). t: tiempo (días)

5.3. Etapa III. Laboratorio

5.3.1. Planta

Las plantas de *Clitoria* sp y *Clitoria ternatea* fueron cosechadas a los días 30, 75 y 120 para evaluar biomasa seca aérea (BSA), radical (BSR), nódulo (BSN), flor (BFLO) y vaina (BSV), proteína cruda, además de número de nódulos (NNO), diámetro de nódulos (DNO), forma de nódulos (FNO) y leghemoglobina (LNO).

La BSR, BSA, BSN, BFLO y BSV fue cuantificada por la técnica gravimétrica después de secar las diferentes materias frescas en una estufa de aire forzado (Scorpion Scientific, A-52055) a 60°C por 72 h y pesando los materiales secos sobre una balanza semi-analítica (Ohaus, Scout Pro SP202). Los resultados se expresaron en gramos.

La proteína cruda fue evaluada a partir de biomasa seca aérea (tallo y hojas) en las tres edades de la planta (día 30, 75 y 120) y en la biomasa seca de la vaina, a 0.2 g de biomasa se le aplico digestión con ácido sulfúrico y cuantificación de nitrógeno total (N) usado método micro-Kjeldhal (Jones *et al.*, 1992). La proteína cruda se calculó con la fórmula de la AOAC (1980):

$$\% \text{ Proteína} = \frac{\text{mL HCl} \times \text{N} \times 1.4}{\text{PM}} \times 6.25 \dots \dots \dots (2)$$

Donde mL: Volumen de ácido clorhídrico utilizado para titular la muestra. N: Normalidad del ácido clorhídrico. PM: Peso de la muestra en gramos.

El NNO se contó de manera directa, se separaron manualmente los nódulos de cada raíz y se contaron. El DNO fue medido en el centro horizontal del nódulo usando un vernier (Mitutoyo, Modelo 500-196-30) (mm). La presencia de nódulos viables (con leghemoglobina, LNO) se determinó de manera visual en una población de 30 nódulos al azar (presencia de color marrón-rojizo) según Weaver y Frederick (1982). Forma de nódulos (FNO); Globoso (A), cilíndrico (B), ramificado (C), abanico (D) y rugoso (E), se determinó de manera visual según la clasificación de Chmelfíková y Hejzman (2012), se usó el total de nódulos en cada tiempo de exposición para evaluar el porcentaje de formas.

5.3.2. Microorganismos

5.3.2.1. Población de *Rhizobium* y bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre

Se evaluaron al día 30, 75 y 120 las poblaciones de *Rhizobium* en nódulo, bacterias de vida libre fijadoras de N₂ de los géneros *Azotobacter* y *Azospirillum* rizosféricos, mediante la técnica de cuenta viable por dilución seriada en medios de cultivos específicos (Madigan *et al.*, 2015).

Para la determinación de bacterias de *Rhizobium*, los nódulos fueron procesados utilizando la metodología de Somasegaran y Hoben, 1994. La desinfección de los nódulos se realizó por inmersión sucesiva en etanol al 95% por 1 min, hipoclorito de sodio al 3% por 3 min y finalmente se lavaron cinco veces con agua estéril. Se depositó 1 g de nódulos lavados y desinfectados, en un frasco pequeño con 9 mL de agua estéril y se maceraron con una varilla de vidrio. De cada frasco se tomó 100 µL de la suspensión y se crecieron en medio levadura manitol agar más rojo Congo (ELMA+RC): 10 g manitol, 0.5 K₂HPO₄, 0.2 g MgSO₄·7H₂O, 0.1 g NaCl, 0.3 g CaCO₃, 0.5 g extracto de levadura, 18 g de agar, 15 mL de rojo Congo y 1000 mL de agua destilada. Ajustando a un pH de 7.

Para la determinación de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre del género *Azospirillum* y *Azotobacter*, se pesaron 10 g de suelo, se suspendió en 90 ml de agua estéril y se agitó por 15 minutos con movimientos horizontales. La dilución seriada se realizó tomando un mililitro

del frasco con la solución de suelo previamente homogenizado, este se colocó en el primer tubo de ensayo y se agitó con el agitador tipo bortex; posteriormente de este tubo se tomó un mililitro y se agregó al siguiente tubo de ensayo, repitiendo esta operación hasta la dilución deseada. Del tubo de ensayo se tomó 100 μ L de la suspensión y se crecieron en:

Medio de cultivo rojo Congo para *Azospirillum*: 0.5 g ácido málico, 0.5 g K_2HPO_4 , 0.2g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1 g NaCl, 0.5 g extracto de levadura, 0.015 g de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 4.8 g KOH, 15 mL rojo Congo, 20 g de agar y 1000 mL de agua destilada (Reinhold *et al.*, 1987).

Medio cultivo Ashby para *Azotobacter*: 20 g manitol, 0.2 g K_2HPO_4 , 0.2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2 g NaCl, 0.1 K_2SO_4 , 5 g $CaCO_3$, 15 g de agar y 1000 ml agua destilada (Döbereiner *et al.*, 1976).

5.3.2.2. Hongo micorrícico vesículo arbuscular

Los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) se evaluaron en raíces secundarias de *Clitoria* sp y *C. ternatea* al día 30, 75 y 120 de exposición a petróleo. La técnica para determinar la colonización de estructura intraradicales del HMA fue por clareo y tinción propuesta por Phillips y Hayman (1970), que consistió en los siguientes pasos; las raíces se lavaron con agua sobre un tamiz de tamaño tal que no dejara pasar las raíces, para eliminar todo el suelo adherido, se seleccionaron 20 segmentos de aproximadamente 1 cm de largo, se colocaron en tela-gasa, envolviéndolas para evitar su dispersión, se colocaron en un vaso de precipitados al que se agregó KOH al 10%, en cantidad suficiente para cubrirlas durante 48 horas a temperatura ambiente. Después de cada exposición el KOH se eliminó y las raíces se enjuagaron con agua destilada, las raíces se cubrieron con peróxido de hidrogeno (H_2O_2) al 3% y se dejó por 10 min, se retiró el H_2O_2 y se enjuagó inmediatamente con agua destilada; con el fin de remover todos los residuos de H_2O_2 se agregó HCl al 10% por 5 min, se enjuago con agua destilada y se colocaron en un vaso de precipitados donde se le adicionó el colorante azul tripano en lactoglicerol al 0.05% por 48 horas. Los 20 segmentos de raíz (1 cm de largo) clareadas y teñidas se colocaron en portaobjetos, sobre las raíces se adicionaron gotas de lactoglicerol para su observación a 40X en microscopio en un total de 30 campos por unidad experimental. El porcentaje de colonización se determina a partir de la siguiente fórmula (Serralde y Ramírez, 2004):

$$\% \text{ Colonización} = \frac{\text{no. de intersecciones micorrizadas}}{\text{no. de intersecciones observadas}} \times 100 \dots\dots\dots (4)$$

5.3.2.3. Esporas extraradicales

La extracción de esporas del suelo se realizó mediante la metodología usada por Gerdemann y Nicolson (1963), más centrifugación en gradiente de sacarosa (20 y 60%) (Daniels y Skipper, 1982). Se tomaron 10 g de suelo y se colocaron en un recipiente al que se le agregó 900 mL de agua y se agitó durante 40 segundos, se dejó reposar durante 30 segundos, posteriormente se vertió en tamices de 500, 149 y 44 µm, este proceso se realizó 5 veces para cada una de las muestras experimentales. Se prepararon tubos de ensayo con gradientes de sacarosa, en cada tubo se agregaron las dos soluciones de sacarosa y se dejó en reserva. Posteriormente en los tubos con el gradiente de sacarosa se vertió el contenido retenido en el tamiz de 44 µm para centrifugarlo 3800 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante obtenido se vertió en una caja Petri con agua destilada para su observación en estereoscopio (Zeiss, modelo steemi 2000) y se reporta número de esporas en 10 g de suelo.

5.3.3. Remoción de petróleo

La prueba de remoción de petróleo se realizó determinando el porcentaje de pérdida de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) en suelo al día 30, 75 y 120 respecto a los HTP iniciales. La extracción de los HTP se realizó en equipo Soxhlet (EPA, 1996), utilizando diclorometano (Fermomt) con 99.5% de pureza.

La cuantificación fue por método gravimétrico (DOF, 2006), utilizando 10 g de suelo húmedo, contenido en un dedal de papel filtro y la extracción se realizó por cinco horas, el sobrenadante se concentró en matraces con roto vapor. Los matraces con el concentrado de petróleo permanecieron por 24 horas en desecador.

La concentración de HTP residual se calculó mediante la ecuación siguiente:

$$\text{HTP (g/kg suelo seco)} = \frac{(\text{HTP g}) (1\ 000\ \text{g/kg})}{P_s\ \text{g}} \dots\dots\dots (3)$$

Donde HTP: (PM+ HTP extraídos del suelo)- (PM); PM: Peso del matraz de extracción a peso constante. Ps: peso del suelo de extracción.

5.4. Etapa IV. Análisis de datos

Los datos de las variables en estudio se les aplicó análisis de varianza (ANOVA). La homogeneización de la variación de los datos fue verificada mediante el programa estadístico del SAS, versión 8.01 (SAS, 2005). Las diferencias entre las medias de las variables crecimiento, producción, nódulos, proteína cruda y actividad simbiótica rizosférica (*Azospirillum*, *Azotobacter*, *Rizobium* y estructuras del hongo micorrízico arbusculares) fueron evaluadas con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) según el diseño experimental con arreglo factorial (5x2x3) y (2x5) tipo de *Clitoria* + dosis de petróleo (10 tratamientos) en cada tiempo de exposición para obtener las curvas dosis de petróleo-respuesta de *Clitoria* sp y *C. ternatea*. Se aplicó correlación de Pearson a degradación (HTP) respecto a variables microbiológicas (SAS, 2005).

CAPÍTULO VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Crecimiento de *Clitoria* sp y *C. ternatea* en dosis y tiempo de exposición a petróleo

La longitud de planta (LP) y tasa de crecimiento relativo (TCR) evaluadas en 30 tratamientos con *Clitoria* sp y *Clitoria ternatea* en suelo con cinco dosis de petróleo fresco, tuvieron diferencias estadísticas significativas (Tukey, $p \leq 0.05$) en la comparación de medias por efecto del tiempo de exposición a petróleo correspondientes a las fases fenológicas de crecimiento, floración y fructificación (Figura 18a). La mayor LP (115 cm) fue de *C. ternatea* al día 120 de exposición a 10 g/kg de petróleo y la menor 14.3 cm al día 30 en *C. ternatea* expuesta a 30 g/kg de petróleo. Así mismo, la mayor TCR (2.3 cm d^{-1}) fue en *C. ternatea* expuesta a 30 g de petróleo al día 75, y la menor con cero se presenta al día 120 en *Clitoria* sp y *C. ternatea* sin petróleo (T21) y *C. ternatea* (T26) con 3 g/kg petróleo (T 27) (Figura 18b).

La mayor altura y TCR de *C. ternatea* en la fase reproductiva (fase de fructificación y floración) expuesta a 10 y 30 g de petróleo crudo, muestra adaptación de esta leguminosa a condiciones de estrés inducido por la contaminación, resultados contrarios en longitud de la planta fueron reportados por Hawrot-Paw *et al.* (2015) en *Pisum sativum* L., cv. Eureka que disminuyó un 51% cuando se expuso a 20% biodiesel y 80% petróleo diésel. Sin embargo, la respuesta adaptativa de plantas has sido reportado por González-Moscoso *et al* (2019) en el pasto *L. hexandra* que al día 120 de exposición a 30 g de petróleo la LP y TCR fue estaditicamente igual al testigo. Esta respuesta adaptativa puede ser debido a que *Clitoria ternatea* responde al estrés con mecanismo de defensa para protegerse del daño, al respecto se ha observado que cuando las plantas estan sujetas a estrés abiótico inducen aumento de moléculas reactivas de oxígeno (MRO) en sus células que conducen al estrés oxidativo, y al contener altos niveles de antioxidantes constituidos o inducidos, tienen mejor resistencia al daño (Ullah *et al*, 2017). La adaptación controla los niveles de MRO por la regulación de una red de defensa antioxidantes que incluyen reacciones enzimáticas, para evitar la toxicidad celular y asegurar sus funciones de señalización como son el control de la proliferación y muerte celular (Mittler, 2002).

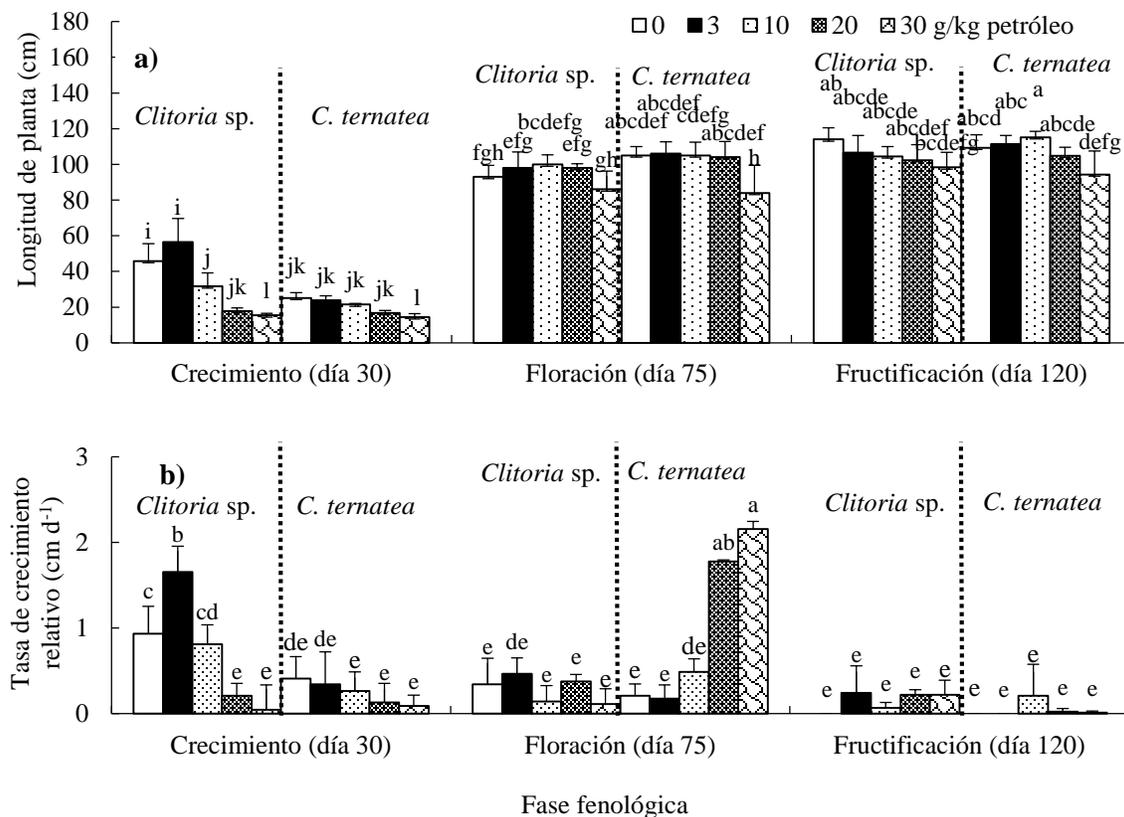


Figura 18. Longitud de planta (a) y tasa de crecimiento relativo (b) de *Clitoria sp* y *Clitoria ternatea* por dosis y tiempos de exposición a petróleo. Letras diferentes por columna indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $p \leq 0.05$, $n=4$).

6.1.1. Dosis de petróleo-respuesta del crecimiento de *Clitoria*

Los resultados en la Figura 19a muestran que después de 30 días de exposición a 3 g/kg petróleo la LP mayor (56 cm) fue en *Clitoria sp* y la menor (14 cm) en *C. ternatea* expuesta a 30 g. En este tiempo de exposición *Clitoria sp* muestra una curva dosis respuesta en forma de U-invertida con la mayor LP en 3 g de petróleo, y disminuye 31, 61 y 67% en 10, 20 y 30 g/kg petróleo respectivamente, respecto al tratamiento testigo. Sin embargo, *C. ternatea* en esta fase fenológica (día 30) muestra una respuesta inversamente proporcional a la dosis de petróleo en el suelo, siendo la mayor LP (25 cm) en suelo testigo.

Al día 75 (fase de floración) sin y expuesta a 3, 10, y 20 g de petróleo indujo la mayor LP (105, 106, 105 y 105 cm, respectivamente) de *C. ternatea*, pero expuesta 30 g disminuye un 20% respecto al tratamiento testigo de esta especie. En esta fase fenológica *Clitoria sp*

expuesta a 3, 10 y 20 g de petróleo incrementa un 4.7, 7.5 y 4.7% la LP respectivamente, pero decrece en suelos con 30 g; la curva dosis respuesta es en forma de U-invertida (Figura 19b).

Al día 120 (fase de fructificación) la mayor LP (114 cm) se obtuvo en *Clitoria* sp, y en *C. ternatea* con 111, 115 cm expuesta a 3 y 10 g de petróleo, respectivamente. *C. ternatea* en esta fase fenológica muestra una curva dosis respuesta hormética en forma de U-invertida al incrementar 1.8 y 5.2% la LP expuesta a 3 y 10 g, y disminuye 4 y 14% expuesta a 20 y 30 g de petróleo. Lo contrario sucede con la LP de *Clitoria* sp que expuestas a 3, 10, 20 y 30 g de petróleo disminuye 7, 9, 10 y 14 % respecto al tratamiento testigo (Figura 19c)

Al día 30 del crecimiento de la planta la TCR mayor (1.6 cm d^{-1}) fue al exponer a *Clitoria* sp a 3 g/kg de petróleo, y la TCR disminuye 13, 77 y 95% en suelo con 10, 20 y 30 g. La curva dosis respuesta hormesis en forma de U-invertida para esta fase (Figura 19d). La TCR de *C. ternatea* disminuye conforme la dosis de petróleo incrementa en el suelo. Diferente respuesta se observa al día 75 de exposición a petróleo (fase de floración) en *C. ternatea* con una curva dosis respuesta en forma de J, pero *Clitoria* sp disminuye la TCR hasta la dosis de 20 g e incrementa expuesta a 30 g, con una curva irregular (Figura 19e). Al día 120 de exposición a petróleo la TCR de *Clitoria* sp incrementa ligeramente respecto al testigo en suelo con las cuatro dosis de petróleo, pero *C. ternatea* dosis de 10 g de petróleo inducen incremento, formando una curva dosis respuesta ligera en forma de U-invertida (Figura 19f).

La respuesta en LP y TCR se observó que ha concentraciones bajas de 3 y 10 g/kg de petróleo, generaron un aparente proceso de hormesis, donde se induce un estímulo en el crecimiento de *Clitoria* sp. y *C. ternatea*. El efecto de hormesis inducida por hidrocarburos del petróleo en plantas, ha sido reportada por diversos autores (González-MoscOSO *et al.*, 2017; Pernía *et al.*, 2018; Orocio-Carrillo *et al.*, 2019). Se ha propuesto que este estímulo en el crecimiento puede deberse a que las plantas responden al estrés con mecanismos de defensa, provocado por cambios metabólicos intracelulares o mecanismos de control fisiológico que les permite tener mejor resistencia al daño (Abha y Swaranjit-Singh, 2012; Olalekan, 2014; Pernía *et al.*, 2018).

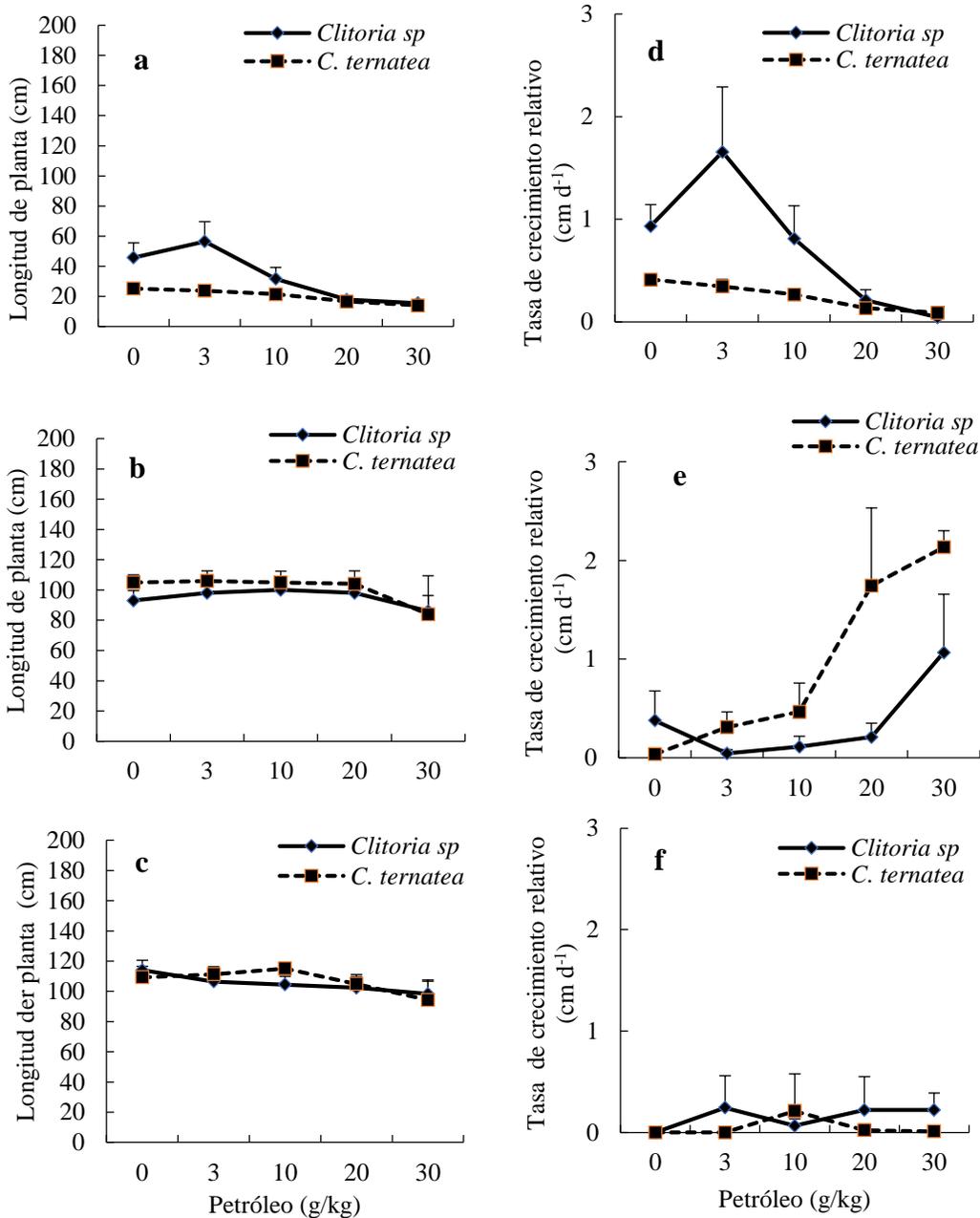


Figura 19. Tendencia de longitud de planta al día 30 (a), 75 (b) y 120 (c), y tasa de crecimiento relativo al día 30 (d), 75 (e), 120 (f) de *Clitoria sp* y *C. ternatea* expuesta a petróleo.

