



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**  
INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRICOLAS

CAMPUS TABASCO

POSGRADO EN PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

**ACTIVIDAD MICROBIANA ASOCIADA A  
*Eleocharis palustris* (L) Roem. & Schult EN LA  
FITORREMEDIACIÓN DE SUELOS CON  
PETRÓLEO**

KARLA CHÁVEZ ÁLVAREZ

**T E S I S**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO

2022

La presente tesis, titulada “**ACTIVIDAD MICROBIANA ASOCIADA A *Eleocharis palustris* (L) Roem. & Schult EN LA FITORREMEDIACIÓN DE SUELOS CON PETRÓLEO**”, realizada por la alumna: Karla Chávez Álvarez, 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**

**POSTGRADO EN PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO**

**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERA: \_\_\_\_\_



**DRA. MARÍA DEL CARMEN RIVERA CRUZ**

ASESOR: \_\_\_\_\_



**DR. LORENZO A. ACEVES NAVARRO**

ASESOR: \_\_\_\_\_



**DR. RUBÉN GARCÍA DE LA CRUZ**

ASESOR: \_\_\_\_\_



**DR. ARMANDO VEGA LÓPEZ**

**H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO FEBRERO DEL 2022**

# ACTIVIDAD MICROBIANA ASOCIADA A *Eleocharis palustris* (L) Roem. & Schult EN LA FITORREMEDIACIÓN DE SUELOS CON PETRÓLEO

Karla Chávez Álvarez, MC  
Colegio de Postgraduados, 2022

## RESUMEN

Los gleysoles en humedales tropicales, localizados en regiones petroleras del mundo, han sido reportados con hidrocarburos derivados del petróleo crudo (PC), con niveles dañinos para los seres vivos. La monocotiledónea *Eleocharis palustris* (Cyperaceae) crece en humedales impactados por actividad petrolera en el sureste de México, y se desconoce ¿Cuál es la respuesta fisiológica y microbiológica de *E. palustris* para sobrevivir y recuperar el Gleysol contaminado con petróleo? Este estudio se realizó durante 38 semanas (nueve meses) en humedal artificial en invernadero, para determinar variables indicadoras de hormesis fisiológica y microbiológica al estrés por petróleo, que junto con la capacidad de la rizosfera de *E. palustris* para remover los HTP, integren una tecnología biológica para recuperar el humedal contaminado. Se establecieron dos experimentos (EXP). EXP-1 (factorial 7x37), constituido por siete dosis de petróleo (DP) (0, 3, 15, 30, 45, 60 y 75 g/kg base seca) y 38 tiempos [semana 1 a la 38 semana después del trasplante], en el que se evaluó la longitud de planta (LP), cantidad de plantas nuevas (PN) y tasa de crecimiento relativo (TCR) de LP y PN a las semanas, dos y 37. El EXP-2 (factorial 7x2), consistió de siete DP y dos tecnologías [atenuación natural (AN) y fitorremediación (FT)- *E. palustris*], y se evaluó materia seca de raíz (MSR) y aérea (MSA), número de raíces primarias (NRP), unidades formadoras colonias de microalgas (MIAL), hongos totales (HT), actinomicetos (ACT), *Pseudomonas* spp (PSE), bacterias hidrocarbonoclasticas (BHID), y remoción de HTP (%). En los 37 tiempos, la LP, PN, MSR, MSA y NRP 38 SDT presentaron índices de hormesis fisiológico  $\geq 1$  e indica respuesta favorable al estrés por PC. Las poblaciones de MIAL, HT, ACT, PSE y BHID rizosféricas promovieron índices horméticos microbiológicos  $\geq 1$ . Los cinco grupos microbianos fueron mayores en suelo con PC sometido a la FT, y menores en AN. *E. palustris* se adapta en humedales contaminados con petróleo, responde al estrés de manera positiva e induce hormesis permanente durante las 38 semanas del crecimiento, producción y en la actividad microbiana rizosférica en la FT. La FT a la semana 38, removió 71.7% de HTP en suelo bajo condiciones anaeróbicas. Es necesario estimular y extender el tiempo de prueba para FT, para obtener una recuperación de las condiciones originales del suelo.

**Palabras claves:** Hormesis fisiológica, hormesis microbiológica, fitorremediación, microalgas.

# MICROBIAL ACTIVITY ASSOCIATED WITH *Eleocharis palustris* (L) Roem. & Schult IN THE FITORREMEDICATION OF SOILS WITH PETROLEUM

Karla Chávez Álvarez MC  
Colegio de Postgraduados, 2022

## SUMMARY

Gleysols in tropical wetlands, located in oil regions of the world, have been reported with hydrocarbons derived from crude oil (CP), with levels harmful to living beings. The monocotyledone *Eleocharis palustris* (Cyperaceae) grows in wetlands impacted by oil activity in southeastern Mexico, and what is the physiological and microbiological response of *E. palustris* to survive and recover oil-contaminated Gleysol? This study was carried out during 38 weeks (nine months) in artificial wetland in greenhouse, to determine variables indicating physiological and microbiological hormesis to oil stress, which together with the ability of the rhizosphere of *E. palustris* to remove the HTP, integrate a biological technology to recover the contaminated wetland. Two experiments (EXP) were established. EXP-1 (factorial 7x37), consisting of seven doses of oil (DP) (0, 3, 15, 30, 45, 60 and 75 g/kg dry base) and 38 times [week 1 to 38 week after transplantation], in which the plant length (LP), number of new plants (PN) and relative growth rate (CRT) of LP and PN at weeks, two and 37 were evaluated. The EXP-2 (factorial 7x2), consisted of seven DP and two technologies [natural attenuation (AN) and phytoremediation (FT)- *E. palustris*], and evaluated dry root matter (MSR) and aerial matter (MSA), number of primary roots (NRP), colony forming units of microalgae (MIAL), total fungi (HT), actinomycetes (ACT), *Pseudomonas* spp (PSE), hydrocarbonoclastic bacteria (BHID), and HTP removal (%). In the 37 times, the LP, PN, MSR, MSA and NRP 38 SDT presented indexes of physiological hormesis  $\geq 1$  and indicates favorable response to stress by CP. Rhizospheric MIAL, HT, ACT, PSE and BHID populations promoted microbiological hormetic indices  $\geq 1$ . The five microbial groups were higher in soil with PC undergoing FT, and lower in NA. *E. palustris* adapts to oil-contaminated wetlands, responds to stress positively and induces permanent hormesis during 38 weeks of growth, production and rhizospheric microbial activity in FT. The FT at week 38 removed 71.7% of PHT in soil under anaerobic conditions. It is necessary to stimulate and extend the test time for FT, to obtain a recovery from the original soil conditions.

**Key words:** physiological hormesis, microbiological hormesis, phytoremediation, microalgae.

## AGRADECIMIENTOS

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

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

A la Dra. María del Carmen Rivera Cruz, Profesora Investigadora del Campus Tabasco, responsable del Laboratorio de Microbiología Ambiental y Aplicada, quien dedicó y me brindó su tiempo, paciencia, conocimientos, confianza y sobre todo su valioso apoyo, para dirigir desde el comienzo este proyecto de investigación hasta la culminación del mismo, siempre estaré agradecida por lo que me ayudó a construir en mi vida.

Al Dr. Lorenzo Armando Aceves Navarro por sus consejos, apoyo y sugerencias realizadas en cada etapa de la tesis y mi formación académica.

Al Dr. Rubén García de la Cruz por su apoyo, sugerencias y sus consejos para el desarrollo de la investigación y mi formación académica.

Al Dr. Armando Vega López Profesor Investigador del Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Unidad Profesional Zacatenco, Ciudad de México, responsable del Laboratorio de Toxicología Ambiental, quien me ha brindado su confianza, tiempo, sugerencias y apoyo para el desarrollo de la investigación, pese a la distancia.

Y por último agradezco a todas las personas que contribuyeron y formaron parte de mi vida en este lapso de tiempo en el Colegio de Postgraduados Campus Tabasco. A mi amiga Gissela Cristel Martínez de la Cruz, por su valioso apoyo, compañía y pláticas que hacían más cortos los días duros de trabajo, aun en días que tenía que madrugar siempre me brindó su apoyo. También a mi amigo Erikzon Limón Soto y a mi amiga Lucely Casango de la Cruz que también estuvieron apoyándome en días de conflicto y me levantaban el ánimo cada vez que se podía.

¡¡ A todos los llevaré en mi corazón por estar en esta parte de mi vida, Dios los bendiga!!

## DEDICATORIAS

*A Dios: por darme vida, salud, sabiduría y fortaleza a lo largo de mi vida y por permitirme terminar mi maestría, rodeándome de personas con grandes valores y principios que me ayudaron a seguir forjándome a nivel profesional y como persona.*

*A mis padres: Norma del Carmen Álvarez López y Juan Carlos Chávez Heredia, que sin ellos no hubiera logrado una meta más en mi vida profesional... muchas gracias por sus consejos, por creer siempre en mí, apoyarme en cada momento y siempre estar junto a mí...*

*Agradezco todo su amor y por haberme forjado sin dejar de luchar  
¡Los amo!*

*A mi amado esposo que siempre estuvo para mí en la elaboración de esta tesis, apoyándome de principio y fin y mucho más allá... viéndome cumplir cada reto y objetivos... animándome, creyendo día con día en mí y acompañándome a crecer más allá de lo que pensaba que podía y que es mi complemento al  
M.C. José Alberto Orocio Carrillo,  
doy gracias a Dios por tenerte, por que sin duda y con mucha certeza sé,  
que eres la pieza de mi rompecabezas,  
sé que juntos seguiremos creciendo...*

**¡¡¡¡TE AMO MUCHISIMO MI AMOR!!!!**

*Y a mis hermanas Lizbeth Chávez Álvarez, Alexandra Chávez Álvarez, Cristina Chávez Álvarez y a mi hermano Juan Carlos Chávez Álvarez que siempre están en cada momento, formando parte de mi vida, y enseñándoles que si se pueden cumplir todos los retos que se presenten en la vida.*

*¡Están en mi corazón!*

## CONTENIDO

	Paginas
AGRADECIMIENTOS .....	iv
DEDICATORIAS .....	v
ÍNDICE DE CUADROS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
INTRODUCCIÓN .....	1
REVISIÓN DE LITERATURA .....	4
2.1. El ecosistema acuático costero.....	4
2.1.1. El humedal de agua dulce .....	5
2.1.2. Características del suelo en los humedales .....	6
2.2. Carbono en el suelo y nitrógeno .....	8
2.2.1. El carbono en el suelo .....	8
2.2.2. El nitrógeno en el suelo.....	9
2.3. Definición y composición de petróleo fresco .....	10
2.3.1. Estructura y tipos de hidrocarburos del petróleo .....	11
2.4. Efecto toxico y hormetico al petróleo .....	12
2.4.1. Efecto de los hidrocarburos en plantas semiacuáticas .....	13
2.4.2. Efecto de hidrocarburos en microorganismos.....	13
2.4.2.1. Bacterias.....	13
2.4.2.2. Hongos heterótrofos.....	15
2.4.2.3. Microalgas.....	16
2.5. Tecnologías biológicas para recuperar suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo .....	16

2.5.1. Atenuación natural .....	17
2.5.2. Fitorremediación .....	17
2.5.3. Biorremediación.....	18
2.5.4. Bioestimulación .....	18
2.6. Definición y características de la rizosfera .....	19
2.7. Función e importancia de los microorganismos en suelo y rizosfera .....	20
2.8. Características de los microorganismos.....	21
2.8.1 <i>Pseudomonas</i> spp.....	21
2.8.2. Bacterias hidrocarbonoclasticas.....	22
2.8.3. Microalgas.....	23
2.8.4. Hongos heterótrofos.....	24
2.8.5. Actinomicetos .....	25
2.9. Rutas de degradación de hidrocarburos en suelo aeróbica y anaeróbica .....	25
2.10. Importancia de la ciperácea <i>Eleocharis palustris</i> .....	28
2.11. Taxonomía de la ciperácea <i>Eleocharis palustris</i> .....	29
OBJETIVOS .....	32
3.1. Objetivo general.....	32
3.1.2. Objetivos particulares .....	32
HIPOTESIS.....	33
4.1. Hipotesis general.....	33
4.1.2. Hipotesis particulares.....	33
MATERIALES Y MÉTODOS .....	34
5.1. Etapa I. Colecta y procesamiento de suelo .....	34
5.2. Etapa II. Trabajo en microtúnel .....	34

5.2.1. Características morfológicas de <i>E. palustris</i> .....	34
5.2.2. Propagación de material vegetal .....	38
5.2.3. Petróleo fresco .....	39
5.2.4. Diseño y configuración experimental .....	39
5.2.4.1. Establecimiento de los experimentos.....	40
5.2.5. Seguimiento de crecimiento de <i>E. palustris</i> .....	41
5.2.6. Levantamiento de experimento.....	41
5.3. Etapa III. Trabajo en laboratorio.....	42
5.3.1. Variables en planta.....	42
5.3.1.1. Número de raíces .....	42
5.3.1.2. Materia seca de raíz y aérea.....	43
5.3.2. Variables microbiológicas en suelo y rizosfera .....	44
5.3.2.1. Población de microalgas .....	44
5.3.2.2. Población hongos y Actinomicetos.....	44
5.3.2.3. Población de bacterias.....	47
5.3.2.4. Diversidad de bacterias .....	48
5.3.2.5. Seguimiento de pigmentos fluorescentes de <i>Pseudomonas</i> spp .....	48
5.3.2.5.1. Características microscópicas Tinción Gram de cepa <i>Pseudomona</i> spp .....	50
5.3.3. Variables químicas en suelo y rizosfera.....	51
5.3.3.1. pH, conductividad eléctrica, materia orgánica y nitrógeno total .....	51
5.3.3.2. Degradación de Hidrocarburos Totales de Petróleo .....	51
5.3.4. Índice hormesis a petróleo .....	52
5.3.5. Etapa IV. Análisis estadísticos.....	53
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	54