6.2. Biomasa vegetal seca de *Clitoria* sp y *C. ternatea* en dosis y tiempo de exposición a petróleo

La biomasa seca radical (BSR) y aérea (BSA) evaluadas en 30 tratamientos integrados con *Clitoria* sp y *Clitoria ternatea* y cinco dosis de petróleo fresco, tuvieron diferencias estadísticas significativa (Tukey, $p \leq 0.05$) en la comparación de medias por efecto del tiempo de exposición a petróleo (Figura 20). La mayor BSR (2.5 g) fue al día 120 en suelo sin petróleo de *Clitoria* sp y la menor (0.06g) fue al día 30 en *C. ternatea* expuesta a 30 g de petróleo (Figura 20a). La mayor BSA (38.7 g) fue al día 120 en *Clitoria* sp expuesta a 3 g de petróleo y la menor (0.03g) al día 30 en *C. ternatea* expuesta a 30 g de petróleo (Figura 20b). El decrecimiento de BSR y BSA en *Clitoria* al exponerse a petróleo, se atribuye según AL-Yemeni *et al.*, (2010) a que el petróleo afecta la fotosíntesis y el contenido de clorofila en la vegetación, lo que podría generar una baja producción de biomasa. El incremento de BSA en *Clitoria* sp en suelo con 3 g de petróleo y la disminución a dosis mayores de petróleo, se puede atribuir a que se ha demostrado que los hidrocarburos en dosis bajas no son tóxicos para las plantas e incrementan los contenidos de carbono en el suelo, mineralizándose de una manera mas rápida, poniendo a disposición de la planta nutrientes asimilables (Plice, 1948), los cuales promueven la biosíntesis de fitohormonas, como el ácido indolacético y giberelina, que estimulan el crecimiento mediante extensión celular (Lynch *et al.*, 2012).

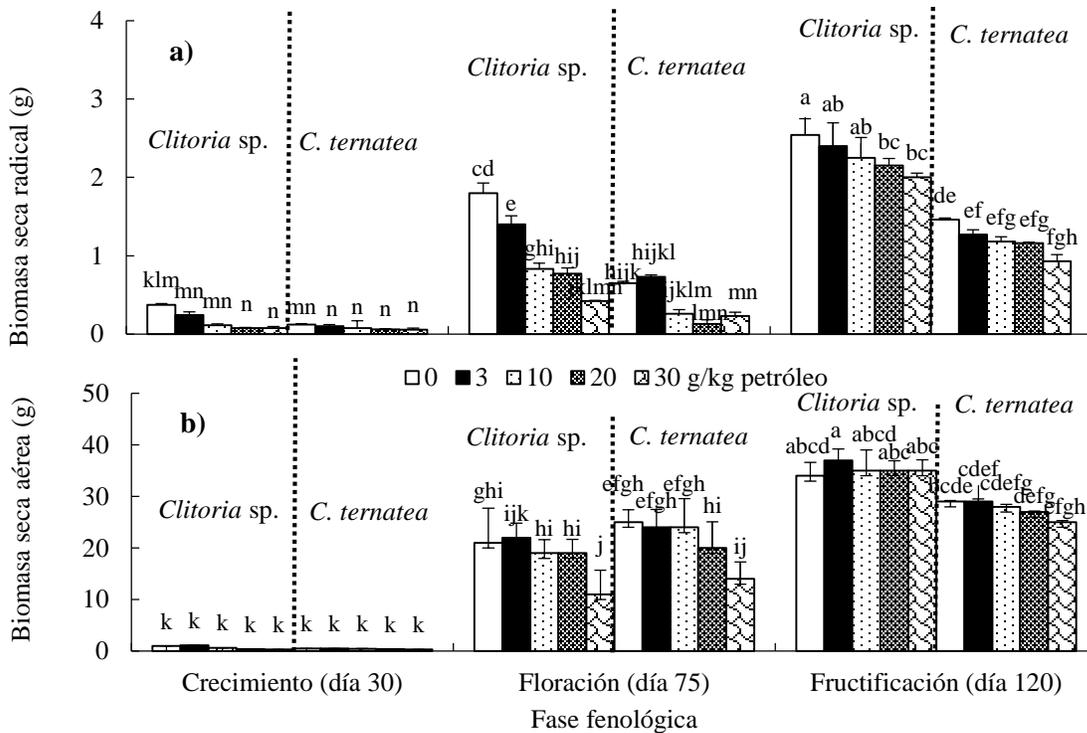


Figura 20. Biomasa seca radical (a) y aérea (b) de *Clitoria sp* y *Clitoria ternatea* según dosis y tiempo de exposición a petróleo. Letras diferentes por columnas indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $p \leq 0.05$, $n=4$).

6.2.1. Dosis de petróleo-respuesta de biomasa vegetal de *Clitoria*

Al día 30 de exposición a 3, 10, 20 y 30 g/kg de petróleo disminuye 35, 70, 79 y 79 % la BSR de *Clitoria sp*, y 16, 35, 48 y 47 % *C. ternatea* respectivamente, con dosis-respuesta inversamente proporcional para cada *Clitoria* (Figura 21a). Al día 75 y 120 la BSR disminuye en *Clitoria* (19, 47, 60 y 74%) y *C. ternatea* (16, 35, 48 y 47%) respectivamente, respecto al tratamiento testigo de cada una de ellas. La respuesta en las dos fases fenológicas para BSR de *Clitoria sp* y *C. ternatea* es inversamente proporcional a la dosis de petróleo (Figura 21b y 21c).

La disminución de BSR se atribuye a que el petróleo forma una capa cerosa sobre los agregados del suelo y en raíz, obstruyendo los poros del suelo causando un intercambio de gases deficiente y un menor flujo de agua, lo que reduce el suministro de nutrientes disponibles para la planta e inhibe la madurez fisiológica de las raíces (Rivera-Cruz *et al.*, 2004; Obayori *et al.*, 2008; Hernández-Valencia *et al.*, 2017). Si el petróleo logra penetrar en el tejido radical

de la planta puede dañar la membrana celular y afectar el intercambio de sustancias entre el interior y exterior de la célula, llegando a provocar lisis de la membrana celular y necrosis de la raíz (Figueruelo y Marino, 2004; Méndez-Natera *et al.*, 2004; Hernández-Valencia *et al.*, 2017).

Al día 30, 75 y 120 de exposición a 3 g/kg de petróleo la BSA de *Clitoria* sp incrementa 17, 4 y 8% respectivamente, pero disminuye expuesta a 10, 20 y 30 g de petróleo (entre, 33 a 67 % fase de crecimiento, (Figura 21d), (8, 10, 27 y 42 %, fase de floración, Figura 21e) y (2, 3 y 12 %, fase de fructificación, Figura 21f); la curva hormética es en forma de U-invertida en donde dosis bajas incrementan y dosis altas la disminuyen la BSA, en los tres tiempos de exposición. Resultados contrarios se observan en *C. ternatea* con mayor sensibilidad que *Clitoria* sp a la exposición a petróleo con respuesta inversamente proporcional a la dosis de petróleo en los tres tiempos de exposición.

La biomasa de flor (BFLO) de *C. ternatea* presenta una ligera curva dosis-respuesta U-invertida en donde dosis bajas (3 g) estimula solo un 3.4% y dosis altas disminuye, sin embargo, la BFLO en *Clitoria* sp se estimula 13, 11, 11 y 9% al exponerse a 3, 10, 20 y 30 g de petróleo respectivamente, respecto al testigo, se observa curva sin respuesta hormética debido a que el incremento es muy bajo con respecto al testigo (Figura 22a). La producción de biomasa de vaina (BSV) tanto en *Clitoria* sp y *C. ternatea* fue afectada negativamente por el petróleo, y se observa una curva dosis respuesta inversamente proporcional a las dosis de petróleo para las dos leguminosas (Figura 22b).

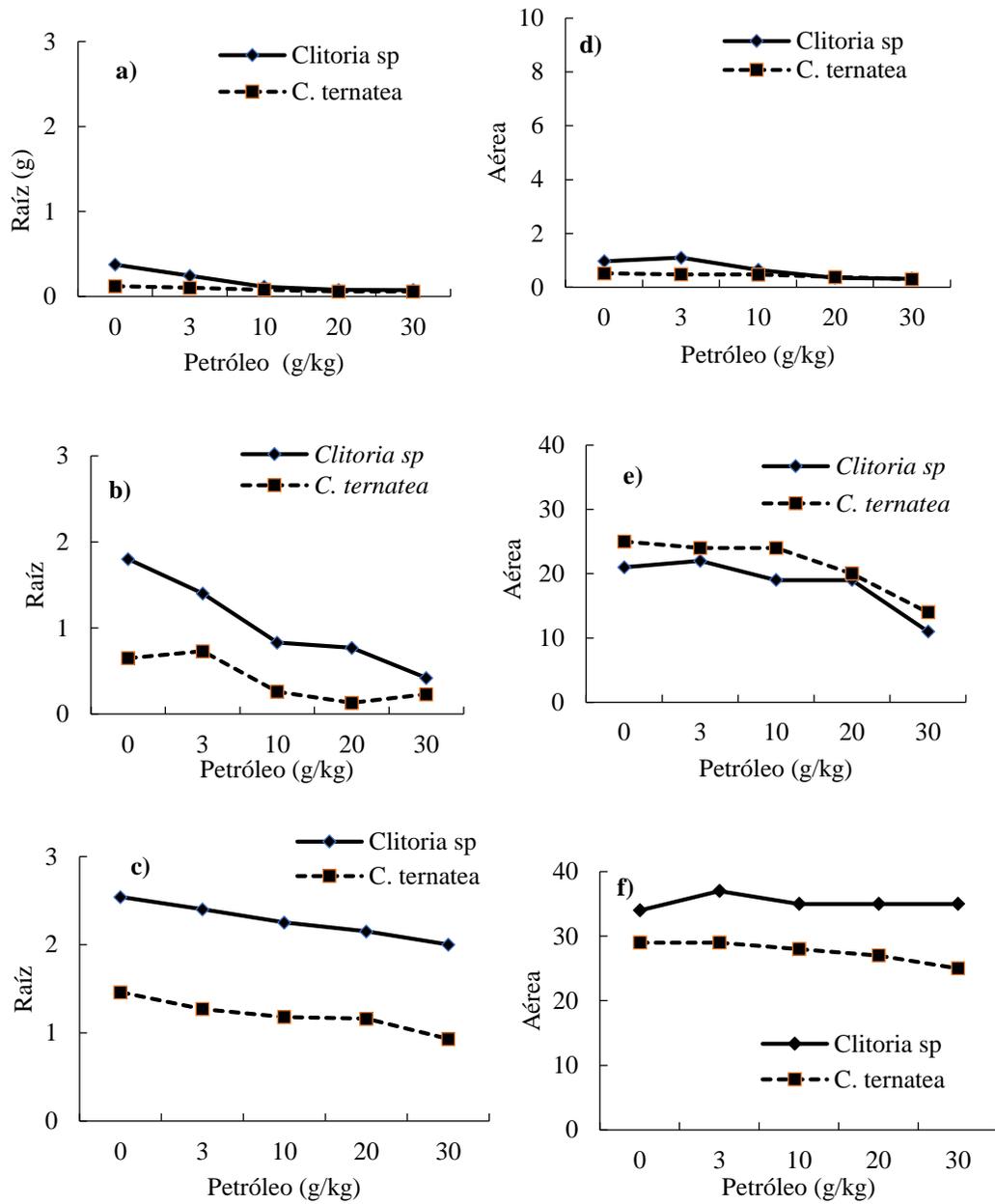


Figura 21. Tendencia de biomasa seca radical al día 30 (a), 75 (b) y 120 (c), y biomasa seca aérea día 30 (d), 75 (e), 120 (f) de *Clitoria sp* y *C. ternatea* expuesta a petróleo.

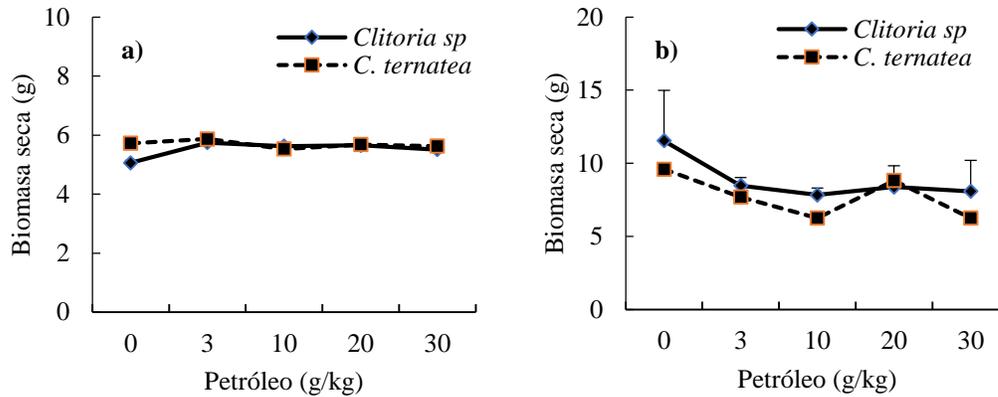


Figura 22. Tendencia de biomasa seca de flor (a) y vaina (b) de *Clitoria sp* y *C. ternatea* expuesta a petróleo.

6.3. Nódulos asociados a *Clitoria sp* y *C. ternatea* según dosis y tiempo de exposición a petróleo

La biomasa seca de nódulos (BSN), número (NNO), diámetro (DNO) y contenido de leghemoglobina (LNO) evaluados en 30 tratamientos con *Clitoria sp* y *Clitoria ternatea* plantada en suelo con cinco dosis de petróleo fresco, tuvieron diferencias estadísticas significativas (Tukey, $p \leq 0.05$) en la comparación de medias por efecto del tiempo de exposición a petróleo correspondientes al día 30, 75 y 120 día de exposición a petróleo (Figura 23).

La mayor BSN (0.41 g) fue al día 120 en *C. ternatea* expuesta a 3 g de petróleo y la menor (0.002g) al día 30 en suelo sin petróleo de *Clitoria sp* (Figura 23a). El mayor NNO (144) fue al día 120 en suelo con 30 g de petróleo y la menor (15) fue al día 30 en suelo sin petróleo en *Clitoria sp*. (Figura 23b). El mayor DNO (4.6) fue al día 120 y el menor (1.2) fue al día 30 en suelo sin petróleo de *Clitoria sp* (Figura 23c). La mayor LNO (98) fue al día 120 y la menor (23) al día 75 en suelo sin petróleo de *Clitoria sp* (Figura 23d).

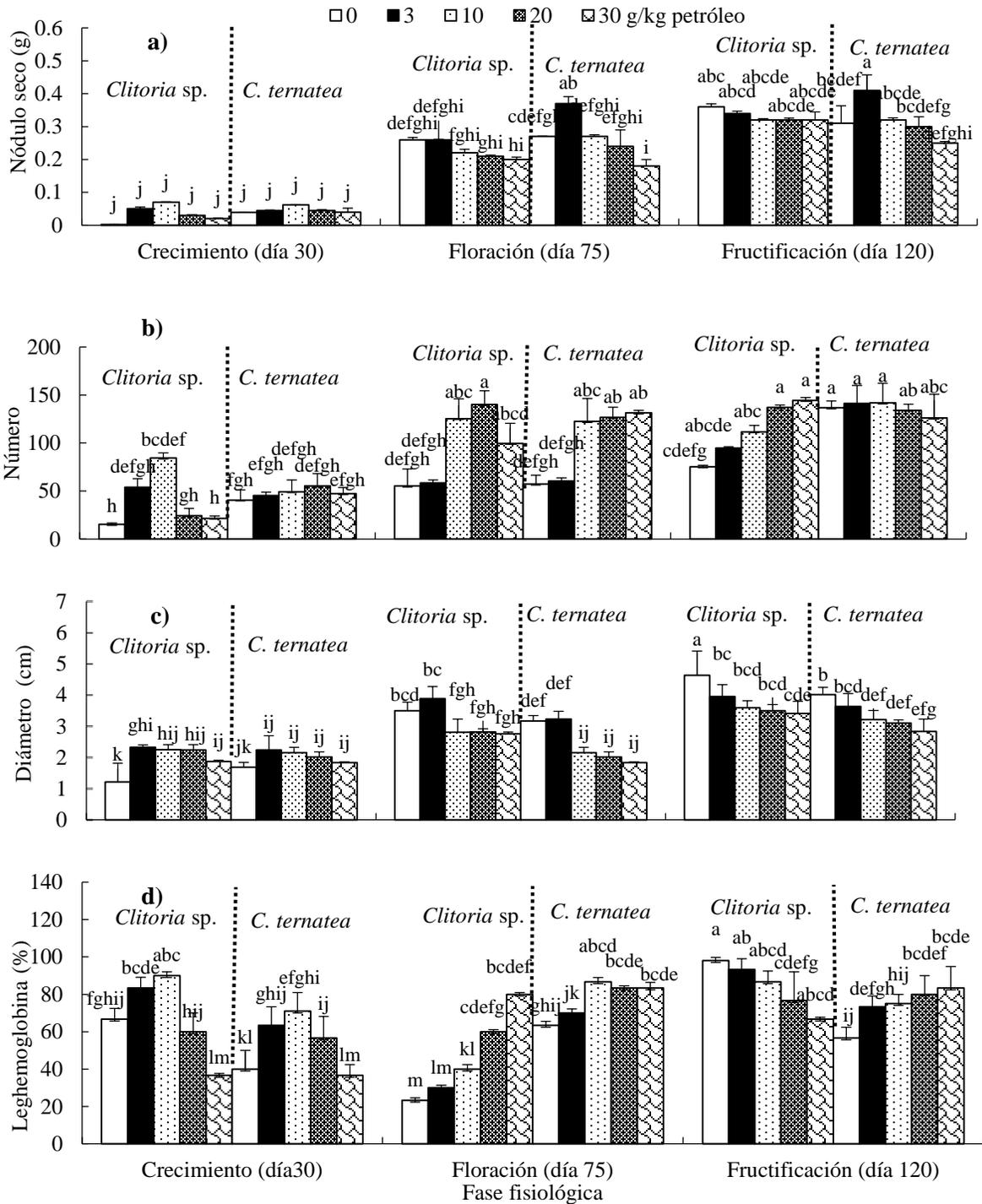


Figura 23. Biomasa seca de nódulo (a), número (b), diámetro (c) y viabilidad (d) de nódulos en *Clitoria sp* y *Clitoria ternatea* según dosis y tiempo de exposición a petróleo. Letras diferentes por columnas indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $p \leq 0.05$, $n=4$).

6.3.1. Dosis de petróleo-respuesta de nódulos asociados a *Clitoria*

La BSN en *Clitoria* sp y *C. ternatea* al día 30 de exposición a 3 y 10 g de petróleo es mayor respecto al tratamiento testigo respectivo, con curva dosis respuesta en forma de U-invertida para las dos leguminosas (Figura 24a). Sin embargo, al día 75 y 120 de exposición a petróleo la BSN en *Clitoria* sp fue inversamente proporcional a la dosis de petróleo, pero *C. ternatea* expuesta a 3 g de petróleo incrementa 27 y 24 % en fase de floración y fructificación respectivamente, formando una curva hormética en forma de U-invertida (Figura 24b y 24c). *Clitoria* sp al día 30 de exposición a 3, 10, 20 y 30 g de petróleo incrementó 48, 54, 46 y 35% el NNO, respectivamente, similar incremento 10, 17, 26 y 13.6% para *C. ternatea* en las mismas dosis respecto al tratamiento testigo; la curva dosis respuesta es en forma de U-invertida en *Clitoria* sp (Figura 24d). Al día 75 y 120 de exposición a petróleo de *Clitoria* sp y *C. ternatea* el NNO incrementa conforme la dosis del petróleo aumenta en el suelo, en la Figura 24e y 24f se observa una curva dosis respuesta en forma de J en NNO.

El DNO por efecto de la dosis de petróleo y tipo de *Clitoria* fue afectado de manera diferente según la fase fenológica. La exposición a 3, 10, 20 y 30 g de petróleo al día 30 incrementa 48, 54, 46 y 35% el DNO en *Clitoria* sp, y 25, 20, 16 y 8 % en *C. ternatea* respectivamente comparado con el tratamiento testigo, la curva dosis respuesta fue en forma de J para cada una de las especies (Figura 25a). Sin embargo, la exposición a 3 g de petróleo al día 75 incrementa 10 y 1.25% el DNO en *Clitoria* sp y *C. ternatea*, con curva dosis respuesta en forma de U-invertida (Figura 25b). Al día 120 de exposición a 3, 10, 20 y 30 g de petróleo disminuye el DNO en ambas especies; con curva dosis respuesta inversamente proporcionales (Figura 25c). La exposición al día 30 a 3 y 10 g de petróleo incrementa 30 y 40% la presencia de LNO en *Clitoria* sp, curva dosis respuesta en forma de U-invertida (Figura 25d), pero en la fase de floración esta incrementa entre 23 a 71% expuesta a las cuatro dosis de petróleo, con curva dosis-respuesta en forma de J (Figura 25e), pero *Clitoria* sp al día 120 de exposición a petróleo (fase de fructificación) la LGNO disminuye entre 5 y 32 % conforme incrementa la dosis de petróleo en el suelo (Figura 25f). El incremento del contenido de LNO en *C. ternatea* por efecto del petróleo fue notoria en las tres fases fisiológicas; (entre 29 a 43% fase de crecimiento), (11 a 24 %, fase de floración) y (22 a 32 %, fructificación); con curva dosis-respuesta hormética en forma de U-invertida al día 30 y curva en forma de J al día 75 y 120 de exposición a petróleo. Delgado *et al.*, (1994) reporta un comportamiento similar en plantas de

soja bajo estrés, atribuido a la fijación del nódulo de CO₂ necesario para la asimilación y el transporte de nitrógeno fijo. Dardanelli *et al.*, (2010) relaciona este comportamiento a que el estrés induce tensión en las plantas, y las plantas responden induciendo una respuesta de defensa.

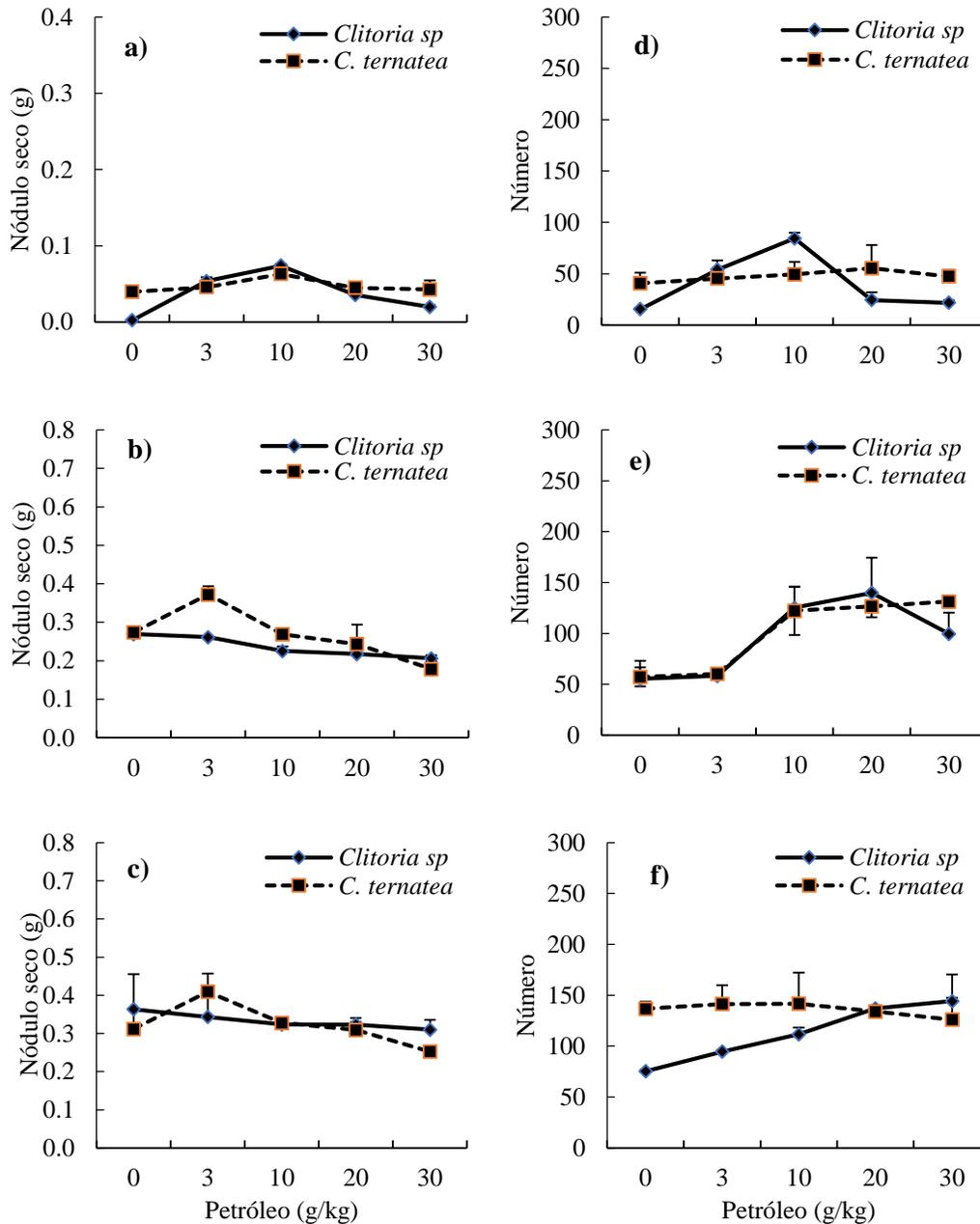


Figura 24. Tendencia de biomasa de nódulos al día 30 (a), 75 (b) y 120 (c), y número de nódulos al día 30 (d),75 (e), 120 (f) de *Clitoria sp* y *C. ternatea* expuesta a petróleo.

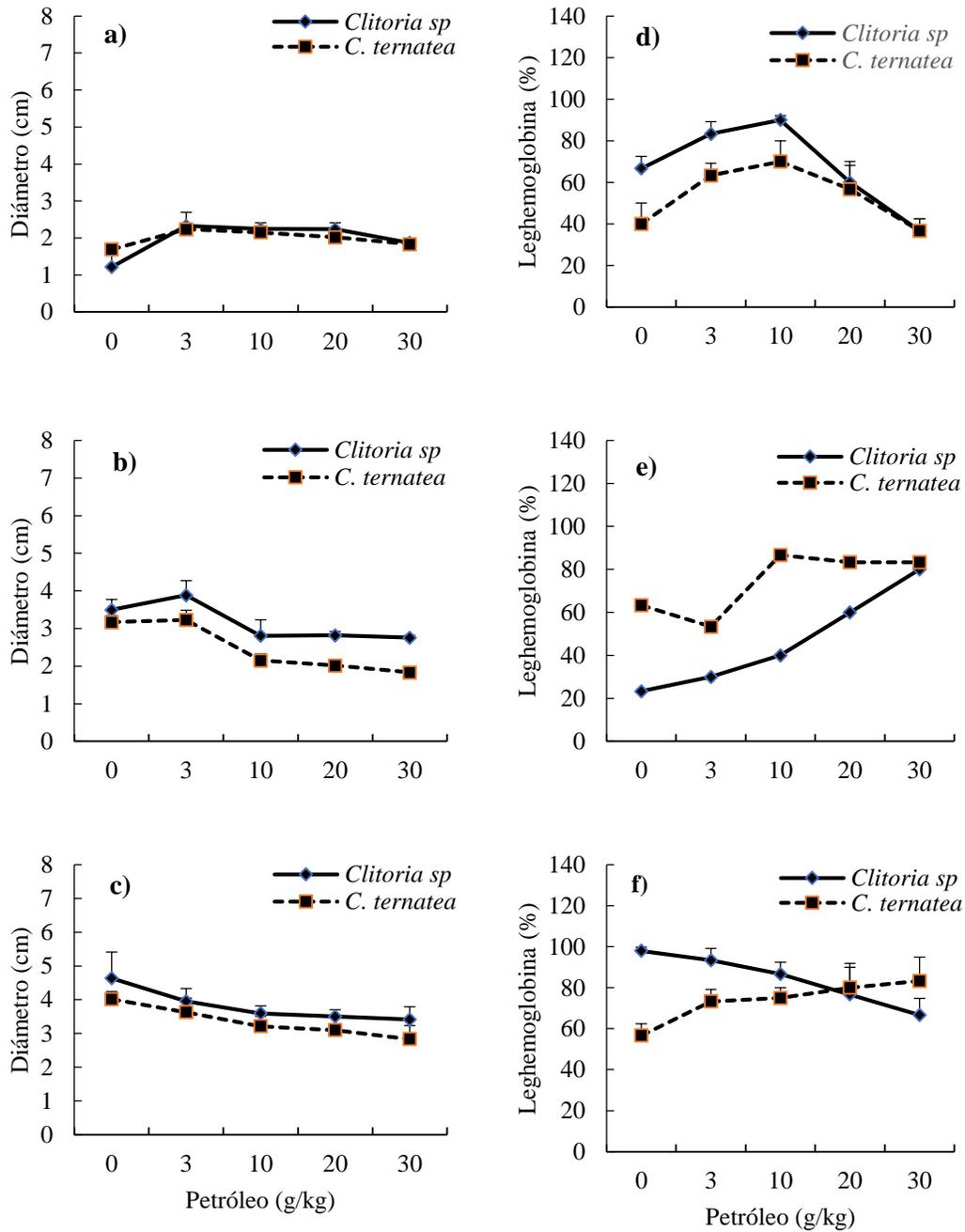


Figura 25. Tendencia del diámetro de nódulos al día 30 (a), 75 (b) y 120 (c), y Leghemoglobina en nódulos al día 30 (d), 75 (e), 120 (f) de *Clitoria sp* y *C. ternatea* expuesta a petróleo.

6.4. Forma de nódulos asociados a *Clitoria* expuesta a petróleo y fase fenológica

La media del porcentaje de nódulos globoso (A), cilíndricos (B), ramificados (C), abanico(D) y rugoso (E) (Figura 26) asociados a la raíz de *Clitoria* sp y *C. ternatea* presentaron cada uno de ellos diferencias estadísticas significativas (Tukey, $p \leq 0.05$), por efecto del tiempo de exposición a petróleo fresco. El mayor porcentaje (100) de nódulos globosos al día 30 se dió en ambas especies de *Clitoria* tanto en suelo sin y con las cuatro dosis de petróleo. Para el día 75 el mayor porcentaje (90.4) fue en *C. ternatea* expuesta a 30 g de petróleo y el menor (18.3) en *Clitoria* sp a 3 g de petróleo. Al día 120 el mayor (60) se encontró a una exposición de 30 g de petróleo y el menor (14.6) en suelo sin petróleo de *Clitoria* sp (Figura 27a).

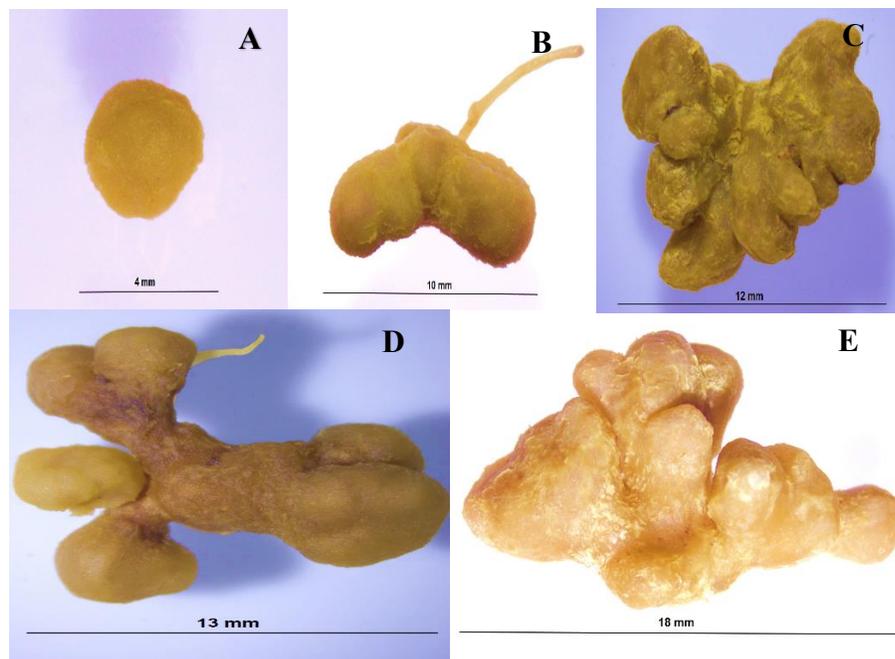


Figura 26. Formas típicas de nódulos en *Clitoria* sp y *C. ternatea*. A. Globoso, B. Cilíndrico, C. Rugoso, D. Ramificado, E. Abanico.

La presencia de nódulos cilíndricos, ramificados, abanico y rugosa solo se encontraron al día 75 y 120. La forma cilíndrica de nódulos solo se observó en *Clitoria* sp con el mayor porcentaje (39.9) al día 75 y la menor (10.2) en suelo sin petróleo al día 120 (Figura 27b).

El porcentaje de nódulos ramificados al día 75 solo se encontró en *Clitoria* sp, pero al día 120 en las dos especies. El mayor porcentaje (30) se encontró expuesta a 10g de petróleo y el menor (9.8) a 3 g de petróleo al día 120 en *C. ternatea* (Figura 27c).

La presencia de nódulos de forma abanico solo se encontraron en dosis bajas (0 y 3 g de petróleo) de ambas especies de *Clitoria* al día 75 y 120. El mayor porcentaje (43.8) se encontró en la dosis de 3 g de petróleo al día 120 y el menor (4.0) en suelo sin petróleo al día 75 en *C. ternatea* (Figura 27d).

Los nódulos rugosos se encontraron al día 75 y 120 en todas las dosis de exposición de ambas especies de *Clitoria*. El mayor porcentaje (50.5) se encontró al día 120 expuesta a 20 g de petróleo y el menor (9.6) al día 75 a 30 g en *C. ternatea* (Figura 27e).

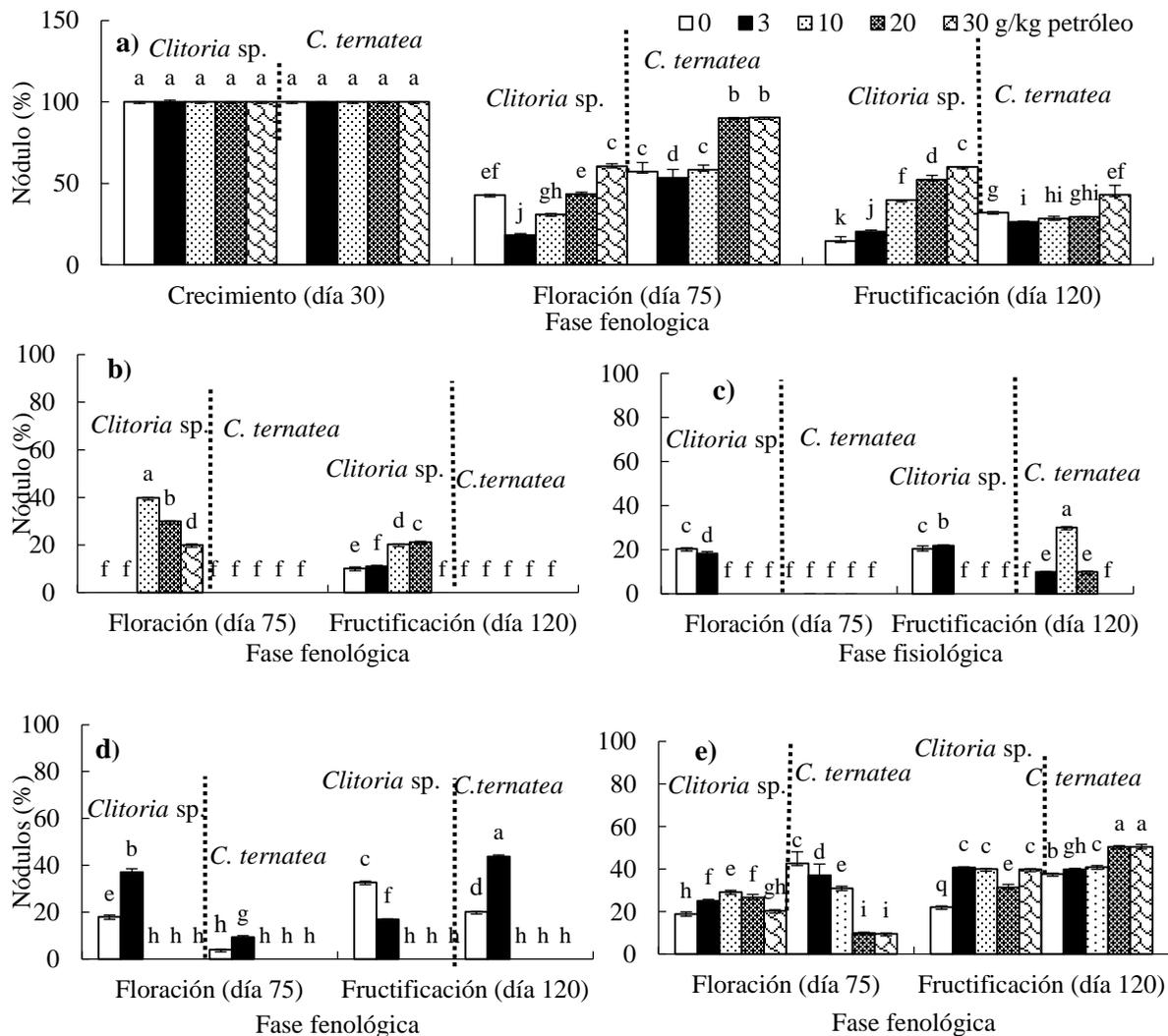


Figura 27. Forma de nódulos de *Clitoria* sp y *C. ternatea* según dosis y tiempo de exposición a petróleo. a) Globoso, b) Cilíndrico, c) Ramificado, d) Abanico y e) Rugoso. Letras diferentes por columnas indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $p \leq 0.05$, $n=30$).

6.4.1. Dosis de petróleo-respuesta de forma de nódulos asociados a *Clitoria*

La Figura 28a muestra una respuesta similar en el porcentaje de nódulos globosos en *Clitoria* sp y *C. ternatea* en suelo testigo, y expuesto a 3, 10, 20 y 30 g de petróleo al día 30. En el día 75 (Figura 28b) *C. ternatea* presenta un estímulo (1.7, 36.6 y 36.6%) en el porcentaje de nódulos globosos expuestos a 10, 20 y 30 g de petróleo, respectivamente, presenta una curva dosis respuesta en forma de J a partir de 10 g de petrolero, sin embargo al día 120 sobresale que el porcentaje de nódulos globosos se estimulan en 35, 75.5, 71 y 75% al exponerse a 3, 10, 20 y 30 g de petróleo, respectivamente, se observa en Figura 28c una curva dosis-respuesta en forma de J para *Clitoria* sp.

Los nódulos cilíndricos por su forma indefinida no se observan al día 30 de exposición al petróleo (fase de crecimiento), pero al día 75 y 120 de exposición a petróleo solo se desarrollaron en *Clitoria* sp, en la Figura 28d se observan una curvas dosis respuesta en forma U-invertida en donde 10 g de petróleo estimula un 100% el porcentaje con respecto al testigo, pero 20 y 30 g de petróleo los estimula respecto al testigo, pero los disminuye 25 y 50% respecto al suelo con 10 g de petróleo, y en la Figura 28e se observa una curva dosi-respuesta en forma de J al día 120, se estimula en 9, 50 y 53% expuesta a 3, 10 y 20 g de petróleo respectivamente.

Los nódulos ramificados no se observan en la primera fase fenológica de las dos *Clitoria*, sin embargo al día 75 el sistema radical de *Clitoria* sp plantada en suelo sin y con 3 g de petróleo desarrolla un 20 y 18% de nódulos ramificados (Figura 29a), pero al día 120 esta forma de nódulo permanece en *Clitoria* sp en similares cantidades (0 y 3 g de petróleo), y en *C. ternatea* se establecen en el sistema radical expuesto a 3, 10 y 20 g de petróleo, con una curva dosis-respuesta en forma de U-invertida con un mayor porcentaje (36%) en 10 g de petróleo, 10 y 10% expuesta 3 y 20 g (Figura 29b).

Nódulos en forma de abanico no se observan en la fase de crecimiento de *Clitoria*. Al día 75 y 120 de exposición a petróleo se desarrollan nódulos en forma de abanico en las dos *Clitorias*, sin embargo, la respuesta hormética es diferente, al día 75 la exposición a 3 g de petróleo estimula (51.3%) esta forma de nódulos en *Clitoria* sp (Figura 29c), pero al 120 se estimula (54.5%) en *C. ternatea* expuesta a 3 g de petróleo (Figura 29d). En los dos sistemas radicales

el porcentaje de nódulos con forma abanico presentan una curva dosis-respuesta en forma de U-invertida.

Nódulos en de forma rugosa se establecen solo al día 75 y 120 del desarrollo de *Clitoria* sin y expuesta a petróleo. Al día 75 el sistema radical de *Clitoria* sp expuesto a 3, 10, 20 y 30 g de petróleo estimula esta forma de nódulos, genera una curva hormetica en forma de U-invertida en donde el porcentaje mayor (29%) es en el suelo con 10 g siendo menores a este valor en suelo con 3, 20 y 30, pero mucho menor respecto al suelo testigo (Figura 29e). Al día 120 (Figura 29f) se distingue que la tendencia del porcentaje de nódulos con respecto a la exposición a petróleo incrementa en raíz de *Clitoria* sp y *C. ternatea*, con curva dosis-respuesta en forma de J. Los estímulos en el porcentaje de nódulos rugosos en *Clitoria* sp fueron 46, 45, 45, 45% y en *C. ternatea* 5, 7.3, 25 y 25 % expuestos a 3, 10, 20 y 30g de petróleo.