6.1. Propiedades químicas de suelo y rizosfera .....	54
6.2. Cinética de crecimiento de <i>Eleocharis palustris</i> en suelo con petróleo .....	56
6.3. Índices hormesis a petróleo.....	60
6.3.1. Índice hormético fisiológico .....	60
6.3.1.1. Crecimiento y producción de <i>Eleocharis palustris</i> .....	60
6.3.1.2. Índice hormético en microorganismos rizosféricos .....	64
6.4. Actividad microbiana rizosférica y remoción de hidrocarburos totales del petróleo .....	66
6.4.1. Los microorganismos según dosis de petróleo y tecnología aplicada .....	66
6.4.2. Diversidad <i>Pseudomonas</i> spp en rizosfera y suelo .....	68
6.4.3. Remoción de hidrocarburos totales del petróleo.....	74
CONCLUSIONES .....	78
LITERATURA CITADA .....	79

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Clasificación de los tipos de petróleo crudo de acuerdo con la gravedad API descritas por Petróleos Mexicanos (PEMEX).....	11
Cuadro 2	Especies vegetales en humedales que crecen en suelos con hidrocarburos totales del petróleo.....	14
Cuadro 3	Grupos de bacterias que crecen y degradan hidrocarburos del petróleo.....	14
Cuadro 4	Recopilación de los porcentajes de degradación de hidrocarburos por especies de hongos, reportados en trabajos de investigación.....	15
Cuadro 5	Recopilación de microalgas en presencia de hidrocarburos, reportados en trabajos de investigación.....	16
Cuadro 6	Compuestos orgánicos detectados en exudados de raíz de plantas.....	20
Cuadro 7	Clasificación para las formas unicelulares y coloniales para ordenes <i>Chlorococcales</i> y <i>Volvocales</i> .....	24
Cuadro 8	Reactivos del medio de cultivo para hongos totales.....	46
Cuadro 9	Reactivos del medio de cultivo para actinomicetos.....	47
Cuadro 10	Reactivos del medio de cultivo Agar cetrimida para bacterias del género <i>Pseudomonas</i> spp formula por litro (pH final: 7,2 ± 0,2).....	47
Cuadro 11	Reactivos del medio de cultivo carbón combinado modificado para bacterias hidrocarbonoclasticas, fórmula por litro.....	48
Cuadro 12	Propiedades químicas en suelo y rizosfera de <i>E. palustris</i> contaminado con petróleo a 38 SDT.....	55
Cuadro 13	Índices hormético fisiológico y microbiológico total 38 SDT de <i>E. palustris</i> expuesta a diferentes dosis de petróleo crudo.....	66
Cuadro 14	Población de microalgas, hongos totales y actinomicetos en suelo y rizosfera de <i>E. palustris</i> contaminado con petróleo.....	67
Cuadro 15	Población de bacterias en suelo y rizosfera de <i>E. palustris</i> contaminado con petróleo.....	68
Cuadro 16	Diversidad de <i>Pseudomonas</i> spp a la 38 semana después de la fitorremediación con <i>E. palustris</i> de suelo con petróleo crudo.....	70
Cuadro 17	Diversidad de <i>Pseudomonas</i> spp en suelo de <i>E. palustris</i> en suelo 38 semanas después de la atenuación.....	70
Cuadro 18	Características macroscópicas y microscópicas de <i>Pseudomonas</i> fluorescentes en suelo 38 semanas después de la fitorremediación.....	72
Cuadro 19	Características macroscópicas y microscópicas de <i>Pseudomonas</i> fluorescentes en suelo 38 semanas después de la atenuación natural.....	74

Cuadro 20	Correlación de la degradación de HTP, tecnología, materia radical y microorganismos .....	77
-----------	---	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Descomposición y reciclado microbiano en sedimentos de humedales.....	4
Figura 2	Características de los humedales inundados de manera temporal o permanentemente, sus raíces siempre en contacto con suelo húmedo o anegado.....	5
Figura 3	Esquema de la disposición de una partícula de suelo con microcolonias.....	7
Figura 4	Clasificación de los componentes químicos del petróleo fresco.....	11
Figura 5	Proceso de rizodegradación de suelos contaminados con petróleo, en la rizosfera de las plantas con liberación de agua y dióxido de carbono al medio .....	18
Figura 6	Esquematación de las diferentes zonas que conforman la rizosfera.....	19
Figura 7	Etapas de la oxidación de un hidrocarburo alifático .....	26
Figura 8	Oxidación de un compuesto aromático mediado por oxigenasas .....	27
Figura 9	<i>Eleocharis palustris</i> (L.) Roem. & Schult .....	29
Figura 10	Diferencia entre una gramínea, ciperáceas y juncos .....	30
Figura 11	Flujograma del proceso de investigación .....	35
Figura 12	Espécimen de <i>Eleocharis palustris</i> (L) Roem. & Schult .....	37
Figura 13	Rizoma (a), tallo subterráneo (b) y raíz fibrosa (c) de <i>Eleocharis palustris</i> .....	37
Figura 14	Proceso de floración y producción de escamas florales y aquenios de <i>Eleocharis palustris</i> .....	38
Figura 15	Selección de los rizomas de <i>Eleocharis palustris</i> de 0.5 cm de diámetro y con de tallos de 5 cm de altura .....	39
Figura 16	Trasplante inicial de rizomas en suelo para establecer los tratamientos de fitorremediación con <i>E. palustris</i> .....	40
Figura 17	a) Conteo directo de plantas nuevas, b) Medición de longitud de planta rizomatosa con regla graduada en <i>E. palustris</i> .....	41
Figura 18	a) UE de la tecnología fitorremediación, b) UE de la tecnología atenuación natural, c) Recolección de suelo, d) Separación de suelo, rizosfera, raíz y material aéreo, e) Recolección de material aéreo, f) Separación de suelo y raíz .....	42
Figura 19	Conteo de raíz fresca de <i>E. palustris</i> a la 38 SDT .....	43

Figura 20	a) Materia seca aérea de <i>E. palustris</i> , b) Materia seca de raíz a la semana 38 SDT, c) Materia seca radical y aérea en estufa de secado.....	43
Figura 21	Proceso del conteo de microalgas. a) Vista de Microalgas sobre la superficie del suelo después de la FT y AN. b) Pesado de muestra (g) y depósito de 9 ml de agua estéril. c) Agitación de muestra suspendida en agua. d) Conteo usando cámara de Neubauer y microscopio compuesto (40X).....	45
Figura 22	Aislamiento de población de hongos y actinomicetos totales mediante la técnica de cuenta viable por dilución seriada .....	46
Figura 23	Descripción morfológica en placa de agar en medios de cultivo sólido.....	49
Figura 24	Aislamiento por siembra por estría en placa .....	49
Figura 25	Tabla Munsell para plantas y telas .....	50
Figura 26	Proceso de tinción Gram de las cepas de <i>Pseudomonas</i> spp .....	51
Figura 27	Extracción de hidrocarburos totales del petróleo con equipo soxhlet y cuantificación. a) Peso de muestra fresca. b) Extracción con diclorometano y c) peso de hidrocarburos totales del petróleo .....	52
Figura 28	Cinética de crecimiento de <i>Eleocharis palustris</i> en suelo sin y con seis dosis de petróleo en 38 semanas. A) Longitud de planta. B) Plantas nuevas en el macollo .....	58
Figura 29	Cinética de la tasa de crecimiento de <i>Eleocharis palustris</i> en suelo sin y con seis dosis de petróleo en 38 semanas. A) Longitud de planta. B) Plantas nuevas en macollo .....	59
Figura 30	Índice de hormesis semanal a la exposición a petróleo en el crecimiento de <i>E. palustris</i> . (A). Longitud de planta. (B) Plantas nuevas .....	61
Figura 31	Efecto en crecimiento de seis dosis de petróleo en <i>E. palustris</i> a la semana 38 después del trasplante.....	62
Figura 32	Índices de hormesis de producción a petróleo fresco. a). Raíces primarias, a). Materia seca raíz, c). Materia seca aérea y d). Materia seca total de la Cyperaceae <i>E. palustris</i> .....	63
Figura 33	Índice hormético microbiológico en rizosfera de Microalgas, Hongos totales y Actinomicetos. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas.....	65
Figura 34	Índice hormético microbiológico en <i>Pseudomonas</i> spp y bacterias hidrocarbonoclastas.....	65
Figura 35	Remoción de hidrocarburos totales del petróleo según las tecnologías de fitorremediación (suelo rizosférico) y atenuación natural (suelo no rizosférico) a las 38 semanas (nueve meses).....	76

## INTRODUCCIÓN

Un problema histórico en humedales tropicales es la contaminación del suelo con hidrocarburos asociados a la extracción de petróleo crudo (PC) y su conducción a los centros de procesamiento industrial, que por su condición de anegamiento los ductos subterráneos se dañan y conlleva a la posibilidad de su liberación accidental al medio ambiente (Rivera-Cruz, 2011; Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2016). El PC está compuesto de cuatro constituyentes; hidrocarburos saturados, hidrocarburos aromáticos, asfáltenos y resinas. Muchos hidrocarburos (PAHs) y sus epóxidos son tóxicos, mutagénicos y/o cancerígenos para los microorganismos y organismos superiores incluyendo al hombre (Dodor *et al.*, 2004; Winquist *et al.*, 2014; Moubasher *et al.*, 2015).

El petróleo en el suelo anegado del humedal cambia su equilibrio estructural original; el aire, agua, suelo y sus propiedades fisicoquímica (Iturbe *et al.*, 2007), y el balance biológico, sin embargo, incrementan evidencias documentales del efecto positivo de los HTP sobre la biología de los organismos en estos ambientes históricamente contaminados (González-Moscoso *et al.*, 2017; Orocio-Carrillo *et al.*, 2019; Alanbary *et al.*, 2019; Rodríguez-Urbe *et al.*, 2021).

El efecto positivo de los TPH sobre el suelo se ha estudiado con la relación que existe entre la cantidad, composición, grado de afectación y beneficio sobre los organismos vivos (Al-Mutairi *et al.*, 2008). El empleo de bioindicadores fisiológicos y microbiológicos que midan la toxicidad y hormesis de un suelo contaminado con hidrocarburos del PC presenta grandes ventajas respecto a indicadores físicos-químicos entre las que destacan su mayor sensibilidad, su carácter integrador, y su alta velocidad de respuesta ((Dutta y Podile, 2010; Pérez *et al.*, 2008; Pentreath *et al.*, 2015).

La respuesta fisiológica de plantas y microorganismos se representa con un valor numérico absoluto que indica daño y/o beneficio a la exposición al contaminante y el valor absoluto en función del tipo de suelo y del contaminante vertido (Chaîneau *et al.*, 2003; Pérez *et al.*, 2008; Calabrese y Blain, 2009). Los indicadores de toxicidad y hormesis son valores absolutos que muestran el efecto negativo o positivo de los organismos vivos a HTP, se obtiene de la relación de la respuesta de los organismos expuesto al contaminante respecto al suelo sin contaminación.

La hormesis es un fenómeno de dosis-respuesta típico en donde dosis bajas y altas estimulan a los seres vivos (Calabrese, 2013), y esta es una capacidad evolutiva alcanzada de los organismos que muestra respuesta adaptativa al estrés y tiene muchas implicaciones para la ecología, toxicología, evaluación de riesgo y otras disciplinas (Agathokleous y Calabrese, 2020a; Calabrese y

Agathokleous, 2020). La hormesis puede orientar el control y remediación de la contaminación, práctica que busca responder que “tan limpio es limpio” (Agathokleous y Calabrese, 2020b; Fan *et al.*, 2021). Los parámetros en planta y sus interacciones con microorganismos que han sido identificados fácilmente como indicadores de estrés a la contaminación con TPH en ecosistemas son; el crecimiento, densidad de raíz, acumulación de materia aérea y radical de plantas, población de microorganismos y diversidad (USEPA, 2002; Vásquez-Luna *et al.*, 2011; Agathokleous *et al.*, 2020).

Los humedales tropicales cubiertos con plantas monocárpicas  $C_3$  de la familia Cyperaceae presentan ciclos de crecimiento cortos, acumulación alta de materia vegetal aérea y raíz, como resultado de tasas fotosintéticas altas que dan la capacidad de la célula para sintetizar azúcares, proteínas, y polisacáridos altos (Sand-Jensen y Frost-Christensen, 1999; Salisbury y Ross, 1999), y posee un sistema radical fibroso sostenido en suelo anegado formando la rizosfera, en donde la raíz deposita exudados orgánicos e inorgánicos que actúan como inductores para el crecimiento de microalgas, actinomicetos, hongos y bacterias benéficas para degradar HTP (Cao *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2011; Neumann y Römheld, 2012). Las microalgas a través de su metabolismo proveen entrada de carbono a la formación del suelo, a través de la fotosíntesis y, a medida que se metaboliza, producen y liberan ácido carbónico acidificando el medio (Pepper y Gerry, 2015), mientras que los hongos, actinomicetos y bacterias son heterótrofas disponen de nutriente para los organismos en el suelo;  $NH_3$ ,  $H_2PO_4^{2-}$ ,  $SO_4^{2-}$  y oxidan y/o reducen carbono de origen biogénico y petrolífero en el suelo o sedimento (Madigan *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2015).

Entre las plantas adaptadas al estrés al petróleo en humedales tropicales y subtropicales se ha reportado; *Typha latifolia* (Omari *et al.*, (2003); *Scirpus grossus* (Al-Baldawi *et al.*, 2015a) y *Ludwigia octovalvis* (Al-mansoori *et al.*, 2017), *Scirpus mucronatus*, *Cyperus laxus*, *Cyperus esculentus* y *L. peploides* (Al-mansoori *et al.*, 2021), y la raíces de estas hospedan microorganismos que incrementan su población expuestos al estrés por hidrocarburos, entre estas; bacterias fijadoras de N, *Pseudomonas* spp., y *Rhodococcus* spp (Vásquez-Luna *et al.*, 2011; Rodríguez-Uribe *et al.*, 2021). En el humedal los hidrocarburos son sorbidos en el suelo y sedimento haciendo más lento su metabolismo y biodegradación (Madigan *et al.*, 2015), y durante su biodegradación los hongos, actinomicetos y bacterias utiliza  $H_2$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $Fe^{3-}$ ,  $NO_3^-$  como donadores de electrones (Maier y Gentry, 2015). La rizosfera en el humedal cambia al suelo y agua e induce mayor flujo de oxígeno, moléculas orgánicas, nutrientes y microorganismos que

liberan enzimas para que los hidrocarburos estén accesibles en la fase acuosa para las plantas y microorganismos heterótrofos, ya sea como hidrocarburos policíclicos disueltos o absorbidos en materia orgánica solubilizada (Cunningham *et al.*, 1996; Brady y Weil, 2008).