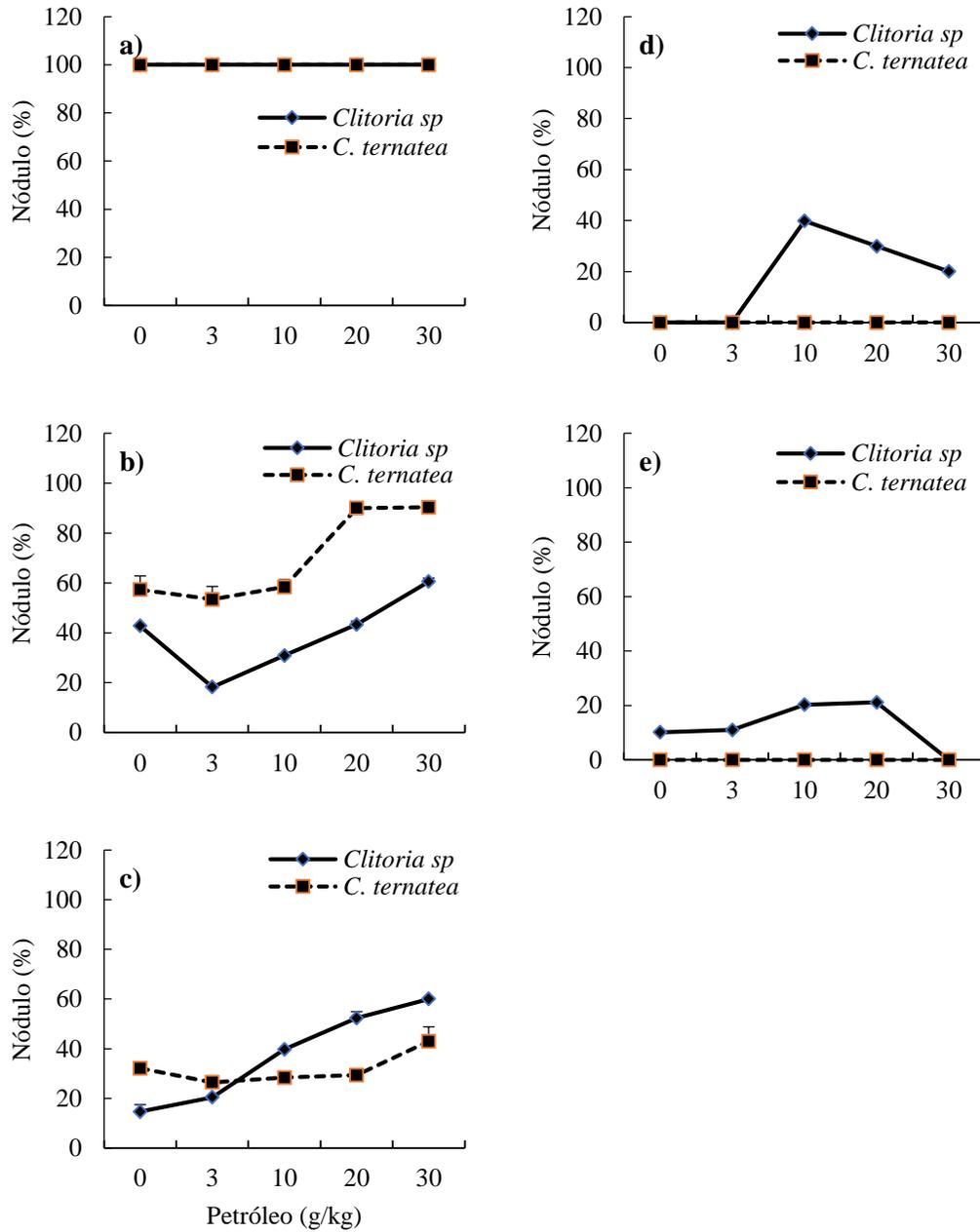


Figura 28. Tendencia de forma de nódulos globosos al día 30 (a), 75 (b) y 120 (c), cilíndrica al día 75 (d) y 120 (e) de *Clitoria sp* y *C. ternatea* expuesta a petróleo.

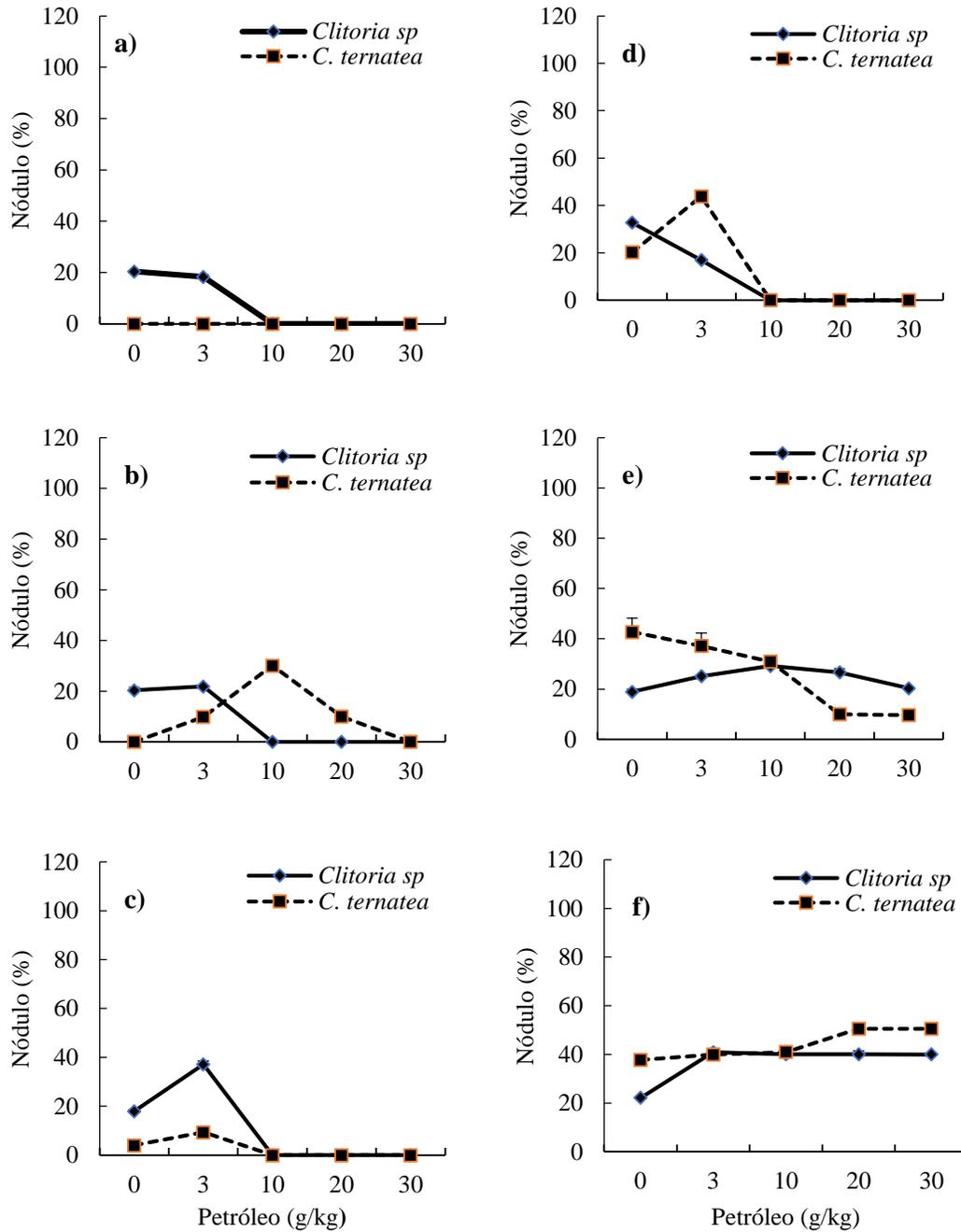


Figura 29. Tendencia de la forma de nódulo ramificado día 75 (a), 120 (b), abanico al día 75 (c) y 120 (d), y rugosa al día 75 (e) y 120 (f) de *Clitoria sp* y *C. ternatea* expuesta a petróleo.

6.5. Proteína cruda aérea y vaina de *Clitoria* expuesta a petróleo por fase fenológica

La proteína cruda aérea evaluadas en 30 tratamientos con *Clitoria* sp y *Clitoria ternatea* en suelo con cinco dosis de petróleo fresco, tuvieron diferencias estadísticas significativas (Tukey, $p \leq 0.05$) en la comparación de medias por efecto del tiempo de exposición a petróleo correspondientes a las fases fenológicas de crecimiento, floración y fructificación (Figura 30a). El mayor porcentaje de proteína cruda aérea (20.9%) fue al día 75 en *C. ternatea* expuesta a 3 g de petróleo y la menor (9.1%) al día 30 en *Clitoria* sp a 30 g de petróleo. Los valores medios de la proteína cruda en vaina de *Clitoria* por efecto de la dosis de petróleo evaluada en 10 tratamientos resentaron diferencias estadísticas significativas (Tukey, $p \leq 0.05$). La mayor acumulación de proteína cruda en vaina (21.2 g) fue en *C. ternatea* en suelo sin petróleo y la menor (13.9 g) en suelo con 30 g de petróleo en ambas especies de *Clitoria* (Figura 30b)

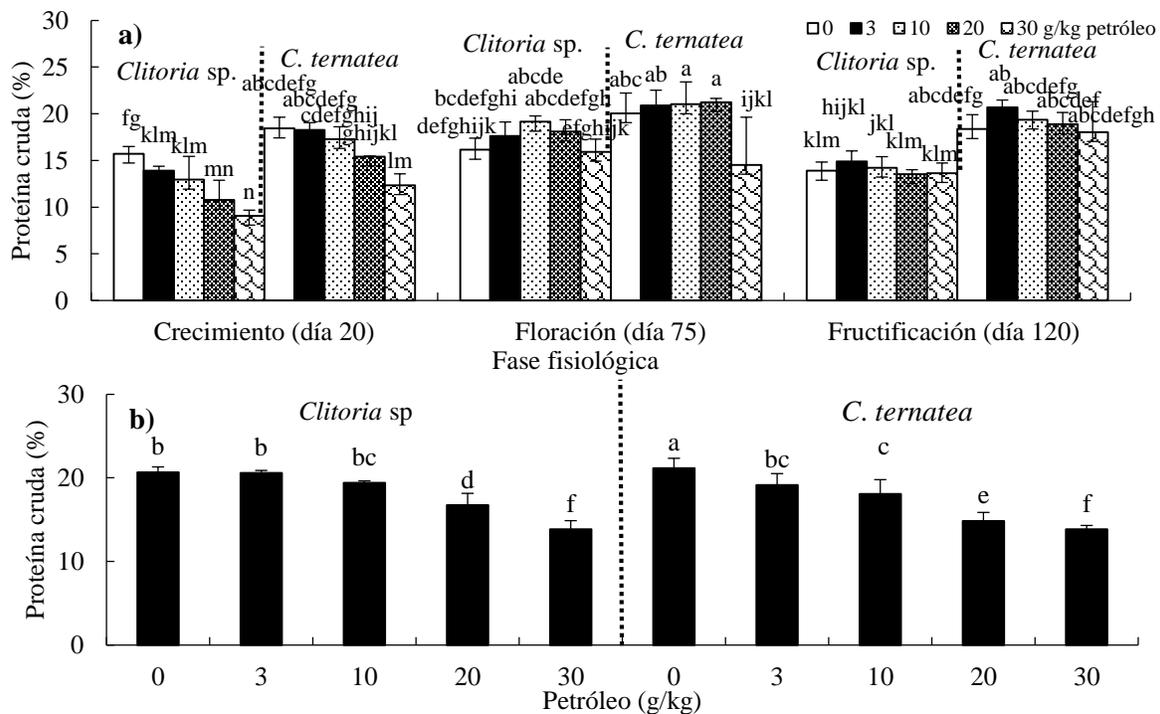


Figura 30. Acumulación de proteína cruda en biomasa aérea (a) y vaina (b) de *Clitoria* sp y *Clitoria ternatea* según dosis y tiempo de exposición a petróleo. Letras minúsculas diferentes indican que los valores son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$, $n=4$).

6.5.1. Dosis de petróleo-respuesta de proteína cruda en *Clitoria*

La respuesta de la acumulación de proteína cruda aérea a la exposición de petróleo, al día 30 fue inveramente proporcional a la dosis de petróleo en las dos especies de *Clitoria* (Figura 31a). Al día 75 la acumulación de proteína cruda aérea incrementa 8.5, 15.7, 10% en *Clitoria* sp y 4.6, 4.7 y 5.6% en *C. ternatea* expuestas a 3, 10 y 20g de petróleo, respectivamente, la curva dosis respuesta para *Clitoria* sp es en forma U-invertida en donde dosis de 10 g de petróleo inducen el punto mayor en la curva, pero es menor en 20 g de petróleo y siendo inferior al testigo en 30 g de petróleo. Sin embargo, en *C. ternatea* la curva dosis respuesta tiende a subir ligeramente en las diferentes dosis de petróleo (Figura 31b). Al día 120 (fase de fructificación) la acumulación de proteína cruda aérea muestras para *Clitoria* sp una curva dosis-respuesta es en forma de U-invertida en donde los puntos mayores se observan en 3 y 10 g de petróleo, sin embargo, en *C. ternatea* la proteína se incrementa expuesta a 3,10 y 20 g de petróleo, la curva dosis-respuesta en forma de U-invertida con el punto mayor al exponerse a a 3 g de petróleo y baja en dosis de 10 y 20g, pero son valores mayores respecto al testigo (Figura 31c).

El contenido de proteína cruda en vaina de *Clitoria* sp y *C. ternatea* presentó sensibilidad a la exposición a petróleo, se observa en la Figura 31d una curva dosis respuesta inversamente proporcional, conforme la dosis de petróleo incrementa en el suelo el porcentaje de proteína disminuye.

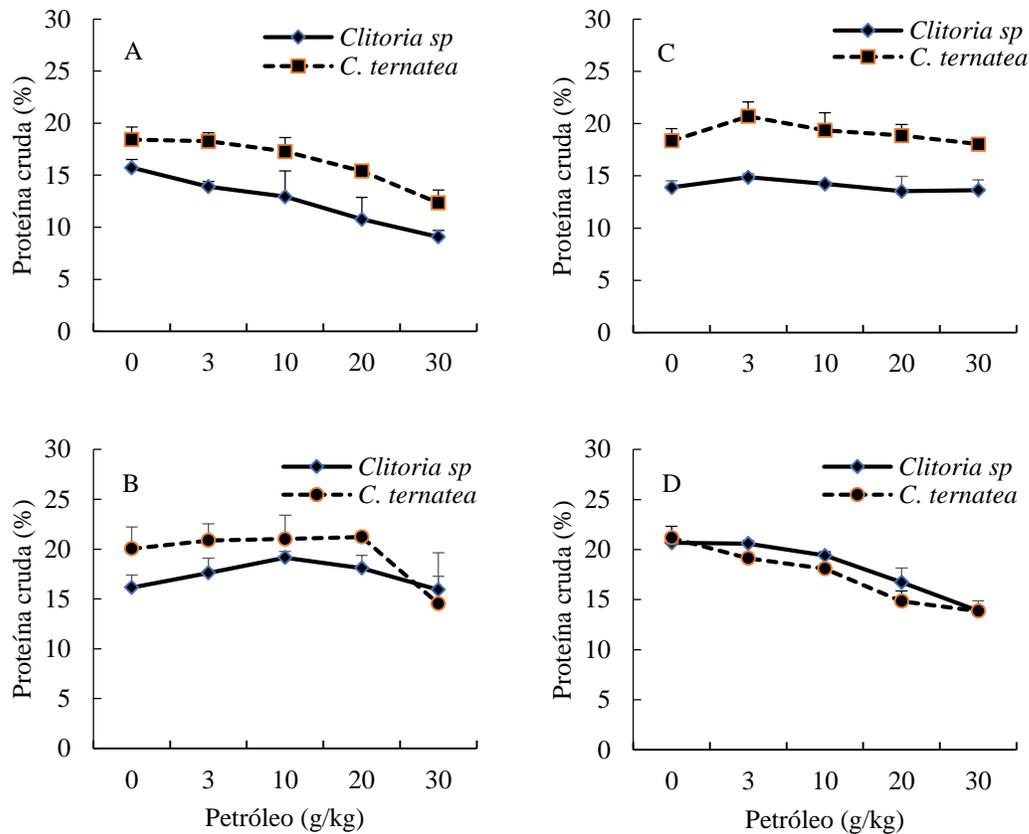


Figura 31. Tendencia de proteína cruda aérea al día 30 (a), 75 (b) y 120 (c), y proteína en vaina (d) acumulada en *Clitoria sp* y *C. ternatea* expuesta a petróleo.

6.5. Efecto de *Clitoria* en el crecimiento, producción y nódulos según dosis y tiempo de exposición a peteróleo

En el Cuadro 5 se observa que las dos leguminosas presentan incremento respecto a la etapa de crecimiento en 11 parámetros de producción, nódulos y proteína cruda por efecto del tipo de *Clitoria* según los tiempos de exposición a petróleo. *Clitoria sp* se distingue en que al día 120 en ocho parámetros de 17 evaluados en planta fueron mayores, respecto a *C. ternatea* que solo en cinco sobresale el promedio. Los parámetros que son mayores *Clitoria sp* mayores son: longitud de planta (105 g), biomasa seca raíz (2.28), biomasa seca aérea (35.8 g), biomasa seca de nódulos (.33 g), biomasa seca de frutos (8.86 g), diámetros de nódulos (3.8 cm), Leghemoglobina (88.7%) y proteína cruda en vaina (18%). *C. ternatea* al día 75 cinco parámetros evaluados tienen un mayor promedio (TCR, BFLO, NNO, nódulo en forma de abanico y proteína cruda aerea), pero *Clitoria sp* solo dos (nódulos cilíndricos y en forma

abanico). Al día 30 de exposición a petróleo la forma de nódulo globoso fue estadísticamente igual en las dos leguminosas.

Considerando lo anterior, *Clitoria* sp entre mayor es el tiempo de exposición a petróleo presenta respuesta positiva, y también mostró una mayor bioestimulación de la degradación de hidrocarburos totales del petróleo (Figura 34), esto se explica por lo que informan Arias-Trinidad *et al* (2017) y Alarcón *et al* (2019) que después de un tiempo determinado el suelo con petróleo presenta menor toxicidad para las leguminosas debido a que se degrada por la presencia del sistema rizosférico.

Cuadro 5. Efecto de *Clitoria* en crecimiento, producción, nódulos y proteína por tiempo de exposición a petróleo.

	<i>Clitoria</i> sp			<i>Clitoria ternatea</i>		
	Tiempo de exposición a petróleo (Día)					
	30	75	120	30	75	120
Longitud de planta (cm)	33.5c	98.8b	105a	20.3d	96.6b	107a
Tasa de cre. relativo (cm d ⁻¹)	.73ab	.36bc	.15c	.20c	.93a	.05c
Biomasas seca raíz (g)	.177d	1.05b	2.28a	.08d	.45c	1.2b
Biomasas seca aérea (g)	.68e	18.4d	35.8a	.43e	21.5c	27.7b
Biomasa seca nódulo (g)	.04c	.23b	.33a	.05c	.26b	.32a
Biomasas seca flor (g)	ND	5.5.b	ND	ND	5.7a	ND
Biomasas seca fruto (g)	ND	ND	8.86a	ND	ND	7.72b
Número de nódulos	38c	96b	113b	46c	267a	113b
Diaméto de nódulos (cm)	1.97d	3.15b	3.8a	1.98d	2.47c	3.36b
Leghemoglobina (%)	67b	39%	88.7a	53.3c	74b	70.6b
Nódulos globoso (%)	100a	39.2c	37c	100a	56b	33.4c
Nódulos cilindrico (%)	0c	17.9a	10b	0c	0c	2c
Nódulos ramificados (%)	0c	7.9ab	8.3ab	0c	1.96bc	9.9a
Nódulos abanico (%)	0c	11a	9.8b	0	11a	12.8a
Nódulo rugoso (%)	0d	24c	34 b	0	31.9b	41.9a
Proteína cruda aérea (%)	12.48d	17.38bc	13.9d	16.3c	19.5a	19ab
Proteína cruda en vaina (%)	ND	ND	18a	ND	ND	17b

Letras minúsculas por hileras son estadísticamente diferentes (Tukey ≤ 0.05 , n=9).

6.6. Población de bacteria de vida libre asociadas a *Clitoria* según dosis y tiempo de exposición a petróleo

La población de bacterias de los grupos *Azotobacter* sp y *Azospirillum* sp presentan diferencias estadísticas significativas entre las medias de tratamientos (Tukey $p \leq 0.05$) por efecto de la dosis de petróleo, tipo de *Clitoria* y tiempo de exposición o fase fenológica (Cuadro 6). La mayor población de *Azotobacter* (818×10^2 UFC g⁻¹ r.s) se observa al día 30 en

suelo expuesto a 10 g de petróleo y la menor (0.1×10^2 UFC) al día 120 en suelo de *C. ternatea* expuesto a 30 g de petróleo. Según Jhon *et al.* (2011) reportan que la contaminación por hidrocarburos en concentraciones menores de 4 g de petróleo favorece el aumento de la población de bacterias del género *Azotobacter*. El aumento a dosis superiores de 4 g puede atribuirse a actividades biológicas en el suelo como la producción de compuestos como el ácido fenólico, ésteres y ácidos grasos, que pueden estar favoreciendo a la comunidad metabólicamente activa (Logeshwaran *et al.*, 2018; Girigiri *et al.*, 2019)

La mayor población de *Azospirillum* (201×10^2 UFC g^{-1} r.s) se logró en *Clitoria* sp en suelo sin petróleo al día 30, en contraste, la menor (0.8 y $.9 \times 10^2$) fue en rizosfera de *Clitoria* sp expuesta a 3 g de petróleo y *C. ternatea* al día 75 de exposición a 30 g de petróleo. El aumento de población de *Azospirillum* al día 30, primera fase fenológica según Muratova *et al.* (2010) puede estar relacionadas con el enriquecimiento del suelo con nitrógeno adicional y a la actividad fitohormonal de *Azospirillum* y, el incremento en la última fase por el aumento selectivo de población que asimile la presencia de hidrocarburos del petróleo.

Cuadro 6. Efecto de dosis y tiempo de exposición a petróleo y *Clitoria* en bacterias rizosféricas reguladoras del crecimiento vegetal de vida libre

Petróleo (g/kg)	Tiempo de exposición a petróleo (fase y día)					
	<i>Azotobacter</i> (10^2 UFC g^{-1} s.s)			<i>Azospirillum</i> (10^3 UFC g^{-1} s.s)		
	Crecimiento (30)	Floración (75)	Fructificación (120)	Crecimiento (30)	Floración (75)	Fructificación (120)
<i>Clitoria</i> sp						
0	6b	3b	1b	201a	3e	25e
3	146b	3b	.3b	128b	.8e	36de
10	169b	2b	.6b	194a	1e	31de
20	169b	1b	.3b	82c	1e	23e
30	131b	3b	.6b	93bc	3e	22e
<i>C. ternatea</i>						
0	99b	48b	32b	27e	1e	10e
3	786a	59b	159b	21e	2e	9e
10	818a	82b	2b	68de	2e	14e
20	456ab	134b	.3b	21e	2e	5e
30	261b	226b	.1b	38ed	.9e	3e
\bar{x}	580	561	19	87	2	18
CV(%)	0.5	1.3	4.1	0.3	0.4	0.3

Letras mayúsculas en cada género de bacteria (tipo de *Clitoria* x dosis x tiempo de exposición a petróleo) indican diferencias estadísticas significativas (Tukey $p \leq 0.05$, $n=9$).

6.6.1. Dosis de petróleo-respuesta de bacterias de vida libre asociada a *Clitoria*

En la Figura 32a se observa al día 30 de exposición a petróleo (fase de crecimiento) la población de *Azotobacter* es estimulada en la rizosfera de *Clitoria* sp (23, 28, 28 y 21.6 veces respecto al testigo) y *C. ternatea* (8.2, 7.8, 7.5 y 2.6 veces respecto al testigo) al estar expuesta a 3, 10, 20 y 30 g de petróleo, respectivamente, con curvas dosis respuesta en forma de U-invertida tanto en la rizosfera de *Clitoria* sp como *C. ternatea*. Al día 75 (floración) la población de *Azotobacter* se estimula (1.2, 1.7, 2.8 y 4.7 veces respecto al testigo expuesta a 3, 10, 20 y 30 g de petróleo) solo en la rizosfera de *C. ternatea*; evidencia una curva dosis respuesta en forma de J (Figura 32a), así mismo en esta misma especie al día 120 (fructificación) *Azotobacter* incrementa (4.9 veces respecto al testigo) al exponerse a 3 g de petróleo en la misma especie, con una curva dosis-respuesta en forma de U-invertida (Figura 32a).

La población de *Azospirillum* en la rizosfera de *Clitoria* sp al día 30 presenta una tendencia a disminuir en las diferentes dosis de petróleo, pero en la rizosfera de *C. ternatea* incrementa 2.5 y 1.4 veces respecto al testigo en 10 y 30 g de petróleo, no se observa una curva dosis-respuesta con tendencia (Figura 32b). Al día 75 de exposición 3, 10 y 20 g de petróleo *Azospirillum* en rizosfera de *Clitoria* sp es afectada negativamente, con una curva dosis respuesta inversamente proporcional, sin embargo, en *C. ternatea* incrementa 2 veces cuando se expone a 3, 10 y 20 g con una curva dosis respuesta en forma de U-invertida muy ligera (Figura 32b). Al día 120 de exposición a 3 y 10 g de petróleo *Azospirillum* en rizosfera de *Clitoria* sp incrementa 1.4 y 1.2 veces respecto al testigo, representa una curva dosis-respuesta en forma de U-invertida, sin embargo, en *C. ternatea* la respuesta en general es inversamente proporcional (Figura 32b).

El aumento en la población de *Azotobacter* y *Azospirillum* en la rizosfera de la leguminosa se atribuye al sistema enzimático inducido por las bacterias y a la adaptación debido a la preexposición al contaminante, favoreciendo la utilización del petróleo crudo como la única fuente de carbono y energía (Muratova *et al.*, 2010; Jhon *et al.*, 2011; Logerhwaran *et al.*, 2018; Girigiri *et al.*, 2019).

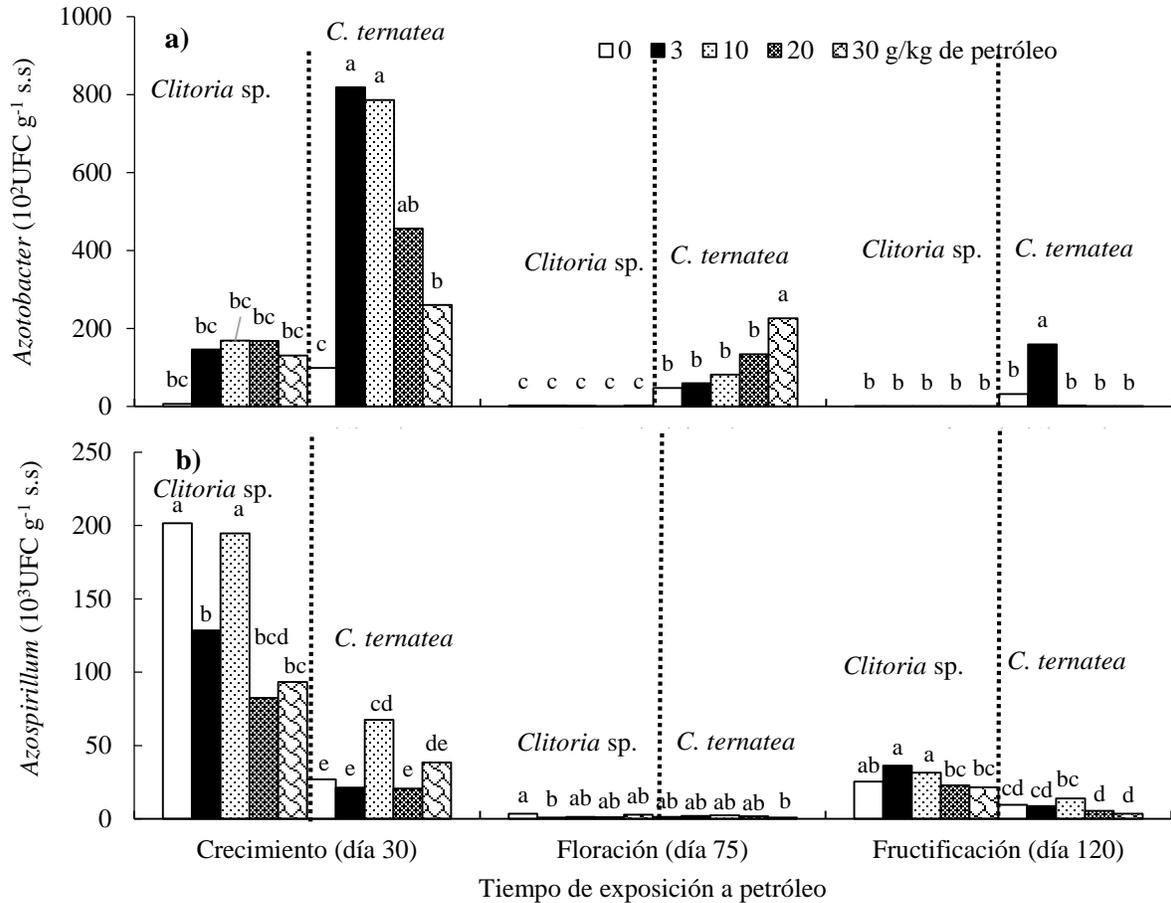


Figura 32. Efecto de dosis y tiempo de exposición a petróleo en población de bacteria de vida libre asociadas a *Clitoria* sp y *C. ternatea*. a) *Azotobacter*; b) *Azospirillum*. Letras minúsculas diferentes indican que los valores son estadísticamente diferentes en cada tiempo de exposición a petróleo (fase fenológica) (Tukey, $p \leq 0.05$, $n=9$).

6.7. Población de *Rhizobium* en nódulos de *Clitoria* según dosis y tiempo de exposición a petróleo

La población de *Rhizobium* sp presentó diferencias estadísticas significativas entre las medias de tratamientos (Tukey $p \leq 0.05$) por efecto de la dosis de petróleo, el tipo de *Clitoria* y la fase fenológica (Cuadro 7). La mayor población (1907 y 1769 x 10³ UFC n.f) fue en los tratamientos integrados por *Clitoria* sp sin y expuesta a 3 g de petróleo al día 120, y la menor al día 30 en los tratamientos *Clitoria* sp+ sin petróleo, *C. ternatea* + 0 y *C. ternatea* con 3, 10, 20 y 30 g de petróleo alcanzado poblaciones muy bajas entre 0 a 2 x 10³ UFC g⁻¹ n.f (Cuadro 7).

6.7.1. Dosis de petróleo-respuesta de *Rhizobium* en nódulos de *Clitoria*

La tendencia de la población de *Rhizobium* en nódulos de *Clitoria* sp y *C. ternatea* en general es inversamente proporcional al presentarse esta tendencia al día 30 en *C. ternatea*, día 75 en *Clitoria* sp y *C. ternatea* y al día 120 en *Clitoria* sp existe respuesta positiva de *Rhizobium* a la exposición a petróleo al día 30, con incrementos de 430, 390, 230 y 130% respecto al testigo, la curva respuesta es en forma de U-invertida debido al incremento mayor en suelo con 3 g y disminuye en dosis de 10, 20 y 30 g de petróleo. Así mismo en *C. ternatea* se observa incremento de *Rhizobium* al día 120 expuesta a 20 y 30 g de petróleo, pero esto no se manifiesta en una curva dosis respuesta con tendencia definida (Cuadro 7). Al respecto Rivera-Cruz *et al.* (2004); Alarcón *et al.* (2019) informan que la población de *Rhizobium* en el nódulo disminuye por efecto del petróleo debido a la falta de oxígeno que le proporciona la planta a través de la leghemoglobina, el cual es limitado por la presencia del petróleo.

Así mismo, el aumento de las poblaciones bacteriana como sucedió en esta investigación con *Rhizobium* al día 30 en *Clitoria* sp, puede atribuirse a los efectos selectivos del petróleo de microorganismos nativos, favoreciendo a aquellos con la capacidad de degradar o utilizar el petróleo como fuente de carbón y energía (Trujillo-Narcía *et al.*, 2014; Alarcón *et al.*, 2019). Esto puede estar relacionado a que en etapas iniciales del derrame de petróleo en el suelo puede interactuar con la degradación de fracciones lábiles o menos tóxicas del petróleo y que a medida que estas fracciones se consumen queda la población dominante capaz de metabolizar los hidrocarburos (Kaplan y Kitts, 2004; Yang *et al.*, 2014).

Cuadro 7. Efecto del petróleo en la población de *Rhizobium* según tiempo de exposición a petróleo.

Petróleo (g/kg)	Tiempo de exposición a petróleo (fase y día)		
	Crecimiento (30)	Floración (75)	Fructificación (120)
..... <i>Rhizobium</i> (10 ³ UFC g ⁻¹ n.s.....			
<i>Clitoria</i> sp			
0	0bE	445bAB	1907aA
3	43bA	39bB	1769aA
10	39bB	117bAB	135bB
20	23bC	52bB	118bB
30	13bD	42bB	69bB
<i>C. ternatea</i>			
0	2bE	564bA	352bB
3	1bE	514bAB	243bB
10	2bE	232bAB	39bB
20	1bE	67bB	480bB
30	.5bE	38bB	464bB
\bar{x}	12	211	558
CV(%)	1.3	1.3	1.2

Letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre los 30 tratamientos (Tukey $p \leq 0.05$, $n=3$). Letras mayúsculas diferentes por columna indican diferencias estadísticas significativas en cada tiempo de exposición (Tukey $p \leq 0.05$, $n=9$).

6.8. Hongos micorrícicos arbusculares en *Clitoria* según dosis y tiempo de exposición a petróleo

Los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) evaluados en 30 tratamientos con *Clitoria* sp y *C. ternatea* plantada en suelo sin y con cuatro dosis de petróleo fresco, tuvieron diferencias estadísticas significativas (Tukey, $p \leq 0.05$) en la comparación de medias por efecto del tiempo de exposición a petróleo correspondientes a las fases fenológicas de crecimiento, floración y fructificación (Cuadro 8). El mayor porcentaje de hifas (74) fue en suelo sin petróleo de *C. ternatea* al día 30 y el menor (13) en *Clitoria* sp expuesta a 30 g de petróleo al día 75. El mayor porcentaje de arbusculos (17) se logró por *C. ternatea* en suelo sin petróleo al día 30 y el menor (0) en suelo con 3, 10, 20, 30 g de petróleo al día 30 en ambas especies de *Clitoria*, al día 75 y 120 en *Clitoria* sp expuesta a 30 g de petróleo. El mayor porcentaje de vesículas (56) fue en suelo sin petróleo de *C. ternatea* al día 120 y el menor (9) al día 30 en la misma especie, pero expuesta a 30 g de petróleo. El mayor porcentaje de esporas intraradicales (60) se logró

por *Clitoria* sp al día 30 en suelo con 30 g de petróleo y el menor (0) en *C. ternatea* expuesta a 10, 20, 30 g de petróleo al día 30, en *Clitoria* sp expuesta a 30g al día 75 y120.

6.8.1. Dosis de petróleo-respuesta del hongo micorrícico arbuscular en *Clitoria*

Al día 30 de exposición a petróleo el porcentaje de hifas, arbusculos y esporas intraradicales en *Clitoria* sp, así como hifas, arbusculos, vesículas y esporas intraradicales en *C. ternatea* presentaron una tendencia disminuir al estar expuesto a las cuatro dosis de petróleo, solo el porcentaje de vesículas asociadas a *Clitoria* sp incrementan 1.62, 1.3, 1.03 veces respecto al suelo testigo al exponerse a 10, 20 y 30 g de petróleo, con una curva dosis respuesta en forma de U-invertida en donde el mayor porcentaje 44% fue en 10 g de petróleo y tienden a bajar en dosis mayores (Cuadro 8).

Al día 75 de exposición a petróleo el porcentaje de vesículas y esporas asociados a *Clitoria* sp y *C. ternatea*, e hifas en *C. ternatea* presentan una tendencia a disminuir expuestas a las cuatro dosis de petróleo, relación inversamente proporcional. Sin embargo, el porcentaje de hifas y arbusculos en *Clitoria* sp y arbusculos en *C. ternatea* son estimulados por 3 g de petróleo (Cuadro 8). La germinación y posterior infección radical de esporas en las etapas iniciales se relaciona con el incremento el porcentaje de hifas y arbusculos, los cuales participan en la absorción de nutrientes y que podría ser una forma de adaptación al medio contaminado (Camarena-Gutiérrez, 2012; Driai *et al.*, 2015). Trejo *et al.* (2013) informan que la presencia de hidrocarburos del petróleo disminuye la tasa de formación y germinación de vesículas y esporas.

Al día 120 de exposición a petróleo el porcentaje de hifas, arbusculos, vesículas y esporas intraradicales en *Clitoria* sp y *C. ternatea* son afectadas negativamente por la presencia del petróleo en el suelo, con curvas dosis respuesta inversamente proporcional (Cuadro 8).

La respuesta negativa de los hidrocarburos del petróleo en la colonización de hongos micorrícicos arbusculares fue reportado en *Daucus carota* por Kirk *et al.* (2005) y *Cichorium intybus* L. por Driai *et al.* (2015), sin embargo, el incremento de esporas según Alarcón *et al.* (2019) la relaciona como una estrategia del HMA de producir esporulación y así asegurar su

progenie en condiciones ambientalmente estresantes. La disminución en la colonización de HMA en suelos con altas concentraciones de petróleo algunos autores lo relacionan con la humedad del suelo, las condiciones de aireación, la estructura radical, además de la reducción de la tasa de germinación de esporas y la modificación de la estructura hifal (Rivera-Cruz *et al.*, 2002; Driai *et al.*, 2015; Alarcón *et al.*, 2019).

Cuadro 8. Estructura intraradicales del hongo micorrícico arbuscular asociado a *Clitoria* sp y *C. ternatea* según dosis y tiempo de exposición a petróleo

Petróleo (g/kg)	Colonización (%)			
	Hifas	Arbúsculos	Vesículas	Esporas
<u>Crecimiento (día 30)</u>				
<i>Clitoria sp</i>				
0	33±1.7cdefg	6±1.9bcd	27±2.2abcd	41±.4ab
3	33±8.7cdefg	0e	25±3.8bcd	41±4.8ab
10	29±2.1defg	0e	44±21.1ab	37±19.7abc
20	20±5.3fg	0e	36±6.1abcd	37±7.3bc
30	27±4.4defg	0e	28±16.0abcd	60±15.9a
<i>C. ternatea</i>				
0	74±.2a	17±.8a	49±7.3ab	4±.1fg
3	64±.2ab	0e	20±6.0bcd	5±.1fg
10	63±.2abcd	0e	40±5.4ab	0g
20	50±.2abcde	0e	23±11.7bcd	0g
30	27±.2defg	0e	9±.9dE	0g
<u>Floración (día 75)</u>				
<i>Clitoria sp</i>				
0	66±7.9ab	9±1.6bcd	49±7.9ab	11±7.1defg
3	68±6.5ab	10±3.1bc	45±8.9ab	9±6.8efg
10	52±4.5abcd	3±.1de	35±13.0abcd	9±1.4efg
20	58±3.1abc	5±1.7bcde	46±11.7ab	3±.1fg
30	15±10.1g	0e	22±6.1bcd	0g
<i>C. ternatea</i>				
0	58±15.5abcA	7±5.7bcd	39±11.3ab	29±16.6bcde
3	51±11.8abcde	11±2.4b	24±6.1bcd	21±13.7bcdefg
10	50±6.2abcde	4±.3cde	35±13.9abcd	23±4.6bcdef
20	36±2.2cdefg	3±.1de	31±1.9Babcd	16±1.9cdefg
30	13±2.4g	4±.1de	11±4.3cd	5±2.0fg
<u>Fructificación (día 120)</u>				
<i>Clitoria sp</i>				
0	66±7.9ab	11±3.6b	49.5±7.9ab	11±7.1edfg
3	68±6.5ab	10±3.1bc	45±8.9ab	9±6.8efg
10	52±4.5abcd	3±.1de	35±13.0abcd	9±1.4efg
20	58±5.1abc	3±3.3de	46±11.7ab	3±.1fg
30	15±10.1g	0e	22±6.1bcd	0gE
<i>C. ternatea</i>				
0	70±7.8a	10±2.7bc	56±6.3a	33±4.5bcd
3	66±7.8ab	6±2.1bcd	33±5.2abcd	21±3.0bcdefg
10	52±8.6abcdB	7±.3bcd	32±4.4abcd	12±1.9defg
20	44±5.9bcdef	4±.2d	29±6.5abcd	7±3.4efg
30	24±.5.1efg	3±.1de	22±6.9bcd	4±1.9fg
\bar{x}	47.1	4.6	33.6	15.3
CV (%)	2.5	1.0	2.8	1.0

Letras minúsculas diferentes en cada tipo de bacteria indican diferencias estadísticas significativas (Tukey $p \leq 0.05$, $n=3$). Letras mayúsculas diferentes por columna indican diferencias estadísticas significativas (Tukey $p \leq 0.05$, $n=3$).

6.9. Colonización total y esporas extraradicales del hongo micorrícico arbuscular en *Clitoria* según dosis y tiempo de exposición a petróleo

La colonización total (CT) y esporas extraradicales evaluadas en 30 tratamientos con *Clitoria* sp y *Clitoria ternatea* plantada en suelo sin y con cuatro dosis de petróleo fresco, tuvieron diferencias estadísticas significativas (Tukey, $p \leq 0.05$) en la comparación de medias por efecto del tiempo de exposición a petróleo correspondientes a las fases fenológicas de crecimiento, floración y fructificación (Figura 33). La mayor CT (42%) fue al día 120 en suelo sin petróleo de *C. ternatea* y la menor (8%) al día 75 en suelo con 30 g de petróleo de la misma especie. El mayor número de ESEXT (90) fue en suelo de *C. ternatea* expuesto a 10 g de petróleo al día 30 y el menor (25) en *Clitoria* sp expuesta a 30 g de petróleo al día 30.

6.9.1. Dosis de petróleo-respuesta de la colonización total y esporas de hongos micorrícicos arbusculares en *Clitoria*

Al día 30 el porcentaje de colonización total en *C. ternatea* expuesta a 3, 10, 20 y 30 g de petróleo disminuye en 1.6, 1.4, 2.0 y 4.1 veces respecto al testigo. Al día 75 y 120 el mayor porcentaje de colonización total en *Clitoria* sp y *C. ternatea* (34 y 33 % respectivamente) se logró en suelo sin petróleo. En la Figura 33a se observa que al día 30, 75 y 120 de exposición a petróleo de *Clitoria* sp y *C. ternatea* el efecto en la colonización total fue inversamente proporcional a las dosis de petróleo.

Las esporas extraradicales al día 30 en *C. ternatea* incrementan (2.6 veces respecto al testigo) a la exposición de 10 g de petróleo (Figura 33b), con una curva dosis respuesta en forma de U-invertida, pero en *Clitoria* sp el efecto fue estadísticamente similar en suelo sin y con petróleo. Al día 75 después de la siembra a 10 g/kg en *Clitoria* sp y 3 g de petróleo en *C. ternatea* incrementa (1.7 y 1.6 veces respectivamente) en comparación al testigo, curva dosis respuesta en forma de U-invertida. Para el día 120 el número de esporas en suelo para *Clitoria* sp. y *C. ternatea* fue estadísticamente similar en suelo sin y con petróleo.

La colonización total de HMA y número de esporas disminuyeron significativamente a medida que aumentaron las concentraciones de petróleo crudo en suelo, lo que coincide con los efectos

negativos de los hidrocarburos del petróleo reportado por varios autores (Rivera-Cruz *et al.*, 2002, Rivera-Cruz, 2011; Driai *et al.*, 2015, Alarcón *et al.*, 2019), sin embargo el efecto que se produce en *C.ternatea* al día 30 y 75 en el número de esporas podría ser una forma de adaptación al medio contaminado para reducir la superficie de contacto entre el hongo y el contaminante favoreciendo la continuidad de la progenie (Driai *et al.*, 2015, Alarcón *et al.*, 2019).