La descontaminación del suelo de los humedales, con hidrocarburos del petróleo en las últimas décadas ha sido abordada por diferentes organismos públicos y científicos, y ha llamado la atención el uso de la fitorremediación con plantas nativas, siendo una opción de reparación atractiva, y rentable (Calabrese y Agathokleousalabre, 2021). La fitorremediación en condiciones anaeróbicas, aunque es más lenta que la aeróbica tiene potencial para reducir el impacto nocivo en la naturaleza al mineralizar a los hidrocarburos en CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O (Lawniczak *et al.*, 2020).

Las plantas nativas de humedales; *Ludwigia octovalvis* (Alanbary *et al.*, 2019), *Spartina alterniflora* (Fleeger *et al.*, 2015) y *Scirpus grossus* (Al-Baldawi *et al.*, 2015b) han demostrado capacidad de remoción de HTP derivado de petróleo, gasolina y diésel de suelo anegado.

*Eleocharis palustris* es una Cyperaceae que se establece en grandes área de humedales con uso ganadero en el trópico húmedo mexicano, producen órganos de almacenamiento subterráneos, como bulbos basales y tubérculos, que permiten la regeneración de plantas en ambientes estrés y después de la contaminación con hidrocarburos del petróleo actuando como órganos perennes (Daehler, 1998; Rivera-Cruz *et al.*, 2016), sin embargo se desconoce su potencial en estudios de adaptación, hormesis y recuperación de suelos con petróleo.

# REVISIÓN DE LITERATURA

## 2.1. El ecosistema acuático costero

El ecosistema acuático costero se ubica en las costas de los continentes del planeta viviente, con una clara influencia marina, tales como estuarios, manglares, comprenden la parte más baja de las cuencas fluviales, bahías, estuarios y lagunas costeras, zonas rocosas, playas, arrecifes, plataformas continentales y taludes, así como las zonas de afloramiento, también se encuentran incluidos sistemas de agua dulce como, lagos, estanques, arroyos, ríos, humedales, marismas, pantanos y turberas (Aylward *et al.*, 2005; FAO, 2019).

Los componentes del ecosistema acuático (agua, sedimento, plantas y microorganismos) interactúan formando el ciclado de nutrientes y generan energía en el sistema. Los cuatro principales nutrientes que los organismos descomponen, gasifican y, por tanto, reciclan hacia la atmósfera son: el carbono, el nitrógeno, el azufre y el fósforo, este último también se transforma de formas de sulfuro insoluble a formas solubles que quedan más fácilmente disponibles para los organismos (Figura 1) (Odum *et al.*, 2006).

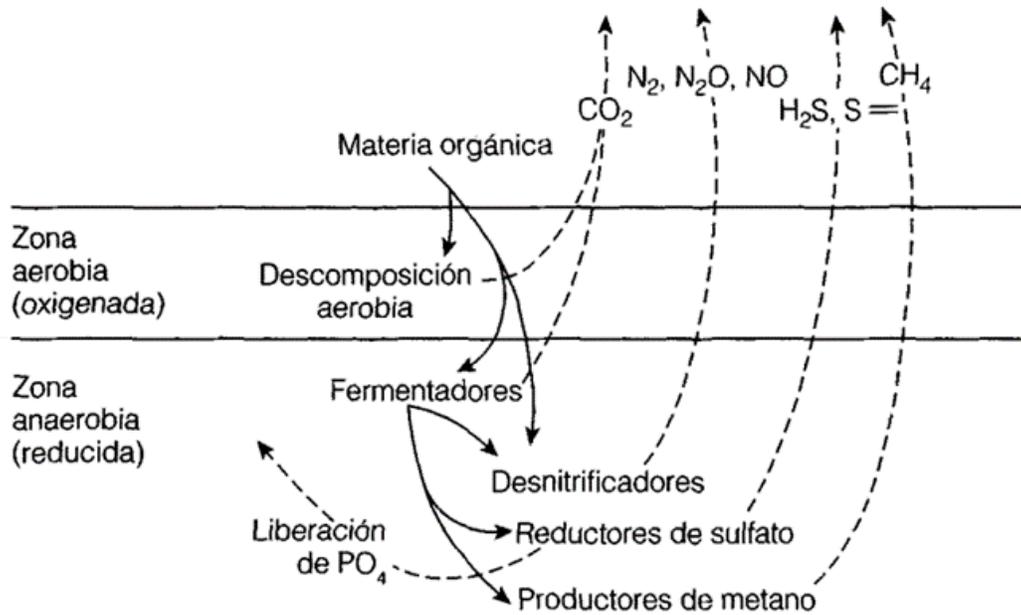


Figura 1. Descomposición y reciclado microbiano en sedimentos de humedales

### 2.1.1. El humedal de agua dulce

Los humedales son considerados zonas de transición entre los ecosistemas terrestres y los acuáticos, con inundación temporal o permanente sin ser por completo ecosistemas acuáticos (Lefevre *et al.*, 2003; Berlanga-Robles *et al.*, 2008), sujetos o no a la influencia de mareas, como pantanos, ciénagas y marismas, cuyos límites los constituyen el tipo de vegetación hidrófila de presencia permanente o estacional; las áreas en donde el suelo es predominantemente hídrico; y las áreas lacustres o de suelos permanentemente húmedos por la descarga natural de acuíferos (LAN, 2020) (Figura 2). Adicionalmente podrán incluir sus zonas ribereñas, costeras, arrecifes de coral adyacentes de una profundidad que no sobrepase los seis metros en marea baja, así como humedales artificiales (RAMSAR, 2016).

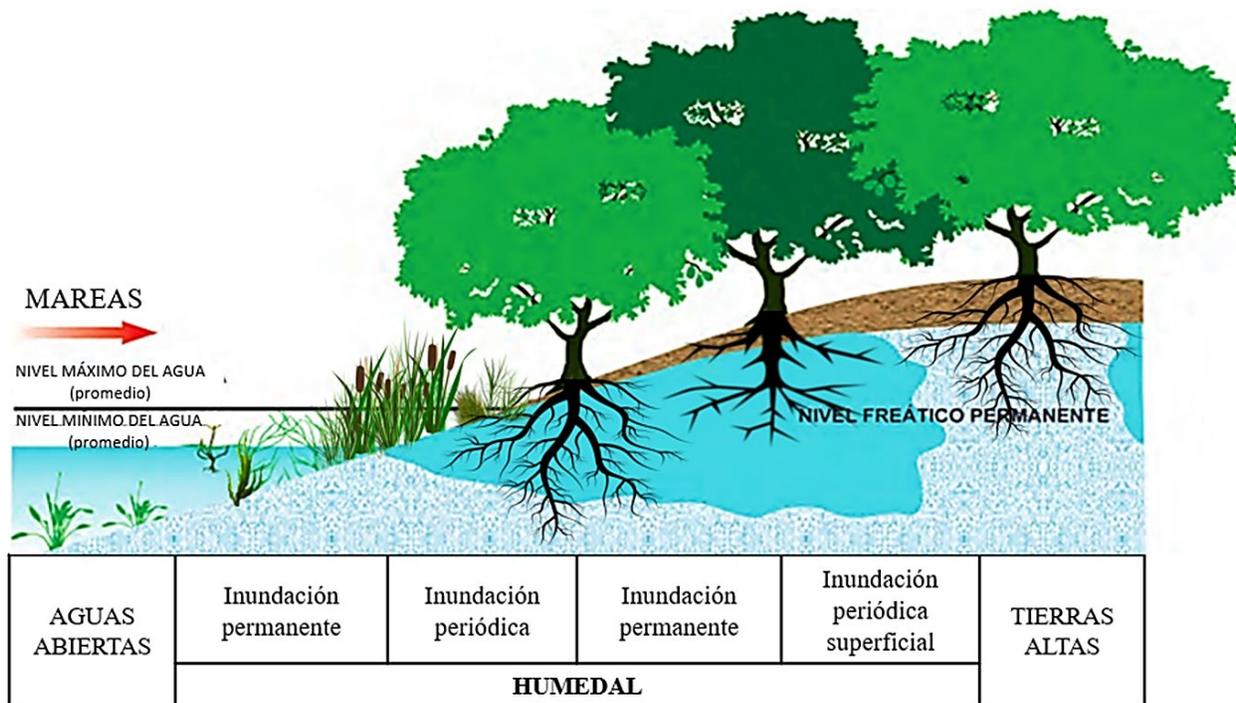


Figura 2. Características de los humedales inundados de manera temporal o permanentemente, sus raíces siempre en contacto con suelo húmedo o anegado (Moreno-Casasola y Infante-Mata, 2016-modificado).

Abarca un amplio grupo de sistemas y ambientes con diferentes características, pero a la vez tienen propiedades comunes que permiten asociarlos (Berlanga-Robles *et al.*, 2008) son ampliamente reconocidos como una de las fuentes más importantes de emisiones globales de metano, pero también capturan grandes cantidades de dióxido de carbono en los suelos (Nahlik y Mitsch, 2011; Mitsch *et al.*, 2013, Were *et al.*, 2021). Además, cuentan con una cobertura de solo el 5-8% de la superficie terrestre de la tierra (Nahlik y Fennessy, 2016).

Los ecosistemas de agua dulce se encuentran en lagos, estanques, arroyos y ríos, y en los humedales, marismas, pantanos y turberas asociados con estos cuerpos de agua. Los sistemas de agua dulce brindan múltiples servicios tanto a los seres humanos como al medio ambiente, que incluyen: 1) consumo, energía y transporte; 2) servicios culturales; 3) mantenimiento de la calidad del agua, control de inundaciones, erosión; y 4) el apoyo a la biodiversidad y la función de los ecosistemas (Aylward *et al.*, 2005).

La Convención de Ramsar sobre Humedales (2018), menciona que los humedales naturales sanos y en funcionamiento son fundamentales para los medios de subsistencia humanos y el desarrollo sostenible, a escala mundial todavía cubren una superficie mayor que la de Canadá (12,1 millones de km<sup>2</sup> con un 54% inundado de forma permanente y un 46% inundado de manera estacional), los humedales están disminuyendo rápidamente a largo plazo en todo el mundo, con pérdidas del 35% entre 1970 y 2015.

### **2.1.2. Características del suelo en los humedales**

Los humedales contienen un suelo que permanece cubierto por el agua la mayor parte del tiempo, sin embargo, su definición es similar a un suelo terrestre. El suelo es un componente abiótico del ecosistema, una combinación que comprende minerales y materia orgánica, así como fases líquidas y gaseosas los cuales adquieren un espacio y se definen por horizontes o capas de la superficie terrestre de una profundidad variable y conservan características propias, estas tres fases se pueden organizar de muy diferentes formas, adquiriendo diversas proporciones para dar lugar a centenares de suelos (Lladó, 2012; SSS, 2014). El suelo está integrado por partículas sólidas (mineral y orgánica), gaseosas, agua y sobre las partículas sólidas se hospedan los microorganismos (Figura 3) (Madigan *et al.*, 2015).

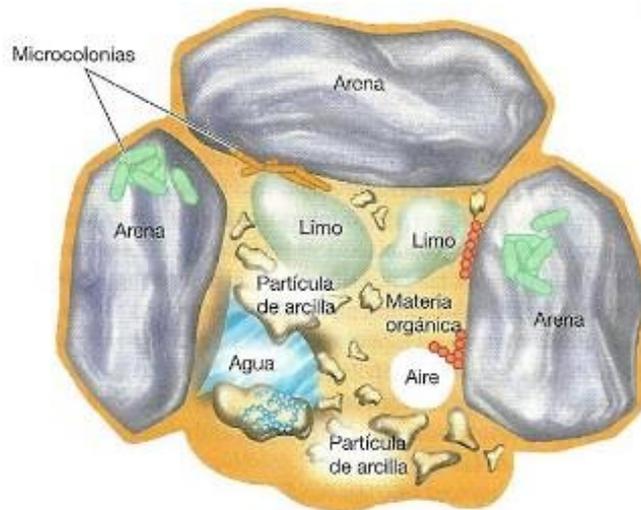


Figura 3. Esquema de la disposición de una partícula de suelo con microcolonias (Madigan *et al.*, 2015).

En el suelo se encuentran partículas de diferentes tamaños, según el diámetro se clasifican en arcilla (< 0.002 mm), limo (0.002 a 0.1 mm) y arena (0.1 a 2 mm). Las diferentes clases de textura del suelo reciben nombres como arcillo-arenosa o arcillo-limosa, según los porcentajes de arena, limo y arcilla que contienen. Un suelo en el que no domina ningún tamaño de partícula se denomina marga o textura media (Madigan *et al.*, 2015).

Los suelos de los humedales se caracterizan por la saturación de agua, la situación anóxica, la acumulación de materia orgánica, el brillo, el moteado, la segregación de hierro/manganeso, la oxidación de los canales radiculares, los revestimientos de los poros del suelo, la producción de una matriz de suelo reducida y por su potencial de almacenamiento de carbono (Collins y Kuehl, 2000; USDA/NRCS, 2006, Hernández, 2009). Es muy común encontrar suelos que desarrollan propiedades gléyicas (del ruso gley, masa de suelo lodosa), es decir que se encuentran saturados de agua la mayor parte del tiempo. Los colores que predominan en la cara de los agregados son rojizos, parduzcos o amarillentos y se combinan con colores en la superficie en grises o azulados (IUSS, 2015).