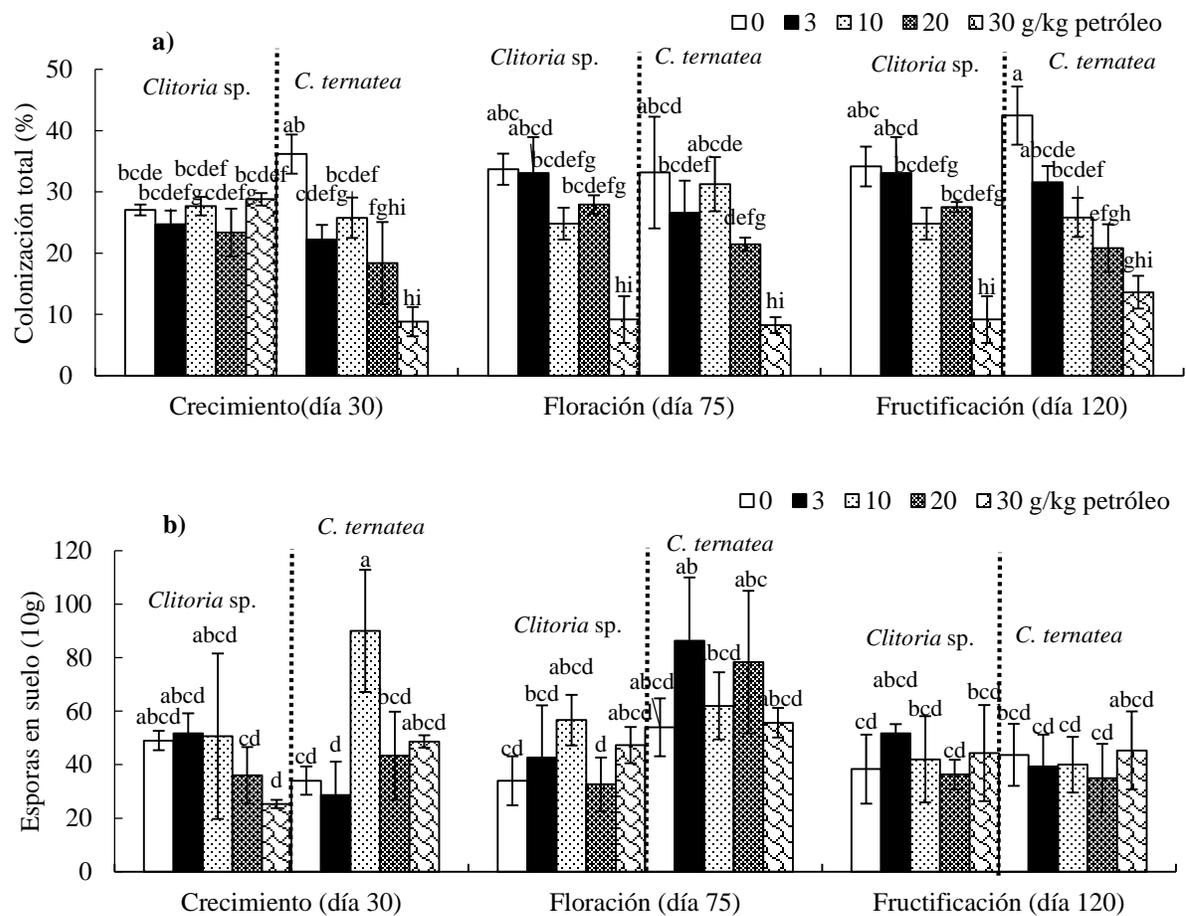


Figura 33. Colonización total y esporas en suelo de hongo micorrízico arbuscular en *Clitoria* sp y *C. ternatea* según dosis y tiempo de exposición a petróleo. a) Colonización total y b) esporas en suelo. Letras minúsculas diferentes indican que los valores son estadísticamente diferentes en cada tiempo de exposición a petróleo (fase fenológica) (Tukey, $p \leq 0.05$, $n=4$).

6.10. Efecto de *Clitoria* en población de bacterias, colonización micorrícica y degradación de hidrocarburos del petróleo según tiempo de exposición a petróleo

El efecto del tipo de *Clitoria* en los parámetros microbiológicos de asociación simbiótica según el Cuadro 9, indica que *Clitoria* sp en 12 de 27 combinaciones (*Clitoria* x tiempo de exposición) es mayor, y *C. ternatea* en 10. Sin embargo, destaca que *Clitoria* sp al día 120 de exposición a petróleo presenta mejor respuesta en cinco parámetros microbiológicos (*Rhizobium*, porcentaje de hifas, arbusculo, vesículas y colonización total) mientras que *C. ternatea* en tres (porcentaje de hifas, arbusculos y colonización total). También destaca al día 75 de exposición a petróleo, que las dos *Clitoria* en cuatro parámetros relacionados con el hongo micorrícico arbuscular son estadísticamente mayores. Similar respuesta, al día 30 las dos *Clitorias* en tres parámetros son estadísticamente iguales, destaca que la población de *Azospirillum* (140×10^3 UFC g^{-1} r.s.) es mayor en *Clitoria* sp y *Azotobacter* en *C. ternatea* (484×10^2 UFC g^{-1} r.s.). Este incremento de estas bacterias de vida libre puede ser según Madigan *et al.* (2015) a que las leguminosas en la fase de crecimiento requieren nitrógeno para el desarrollo de los órganos vegetativos y el N_2 atmosférico es fijado en el suelo a forma de NH_4 por estas bacterias diazotróficas de vida libre. Sin embargo, *Rhizobium* en nódulos es mayor en la fase fructificación (día 120) de *Clitoria* sp, esto posiblemente se debe a que la planta en esta fase fenológica requiere la fijación simbiótica del N_2 para la formación de proteína que según Azcón-Bieto y Talón (2008) se requieren para la síntesis de carbohidratos en vaina.

Cuadro 9. Efecto del tiempo de exposición a petróleo en *Clitoria* sobre la población de bacterias y hongos micorrícicos arbusculares.

Bacterias y HMA	<i>Clitoria</i> sp			<i>Clitoria ternatea</i>		
	Tiempo de exposición a petróleo (Día)					
	30	75	120	30	75	120
<i>Azospirillum</i> (10^3 UFC g^{-1} s.s)	140a	2c	27b	35b	2c	8c
<i>Azotobacter</i> (10^2 UFC g^{-1} s.s)	124b	.2b	.1b	484a	110b	4b
<i>Rhizobium</i> (10^3 UFC g^{-1} s.s)	24b	139b	799a	2b	238b	316b
Hifas (%)	28.6b	51.7a	51.7a	55.4a	44.1a	51.4a
Arbusculos (%)	1.3b	5.5a	5.5a	3.5b	5.9a	6.2a
Vesículas (%)	32.2ab	39.5a	39.5a	28.3b	28.1b	34.3ab
Esporas intraradicales (%)	43.2a	6.3c	6.3c	1.9c	18.4b	15.6b
Colonización total (%)	26.3a	25.7a	25.7a	22.3a	24.1a	26.9a
Esporas extraradicales (10g)	43b	43b	43b	49b	67a	41b

Letras minúsculas por hileras son estadísticamente diferentes (Tukey ≤ 0.05 , $n=12$).

6.11. Tendencias dosis de petróleo-respuesta en planta y actividad microbiana de *Clitoria* en cada tiempo de exposición

Las curvas dosis de petróleo-respuesta en 17 parámetros de crecimiento, producción, nódulos y proteína cruda combinados con tiempos de exposición a petróleo (51 combinaciones) muestran tres tipos de tendencias; (a). 22 curvas dosis respuesta en forma hormética para *Clitoria* sp y 20 para *C. ternatea*, (b) 19 curvas lineales con tendencias inversamente proporcional a la dosis de petróleo para *Clitoria* sp y *C. ternatea*, y (c) ocho respuestas sin tendencia definida en *Clitoria* sp y 12 para *C. ternatea* (Cuadro 10).

Las curvas dosis de petróleo-respuesta en ocho variables de población de bacterias reguladoras de crecimiento vegetal y hongos micorrízicos arbusculares combinados con tiempos de exposición a petróleo (27 combinaciones) muestran tres tipos de tendencias ; (a) nueve curvas dosis respuesta hormética para *Clitoria* sp y seis para *C. ternatea*, (b) 16 y 11 tendencias inversamente proporcional para *Clitoria* sp y *C. ternatea* respectivamente, (c) dos y 10 respuestas sin tendencia definida para *Clitoria* sp y *C. ternatea* respectivamente (Cuadro 10).

Considerando lo anterior, en respuesta a parámetros de crecimiento, producción, nódulos, proteína cruda y actividad microbiana simbiótica que tienden a incrementar por efecto del petróleo, es decir 31 curvas dosis-respuesta en forma hormesis para *Clitoria* sp, lo que es indicador de adaptación de la especie a suelos que contengan entre 3-30 g/kg de petróleo crudo. Pero también, es importante mencionar la respuesta inversamente proporcional de las variables respecto al petróleo, en donde resalta 30 respuestas inversas para *Clitoria* sp y 26 para *C. ternatea*.

Clitoria sp al parecer tiende a ser más productiva y hospedera de hongos micorrízicos arbusculares, y esta fortaleza se debe a su origen, ella es una especie silvestre en zonas aledañas a infraestructura petróleo, aunque el contenido de proteína aérea es menor que en *C. ternatea*, el contenido de proteína en vaina es mayor

Cuadro 10. Curva dosis-respuesta de variables de crecimiento, producción, nódulos y actividad microbiana de *Clitoria* sp y *C. ternatea* en tres tiempos de exposición a petróleo.

Parámetros	<i>Clitoria</i> sp			<i>C. ternatea</i>		
	30	75	120	30	75	120
<u>Crecimiento y producción</u>						
Longitud de planta (cm)	U-inv	U-inv	Inversa	Inversa	Inversa	U-inv
TCR (cm d ⁻¹)	U-inv	Inversa	U-inv	Inversa	J	no
Biomasa raíz (g)	Inversa	Inversa	Inversa	Inversa	Inversa	Inversa
Biomasa aérea (g)	U-inv	Inversa	U-inv	Inversa	Inversa	Inversa
Biomasa nódulo (g)	U-inv	Inversa	Inversa	U-inv	U-inv	U-inv
Biomasa flores (g)	no	Inversa	no	no	Inversa	no
Biomasa vaina (g)	no	no	Inversa	no	no	Inversa
Número nódulos	U-inv	J	J	U-inv	J	J
Diámetro nódulo (mm)	J	U-inv	Inversa	J	U-inv	Inversa
Leghemoglobina (%)	U-inv	J	Inversa	U-inv	J	J
Nódulo globoso (%)	no	J	J	Igual	J	no
Nódulo cilíndrico (%)	no	Inversa	J	no	no	no
Nódulo ramificado (%)	no	Inversa	Inversa	no	no	U-inv
Nódulo abanico (%)	no	U-inv	Ausente	no	U-inv	U-inv
Nódulo rugoso (%)	no	U-inv	U-inv	Inversa	Inversa	J
Proteína aérea (%)	Inversa	U-inv	U-inv	Inversa	J	U-inv
Proteína vaina (%)	no	no	Inversa	no	no	Inversa
Subtotal: 17						
<u>Actividad microbiana</u>						
<i>Azotobacter</i> (UFC g ⁻¹ r.s)	U-inv	Inversa	Inversa	U-inv	J	U-inv
<i>Azospirillum</i> (UFC g ⁻¹ r. s)	no	Inversa	U-inv	no	Inversa	Inversa
<i>Rhizobium</i> (UFC g ⁻¹ r.s)	U-inv	Inversa	Inversa	no	Inversa	Inversa
Hifas (%)	Inversa	U-inv	Inversa	no	Inversa	Inversa
Arbusculo (%)	Inversa	U-inv	Inversa	no	U-inv	Inversa
Vesículas (%)	U-inv	Inversa	Inversa	no	no	Inversa
Esporas intraradical (%)	no	Inversa	Inversa	no	no	Inversa
Colonización total (%)	Inversa	Inversa	Inversa	no	no	Inversa
Esporas extraradical (10g)	U-inv	U-inv	U-inv	U-inv	U-inv	Inversa
Subtotal: 9						
Total: 26						

U-inv: Curva dosis-respuesta en forma de U-invertida. J: Curva dosis-respuesta en forma de J. Inversa: Tendencia inversamente proporcional. no: Sin tendencia alguna o no hubo respuesta de la variable.

6.12. Degradación de hidrocarburos totales del petróleo en rizosfera de *Clitoria* según dosis y tiempo de exposición a petróleo

Al día 30, 75 y 120 de exposición a petróleo la mayor degradación (DEG) de HTP fue 43, 69 y 73.9 % respectivamente, en rizosfera de *Clitoria* sp plantada en suelo con 3 g de petróleo, y la menor (22, 46.7 y 67%) en los tratamientos integrados con *Clitoria* sp + 30 g de petróleo (Figura 34). Al respecto Rivera-Cruz *et al.* (2012); Arias-Trinidad *et al.* (2017); Somtrakoon *et al.* (2018); Alarcón *et al.* (2019); Morales-Guzmán *et al.* (2020), informan que las leguminosas tienen capacidad para fitorremediar suelos con bajas dosis de petróleo y esta se logra a través del tiempo.

El porcentaje de DEG de HTP se explica por la presencia de microorganismos que se hospedan al día 30, 75 y 120 en la rizosfera de *Clitoria*, al respecto en esta investigación el tiempo de exposición a petróleo presentó relación positiva altamente significativa con DEG ($r=0.454^{**}$), y la DEG con CT ($r=0.289^{**}$). Es importante destacar que al día 30 de exposición a petróleo la DEG se relaciona positivamente con AZT ($r=0.425^*$), RIZ ($r=0.566^{**}$) y ESEXT ($r=0.390^*$), así mismo al día 75 y 120 existe relación positiva con ESEXT ($r=0.477^{**}$ y $r=0.413^*$) (Cuadro 11).

Sobresale la relación DEG de HTP con esporas extraradicales en los tres tiempos evaluados (Cuadro 11), esto es un indicador biológico de la disminución de la contaminación del suelo, los HMA son capaces de reproducirse y depositar esporas extraradicales listas para germinar e iniciar el proceso de crecimiento de hifas y hacer simbiosis con *Clitoria*. Para que la hifa del HMA arbuscular se desarrolle y espanda por el suelo requiere metabolizar carbono de origen biogénico o antropogénico.

6.13. Efecto de *Clitoria* en la degradación de petróleo fresco

En la Figura 35 se observa diferencias estadísticas significativas de las medias del porcentaje de degradación de HTP (Tukey $p \leq 0.05$) bioestimulado por la rizosfera de *Clitoria* sp y *C. ternatea* al día 30, 75 y 120 de exposición a petróleo fresco. Las mayores medias de degradación se encontraron en el rango de 40 a 51% al día 75 y 120 y fueron estadísticamente iguales en las dos *Clitorias*. Al respecto Yang *et al.* (2014) informa la capacidad de algunas leguminosas para la remoción de fracciones lábiles o menos tóxicas en concentraciones bajas de petróleo. Así mismo esta degradación al día 75 y 120 puede al mayor porcentaje de

colonización del HMA que se establece en las dos *Clitorias* (Cuadro 9), y esto se confirma por la relación altamente significativa y positiva (.562**, .485**) entre tipo de *Clitoria**EXINT al día 75 y 120 (Cuadro 11). Los HMA son asociaciones mutualistas que utilizan sustratos orgánicos para su metabolismo y crecimiento.

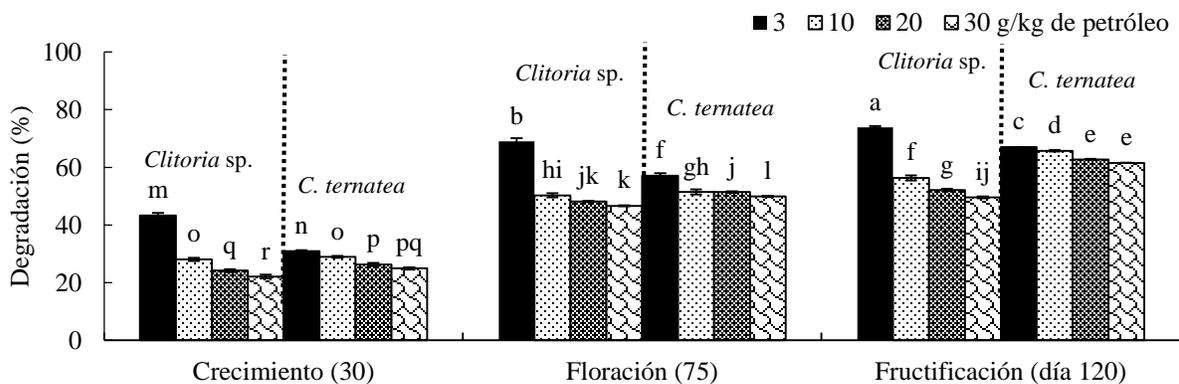


Figura 34. Degradación de hidrocarburos totales del petróleo en rizosfera de *Clitoria sp* y *C. ternatea*. Letras minúsculas diferentes entre columnas indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $p \leq 0.05$, $n=4$).

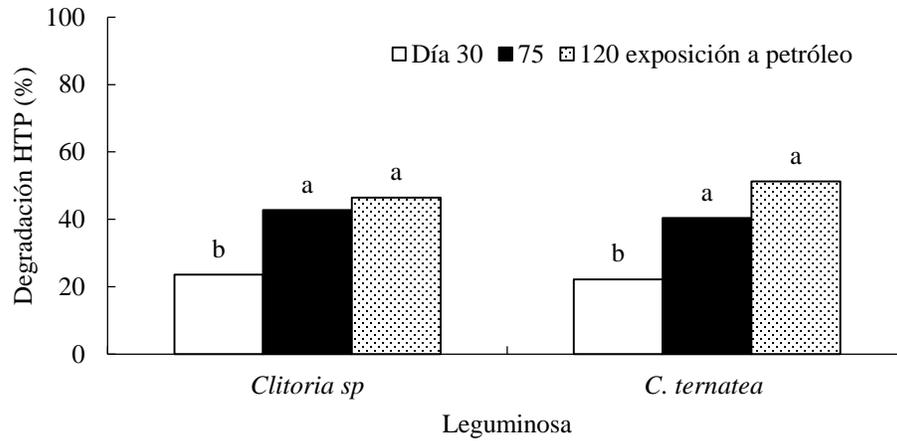


Figura 35. Efecto de *Clitoria* en la degradación de hidrocarburos totales del petróleo en tiempos de exposición a petróleo. Letras minúsculas diferentes entre columnas indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $p \leq 0.05$, $n=12$).

Cuadro 11. Correlación Person's general, día 30, 75 y 120 entre degradación y microorganismos rizosféricos.

	Petróleo	DEG	AZT	AZP	RIZ	HIF	ARB	VES	ESINT	CT	ESEXT
General											
Tiempo	-.228*	.454**	-.482**	.527**	.414**	NS	.304**	.194	-.289*	.091	NS
Petróleo		NS	NS	NS	-.290**	-.706**	-.579**	-.514**	NS	-.635**	NS
<i>Clitoria</i>		NS	.350**	-.385**	NS	NS	NS	-.244*	NS	NS	.256*
DEG		NS	NS	-.313**	NS	NS	NS	-.225*	-.290**	.289**	NS
Día 30											
Petróleo		NS	NS	NS	NS	NS	-.344**	NS	NS	NS	NS
DEG		1	.415*	NS	.566**	NS	-.628**	NS	NS	NS	.390*
<i>Clitoria</i>	.978**	NS	.528**	-.789**	-.694**	.686**	NS	NS	-.912**	NS	NS
Día 75											
Petróleo		.354*	.480**	NS	-.364*	-.502**	.451*	NS	-.384**	.480**	NS
DEG		1	NS	.477**							
<i>Clitoria</i>	NS	NS	.712**	NS	NS	NS	NS	-.413**	.562**	NS	NS
Día 120											
Petróleo		NS	NS	NS	NS	-.479**	-.544**	NS	-.497**	-.462**	NS
DEG		1	NS	.413*							
<i>Clitoria</i>	NS	NS	NS	-.838**	NS	NS	NS	NS	.485**	NS	NS

La correlación general es de 30 tratamientos. Correlación por día de exposición a petróleo con 10 tratamientos. *, ** = $p \leq 0.05$, 0.01 , respectivamente, NS = no significativo a $p \leq 0.05$. DEG: Degradación; AZT: *Azotobacter*; AZP: *Azospirillum*; RIZ: *Rhizobium*; HIF: Hifas; ARB: Arbusculos; VES: Vesículas; ESINT: Esporas intraradicales; CT: Colonización total; ESEXT: Esporas extraradical

CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES

7.1. Conclusion general

Clitoria sp expuesta al día 30, 75 y 120 a 3 g de petróleo indujo mayor degradación de hidrocarburos totales del petróleo, colonización del hongo micorrícico arbuscular en Gleysols, y mayor tendencia con respuestas horméticas que *C. ternatea* en los tres tiempo de exposición a 3, 10, 20 y 30 g de petróleo en el crecimiento, producción, nodulación, proteína aérea y actividad microbiana simbiótica, por lo que es recomendable su integración en una tecnología *ex situ* y *on situ* de fitorremediación para Gleysols contaminados hasta con 30 g de petróleo del estado de Tabasco.