Los regímenes de humedad del suelo están definidos en términos del nivel del manto freático y por la presencia o ausencia de agua retenida, por ejemplo, el régimen de humedad údico (*L. udus*, húmedo), donde el suelo se encuentra seco <90 días acumulativos al año y <45 días consecutivos en verano. En este régimen se presentan los suelos de los climas húmedos, con la precipitación

bien distribuida y también aquellos de climas donde las precipitaciones se concentran en varios meses, pero que son suficientes para recargar el suelo para los meses secos (Porta *et al.*, 2014; SSS, 2014).

Los humedales agrupan a una gran gama de hábitats continentales, costeros y marinos que comparten ciertas características climáticas y geológicas, así como una hidrología y una edafología singular (Moreno-Casasola y Travieso-Bello, 2007). Se pueden encontrar en los humedales y cerca de ellos vegetación como el pasto *Megathyrsus maximus* (Jacq.), de la familia de las poaceae (Valencia *et al.*, 2017), la gramínea *Leersia hexandra* de la familia de las poaceae (Rivera-Cruz *et al.*, 2016; Arias-Trinidad *et al.*, 2017; Trujillo-Narcía *et al.*, 2018; Orocio-Carrillo *et al.*, 2019), el pasto *Brachyaria mutica* es una herbácea perteneciente a la familia de las poáceas (Maldonado-Chávez *et al.*, 2010), la Cyperaceae, *Cyperus articulatus* que es conocida en campo con el nombre de tule (Rivera-Cruz *et al.*, 2016) y *Eleocharis palustris* de la familia Cyperaceae que contiene un tallo triangular (Asturnatura, 2013), esta Cyperaceae es extremadamente variable y sumamente difícil en términos taxonómicos (Alvarado-Cárdenas *et al.*, 2013). También se puede encontrar especies de manglares como el mangle blanco (*Laguncularia racemosa*) perteneciente a la familia Combretaceae (Agráz-Hernández *et al.*, 2006, CONABIO, 2018) y el mangle negro *Avicennia germinans* de la familia acanthaceae (Hernández *et al.*, 2008), entre muchas otras especies de familias botánicas como *Fabaceae*, *Combretaceae* (Adams *et al.*, 2009), juncales y carrizales (Moreno-Casasola y Infante-Mata, 2016).

## **2.2. Carbono en el suelo y nitrógeno**

### **2.2.1. El carbono en el suelo**

El carbono es el elemento químico clave en los compuestos de naturaleza orgánica, se encuentra entre los océanos, la atmósfera, el suelo y el subsuelo, instancias que conforman los depósitos, reservorios o almacenes de carbono. El intercambio de carbono entre el reservorio terrestre y el atmosférico es el resultado de procesos naturales como la fotosíntesis y la respiración, así como de la emisión de gases de origen antrópico (Rügnitz *et al.*, 2009). El carbono orgánico del suelo (COS) es un componente importante del ciclo global del Carbono, ocupando un 69.8 % del Carbón orgánico de la biosfera (FAO, 2001).

El COS asociado a la materia orgánica del suelo proporciona coloides de alta capacidad de intercambio catiónico. Su efecto en las propiedades físicas se manifiesta mediante la modificación

de la estructura y la distribución del espacio poroso del suelo (Martínez *et al.*, 2008). Además, se encuentra en forma de residuos orgánicos poco alterados de vegetales, animales y microorganismos, en forma de humus y en formas muy condensadas de composición próxima al Carbón elemental (Jackson, 1964). El COS se relaciona con la sustentabilidad de los sistemas agrícolas afectando las propiedades del suelo relacionadas con el rendimiento sostenido de los cultivos. El COS se vincula con la cantidad y disponibilidad de nutrientes del suelo, al aportar elementos como el N cuyo aporte mineral es normalmente deficitario (Martínez *et al.*, 2008). Los humedales desempeñan un papel importante en el secuestro y almacenamiento de carbono (RAMSAR, 2018) Los humedales brindan importantes servicios al medio ambiente, actúan de modo crucial en la captación de CO<sub>2</sub> atmosférico ante el presente escenario del cambio climático. (Pérez *et al.*, 2015).

El ciclo del carbono es un ciclo biogeoquímico, por el cual el carbono se intercambia entre la biosfera, la litosfera, la hidrosfera y la atmósfera de la Tierra (Pérez *et al.*, 2015). Por lo cual el carbono circula a través de los océanos, de la atmósfera, de la superficie y el interior terrestre, en un gran ciclo biogeoquímico. El ciclo del carbono está constituido por cuatro reservorios principales de carbono interconectados por rutas de intercambio. Los reservorios son la atmósfera, los océanos (que incluyen el carbono inorgánico disuelto, los organismos marítimos y la materia no viva), los sedimentos (que incluyen los combustibles fósiles), la biosfera terrestre (sistemas de agua dulce y material orgánico no vivo, como el carbono del suelo). Los movimientos anuales de carbono entre reservorios ocurren debido a varios procesos químicos, físicos, geológicos y biológicos (Raisman y González, 2007).

### **2.2.2. El nitrógeno en el suelo**

El nitrógeno (N) es el elemento más abundante en la atmósfera terrestre, pero no está bioquímicamente disponible para la mayoría de los organismos (Dahal *et al.*, 2017). El contenido de N orgánico en el suelo incluye una gran variedad de formas (Binkley y Vitousek, 1989), puede no estar disponible para las plantas en moléculas complejas o perderse por denitrificación, erosión del suelo, lixiviado, volatilización (Philippot y Germon, 2005).

Del N total del suelo el 78 y 95% corresponde a N orgánico, de esta fracción se encuentran aminoácidos (20-40%), aminoazúcares (5-10%), bases púricas y pirimídicas (1-2%) (Florencia, 2019). El N orgánico y atmosférico no pueden ser utilizados directamente por las plantas.

Para que estas absorban el nitrógeno, primero se debe convertir en amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y/o nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), que son las formas disponibles para la absorción por las plantas, el  $\text{NH}_4^+$  se metaboliza en las raíces y requiere más oxígeno, mientras que el metabolismo del  $\text{NO}_3^-$  tiene lugar en las hojas (Sela, 2019). El  $\text{NO}_3^-$  es la principal forma de absorción por las plantas (Florencia, 2019).

### 2.3. Definición y composición de petróleo fresco

La palabra petróleo se deriva del latín *petroleum*, aceite de roca. Constituido por una mezcla de hidrocarburos y otros compuestos persistentes orgánicos que se presentan en el medio ambiente, ya sea en estado sólido, líquido, o gaseoso (Lamichhane *et al.*, 2016; SGM, 2017). La apariencia del petróleo crudo se modifica, suele ser de color negro, marrón oscuro, amarillento o incluso verdoso dependiendo de su composición química (Varjani y Upasani, 2013; Varjani, 2014) está constituido, principalmente por hidrogeno y carbono (Harman, 2013). También por una mezcla compleja de hidrocarburos aromáticos, poliaromáticos lineales o ramificados, saturados o insaturados, alifáticos, heterocíclicos, naftenos, asfáltenos, alicíclicos y compuestos volátiles, además el 60-90% de ellos están clasificados como biodegradables (Sammarco *et al.*, 2013; Falkova *et al.*, 2016, Lamichhane *et al.*, 2016).

Los diferentes tipos de petróleo crudo se clasifican desde el punto de vista industrial dependiendo de las propiedades físicas, químicas y su ubicación geográfica de su producción. La clasificación se expresa en una escala normalizada por el Instituto Americano del Petróleo (*American Petroleum Institute*, API), denominado como gravedad API (Marroquín, 2007; Varjani, 2014). El petróleo mexicano se identifica actualmente con cinco tipos el Maya, Istmo, Olmeca, Altamira y el Talam (Cuadro 1). Esta diversidad conforma lo que se conoce como mezcla mexicana:

- ✦ El crudo Maya (Pesado), con densidad de 21 a 22° API y 3.3% de contenido de azufre,
- ✦ El Talam (Pesado), con densidad de 16° API y amargo con 2.8% de azufre en peso,
- ✦ El crudo Altamira (Pesado), con una gravedad de 15° a 16.5° API y un contenido de azufre en el rango de 5.5% a 6.0% en peso,
- ✦ El petróleo tipo Istmo (Ligero), con densidad de 32-33° API y 1.8% de azufre en peso,
- ✦ El crudo Olmeca (Superligero), con densidad de 39.3° API y un contenido de 1.3% de azufre (SENER, 2018).

Cuadro 1. Clasificación de los tipos de petróleo crudo de acuerdo con la gravedad API descritas por Petróleos Mexicanos (PEMEX).

Clasificación	Petróleo crudo	Gravedad °API
Pesado	Altamira	15-16.5
Pesado	Talam	16
Pesado	Maya	21-22
Ligero	Istmo	32-33
Superligero	Olmeca	39.3

Fuente: SENER, 2018

### 2.3.1. Estructura y tipos de hidrocarburos del petróleo

El petróleo crudo contiene cuatro formas estructurales en función de la solubilidad en solventes orgánicos: compuestos saturados, aromáticos, asfáltenos y resinas (Gary y Handwerk, 2003; Delgado, 2006; Lamichhane *et al.*, 2016) (Figura 4).

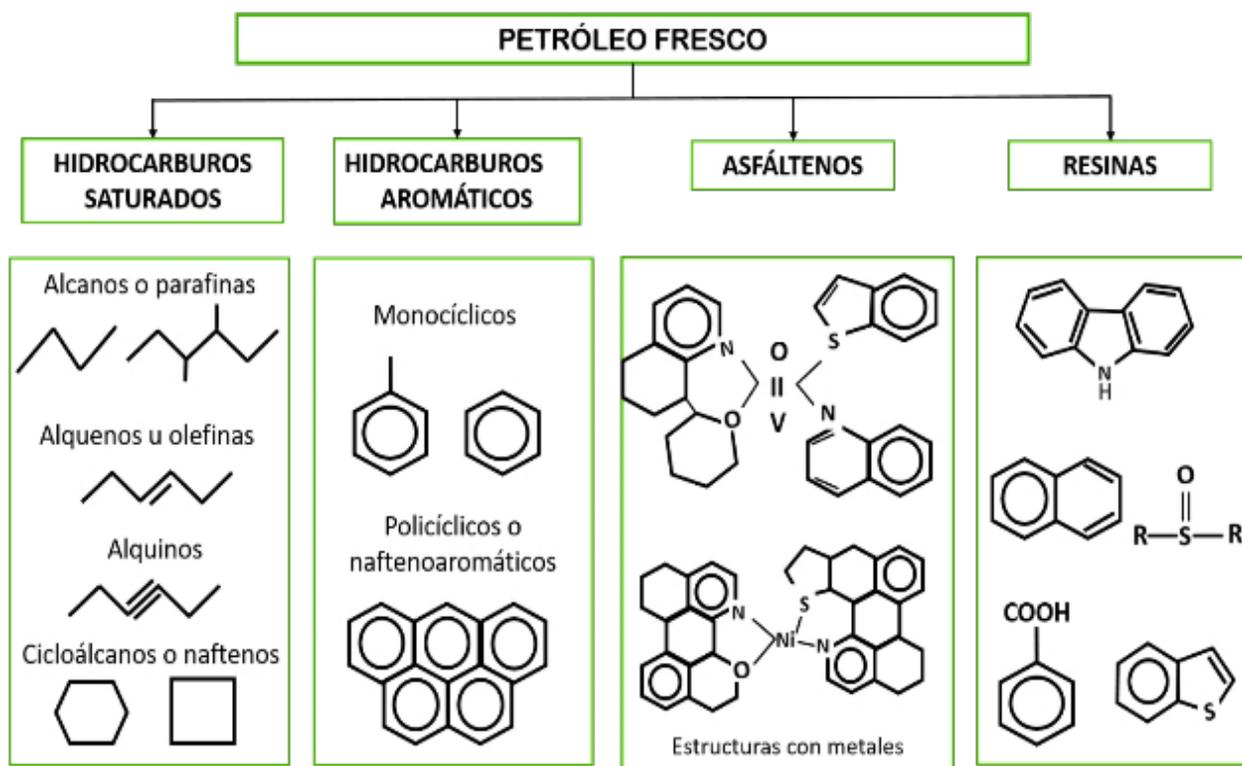


Figura 4. Clasificación de los componentes químicos del petróleo fresco (Gary y Handwerk, 2003; Delgado, 2006; Lamichhane *et al.*, 2016).

## 2.4. Efecto tóxico y hormético al petróleo

La presencia de materias externas en el ecosistema, como sustancias químicas entre estas los hidrocarburos del petróleo (iónicos y no iónicos) que afecta a los organismos acuáticos, la biota del suelo y la salud de los seres humanos (Oyuela *et al.*, 2016; Fauzul *et al.*, 2019; Qurratu *et al.*, 2018; Oyuela *et al.*, 2016), y sus efectos dependen de factores como, el tipo de compuesto químico, la cantidad vertida y el tiempo de exposición (ATSDR, 1999). Los efectos tóxicos de la contaminación por hidrocarburos para la salud humana incluyen irritación de la piel, enfermedad de garganta, asma, bronquitis, daños en el sistema nervioso central, cáncer e incluso la muerte (ATSDR, 1999; Morales Terrés *et al.*, 2010; Fauzul *et al.*, 2020).

Las manifestaciones de los seres vivos al exponerse a los contaminantes pueden ser positiva y/o negativa del crecimiento de los seres vivos y poblaciones microbianas (Morris, 2004; Senthil, 2020). Los efectos de los hidrocarburos pueden ser tóxicos y agudos (Morales Terrés *et al.*, 2010; Oyuela *et al.*, 2016; Titah *et al.*, 2018), pero también pueden inducir efecto positivo llamado hormesis.

Esta toxicidad se debe principalmente a un modo de acción de tipo narcótico inespecífico, que se basa en la partición de un contaminante disuelto en la capa lipofílica de la membrana celular, lo que provoca una alteración de la integridad de la membrana (Sikkema *et al.*, 1995). Este efecto es importante porque, debido a las interacciones hidrófobas, la membrana celular es un sitio importante de acumulación de contaminantes orgánicos en los microorganismos (Kenawy *et al.*, 2007).