7.1.1. Conclusiones particulares

1. El efecto de la conuinación *Clitoria*-dosis-tiempo de exposición a petróleo indujo mejor respuesta en crecimiento, biomasa, número, diámetro y formas de nódulos, acumulación de proteína cruda aérea y vaina, población de *Azotobacter* y, colonización intraradical de cinco estructuras del hongo micorrícico arbuscular en *Clitoria ternatea*.
2. *Clitoria* sp respecto a *C. ternatea* es una leguminosa silvestre con mayor tendencia a formar hormesis en la respuesta de variables de crecimiento, producción, nodulación, proteína y actividad microbiana simbiótica. *Clitoria* sp presento un total de 31 curvas dosis-respuesta en forma de hormesis, mientras que *C. ternatea* 26, además *Clitoria* sp presenta mayor biomasa seca de raíz y aérea con un contenido de 17 y 18 % de proteína aérea y vaina. Esto permite recomendar a *Clitoria* sp para establecerla en ambientes estresados por la contaminación con petróleo.
3. El efecto del tipo de *Clitoria* al día 30, 75 y 120 de exposición a petróleo concluye que *Clitoria* sp y *C. ternatea* son estadísticamente iguales en la bioestimuladora de la degradación de HTP en los tres tiempos; *Clitoria* sp degrada 24, 43 y 46% y *C. ternatea*

22, 40 y 53 %, sin embargo, *Clitoria* sp se adapta mejor al petróleo por mejor respuesta en 23 de 78 combinaciones en las variables de crecimiento, producción, proteína cruda, nodulación y actividad microbiana simbiótica

4. La combinación *Clitoria* sp + 3g de petróleo al día 120, bioestimuló la mayor degradación de hidrocarburos totales del petróleo con 73.9%, esta degradación al relacionarse de manera positiva con el tiempo de exposición a petróleo, la colonización total del HMA, población de *Azotobacter* y *Azospirillum* (al día 30) contribuyeron a la descontaminación del Gleysols

CAPÍTULO VIII. LITERATURA CITADA

- Abha S. y Swaranjit-Singh C. 2012. Hydrocarbon pollution: effects on living organisms, remediation of contaminated, environments, and effects of heavy metals co-contamination on bioremediation. *In: Romero-Zerón L. (ed.). Introduction to enhanced oil recovery (EOR) processes and bioremediation of oil-contaminated sites. InTech Europe, Rijeka, Croatia, pp. 185-206.* <https://doi.org/10.5772/48014>
- Abubakar C.M. 2015. Bioremediation and Biodegradation of Hydrocarbon Contaminated Soils: A Review. *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology (IOSR-JESTFT)*, 9: 38-45. https://www.researchgate.net/profile/Mohammed_Clarkson/publication/283716335_Bioremediation_and_Biodegradation_of_Hydrocarbon_Contaminated_Soils_A_Review/links/5863be7d08ae8fce490b6bcb/Bioremediation-and-Biodegradation-of-Hydrocarbon-Contaminated-Soils-A-Review
- Aguilera G.L.I., V. Olalde P., M.R. Arriaga y R. Contreras A. 2007. Micorrizas arbusculares. *Ciencia Ergo Sum*, 14(3): 300-306. <https://cienciaergosum.uaemex.mx/article/view/7149>
- Ahemad M. and M. Kibret. 2013. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University – Science*, 26(1): 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>
- Alarcón A., M. García-Díaz, L.V. Hernández-Cuevas, R. Esquivel-Cote, R. Ferrera-Cerrato, J.J. Almaraz-Suarez and O. Ferrera- Rodríguez. 2019. Impact of crude oil on functional groups of culturable bacteria and colonization of symbiotic microorganisms in the *Clitoria-Brachiaria* rhizosphere grown in mesocosms. *Acta biológica Colombiana*, 24(2):343-353. <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v24n2.64771>
- Alarcón, A., J. Delgadillo-Martínez, A. Franco-Ramírez, F.T. Davies Jr. and R. Ferrera-Cerrato. 2006. Influence of two polycyclic aromatic hydrocarbons on spore germination, and phytoremediation potential of *Gigaspora margarita-Echinochloa polystachya* symbiosis in benzo[a]pyrene-polluted substrate. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 22(1):39-47. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rica/v22n1/0188-4999-rica-22-01-39>
- Al-Yemeni M.N., Siddiqui M.H. y Wijaya L.F. 2010. Effect of petroleum polluted soil on the

- performance of *Phaseolus vulgaris* L. American-Eurasian. *Journal of Agriculture and Environmental Sciences*, 7 (4), 427-432. [http://www.idosi.org/aejaes/jaes7\(4\)/8](http://www.idosi.org/aejaes/jaes7(4)/8)
- Anaya L.A.L. 2003. Ecología química. Editorial Plaza y Valdés. México, D.F. 349 p.
- Ángeles-Núñez J.G. y T. Cruz-Acosta. 2015. Aislamiento, caracterización molecular y evaluación de cepas fijadas de nitrógeno en la promoción del crecimiento de frijol. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(5):929-942. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263139893002>
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1980. Official Methods of Analysis, 13th edn. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC.
- Arias-Trinidad A., M.C. Rivera-Cruz y A. Trujillo-Narcía. 2017. Fitotoxicidad de un suelo contaminado con petróleo fresco sobre *Phaseolus vulgaris* L. (Leguminosae). *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33(3): 411-419. <http://dx.doi.org/10.20937/RICA.2017.33.03.05>
- Atlas R.M y R. Bartha. 2002. Ecología microbiana y microbiología ambiental. 4a ed. Editorial Pearson Educación. Madrid, España. 696 p.
- Bagnères A.G y H.M. Martine. 2020. Ecología química. ISTE Group. Londres, Inglaterra. 236 p.
- Baneshi, M.M, R. Rezael K., A. Jonidi J., S. Nasser, N. Jaafarzadeth and A. Esrafil. 2014. Effect of bioaugmentation to enhance phytoremediation for removal of phenanthrene and pyrene from soil with *Sorghum* and *Onobrychis sativa*. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 12:24. <https://dx.doi.org/10.1186%2F2052-336X-12-24>
- Barrer S.E. 2009. El uso de hongos micorrizicos arbusculares como una alternativa para la agricultura. *Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 7(1): 123-132. <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v7n1/v7n1a14>
- Bashan Y. and L.E. de-Bashan. 2010. How the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth—A Critical Assessment. *Advances in Agronomy*, 108:77-136. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(10\)08002-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(10)08002-8)
- Bello G. J. y A. López de Cerain S. 2001. Fundamentos de ciencia toxicológica. Diaz de Santos. Madrid, España. 349 p.
- Benito de Vega J.A. y M.C. Escribano G. 2018. Análisis químico, FP. Punto Rojo Libros.

- Sevilla, España. 220 p.
- Botello, A. V. 2005. Características, composición y propiedades fisicoquímicas del petróleo. *In: Botello, A. V., J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández (eds). Golfo de México Contaminación Ambiental: Diagnostico y Tendencia. Univ. Autón. de Campeche. Univ. Autón. de México, Instituto Nacional de Ecología. Campeche, México. pp: 264-265.*
- Bouyoucos G. 1962. Hydrometer method for particle-size analysis of soils. *Agronomy Journal*, 54: 464-465. <https://doi.org/10.2134/agronj1962.00021962005400050028x>
- Brady N. and R. Weil. 2008. The nature and properties of soils. 14th ed. Pearson-Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, USA. 975 p.
- Cabrera T. E., R.E Sosa y R.J Pérez. 2010. *Clitoria ternatea*, Suplemento Alimenticio para Vacas de Doble Propósito. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Chetumal. Centro Regional del Sureste. 32 p.
- Calabrese E.J. and L. Baldwin. 2003. Toxicology rethinks its central belief. *Nature*, 421: 691–692. <https://doi.org/10.1038/421691a>
- Calabrese E.J. and R.B. Blain. 2009. Hormesis and plant biology. *Environmental Pollution*, 157: 42-48. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.07.028>
- Calabrese V., C. Cornelius, A.T. Dinkova-Kostova, I. Iavicoli, R. Di Paola, A. Koverech, S. Cuzzocrea, E. Rizzarelli and E.J Calabrese.2012. Cellular stress responses, hormetic phytochemicals and vitagenes in aging and longevity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1822(5):753-783. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.11.002>
- Camarena-Gutiérrez G. 2012. Interacción Planta-Hongos Micorrízicos Arbusculares. *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente*, 18(3): 409-421. <http://dx.doi.org/10.5154/r.rchscfa.2011.11.093>
- Carreón A.Y., D.N. Gómez y T.M. Martínez. 2008. Las micorrizas arbusculares en la protección vegetal. *Biológicas*, 10: 60-70. <https://www.biologicas.umich.mx/index.php?journal=biologicas&page=article&op=view&path%5B%5D=39>
- Castillo-Rodríguez F., M.D. Roldan Ruiz. R. Blasco P., M.J. Huertas R., F.J. Caballero D.C. Moreno-Vivian y M.M. Luque-Romero.2005. Biotecnología Ambiental. Editorial Tébar. Madrid, España. 616 p.

- Chandra S., R. Sharma, K. Singh, and A. Sharma. 2013. Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon. *Annals of Microbiology*, 63: 417-431. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0543-3>
- Chávez-Álvarez K., M.C. Rivera-Cruz. A. Trujillo-Narcía y E. Espinoza-Molar. 2019. Aislamiento y adaptación de *Azospirillum* spp y *Rhizobium* spp asociados con la leguminosa *Mimosa pigra* L. expuesta a petróleo crudo superligero. In: Martínez-Herrera J. y C. Hernández-Hernández (Comps.). Investigaciones Científicas y Agrotecnológicas para la Seguridad Alimentaria. INIFAP. Tab., México. Año 1, No. 1, 689 páginas. <http://www.reunioncientificatabasco.org.mx/pdf/2019/InvestCientifAgro2019>
- Curl E.A and B. Truelove. The Rhizosphere. Advanced Series in Agricultural Sciences 15. 2012. Springer Science & Business Media. Alabama, USA. 288 P.
- Curtis H. y A. Schnek. 2008. Curtis. Biología. 7ª edición en español. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 1160 p.
- Daniels, B.A. and Skipper, H.A. 1982. Methods for the recovery and quantitative estimation of propagules from soil. In: Schenck, N.C., Ed., Methods & Principles of Mycorrhizal Research, American Phytopathological Society, St. Paul, 29-35.
- Dardanelli M.S., H. Manyani, S. González-Barroso, M.A. Rodríguez-Carvajal, A.M Gil-Serrano, M.R. Espuny, F.J. López-Baena, R.A. Bellogin, M. Megías and F.J Ollero. 2010. Efecto de la presencia de rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR) *Chryseobacterium balustinum* Aur9 y estrés salino en el patrón de flavonoides exudados por las raíces de soja. *Plant and Soil*, 328:483-493. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0127-6>
- De la Lata L.M.D. 2005. Química orgánica. 1ª reimpresión. Editorial Progreso S. A de C. V. México, D.F. 144 p.
- Delgadillo-López A.E., A. González-Ramírez, F. Prieto-García, J.R. Villagómez-Ibarra y O. Acevedo-Sandoval. 2011. Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical and subtropical agroecosystems*, 14: 597-612. <http://www.scielo.org.mx/pdf/tsa/v14n2/v14n2a2>
- Delgado M.J., F. Ligeró and C. Lluch. 1994. Effect of salt stress on growth and nitrogen fixation by pea, faba bean, common bean and soybean plants. *Soil Biology and*

- Biochemistry*, 26:71–376. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(94\)90286-0](https://doi.org/10.1016/0038-0717(94)90286-0)
- Díaz-Martínez M.E., A. Alarcón, R. Ferrera-Cerrato, J.J. Almaraz- Suarez y O. García-Barradas, Oscar. 2013. Crecimiento de *Casuarina equisetifolia* (Casuarinaceae) en suelo con diésel, y aplicación de bioestimulación y bioaumentación. *Revista de Biología Tropical*, 61(3): 1039-1052. http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442013000400005&lng=en&tlng=es.
- Döbereiner J, I.E. Marriel and M. Nery. 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Canadian Journal of Microbiology*, 22: 1464-1473. <https://doi.org/10.1139/m76-217>
- DOF (Diario Oficial de la Federación). 2002. NOM-021-SEMARNAT-2003. Norma Oficial Mexicana NOM-021- SEMARNAT -2003, Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudio, muestreo y análisis. Diario Oficial de la Federación. 31 diciembre 2014. Segunda sección. 75 p.
- DOF (Diario Oficial de la Federación). 2006. NMX-AA-134-SCFI-2006. Suelo hidrocarburos fracción pesada extracción y gravimetría método de prueba. Diario Oficial 12 de octubre 2006. Secretaria de Economía, México D.F. 27 p.
- Dos santos J.J and L.T. Maranhó. 2018. Rhizospheric microorganisms as a solution for the recovery of soils contaminated by petroleum: A review. *Journal of Environmental Management*, 210: 104-113. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.01.015>
- Downie J. A. 2010. The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(2): 150-170. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00205.x>
- Driai S., A. Verdín, F. Laruelle, A. Beddiar and A. Lounes-Hadj S. 2015. Is the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* able to fulfil its life cycle in the presence of diesel pollution? *International Biodeterioration & Biodegradation*, 105:58-65. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.08.012>
- EPA (Environment Protection Agency). 1996. Method 3540C Mod. Soxhlet Extraction. Washington, DC. USA. 8 p.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Portal de suelos de la FAO. 2020. <http://www.fao.org/soils-portal/soil-biodiversity/es/>

- Fernández C., S. Massiel, J.C. Pereira, A. Mallia, M.J. Llobregat y V. Altomare. 2006. Biodegradabilidad de las fracciones de resinas y asfáltenos por pseudomonas en suelo impactado con crudo mediano. *Revista INGENIERIA UC*, 13(2):7-13. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=70713202>
- Ferrera-Cerrato R. y A. Alarcón. 2013. Microorganismos rizosféricos durante la fitorremediación de hidrocarburos del petróleo en suelos. *In: Alarcón, A., Ferrera-Cerrato, R. (eds.), Biorremediación de suelos y aguas contaminadas con compuestos orgánicos e inorgánicos. Trillas, México. 333 p.*
- Fester T., J. Giebler, L.Y. Wick, D. Schlosser and M. Kästner. 2014. Plant–Microbe interactions as drivers of ecosystem functions relevant for the biodegradation of organic contaminants. *Current Opinion in Biotechnology*, 27: 168-175. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.01.017>
- Fierer N. 2017. Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 15: 579–590. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.87>
- Figueruelo A.J. y M. Marino D. 2004. Química Física del Ambiente y de los Procesos Medioambientales. Editorial Reverté. Madrid, España. 591 p.
- FitzPatrick, E.A. 1984. Suelos: su formación, clasificación y distribución. C.E.C.S.A. México, D.F. 430 p.
- Fritsche W. and M. Hofrichter. 2008. Chapter 6 Aerobic Degradation by Microorganisms. *Biotechnology*, 144-167. <https://doi.org/10.1002/9783527620951.ch6>
- Gage D. J. 2004. Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(2): 280-300. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.2.280-300.2004>
- Gamage W., K. Masakorala, M.T. Brown and W. Gamage. 2020. Tolerance of *Impatiens balsamina* L., and *Crotalaria retusa* L. to grow on soil contaminated by used lubricating oil: A comparative study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 188: 109911. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109911>
- Gaskin S.E. and R. H. Bentham. 2010. Rhizoremediation of hydrocarbon contaminated soil using Australian native grasses. *Science of the Total Environment*, 408: 3683–3688. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.05.004>

- Gerdemann, J. W. and T. H. Nicolson. 1963. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society*, 46: 235-244. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(63\)80079-0](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(63)80079-0)
- Girigiri B., Nchedu A. C., and Okechukwu S. H. 2019. Bioremediation of Crude Oil Polluted Soil Using Biofertilizer from Nitrogen-fixing and Phosphate-solubilizing Bacteria. *American Journal of Nanosciences*, 5(4): 27-38. <http://article.sciencepublishinggroup.com/pdf/10.11648.j.ajn.20190504.11>
- Glick B.R. 2012. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientica*, 2012:1-15. <http://dx.doi.org/10.6064/2012/963401>
- González-Moscoso M., M. C. Rivera-Cruz, J. Delgadillo-Martínez, L. C. Lagunes-Espinoza. 2017. Growth analysis and plant production of *Leersia hexandra* Swartz in tropic wet mexican in fuction on petroleum and surfactant. *Polibotanica*, 43:177-196. <http://dx.doi.org/10.18387/polibotanica.43.8>
- González-Moscoso M., M.C. Rivera-Cruz and A. Trujillo-Narcía. 2019. Decontamination of soil containing oil by natural attenuation, phytoremediation and chemical desorption. *International Journal of Phytoremediation*, 21 (8): 768-776. <https://doi.org/10.1080/15226514.2019.1566879>
- Harrier L.A. and C. A. Watson. 2004. The potential role of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in the bioprotection of plants against soil-borne pathogens in organic and/or other sustainble farming systems. *Pest Management Science*, 60:149–157. <https://doi.org/10.1002/ps.820>
- Hawrot-Paw M. A. Wijatkowski and M. Mikiciuk. 2015. Influence of diesel and biodiesel fuel-contaminated soil on microorganisms, growth and development of plants. *Plant, Soil and Environment*, 61: 189-194. <https://doi.org/10.17221/974/2014-PSE>
- Hayat R., S. Ali, U. Amara, R. Khalid and I. Ahmed. 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*, 60: 579-598. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0117-1>
- Hernández-Ortega H.A., A. Alarcón, R. Ferrera-Cerrato, H.A. Zavaleta-Mancera, H.A. López-Delgado and M.R. Mendoza-López. 2012. Arbuscular mycorrhizal fungi on growth, nutrient status, and total antioxidant activity of *Melilotus albus* during phytoremediation of a diesel-contaminated substrate. *Journal of Environmental*

- Management*, 95: 319-324. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.02.015>
- Hernández-Valencia I., L. M. Lárez y J. V. García. 2017. Evaluación de la toxicidad de un suelo contaminando con diferentes tipos de crudos sobre la germinación de dos pastos tropicales. *Bioagro*, 29: 73-82. <http://ve.scielo.org/pdf/ba/v29n2/art01>
- IUSS Working Group WRB. 2015. Base referencial mundial del recurso suelo 2014, Actualización 2015. Sistema internacional de clasificación de suelos para la nomenclatura de suelos y la creación de leyendas de mapas de suelos. Informes sobre recursos mundiales de suelos 106. FAO, Rome, Italy. 205 p.
- Jiménez-Ballesta R. 2017. Introducción a la contaminación de suelos. Mundi-Prensa Libros. Madrid, España. 604 p.
- John R.C., A. Y. Itah, J. P. Essien and D. I. Ikpe. 2011. Fate of nitrogen-fixing bacteria in crude oil contaminated wetland ultisol. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 87:343–353. <https://doi.org/10.1007/s00128-011-0320-1>
- Johnson D.L., K.L. Maguire, D.R. Anderson and S.P McGrath. 2004. Enhance dissipation of chrysene in planted soil: the impact of a rhizobial inoculum. *Soil Biology and Biochemistry*, 36:33-38. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2003.07.004>
- Jones J. B., B. Wolf, and H. A. Mills. 1992. Plant Analysis Handbook. A Practical Sampling, Preparation, Analysis, and Interpretation Guide. Micro-Macro Publishing, Inc., USA. 213 p.
- Jones K.M., H. Kobayashi, B.W. Davies, M.E. Taga and G.C. Walker. 2007. How rhizobial symbionts invade plants: The *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nature Reviews Microbiology*, 5: 619-633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1705>
- Kaplan C.W. and C.L Kitts. 2004. Bacterial succession in a petroleum land treatment unit. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3):1777- 1786. <https://dx.doi.org/10.1128/AEM.70.3.1777-1786.2004>
- Khan S., M. Afzal, S. Iqbal, Q.M. Khan. 2013. Plant–Bacteria partnerships for the remediation of hydrocarbon contaminated soils. *Chemosphere*, 90: 1317-1332. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.09.045>
- Kirk J.L., P. Moutoglis, J. Klironomos, H. Lee and J.T. Trevors. 2005. Toxicity of diesel to germination, growth and colonization of *Glomus intraradices* in soil and in vitro transformed carrot root cultures. *Plant and Soil*, 270:23-30.

<https://doi.org/10.1007/s11104-004-1013-x>

- Kouda K. and M. I. 2010. Beneficial effects of mild stress (hormetic effects): dietary restriction and health. *Journal of Physiological Anthropology*, 29(4):127-132. <https://doi.org/10.2114/jpa2.29.127>
- Kuppusamy S., N.R. Maddela, M. Megharaj and K. Venkateswarlu. 2019. Total Petroleum Hydrocarbons: Environmental Fate, Toxicity, and Remediation. Springer. Cham, Switzerland. 264 p.
- Labud V., C. García, and T. Hernandez. 2007. Effect of hydrocarbons pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. *Chemosphere*, 66: 1863-1871. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.08.021>
- Largo-Pereda E. 2010. Degradación de alcanos mediante *Alcanivorax venustensis* inmovilizada en hidrogeles adhesivos y biodegradables. Tesis doctoral. Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea. Leioa, BI, España. 212 p.
- Leung K. T., K. Nandakumar, J. Sreekumari, H. Lee and J. T. Trevors. 2007. Biodegradation and bioremediation of organic pollutants in soil. In: Van Elsas, J. D., J. K. Jansson and J. T. Trevors (eds). *Modern Soil Microbiology*. Taylor & Francis Group. New York, USA. 672 p.
- Liu R., R.N. Jadeja, Q. Zhou and Z. Liu. 2012. Treatment and Remediation of Petroleum-Contaminated Soil Using Selective Ornamental Plants. *Environmental Engineering Science*, 29: 494-501. <https://doi.org/10.1089/ees.2010.0490>
- Logeshwaran P., M. Megharaj, S. Chadalavada, M. Bowman and R. Naidu R. 2018. Petroleum hydrocarbons (PH) in groundwater aquifers: An overview of environmental fate, toxicity, microbial degradation and risk-based remediation approaches. *Environmental Science & Technology*, 10: 175-193. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2018.02.001>
- López-Diazguerrero N.E., V.Y. González P., R.J. Hernández-Bautista, A. Alarcón-Aguilar, A. Luna-López y M. Königsberg F. 2013. Hormesis: lo que no mata, fortalece. In: Lifshitz A. (ed). *Gaceta Médica de México*. 149(4): 438-447. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenI.cgi?IDREVISTA=16&IDARTICULO=45538&IDPUBLICACION=4693>

- Lynch J., P. Marschner and Z Rengel. 2012. Effect of Internal and External Factors on Root Growth and Development. *In*: P. Marschner (ed.). Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants. 3er. ed. Elsevier. San Diego, CA. pp: 331-346. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384905-2.00013-3>
- Madigan M. T., J. M. Martinko, K. S. Bender, D. H. Buckley y D. A. Stahl. 2015. Brock. Biología de los Microorganismos. 14a. edición. Pearson Educación, S.A. Madrid, España. 1099 p.
- Maldonado-Chávez E., M. C. Rivera-Cruz, F. Izquierdo-Reyes y D. J. Palma-López. 2010. Efectos de la rizosfera, microorganismos y fertilización en la biorremediación y fitorremediación de suelos con petróleo crudo nuevo e intemperizado. *Universidad y Ciencia*, 26: 121-136. <http://www.scielo.org.mx/pdf/uc/v26n2/v26n2a1>
- Maletic S., S. Roncevic, B. Dalacija, J. Agbaba, M. Watson, A. Tubic and S. Ugarcina P. 2012. Characterization of weathered petroleum hydrocarbons during a landfarming bioremediation study. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 77:1671-1685. <https://doi.org/10.2298/JSC120430072M>
- Marín G.M.L., M.J Climent O., S. Iborra C., S. Encinas P., B. Ferrer R., F. Sancenón G., S. Navalón O. y M. Morera B. 2012. Química para ingeniería. Problemas y prácticas. Editorial Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. 244 p.
- Marquina M.E., N.E. González y Y. Castro. 2011. Caracterización fenotípica y genotípica de doce rizobios aislados de diversas regiones geográficas de Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, 59(3): 1017-1036. <https://doi.org/10.15517/rbt.v0i0.3375>
- Marrero-Coto J., I. Amores-Sánchez y O. Coto-Pérez. 2012. Fitorremediación, una tecnología que involucra a plantas y microorganismos en el saneamiento ambiental. *ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar*, 46(3):52-61. <https://www.redalyc.org/pdf/2231/223124988007.pdf>
- Meckenstock R.U. and H. Mouttaki. 2011. Anaerobic degradation of non- substituted aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, 22: 406-14. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.02.009>
- Meckenstock R.U., M. Boll, H. Mouttaki, J. S. Koelschbach, P. C. Tarouco, P. Weyrauch, X. Dong, and A. M. Himmelberg. 2016. Anaerobic degradation of benzene and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 26:

92-118. <https://doi.org/10.1159/000441358>

- Mena E., J. Villaseñor, M. A. Rodrigo, and P. Cañizares. 2016. Electrokinetic remediation of soil polluted with insoluble organics using biological permeable reactive barriers: effect of periodic polarity reversal and voltage gradient. *Chemical Engineering Journal*, 299: 30-36. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.04.049>
- Méndez-Natera J. R., C. Roque, K. Zapata y V. A. Otahola-Gomez. 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. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/2221562>
- Minoui S., D. Minai-Tehrani and M. Shahriari. 2015. Chapter 8 Phytoremediation of Crude Oil-Contaminated Soil by *Medicago sativa* (Alfalfa) and the Effect of Oil on its Growth. In: Öztürk M., M. Ashraf, A. Aksoy and M. Ahmad. (eds). *Phytoremediation for Green Energy*. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7887-0_8
- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *TRENDS in Plant Science*, 7(9): 405-410. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9)
- Molina L.M., L. Mahecha L., M. Medina S. 2005. Importancia del manejo de hongos micorrizógenos en el establecimiento de árboles en sistemas silvopastoriles. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 18(2): 162-175. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=295022959007>
- Montenegro-Gómez S.P., S. Gómez-Posada y S.E. Barrera-Berdugo. 2017. Efecto de la gallinaza sobre *Azotobacter* sp. *Azospirillum* sp. y hongos micorrízicos arbusculares en un cultivo de cebolla (*Allium stulosum*). *Entramado*, 26: 250-257. <https://doi.org/10.18041/entramado.2017v13n2.26232>
- Morales M. E. J., E. J. Morales-Rosales, E. Díaz-López, A. J. Cruz-Luna, N. Medina-Arias y M. Guerrero-De la Cruz. 2015. Tasa de asimilación neta y rendimiento de girasol en función de urea y urea de liberación lenta. *Agrociencia*, 49:163-176. <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v49n2/v49n2a5>
- Morales-Guzmán G., A. Alarcón, R. Ferrera-Cerrato, M.C. Rivera-Cruz, L.G. Torres-Bustillos y M.R. Mendoza-López. 2020. Efecto de bacterias emulsificantes en la atenuación de la fitotoxicidad de suelos contaminados con petróleo intemperizado. *Revista de Biología Tropical (Int. J. Trop. Biol.)*, 68(2): 692-703.