La hormesis es una relación dosis-respuesta bifásica que se caracteriza por una estimulación máxima entre un 30 y un 60% mayor que los valores del grupo de control (Calabrese y Baldwin, 2001; Calabrese y Blain, 2011; Calabrese y Mattson, 2017, Agathokleous *et al.*, 2020; Calabrese y Agathokleous, 2021). La hormesis puede mejorar entendimientos y tiene importantes implicaciones para las prácticas de remediación (Agathokleous y Calabrese, 2020b; Agathokleous *et al.*, 2020). Los resultados horméticos se pueden representar en una curva en forma de U, donde se puede observar disminuciones por debajo del control en dosis bajas seguida del ascenso en dosis más altas o una curva en forma de U invertida que expresa el incremento por arriba del control a dosis menores seguida de un descenso a dosis más altas (Calabrese y Baldwin, 2001; Calabrese y Baldwin, 2003a, Calabrese y Baldwin, 2003b ). Los criterios de dosis-respuesta en forma de J son

proporcionalmente similares a los de la dosis-respuesta en forma de U invertida (Calabrese y Blain, 2009).

Existen plantas y microorganismos que, al verse expuestos a hidrocarburos del petróleo, han desarrollado capacidades denominadas como hormesis, para estimular su crecimiento en suelo contaminado con petróleo (Jia *et al.*, 2013; González-Moscoso *et al.*, 2017; Orocio-Carrillo *et al.*, 2019). La hormesis es una capacidad desarrollada evolutivamente y tiene varias implicaciones para la ecología, la toxicología, la evaluación de riesgos y muchas otras (sub) disciplinas (Calabrese y Agathokleous, 2020). Actualmente se está desarrollando investigaciones sobre hormesis en plantas y tiene amplias implicaciones para la evaluación de riesgos, la biología del estrés y la agricultura (Agathokleous *et al.*, 2020).

#### **2.4.1. Efecto de los hidrocarburos en plantas semiacuáticas**

En el Cuadro 2 se observa 10 especies de plantas que crecen en suelo de humedales y contaminados con hidrocarburos del petróleo crudo. Entre estas especies predominan los pastos al crecer en suelo que contienen entre 7.9 hasta 238 g/kg de PC. En segundo lugar, las Cyperaceae pueden sobrevivir en suelo contaminado de 5 hasta 119.373 g/kg de PC. Y en tercer lugar las poaceae que pueden adaptarse en suelos con 30 g/kg de PC.

#### **2.4.2. Efecto de hidrocarburos en microorganismos**

##### **2.4.2.1. Bacterias**

Los microorganismos son los agentes primarios de la degradación de contaminantes orgánicos en el suelo, al incrementar la población microbiana en un suelo contaminado, se puede también acelerar la degradación de los contaminantes orgánicos como los hidrocarburos (Wan *et al.*, 2002, Lee *et al.*, 2007).

Las bacterias tienen un crecimiento rápido y una mayor capacidad de adaptación a los medios contaminados, lo que incrementa la probabilidad de éxito en la biodegradación de compuestos como el hidrocarburo (Velasco, 2004). Al respecto Salleh *et al.* (2003) informa que *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp. y *Mycobacterium* sp degradan alcanos, monoaromáticos y poliaromáticos respectivamente; Leahy *et al.*, (1990) y Milić *et al.*, (2009) indican que entre los géneros de bacterias en suelo y agua que degradan hidrocarburos son: *Pseudomonas* sp, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*,

*Micrococcus*, *Rhodococcus* *Mycobacterium*, *Corynebacterium* y *Bacillus*. En el Cuadro 3, se observan diferentes grupos de bacterias.

Cuadro 2. Especies vegetales en humedales que crecen en suelos con hidrocarburos totales del petróleo.

<b>Especie</b>	<b>Petróleo (g/kg)</b>	<b>Efecto</b>	<b>Referencia</b>
<i>Echinochloa polystachya</i>	7.7 a 79	Positivo	Rivera-Cruz y Trujillo-Narcía, 2004
<i>Brachiaria mutica</i>	7.8 a 79	Positivo	Rivera-Cruz y Trujillo-Narcía, 2004
<i>Brachiaria humidicola</i>	7.7 a 78	Positivo	Zavala-Cruz <i>et al.</i> , 2005
<i>Brachiaria mutica</i>	50 a 79	Positivo	Maldonado-Chávez <i>et al.</i> , 2010
<i>Cyperus rotundus</i>	20 a 102	Positivo	Basumatary <i>et al.</i> , 2012
<i>Cyperus articulatus</i>	60 a 119	Positivo	Rivera-Cruz <i>et al.</i> , 2016
<i>Eleocharis palustris</i>	601 a 119	Positivo	Rivera-Cruz <i>et al.</i> , 2016
<i>Leersia hexandra</i> Sw	61 a 119	Positivo	Rivera-Cruz <i>et al.</i> , 2016;
<i>Leersia hexandra</i> Sw	14 a 112	Positivo	Arias-Trinidad <i>et al.</i> , 2017
<i>Panicum maximum</i>	30	Positivo	Hernández-Valencia <i>et al.</i> , 2017
<i>Scirpus mucronatus</i> L	40	Positivo	Purwanti <i>et al.</i> , 2015
<i>Leersia hexandra</i> Sw	75 a 119	Positivo	Trujillo-Narcía <i>et al.</i> , 2018
<i>Eleocharis palustris</i>	75 a 119	Positivo	Trujillo-Narcía <i>et al.</i> , 2018
<i>Leersia hexandra</i> Sw	7.9 a 238	Positivo	Orocio-Carrillo <i>et al.</i> , 2019
<i>Cyperus laevigatus</i> L	0.050	Positivo	Fahid <i>et al.</i> , 2020
<i>Scirpus mucronatus</i> L	5 a 30	Positivo	Fadhile <i>et al.</i> , 2021

Cuadro 3. Grupos de bacterias que crecen y degradan hidrocarburos del petróleo.

<b>Bacterias</b>	<b>Hidrocarburo</b>	<b>Referencia</b>
Bacterias fijadoras de N	HTP	Rivera-Cruz <i>et al.</i> , 2016
Bacterias solubilizantes de fosfato	Petróleo ligero	Rivera-Cruz <i>et al.</i> , 2016
Bacterias solubilizadoras de potasio	Petróleo ligero	Rivera-Cruz <i>et al.</i> , 2016
<i>Azotobacter spp</i>	HTP	López-Jiménez <i>et al.</i> , 2019
<i>Azospirillum spp</i>	HTP	López-Jiménez <i>et al.</i> , 2019
Bacterias Hidrocarbonoclasticas	HTP	Orocio-Carrillo <i>et al.</i> , 2019
Bacterias solubilizadoras de fosfato	HTP	Martínez-Hernández <i>et al.</i> , 2021
Hongos micorrízicos arbusculares	HTP	Martínez-Hernández <i>et al.</i> , 2021
<i>Pseudomonas sp.</i>	HTP	Nwinyi <i>et al.</i> , 2016
<i>Pseudomonas sp.</i>	HTP	Mnif <i>et al.</i> , 2017
<i>Pseudomonas sp.</i>	HTP	Widdel y Rabus, 2001
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	HTP	McNally <i>et al.</i> , 1998

### 2.4.2.2. Hongos heterótrofos

Para la degradación y eliminación de hidrocarburos se han utilizado diversos tipos de hongos ya que han mostrado potencial para reproducir cantidades significativas de enzimas eficientes para su degradación y eliminación (Saraswathy y Hallberg, 2002; Chávez-Gómez *et al.*, 2003; Genovese *et al.*, 2008).

En el Cuadro 4 se muestran porcentajes de degradación de hidrocarburos por especies de hongos, reportados en trabajos de investigación. Los hongos filamentosos, que se encuentran comúnmente en sustratos lignocelulósicos, producen enzimas extracelulares de baja especificidad, que pueden degradar diferentes compuestos recalcitrantes, como hidrocarburos, resinas y asfaltos (Tortella *et al.*, 2005).

Cuadro 4. Recopilación de los porcentajes de degradación de hidrocarburos por especies de hongos, reportados en trabajos de investigación.

Hongos	Degradación %	Referencia
<i>Beauveria alba</i>	49	Chaîneau <i>et al.</i> , 1999
<i>Penicillium simplicissimum</i>	45	Chaîneau <i>et al.</i> , 1999
<i>Bjerkandera adusta</i>	50	Meysami y Baheri, 2003
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	50	Meysami y Baheri, 2003
<i>Pleurotus ostreatus</i>	50	Meysami y Baheri, 2003
<i>Pleurotus pilmanarius</i>	50	Meysami y Baheri, 2003
<i>Trametes versicolor</i>	50	Meysami y Baheri, 2003
<i>Pleurotus ostreatus</i>	73 y 58	Leonardi <i>et al.</i> , 2007
<i>Rhizopus sp</i>	47	Mancera-López <i>et al.</i> , 2008
<i>Aspergillus sydowii</i>	40	Mancera-López <i>et al.</i> , 2008
<i>Penicillium funiculosum</i>	45	Mancera-López <i>et al.</i> , 2008
<i>Aspergillus Niger</i> ,	64.6 y 76.3	Pérez-Armendáriz <i>et al.</i> , 2010
<i>Penicillium glabrum</i>	65 y 72	Pérez-Armendáriz <i>et al.</i> , 2010
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	78.5 y 62.3	Pérez-Armendáriz <i>et al.</i> , 2010
<i>Anthracoxyllum</i>	80	Acevedo <i>et al.</i> , 2011
<i>Polyporus sp. S133</i>	93 y 43	Kristanti <i>et al.</i> 2011
<i>Aspergillus terreus</i>	98.5	Ali <i>et al.</i> , 2012
<i>Trematophoma</i>	70- 90	Moghimi <i>et al.</i> , 2017
<i>Aspergillus spp</i>	73	Contreras y Carreño, 2018

### 2.4.2.3. Microalgas

Las microalgas fotosintéticas proporcionan oxígeno, por tal han sido aprovechadas ampliamente en el campo de la biotecnología para la elaboración de consorcios que permitan optimizar procesos tales como la biorremediación (Subashchandrabose *et al.*, 2011).

En el Cuadro 5 se reportan microalgas en presencia de hidrocarburos, reportados en trabajos de investigación.

Cuadro 5. Recopilación de Microalgas en presencia de hidrocarburos, reportados en trabajos de investigación.

Microalgas	Referencia
<i>Chlorella vulgaris</i>	Silva <i>et al.</i> , 2008
<i>Phormedium bohneri</i>	Dwivedi <i>et al.</i> , 2010
<i>Oscillatoria tenuis</i>	Dwivedi <i>et al.</i> , 2010
<i>Chlamydomonas angulosa</i>	Dwivedi <i>et al.</i> , 2010
<i>Ulothrix tenuissima</i>	Dwivedi <i>et al.</i> , 2010
<i>Oscillatoria nigra</i>	Dwivedi <i>et al.</i> , 2010
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Tang <i>et al.</i> , 2011
<i>Chlorella vulgaris</i>	Puentes, 2014

### 2.5. Tecnologías biológicas para recuperar suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo

Las tecnologías de remediación biológica (biorremediación, bioestimulación, fitorremediación, biolabranza, etc.), se refiere a la utilización de procesos biológicos (microorganismos) para la degradación, transformación o remoción de los contaminantes a productos metabólicos inocuos y restaurar la calidad del medio ambiente (Volke y Velasco 2002; Emeka *et al.*, 2018).

Se han convertido en métodos alternativos para la remediación de suelos contaminados con petróleo por que ofrecen beneficios estéticos ecológicos, son factibles, rentables, naturales y fáciles de aplicar (Shekoohiyan *et al.*, 2016; Hussain *et al.*, 2018).

Entre las técnicas biológicas que se utilizan para recuperar suelos con hidrocarburos del petróleo se han reportado; atenuación natural, biorremediación, bioestimulación y fitorremediación. (Gallego *et al.*, 2001; Chaudhry *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2011; Bramley-Alves *et al.*, 2014).

### **2.5.1. Atenuación natural**

La atenuación natural es una técnica de biorremediación *in situ* de bajo costo, su característica principal es la utilización de los procesos físico-químicos de interacción contaminante suelo y los procesos de biodegradación tienen lugar de forma natural (López *et al.*, 2006). No obstante, a pesar de que puede ser utilizado en lugares muy variados, raramente se suele aplicar de forma individual puesto que es un tratamiento mucho más lento que los que utilizan tecnologías ingenieriles (Ortiz *et al.*, 2006).

Los procesos naturales que se invocan para la recuperación son biológicos, como la biodegradación aerobia, anaerobia y co-metabólica, y procesos físico-químicos como la volatilización, dispersión, dilución, desintegración radioactiva, estabilización química y bioquímica, precipitación y sorción en partículas de materia orgánica y arcillas del suelo (López *et al.*, 2006; Ortiz *et al.*, 2006). Se denomina también biorremediación intrínseca y se lleva a cabo por los microorganismos autóctonos, principalmente bacterias, del medio afectado (Watanabe, 2001). La capacidad intrínseca de asimilación de un medio depende de las “habilidades metabólicas” de los microorganismos nativos, del tipo de contaminante y lógicamente de la geoquímica y la hidrogeología en la zona (Gallego *et al.*, 2007).

### **2.5.2. Fitorremediación**

El término fitorremediación está formado por el prefijo griego *phyto* (planta) y de la raíz latina *remedium* (remover) y se refiere al uso de plantas en el saneamiento del terreno (Walton *et al.*, 1995). Es una tecnología prometedora de bajo costo para la limpieza de sitios contaminados, las limitaciones que rodean los mecanismos obstaculizan los intentos de optimización (Phillips *et al.*, 2012). También aprovecha la capacidad de ciertas plantas para degradar, absorber, acumular, metabolizar, volatilizar o estabilizar contaminantes presentes en el suelo, aire, agua o sedimentos como: metales pesados, metales radioactivos, compuestos orgánicos y compuestos derivados del petróleo (Peña-Castro *et al.*, 2006; Ferrea-Cerrato *et al.*, 2007; Lum *et al.*, 2014; Delgadillo-López *et al.*, 2011).

Una planta fitorremediadora de suelos contaminados con aceite debe primero ser tolerante a la presencia del contaminante y, al crecer, debe proporcionar condiciones favorables para el crecimiento de microorganismos en la rizosfera, aumentando la aireación, eliminando los exudados rizosféricos y, en consecuencia, proporcionando la biodegradación de los contaminantes.

Los microorganismos, a su vez, secretan enzimas que degradan el aceite y, como resultado, generan energía para las células y sustancias como el agua y el dióxido de carbono que se liberan al medio ambiente (Figura 5) (Janzen y Teresinha 2018).

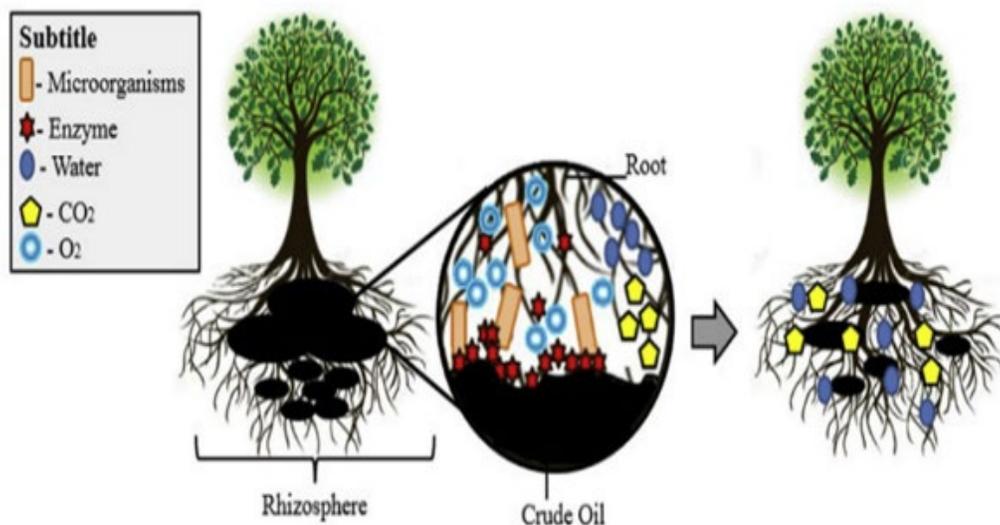


Figura 5. Proceso de rizodegradación de suelos contaminados con petróleo, en la rizosfera de las plantas con liberación de agua y dióxido de carbono al medio

### 2.5.3. Biorremediación

La biorremediación se define como el proceso mediante el cual se hace uso de organismos como plantas, hongos, bacterias naturales (microorganismos) o modificadas genéticamente para eliminar contaminantes, transformarlos en sustancias menos tóxicas, deteniendo el deterioro progresivo o incluso convirtiéndolos en inocuas para el ambiente y la salud humana (Benavides *et al.*, 2006; Acuña *et al.*, 2012; Rivera *et al.*, 2018). Se fundamenta en la capacidad natural que poseen determinados microorganismos para incorporar contaminantes en sus procesos metabólicos y usarlos como fuente de energía o carbono (Dzionek *et al.*, 2016; Mosa *et al.*, 2016).

### 2.5.4. Bioestimulación

La bioestimulación consiste en la complementación del medio en el cual se encuentran los microorganismos con nutrientes o condiciones adecuadas: nitratos, fosfatos, aceptores de electrones (oxígeno) o ajustes de pH (Gallego *et al.*, 2005). Esta técnica para la remediación de

suelos contaminados con hidrocarburos, ha sido estudiada en diferentes investigaciones, obteniéndose resultados favorables (Vallejo *et al.*, 2005; Samanez, 2008; Vallejo *et al.*, 2016).

Ñústez *et al.*, (2014) obtuvieron por medio de la bioestimulación efectos positivos en la reducción de HTP con porcentajes de reducción de contenido de hidrocarburos entre el 83 y 94% y observaron un incremento de la población bacteriana. Las tasas de degradación en un estudio de similares condiciones reportó porcentajes de reducción entre 26 y 61% en procesos de 12 a 80 días (Xu y Lu, 2010).

## 2.6. Definición y características de la rizosfera

La rizosfera es una zona del suelo que va desde la superficie hasta una profundidad de 1 a 5 mm, donde la interdependencia entre plantas y microorganismos que conduce en el mejor de los casos a relaciones simbióticas (Oliveros *et al.*, 2009; Newman *et al.*, 2016). La extensión varía de acuerdo al tipo de suelo, la especie de planta y edad (Giraldo y Villa, 2016). La comunidad de la rizosfera está constituida por la microbiota (bacterias, hongos y algas) y por la una microfauna (protozoos, nematodos, insectos y ácaros), (Calvo, 2011). La rizosfera se compone de tres áreas (Figura 6) 1) ectorrizosfera, que es la zona alrededor de las raíces, 2) rizoplano, zona de la superficie de la raíz y 3) endorrizosfera, involucra la epidermis y las corticales de la raíz (Brimecombe *et al.*, 2001).

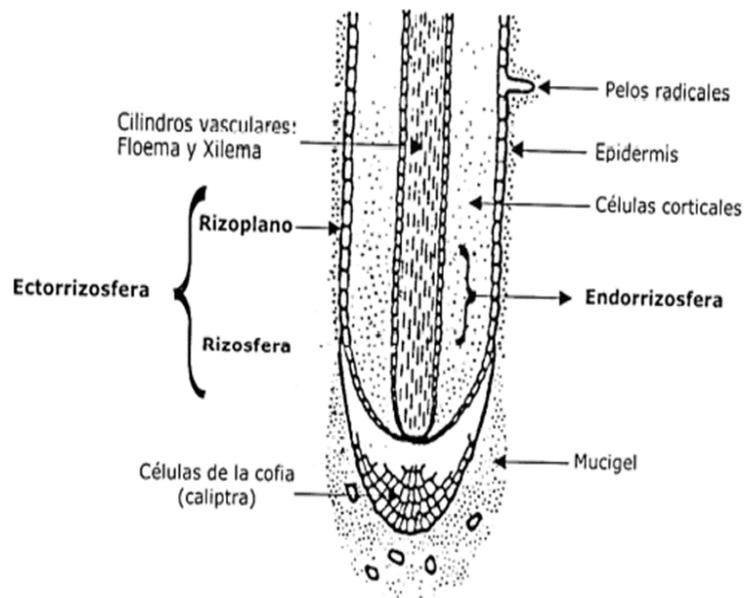


Figura 6. Esquematización de las diferentes zonas que conforman la rizosfera (Brimecombe *et al.*, 2001).

Los exudados de las raíces son utilizados por los microorganismos como fuente nutritiva, influyendo indirectamente en las interrelaciones entre los microorganismos colonizadores a través de la acción selectiva que ejercen sobre especies o grupos particulares (Soroa-Bell *et al.*, 2009). Las raíces primarias, secundarias y sus cabellos radiculares, genéricamente son capaces de liberar cantidades significativas de exudados, de donde se incluyen azúcares y polisacáridos simples, aminoácidos, ácidos orgánicos y compuestos fenólicos (Cuadro 6) (Oliveros-Bastidas *et al.*, 2009).

Cuadro 6. Compuestos orgánicos detectados en exudados de raíz de plantas

Clase	Ejemplos	Función reportada
Carbohidratos	Arabinosa, glucosa, fructuosa, galactosa, maltosa, ramosa, ribosa, sucrosa y ribosa	Proveer ambiente favorable para el crecimiento de microorganismo
Aminoácidos y aminas	Todos los 20 aminoácidos proteicos, ácido amino butírico, homoserina, cistationina y ácido mugineíco	Inhibidor de nematodos
Ácidos alifáticos	Fórmico, acético, butírico, propiónico, maleíco, cítrico, isocítrico, oxálico, fumárico, malónico, succínico	Reguladores del crecimiento de la planta y efecto inhibidor
Ácidos aromáticos	<i>p</i> -hidroxibenzoíco, cafeíco, <i>p</i> -cumárico, ferúlico, gálico, gentísico, protocatecuico, salicílico, sináptico, siringico	Efecto estimulante, dependiente de la concentración de prueba
Fenólicos varios	Flavonoides, flavonas, flavononas, antocianininas, isoflavonoides	Inhibidor o estimulante del crecimiento dependiendo de la concentración de prueba
Ácidos grasos	Linoleíco, linolénico, oleíco, palmítito, esteárico	Reguladores de crecimiento
Steroides	Compestrol, colesterol, sitosterol, estigmasterol	Reguladores de crecimiento

## 2.7. Función e importancia de los microorganismos en suelo y rizosfera

Los microorganismos en el suelo y la rizosfera desempeñan una función importante en el ecosistema, ellos muestran la actividad microbiana que es sinónimo de los procesos bioquímicos que se desarrollan para mantener el equilibrio en la interacción suelo-planta del ecosistema.

La actividad microbiana muestra la dinámica de crecimiento de la macroflora, microflora y microfauna que es comúnmente identificada por: 1) el número de individuos 2) la biomasa por unidad de volumen de área en el suelo y 3) su actividad metabólica (frecuentemente medido como la cantidad de dióxido de carbono generado en la respiración) (Brady y Weil, 2008).

La actividad microbiana en suelo rizosférico a nivel de campo, es considerado un parámetro clave en la determinación de la calidad biológica del suelo y para efectos del estudio realizado puede ser un reflejo de las condiciones físico-químicas óptimas para el desarrollo de los procesos metabólicos de microorganismos (Ramos y Zúñiga, 2008).

Muchos microorganismos diferentes participan en las reacciones de los ciclos biogeoquímicos, y en muchos casos son ellos los únicos agentes biológicos capaces de regenerar formas de los elementos necesarias para otros organismos, especialmente para las plantas (Madigan *et al.*, 2015).

La comprensión de estos ciclos permite a los científicos a entender y predecir el desarrollo de comunidades de microbios y actividades en el medio ambiente (Pepper *et al.*, 2016). Por ejemplo, el sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ) es oxidado por microorganismos fotótrofos y quimiolitótrofos a azufre ( $S^0$ ) y sulfato ( $SO_4^{2-}$ ); este último es un nutriente esencial para las plantas y los primeros dos afectan al ciclo del carbono produciendo nuevo carbono orgánico a partir de  $CO_2$ . No obstante, el sulfato se puede reducir a sulfuro de hidrógeno por la actividad de las bacterias reductoras de sulfato, organismos que consumen carbono orgánico, y esta reducción cierra el ciclo biogeoquímico del azufre a la vez que regenera el  $CO_2$  (Madigan *et al.*, 2015).

El ciclo del nitrógeno es otro ciclo biogeoquímico crítico para la vida, el nitrógeno puede ser absorbido por escorrentía superficial durante eventos de precipitación y eventualmente depositarse en lagos, arroyos y ríos (Brusseau, 2019). Este ciclo es un proceso microbiano, y resulta fundamental para la regeneración de formas de nitrógeno utilizables por las plantas y otros organismos. Está impulsado por bacterias quimiolitótrofas y quimioorganótrofas, organismos que producen y consumen, respectivamente, carbono orgánico (Madigan *et al.*, 2015).

## **2.8. Características de los microorganismos**

### **2.8.1 *Pseudomonas* spp**

Las bacterias del género *Pseudomonas* spp habitan suelo y rizosfera contaminados con hidrocarburos policíclicos derivados del petróleo, y son reguladoras del crecimiento vegetal (Garrity *et al.*, 2005), ellas contienen en los plásmidos enzimas codificadas que oxigenan al

hidrocarburo policíclico como el naftaleno (Madigan *et al.*, 2015). En la taxonomía de *P. aeruginosa* y otras *Pseudomonas fluorescentes* Jessen (1965) enumeró seis pigmentos producidos por la masa celular de las colonias, derivado de los genes de dichos plásmidos que inducen fluorescencia de diferentes colores (Madigan *et al.*, 2015).

Se producen cuatro pigmentos de fenazinas [piocianina (Azúl), piorubina (rosa claro, rojiso o marron oscuro), clorafina (verde), oxifenazina (Naranja)], Pseudomonas proteína azul y pioverdina (amarillo-verdoso) (Garrity *et al.*, 2005).

Las *Pseudomonas* spp son bacterias gran negativas, ubicuas, que pertenecen a la subclase gamma de las Proteobacterias, son bacterias productoras de biosurfactantes (Palleroni, 1984; Nelson *et al.*, 2002). Tienen un potencial considerable para aplicaciones biotecnológicas, particularmente en las áreas de biorremediación (Dejonghe *et al.*, 2001), participan en actividades de degradación de contaminantes biogénicos y xenobióticos (Timmis, 2002). Según Haritash *et al.*, (2009) *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Mycobacterium* spp., *Haemophilus* spp., *Rhodococcus* spp., *Paenibacillus* spp. son algunas de las bacterias más estudiadas y aplicadas en la remoción.

Las *Pseudomonas* spp son capaces de utilizar como fuente de energía una gran cantidad de compuestos orgánicos del petróleo, de esta forma logran proliferar, colonizar nichos y ambientes inhóspitos (Pérez *et al.*, 2008). Este género es ampliamente conocido por poseer variedad de especies que demuestran una alta eficiencia para degradar una gran cantidad de sustratos, tales como compuestos alifáticos, aromáticos y poliaromáticos (Fan *et al.*, 2003; Molina *et al.*, 2009).

La especie *P. fluorescens* se le conoce por su poder degradativo sobre naftaleno y asfaltenos (Rockne *et al.*, 2000), además de tener altas tasas degradativas, tal como documentan Obi *et al.*, (2016) y Bracho *et al.*, (2004) con valores de hasta alrededor del 79% de hidrocarburos degradados. Pérez *et al.*, (2008) reporta un 57% de degradación por parte de *Pseudomona aeruginosa*.

### **2.8.2. Bacterias hidrocarbonoclasticas**

Las bacterias hidrocarbonoclastas son grupos de microorganismos que tiene la particularidad de degradar hidrocarburos, estas lo utilizan como única fuente de carbono y energía. Es por esta característica que este tipo de bacterias y hongos son utilizadas para evaluar zonas perturbadas por petróleo (García-Cruz y Aguirre-Macedo, 2014).

Las bacterias hidrocarbonoclastas responden rápidamente a la adición de hidrocarburos y se ha demostrado que aumentan transitoriamente hasta un 90% de la comunidad microbiana total en respuesta a la adición de hidrocarburos (Yakimov *et al.*, 2007, Pepper *et al.*, 2016).