<https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/rbt/article/download/39327/41872/>

- Mukerji K.G, C. Manoharachary and J. Singh. 2006. Microbial Activity in the Rhizosphere. Soil Biology. Springer. Leipzig, Germany. 349p.
- Muñoz-Márquez E., C. Macías-López, A. Franco-Ramírez, E. Sánchez-Chávez, J. Jiménez-Castro y J. González-García. 2009. Identificación y colonización natural de hongos micorrízicos arbusculares en nogal. *Terra Latinoamericana*, 27(4): 355-361. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-57792009000400010
- Muratova AY, O.V. Turkovskaya, L.P. Antonyuk, O.E. Makarov, L. I. Pozdnyakova y V. V. Ignatov. 2005. Oil-Oxidizing Potential of Associative Rhizobacteria of the Genus *Azospirillum*. *Microbiology*, 74: 210–215. <https://doi.org/10.1007/s11021-005-0053-4>
- Muratova, A.Y., A. D. Bondarenkova, L. V. Panchenko and O. V. Turkovskaya. 2010. Use of Integrated Phytoremediation for Cleaning-up of Oil-Sludge-Contaminated Soil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 46(8): 789-794. <https://doi.org/10.1134/S0003683810080090>
- Nwoko C.O. 2014. Effect of Arbuscular Mycorrhizal (AM) Fungi on the Physiological Performance of *Phaseolus vulgaris* Grown under Crude Oil Contaminated Soil. *Journal of Geoscience and Environmental Protection*, 2: 9-14. <http://dx.doi.org/10.4236/gep.2014.24002>
- Obayori O.S., M.O. Ilori, S.A. Adebusoye, O.O. Amud and G.O. Oyetibo. 2008. Microbial population changes in tropical agricultural soil experimentally contaminated with crude petroleum. *African Journal of Biotechnology*, 7: 4512-4520. <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/59631/47921>
- Olalekan A. 2014. The effect of palm kernel oil (PKO) biodiesel-contaminated soil on morphological and biochemical properties of *Zea mays*. *Journal Plant Biochemistry Physiology*, 2: 1-6. <https://doi.org/10.4172/2329-9029.1000138>
- Orocio-Carrillo J.A., M.C. Rivera-Cruz, E. M. Aranda-Ibañez, A. Trujillo-Narcía, G. Hernández-Galvez, M.R. Mendoza-López. 2019. Hormesis under oil-induced stress in *Leersia hexandra* Sw. used as phytoremediator in clay soils of the Mexican humid tropic. *Ecotoxicology*, 28: 1063-1074. <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02106-1>
- Ortíz B. O., I. L. Ize y A. G. Gavilán. 2003. La restauración de suelos contaminados con

- hidrocarburos en México. *Gaceta Ecológica*, 69: 83-92.
<https://www.redalyc.org/pdf/539/53906906>
- Panchenko L., A. Muratova and O. Turkovskaya. 2017. Comparison of the phytoremediation potentials of *Medicago falcata* L. And *Medicago sativa* L. in aged oil-sludge-contaminated soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 24: 3117-3130.
<https://doi.org/10.1007/s11356-016-8025-y>
- Parmar N. and J. Dufresne. 2011. Chapter 2 Beneficial Interactions of Plant Growth Promoting Rhizosphere Microorganisms. *In: Singh A., N. Parmar and R. Kuhad(eds). Bioaugmentation, Biostimulation and Biocontrol. Volumen 10 de Soil Biology, vol 108. Springer Science & Business Media. Toronto, Canadá. 364 p.*
https://doi.org/10.1007/978-3-642-19769-7_2
- PEMEX (Petróleos Mexicanos). 2020. Informe anual 2019. PEMEX por el rescate de la soberanía.
https://www.pemex.com/acerca/informes_publicaciones/Documents/Informe-Anual/Informe%20Anual%202019.pdf. Consultado 24 de julio de 2020.
- Peng S., Q. Zhou, Z. Cai, and Z. Zhang. 2009. Phytoremediation of petroleum contaminated soils by *Mirabilis Jalapa* L in a greenhouse plot experiment. *Journal of Hazardous Materials*, 168: 1490-1496. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.036>
- Pentreath V, E. González, M. Barquín, S.M. Ríos, S. Perales. 2015. Bioensayo de toxicidad aguda con plantas nativas para evaluar un derrame de petróleo. *Revista de Salud Ambiental*, 15(1):4-12. <http://ojs.diffundit.com/index.php/rsa/article/view/551/668>
- Pepper L.I., P. C. Gerba, and J. T. Gentry. 2015. *Environmental Microbiology*. Academic Press is an imprint of Elsevier. 3ra Edition. United States of America. 705 p.
- Pereg L., L.E. de-Bashan and Y. Bashan. 2016. Assessment of affinity and specificity of *Azospirillum* for plants. *Plant and Soil*, 399:389–414. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2778-9>
- Pérez-Hernández I., S. Ochoa-Gaona, R.H. Adams S, M.C. Rivera-Cruz, V. Geissen. 2013. Tolerance of four tropical tree species to heavy petroleum contamination. *Water, Air, and Soil Pollut*, 224: 1637. <https://doi.org/10.1007/s11270-013-1637-7>
- Pernía B., D. Rojas-Tortolero, L. Sena, A. De sisto, Y. Inojosa y L. Naranjo. 2018. Fitotoxicidad de HAP, crudos extra pesados y sus fracciones en *Lactuca sativa*: Una

- interpretación integral utilizando un índice de toxicidad modificado. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 34 (1): 79-91. <http://dx.doi.org/10.20937/RICA.2018.34.01.07>
- Phillips J. M. and D. S. Hayman. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment to infection. *Transactions of the British Mycological Society*. Soc, 55: 158-161. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(70\)80110-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(70)80110-3)
- Pinedo J., R. Ibáñez, J.P.A. Lijzen, Á. Irabien. 2013. Assessment of soil pollution based on total petroleum hydrocarbons and individual oil substances. *Journal of Environmental Management*, 130: 72-79. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.08.048>
- Pinton R., Z. Varanini and P. Nannipieri. 2001. The Rhizosphere. Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface. Marcel Dekker. New York, USA. 440 p.
- Plice J.M., 1948. Some effects of crude petroleum on soil fertility. *Soil Science Society of America Journal*, 13: 413-416. <https://doi.org/10.2136/sssaj1949.036159950013000C0075x>
- Porta J., M. López- Acevedo y R.M. Poch. 2019. Edafología: Uso y protección del suelo. 4ª edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 624 p.
- Puente M.L. y J.E. García. 2013. Capítulo 1 Revisión del uso de *Azospirillum brasilense* como promotor de crecimiento en trigo y maíz en argentina. In: Puente, M.L., J.E. García y A. Peticari (eds). Uso Actual y Potencial de Microorganismos para Mejorar la Nutrición y el Desarrollo en Trigo y Maíz. Ediciones INTA. Instituto nacional de tecnología agropecuaria. Buenos Aires, Argentina. 81p.
- Pushpanathan M., S. Jayashree, P. Gunasekaran and J. Rajendhram. 2014. Microbial bioremediation: A metagenomic approach microbial. *Microbial Biodegradation and Bioremediation*, 1: 407-419. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800021-2.00017-0>
- Ramírez G.M. y A. Rodríguez. 2012. Mecanismos de defensa y respuestas de las plantas en la interacción micorrízica: una revisión. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XIV (1):271-284. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77624081025>
- Reinhold B., Hurek T., Fendrik I., Pot B., Gillis M., Kersters K., Thielemans D. and De Ley J. 1987. *Azospirillum halopraeferans* sp. nov., a nitrogen fixing organism associated with roots of Kallar (*Leptochloa fusca* (L) Kunth). *International Journal of Systematic and*

- Evolutionary Microbiology*, 37: 43-46. <https://doi.org/10.1099/00207713-37-1-43>
- Repetto J.M y G. Repetto K. 2009. Toxicología fundamental. 4ª Edición. Ediciones Diaz de Santos. Sevilla, España. 620p.
- Rivera-Cruz, MC., E. Maldonado- Chávez and A. Trujillo- Narcía. 2012. Effects of crude oil on the growth of *Brachiaria mutica* and *Leucaena leucocephala* and on soil and plant macronutrients. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 15 SUP 2: S30-S39. <http://www.revista.ccba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/1742/771>
- Rivera-Cruz M. C. 2011. Bacterias y hongos en suelos contaminados con petróleo crudo en Tabasco. In: Gamboa A.M., y Rojas H.R. (eds.). Recursos Genéticos microbianos en la Zona Golfo-Sureste de México V-1. Subsistema Nacional de Recursos Genéticos Microbianos (SUBNARGEM). Morelia Michoacán, México. pp: 77-87.
- Rivera-Cruz M. C., R. Ferrera-Cerrato, V. Volker H., R. Rodríguez V. y L. Fernández L. 2002. Adaptación y selección de microorganismos autóctonos en medios de cultivos enriquecidos con petróleo crudo. *Terra Latinoamericana*, 20: 423-434. <https://www.redalyc.org/pdf/573/57320407>
- Rivera-Cruz M.C., A. Trujillo-Narcía, M.A. Miranda y E. Maldonado. 2005. Evaluación toxicológica de suelos contaminados con petróleo nuevo e intemperizado mediante ensayos con leguminosas. *Interciencia*, 30: 326-331. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442005000600005&lng=es&tlng=es.
- Rodrigues E.M and M.R. Tótola. 2015. Petroleum: From Basic Features to Hydrocarbons Bioremediation in Oceans. *Open Access Library Journal*, 2: e2136. <http://dx.doi.org/10.4236/oalib.1102136>
- Rodríguez-Navarro D.N., M.S. Dardanelli and J.E. Ruíz-Saíenz. 2007. Attachment of bacteria to the roots of higher plants. *FEMS Microbiology Letters*, 272: 127–136. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00761.x>
- Roth L.E., K. Jeon and G. Stacey. 1988. Homology in endosymbiotic system: the term symbiosome. In: Palacios R. and D.P.S. Verma (eds.). Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions. American Phytopathological Society Press. Michigan, USA. 401 p.
- Rubio E. y A. Peticari. 2013. Capítulo 5 Empleo de *Azotobacter* como inoculante en cultivos

- extensivos. *In*: Puente, M.L., J.E. García y A. Peticari (Eds). 2013. Uso Actual y Potencial de Microorganismos para Mejorar la Nutrición y el Desarrollo en Trigo y Maíz. Ediciones INTA. Instituto nacional de tecnología agropecuaria. Buenos Aires, Argentina. 81p.
- Sánchez M.J.C. 2003. Conceptos básicos de ecotoxicología. *In*: Solis S. y J.A. López A (Eds). Principios básicos de contaminación ambiental. Universidad Autonoma del Estado de Mexico. Toluca, México. 279 p.
- Serralde O. A.M. Y M.M. Ramirez G. 2004. Análisis de poblaciones de micorrizas en maíz (*Zea mays*) cultivado en suelos ácidos bajo diferentes tratamientos agronómicos. *Revista Corpoica*, 5(1): 31-40. https://doi.org/10.21930/rcta.vol5_num1_art:22
- Serrano M. F., L. M. Torrado y D. D. Pérez. 2013. Impacto de los derrames de crudo en las propiedades mecánicas de suelos arenosos. *Revista científica "General José María Córdova"*, Sección Ciencia y tecnología, 11: 233-244. <http://www.scielo.org.co/pdf/recig/v11n12/v11n12a12>
- Shahsavari E., E.M. Adetutu, P.A. Anderson and A.S. Ball. 2013. Rhizoremediation of phenanthrene and pyrene contaminated soil using wheat. *Water Air Soil Pollut*, 224: 1495. <https://doi.org/10.1007/s11270-013-1495-3>
- Sharma R., S. Virendra, B and S. Sharma. 2017. Chapter 1 Impact of Rhizobial Inoculants on Rhizospheric Microbial Communities. *In*: Hansen A.P, D.K. Chounhary, P. K. Agrawal and A. Varma (eds). *Rhizobium* Biology and Biotechnology. Volume 50 de Soil Biology. Springer. Cham, Switzerland. 339 p. https://doi.org/10.1007/978-3-319-64982-5_1
- Sierra P.J.O. 2005. Fundamentos para el establecimiento de pasturas y cultivos forrajeros. 2ª edición. Editorial Universidad de Antioquia. Medellin, Colombia. 244 p.
- Silva R.de Cássia F.S., D.G. Almeida, R.D. Rufino, J.M. Luna, V.A. Santos and L.A. Sarubbo. 2014. Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills. *International Journal of Molecular Sciences*, 15: 12523-12542. <https://doi.org/10.3390/ijms150712523>
- Singh K. and S. Chandra. 2013. Treatment of petroleum hydrocarbons polluted environment through bioremediation: A review. *Pakistan of journal biological sciences*, 17(1): 1-8. <http://dx.doi.org/10.3923/pjbs.2014.1.8>

- Soil Survey Staff. 2014. Keys to Soil Taxonomy. 12th edition. United States Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service. USDA. NRCS. Washington, DC. USA. 360 p.
- Somasegaran P. and H. J. Hoben. 1994. Handbook for Rhizobia: Methods in Legume-*Rhizobium* Technology. NifTAL Project. University of Hawaii Springer. New York. Hawaii, USA. 450 p.
- Somers E., J. Vanderleyden and M. Srinivasan. 2004. Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Critical Reviews in Microbiology*, 30: 205–240. <https://doi.org/10.1080/10408410490468786>
- Somtrakoon K., W. Chouychai and H. Lee. 2018. Potential of butterfly pea (*Clitoria ternatea*) and yam vean (*Pachyrhizus erosus*) plants for phytoremediation of anthracene- and pyrene contaminated soil. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 40(3):725-731. <https://rdo.psu.ac.th/sjstweb/journal/40-3/30>
- Souza E.C., T.C. Vessoni-Penna, and R.P de Souza Oliveira. 2014. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 89: 88-94. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.01.007>
- Suzaki T., E. Yoro and M. Kawaguchi. 2015. Leguminous Plants: Inventors of Root Nodules to Accommodate Symbiotic Bacteria. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 316: 111-158. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.ircmb.2015.01.004>
- Taiz L. y E. Zeiger. 2002. Fisiología vegetal. Volumen 2. Unidad 2 Crecimiento y desarrollo. Castelló de la Plana: Publicacions de la Universitat Jaume. Massachusetts, USA. 652 p.
- Tanee F.B.G. and L.A. Akonye. 2009. Effectiveness of *Vigna Unguiculata* as a Phytoremediation Plant in the remediation of Crude Oil polluted soil for Cassava (*Manihot Esculenta*; Crantz) Cultivation. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 13(1): 43 – 47. <https://doi.org/10.4314/jasem.v13i1.55263>
- Teng Y., Y. Shen, Y. Luo, X. Sun, M. Sun, D. Fu, Z. Li and P. Christie. 2011. Influence of *Rhizobium meliloti* on phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by alfalfa in an aged contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 186: 1271-1276. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.11.126>

- Timmers A.C.J., E. Soupène, M.C Auriac, F. de Billy, J. Vasse, P. Boistard and G. Truchet. 2000. Saprophytic intracellular rhizobia in alfalfa nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*, 13(11):1204-1213. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.11.1204>
- Tomei M.C and A. Daugulis. 2013. Ex Situ Bioremediation of Contaminated Soils: An Overview of Conventional and Innovative Technologies. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 43: 2107-2139. <http://dx.doi.org/10.1080/10643389.2012.672056>
- Trejo D., C. Mreira, I. Bañuelos, L. Lara, G. Alafita and A. Reyes. 2013. Effect of diésel and biodiesel on the growth of *Brachidaria decumbens* inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 16: 391-398. <http://www.revista.ccba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/download/1642/835>
- Trujillo-Narcía A., M. C. Rivera-Cruz, L. C. Lagunes-Espinosa, D. J. Palma-López, S. Sánchez-Soto y G. Ramírez-Valverde. 2012. Efecto de la restauración de un fluvisol contaminado con petróleo crudo. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 28: 361-374. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=37025139008>
- Trujillo-Narcía A., M.C. Rivera-Cruz, L.C. Lagunes-Espinoza, D.J Palma-López, S. Sánchez-Soto y G. Ramírez-Valverde G. 2014. Uso de fertilizantes orgánicos en la enmendación de un fluvisol restaurado tras la contaminación con petróleo. *Interciencia*, 39(4):266-273. <https://www.redalyc.org/pdf/339/33930412009>
- Ullah A., Sun H., Yang X., and Zhang X. 2017. Drought coping strategies in cotton: increased crop per drop. *Plant Biotechnology Journal*, 15:271–284. <https://doi.org/10.1111/pbi.12688>
- Varjani S. J. 2017. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*, 223: 277-286. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.037>
- Vázquez-Luna D., M. Castelán-estrada, M.C Rivera-Cruz, Á.I. Ortiz-Ceballos y F. Izquierdo-Reyes. 2010. *Crotalaria incana* L. y *Leucaena leucocephala* Lam. (Leguminosae): especies indicadoras de toxicidad por hidrocarburos de petróleo en el suelo. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 26(3): 183-191. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rica/v26n3/v26n3a1>
- Vázquez-Luna M., A. Montiel-Flores, D. Vázquez-Luna y M.F. Herrera-Tenorio. 2011.

- Impacto del petróleo crudo en suelo sobre la microbiota de vida libre fijadora de nitrógeno. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 13(3): 511-523.
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93920942029>
- Velasco J.A. y T.L. Volke S. 2003. El composteo: una alternativa tecnológica para la biorremediación de suelos en México. *Gaceta Ecológica*, 66:41-53.
<https://www.redalyc.org/pdf/539/53906604>
- Velásquez A.J.A. 2017. Contaminación de suelos y aguas por hidrocarburos en Colombia. Análisis de la fitorremediación como estrategia biotecnológica de recuperación. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 8(1): 151 – 167.
<https://doi.org/10.22490/21456453.1846>
- Walkley A.J. and I.A. Black.1934. Estimation of soil organic carbon by the chromic acid titration method. *Soil Science*, 37: 29-38.
https://journals.lww.com/soilsci/Citation/1934/01000/AN_EXAMINATION_OF_THE_DEGTJAREFF_METHOD_FOR.3.aspx
- Wang J., Z. Zhongzhi, S. Youming, H. Wei, He Feng and S. Hongguang. 2008. Phytoremediation of petroleum polluted soil. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 5: 167-171 <https://doi.org/10.1007/s12182-008-0026-0>
- Wauquier J.P. 2004. El refino del Petróleo: Petróleo crudo Productos petrolíferos Esquemas de fabricación. Ediciones Díaz de Santos. Madrid, España. 462 p.
- Wei S. and S. Pan. 2010. Phytoremediation for soils contaminated by phenanthrene and pyrene with multiple plant species. *Journal of Soils and Sediments*, 10: 886-894.
<https://doi.org/10.1007/s11368-010-0216-4>
- Wolicka D., A. Suszek, A. Borkowski and A. Bielecka. 2009. Application of aerobic microorganisms in bioremediation in situ of soil contaminated by petroleum products. *Bioresource Technology*, 100: 3221-3227.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.020xxx>
- Yang S., X. Wen, L. Zhao, Y. Shi and H. Jin. 2014. Crude oil treatment leads to shift of bacterial communities in soils from the Deep active layer and upper permafrost along the China-Russia crude oil pipeline route. *PlosOne*, 9 (5): e96552.
<https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0096552>
- Zamora A, J. Ramos y M. Arias. 2012. Efecto de la contaminación por hidrocarburos sobre

algunas propiedades químicas y microbiológicas de un suelo de sabana. *Bioagro*, 24(1):5-12.

[http://www.ucla.edu.ve/bioagro/Rev24\(1\)/1.%20Efecto%20de%20la%20contaminaci%C3%B3n](http://www.ucla.edu.ve/bioagro/Rev24(1)/1.%20Efecto%20de%20la%20contaminaci%C3%B3n)

Zavala-Cruz J., F. Gavi-Reyes, R. H. Adams-Srhoeder, R. Ferrera-Cerrato y D.J. Palma-López. 2007. 7 Hidrocarburos del petróleo y tecnologías de biorremediación para suelos de tabasco. *In*: Palma-López D.J. y A. Triano S. (Comps.). Plan de uso sustentable de los suelos de Tabasco, Vol. II. Ed. COLEGIO DE POSTGRADUADOS-ISPROTAB. Tabasco, México. 160 p.

Zhang C., L. Guobin, X. Sha and S. Zilin. 2011. Rhizosphere soil microbial activity under different vegetation types on the Loess Plateau, China. *Geoderma*, 161: 115-125. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2010.12.003>