Los géneros más reconocidos incluyen *Pseudomonas*, *Xantomonas*, *Corinobacterium*, *Xanthobacter*, *Streptomyces*, *Bacillus* y *Brevibacterium* (Mooney *et al.*, 2006, Pepper *et al.*, 2016)

### **2.8.3. Microalgas**

Las microalgas son microorganismos unicelulares, se clasifican como procariotas y eucariotas. Se dividen en diferentes grupos en función de su taxonomía, incluyendo azul-verde, verde, verde-amarillo, rojo, marrón y las algas de oro. Hay más de 50.000 especies de microalgas (Rashid *et al.*, 2014). El término “alga”, carece de significado taxonómico y no corresponde a ninguna categoría nomenclatural, es decir, sólo es un término colectivo para un grupo heterogéneo de individuos. A su vez, el término “microalga” hace referencia a un grupo de individuos microscópicos diferenciándose así de las “macroalgas” (Alveal *et al.*, 1995; Parra y Bicudo 1996; Parra, 2006).

El término microalga se encuentra ligado al desarrollo biotecnológico en este contexto, las cianobacterias o algas verde-azules, con estructura procariota (Borowitzka, 1988), se han considerado tradicionalmente dentro de un grupo diverso de microorganismos fotosintéticos unicelulares y multicelulares simples que están presentes en todos los ecosistemas existentes en la Tierra (Mata *et al.*, 2010). Las microalgas poseen una capacidad de eliminar o biotransformar contaminantes de un medio líquido o gaseoso (Hernandez y Labbé, 2014). En general, las microalgas dependen para su crecimiento de luz solar, nutrientes simples que incluyen nitrógeno, azufre, fósforo y dióxido de carbono (Pignolet *et al.*, 2013). Sin embargo, como respuesta a los cambios en las condiciones ambientales, pueden poner en funcionamiento diversos tipos de metabolismo (fotoautotrófico, heterotrófico, mixotrófico, foto heterotrófico) (Arias *et al.*, 2013).

Las microalgas adquieren un gran protagonismo, al ser considerados eco-amigables (ecofriendly process), ya que reciclan eficientemente contaminantes desde medios líquidos y gaseosos (Dominic *et al.*, 2009., Doušková *et al.* 2010., León y Chaves 2010., González-López *et al.*, 2011., Rawat *et al.*, 2011). En los últimos años, las cepas de microalgas más utilizadas en la fitorremediación pertenecen al filo Chlorophyta, en particular las especies de los géneros *Chlorella* y *Scenedesmus* (Masojídek y Torzillo, 2008; Spain *et al.*, 2021).

De acuerdo con el sistema de clasificación propuesto por Parra y Bicudo (1996), la división Chlorophyta está representada por 15 órdenes, los cuales son agrupados según sus características morfológicas en: a) Formas unicelulares y coloniales, b) Formas filamentosas unicelulares y c) Formas multinucleadas (Cuadro 7).

Cuadro 7. Clasificación para las formas unicelulares y coloniales para ordenes *Chlorococcales* y *Volvocales*.

<b>División</b>	Chlorophyta	Chlorophyta	Chlorophyta
<b>Clase</b>	Chlorophyceae	Chlorophyceae	Chlorophyceae
<b>Orden</b>	Chlorococcales	Chlorococcales	Volvocales
<b>Familia</b>	Oocystaceae	Oocystaceae	Chlamydomonadaceae
<b>Género</b>	<i>Chlorella</i>	<i>Monoraphidium</i>	<i>Chlamydomonas</i>

Fuente: Parra y Bicudo 1996

#### 2.8.4. Hongos heterótrofos

Existen hongos capaces de biotransformar o biodegradar hidrocarburos que pueden ser utilizados como estrategia en la micorremediación de aguas y suelos impactados por la actividad petrolera.

Los suelos contaminados contienen gran cantidad de microorganismos que pueden incluir hongos capaces de utilizar hidrocarburos (Cañas y Jerez, 2003) debido a que utilizan a los hidrocarburos como fuente de energía (Madigan *et al.*, 2015), pero su diversidad microbiana es más reducida (Castillo y Roldán, 2005).

Pérez-Hernández y colaboradores, (2015) encontraron que tres de las cuatro especies vegetales evaluadas el petróleo intemperizado estimulo el crecimiento de los hongos heterótrofos. Esto se puede explicar porque los suelos con petróleo intemperizado se caracterizan por tener un pH ácido donde los hongos tienden a ser más tolerantes a los ácidos que las bacterias (muchas especies crecen a un pH óptimo de 5 o menos) y son más sensibles a la variación en la humedad (Madigan *et al.*, 2015; Merkl *et al.*, 2004), favoreciendo sus actividades metabólicas (Rivera-Cruz *et al.*, 2006).

Meysami y Baheri (2003), estudiaron en condiciones de laboratorio a las especies *Penicillium simplicissimum*, *Bjerkandera adusta*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pilmanarius*, *Trametes versicolor* y encontraron que estas cepas de hongos reducen hasta el 50 % de HTP en 35 días en un suelo artificialmente contaminado con 10,000 ppm.

### **2.8.5. Actinomicetos**

Los actinomicetos son organismos procariotes que están clasificados como bacterias. Son un componente importante de la comunidad bacteriana, especialmente bajo condiciones de pH alto, temperatura alta o estrés hídrico.

Morfológicamente, los actinomicetos se parecen a los hongos porque sus células alargadas que se ramifican en filamentos o hifas. Estas hifas son más pequeñas que las hifas de hongos. Estructura de procariota tamaño 1-2  $\mu\text{m}$  de diámetros, morfología filamentosa, respiración aeróbica y anaeróbica, habitan zonas marinas y anegadas, son capaces de degradar complejas moléculas orgánica y fijar nitrógeno atmosférico (Pepper y Gentry, 2016). Ellos son empleados en el proceso de biorremediación, debido a que son capaces de degradar compuestos tóxicos en el suelo (Benavides *et al.*, 2006).

### **2.9. Rutas de degradación de hidrocarburos en suelo aeróbica y anaeróbica**

La biodegradación de los hidrocarburos del petróleo implica reacciones metabólicas catalizadas por una variedad de enzimas como por ejemplo las oxigenasas, las peroxidasas, las reductasas, las hidroxilasas y las deshidrogenasas son comunes tanto para las vías aeróbicas como anaeróbicas que realizan los microorganismos (Peixoto *et al.*, 2011).

En la degradación aeróbica de los grupos metilo de n-alcanos, la vía más común es la incorporación directa de un átomo de oxígeno en uno de los carbonos finales del alcano por una enzima monooxigenasa que resulta en la formación de un alcohol primario (Pepper *et al.*, 2016).

El paso inicial en la degradación de 1-alqueno puede implicar un ataque en el terminal o un grupo metilo subterminal como se describe para los alcanos. Alternativamente, el paso inicial puede ser el ataque en el doble enlace, que puede producir un alcohol primario o secundario o un epóxido. Cada uno de estos productos de degradación inicial se oxida aún más a un ácido graso primario, que se degrada por oxidación  $\beta$  como se muestra en la para alcanos (Pepper *et al.*, 2016; Logeshwaran *et al.*, 2018).

Se pueden utilizar muchos hidrocarburos aromáticos como donadores de electrones en condiciones aerobias por los microorganismos, entre los cuales las bacterias del género *Pseudomonas* han sido las más estudiadas. Sus metabolismos suelen iniciarse con la formación de catecol o un compuesto relacionado estructuralmente a través del ataque de las oxigenasas (Madigan *et al.*, 2015; Pepper *et al.*, 2016).

Las etapas de oxidación de los compuestos alifáticos están determinadas por la acción de enzimas catalizadoras: las oxigenasas. Existen dos tipos de éstas: dioxigenasas y monooxigenasas.

Las primeras catalizan la incorporación del oxígeno molecular ( $O_2$ ) completo, es decir, sus dos átomos de oxígeno entran en la molécula. Mientras que las monooxigenasas se encargan de catalizar la incorporación de un solo átomo de los dos que posee el oxígeno molecular y el átomo restante de oxígeno lo reduce a agua ( $H_2O$ ) (Figura 7) (Madigan *et al.*, 2015). Los microorganismos capaces de llevar a cabo este tipo de degradación principalmente, son: *Pseudomonas*, *Nocardia* y *Mycobacterium* (Madigan *et al.*, 2015; Castillo *et al.*, 2000).

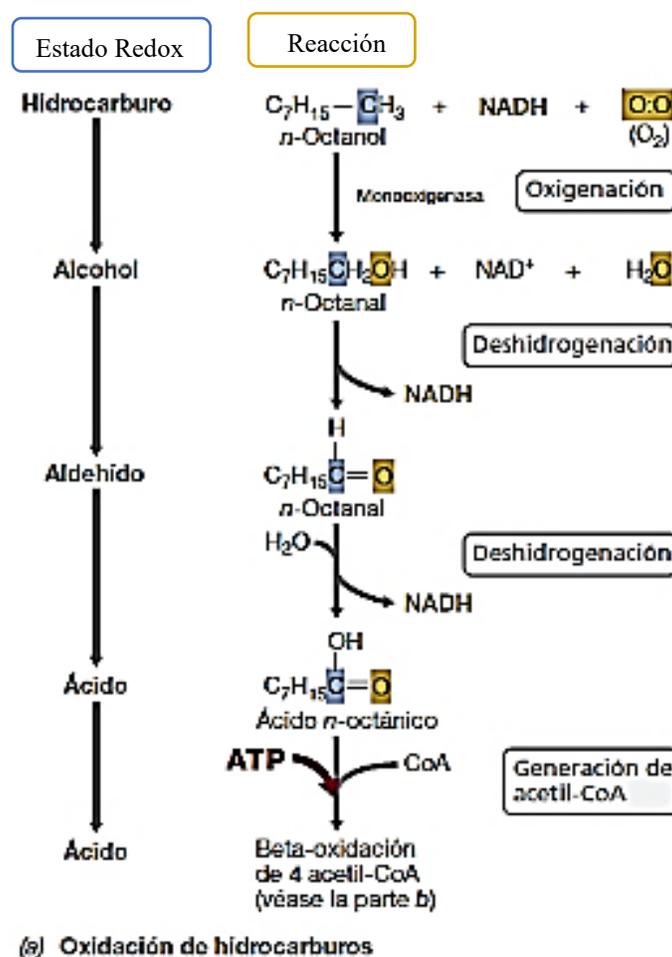


Figura 7. Etapas de la oxidación de un hidrocarburo alifático (Madigan *et al.*, 2015).

La Figura 8 muestra diferentes reacciones catalizadas por oxigenasas. En la primera reacción se puede ver la reacción catalizadora de la monooxigenasa, provocando la hidroxilación de benceno a

catecol. En otra de estas reacciones, la dioxigenasa rompe el anillo intradiol del aromático, provocando un corte del catecol a cis, cis-muconato, mientras que en el último caso en la degradación de tolueno, la dioxigenasa hidroxila el anillo y luego corta el anillo extradiol.

Al igual que en el catabolismo de los hidrocarburos alifáticos aerobios, los compuestos aromáticos, con uno o varios anillos, se oxidan normalmente por completo a CO<sub>2</sub> (Madigan *et al.*, 2015; Pepper *et al.*, 2016).

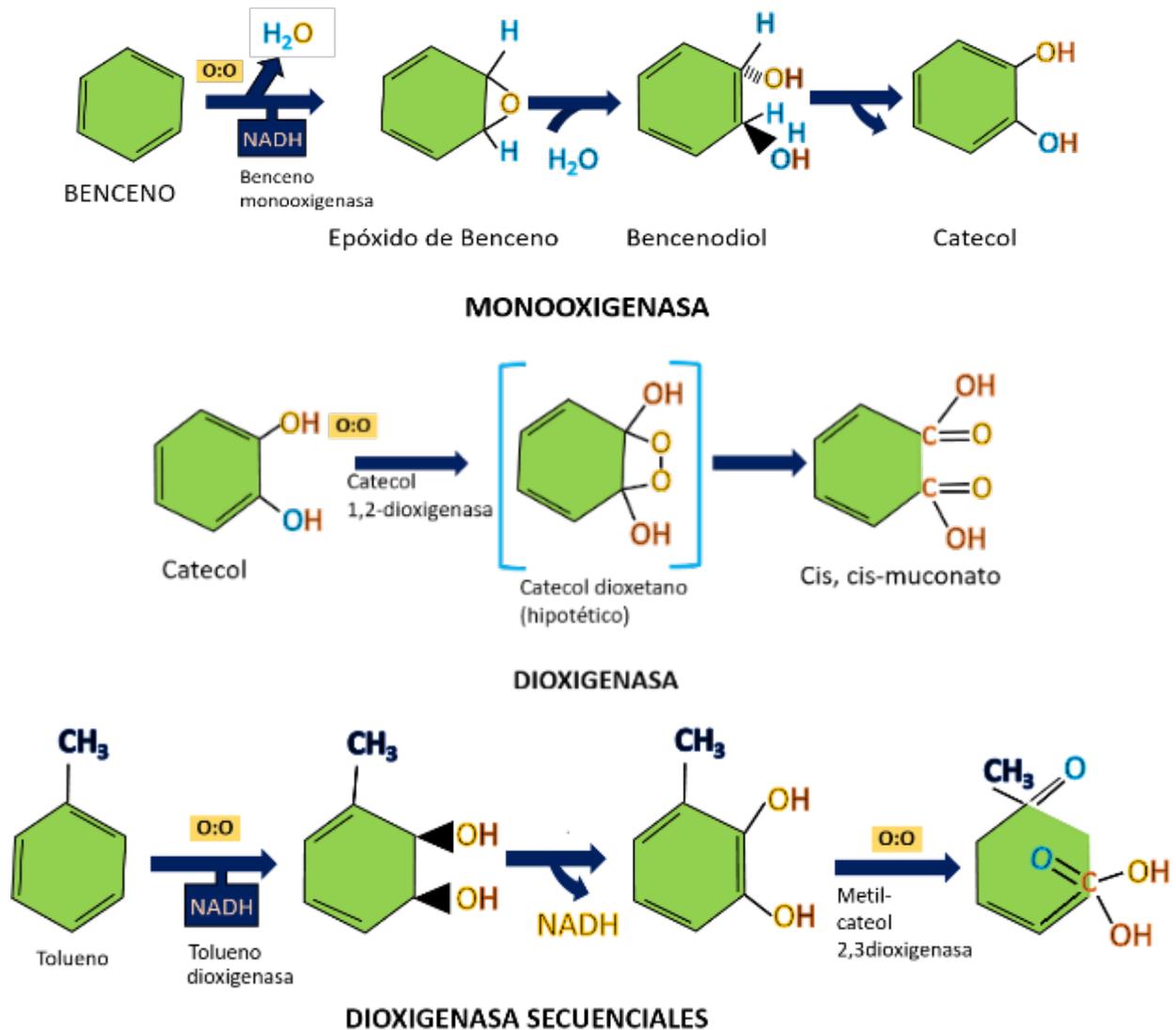


Figura 8. Oxidación de un compuesto aromático mediado por oxigenasas (Madigan *et al.*, 2015).

La actividad metabólica de microorganismos aerobios heterótrofos es fundamental para transformar y degradar los hidrocarburos que contaminan el suelo; conocer su número y composición indica de forma indirecta la factibilidad de llevar a cabo un tratamiento biológico (Mishra *et al.*, 2001).

La activación inicial de los hidrocarburos es fundamental para la biodegradación anaeróbica, en este sentido por ejemplo los alcanos deben activarse mediante un mecanismo que no depende del O<sub>2</sub> (Rojo, 2009; Varjani y Upasani, 2017).

En contraste, se ha demostrado que los alifáticos de mayor peso molecular sufren degradación utilizando una vía única, donde el primer paso en la biodegradación implica la activación del alcano en una posición sub-terminal mediante la adición de una molécula de fumarato al alcano, produciendo un derivado de alquil-succinato. Posteriormente, el producto de reacción se une a CoA y se convierte en un acil-CoA que puede metabolizarse adicionalmente por  $\beta$ -oxidación (Rojo, 2009; Pepper *et al.*, 2016)

### **2.10. Importancia de la ciperácea *Eleocharis palustris***

La familia Cyperaceae incluye unos 115 géneros y alrededor de 3,600 especies, con una distribución cosmopolita (Gómez-Laurito *et al.*, 2003). La ciperácea *E. palustris* es frecuente en las balsas para abreviar el ganado (Blasco-Zumeta, 2016).

El término "*Eleocharis*" proviene del griego ἔλος hélos “pantano” y de χάρις cháris “gracia, belleza, ornamento”: una planta que embellece los pantanos, el epíteto específico “*palustris*” proviene de pálus, “pantano” palúdis: pantano, para el hábitat de crecimiento (Ecosostenibile, 2021). *E. palustris* tiene morfología y fisiología características que estimulan la adaptación y crecimiento de la planta a condiciones desfavorables (Figura 9) (Hauser, 2006; Tilley *et al.*, 2012). Es una especie pionera que cubre muy bien el suelo arcilloso rápidamente a medida que disminuye el nivel del agua, y también bajo condiciones de inundación, es dominante en todas las etapas serosas. Tiene crecimiento rizomatoso rápido en ambientes cálidos, ambos en el suelo con manto freático a 30 cm debajo de la superficie como también en terrenos inundados (Trujillo-Narcía *et al.*, 2018). La *E. palustris* crece en suelos de humedales contaminado con 75,560 a 118,789 mg kg<sup>-1</sup> de petróleo degradado y también con sulfato, derivado del petróleo. Se recomienda el uso de *Leersia hexandra* grass y *E. palustris* para la descontaminación de suelos inundados y erosionados contaminados con aceite y sulfato (Trujillo-Narcía *et al.*, 2018).



Figura 9. *Eleocharis palustris* (L.) Roem. & Schult (Martin Cilenšek, 2008).

Según Tilley *et al.*, (2012) esta especie es utilizada para la restauración de humedales. Planta perenne con un rizoma de entrenudos de (0,6)1,5-2,5(4) mm de diámetro, rojizo o marrón, cubierto de escamas translúcidas cuando joven. Tallos (6)11- 60(100) cm x (0,5)1-3(3,5) mm, rectos o curvados, estriados cuando secos, vainas herbáceas, frecuentemente purpúreas hacia la base, a veces algunas de ellas deshilachadas; la superior truncada horizontalmente, florece de marzo a noviembre (Asturnatura, 2021).

### 2.11. Taxonomía de la ciperácea *Eleocharis palustris*

Es común confundir entre sí gramíneas, ciperáceas y juncos. En la Figura 10 se da una clave para diferenciar estas tres familias (CIAT, 1988). Según Tilley *al et.*, (2012) el alargamiento del rizoma sigue una línea casi lineal trayectoria para escapar de la competencia intra e interespecífica.

Los mismos autores también mencionan que *E. palustris* tiene una masa de raíz densa que se extiende más de 40 cm en la profundidad del suelo, prospera en lugares perturbados.

En las ciperáceas las hojas se encuentran dispuestas en tres series (roseta); la vaina de la hoja es tubular y entera; el tallo es de sección triangular y completamente sólido. Cada flor de una espiga se encuentra ubicada en la axila de una bráctea simple, la gluma. Producen también una sola semilla (CIAT, 1988).

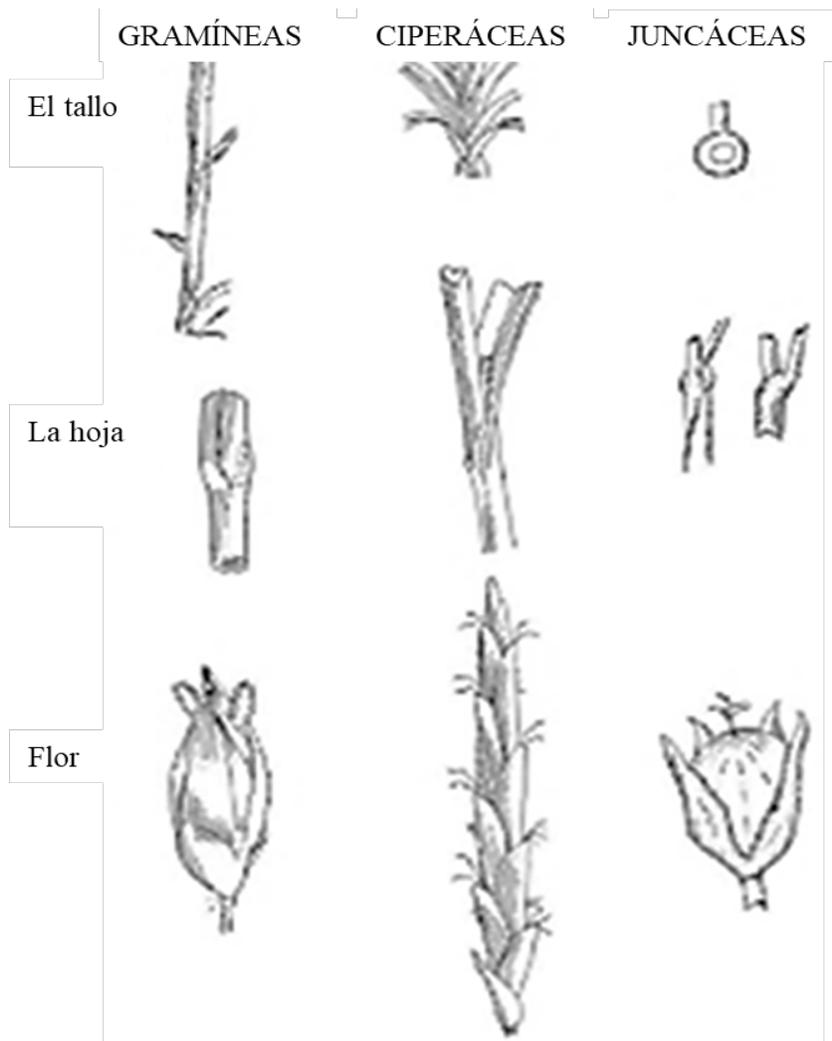


Figura 10. Diferencia entre una gramínea, ciperáceas y juncos (CIAT, 1988).

## **Taxonomía**

- Plantas (Reino Plantae)
- Plantas Vasculares (Filo Tracheophyta)
- Plantas con Flores (Subfilo Angiospermae)
- Pastos, Palmeras y Parientes (Monocotiledóneas) (clase Liliopsida)
- Pastos, Juncos, Bromelias y Afines (Orden Poales)
- Tules Y Zacates de Laguna (Familia Cyperaceae)
- Subfamilia Cyperoideae
- Tribu Eleocharideae
- Junco Espiga (Género *Eleocharis*)
- Tule (*Eleocharis palustris*)
- *Eleocharis palustris* ssp. *palustris*

Bánki *et al.*, 2021.

## OBJETIVOS

### 3.1. Objetivo general

Conocer variables indicadoras de hormesis fisiológicas y microbiológicas al estrés por petróleo, que junto con la capacidad de la rizosfera de *E. palustris* para remover HTP, integren una tecnología biológica, que recupere químicamente al suelo Gleysol de humedales impactado por la actividad petrolera en el trópico de México.

### 3.1.2. Objetivos particulares

- Obtener indicadores de hormesis fisiológico de *E. palustris* a petróleo crudo en el crecimiento a través del tiempo y producción de material vegetal al final del proceso de fitorremediación del suelo anegado.
- Determinar indicadores hormesis microbiológicos rizosféricos de *E. palustris* a diferentes dosis de petróleo crudo, basado en poblaciones de microalgas, hongos, actinomicetos y bacterias al final del proceso de fitorremediación.
- Evaluar la diversidad de bacterias del grupo *Pseudomonas* spp después de la fitorremediación y atenuación natural del suelo con petróleo.
- Análisis comparativo de la remoción de hidrocarburos totales del petróleo estimulados por atenuación natural y fitorremediación rizosférica de *E. palustris*, y la relación de estas con variables microbiológicas y mineralización del carbono orgánico.

## HIPOTESIS

### 4.1. Hipotesis general

La tecnología biológica para recuperar Gleysol de humedal con petróleo se relaciona con variables de crecimiento, producción y microbiológicas asociadas a *E. palustris* con respuesta positivas al estrés por petróleo crudo, y con rizosfera que remueva hidrocarburos totales del petróleo del suelo.

### 4.1.2. Hipotesis particulares

- El crecimiento de *E. palustris* a través del tiempo y la producción de material vegetal son indicadores de hormesis al estrés inducido por el petróleo crudo de Gleysol inundado.
- La población de microalgas, hongos totales, actinomicetos y bacterias *Pseudomonas* spp e hidrocarbonoclastas en rizosfera de *E. palustris* son indicadoras de hormesis al estrés inducido por el petróleo crudo de Gleysol inundado.
- La rizosfera de *E. palustris* usado para fitorremediar Gleysol con petróleo crudo induce mayor diversidad de colonias del género *Pseudomonas fluorescentes* respecto al suelo con atenuación natural.
- La remoción de hidrocarburos totales del petróleo en Gleysol del humedal es bioestimulada en mayor porcentaje por la fitorremediación con *E. palustris* respecto a la atenuación natural, y la remoción de HTP se relaciona positivamente con la población microbiana que se establece en el suelo y la mineralización del carbono orgánico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación de Ciencia Básica Aplicada y pertenece a la LGAC Manejo Sustentable de los Recursos Naturales para la Producción Agroalimentaria del Trópico (PROPAT), se realizó en las instalaciones del Colegio de Postgraduados *Campus* Tabasco, así como en el Laboratorio de Microbiología Agrícola y Ambiental del mismo, ubicado en Periférico Carlos A. Molina S/N, Km. 3.5, Huimanguillo, Tabasco ( $17^{\circ} 58'36.22''$  N y  $93^{\circ} 23'11.0''$  O), a 10 msnm, en clima tropical cálido húmedo con abundantes lluvias en verano y temperatura media de  $26.4^{\circ}\text{C}$  (INEGI, 2005).

El proceso de investigación se efectuó en cuatro etapas secuenciales: Etapa I. Trabajo en campo. Etapa II. Trabajo en microtúnel. Etapa III. Trabajo en laboratorio. Etapa IV. Análisis estadístico. Etapa V. Escritura de tesis (Figura 11).

### 5.1. Etapa I. Colecta y procesamiento de suelo

El suelo utilizado para el experimento en esta investigación fue un Gleysol sin contaminación del horizonte superficial (0-30 cm), obtenido ejido Paso y Playa, ubicado en el km 2 de la carretera federal Cárdenas-Huimanguillo. Las coordenadas UTM del sitio de colecta de las muestras son latitud  $17^{\circ}57'42.5268''$ N y longitud  $93^{\circ}21'41.5097''$ W.

El suelo (200 kg) se secó bajo sombra, y se tamizó a través de malla (5 mm abertura) para determinar sus 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 franco arcilloso (arena 12%, arcilla 51%, limo 37%); pH moderadamente ácido de 6.4; conductividad eléctrica de 0.3 dS/m; contenido rico de materia orgánica 6.1%; nitrógeno total alto con 55.5 ppm; y capacidad de intercambio catiónico baja con 9.6 cmol/kg (Rodríguez-Uribe *et al.*, 2021). Posteriormente, se trasladó al microtúnel *Campus* Tabasco, Colegio de Postgraduados, donde se pesaron 2000 g por unidad experimental para establecer el experimento.

### 5.2. Etapa II. Trabajo en microtúnel

#### 5.2.1. Características morfológicas de *E. palustris*

El nombre *Eleocharis* viene de la combinación de dos palabras griegas:  $\lambda\omicron\zeta$  (elios) que significa “en humedales, que crece en ciénagas y pantanos” y  $\chi\acute{\alpha}\rho\iota\zeta$  (charis) que se traduce como “gracia”,

lo que lleva a la conjetura de que Brown hace referencia a la gracia o elegancia con la que crecen estas hierbas en los humedales (Svenson 1929; Rosen *et al.*, 2007).

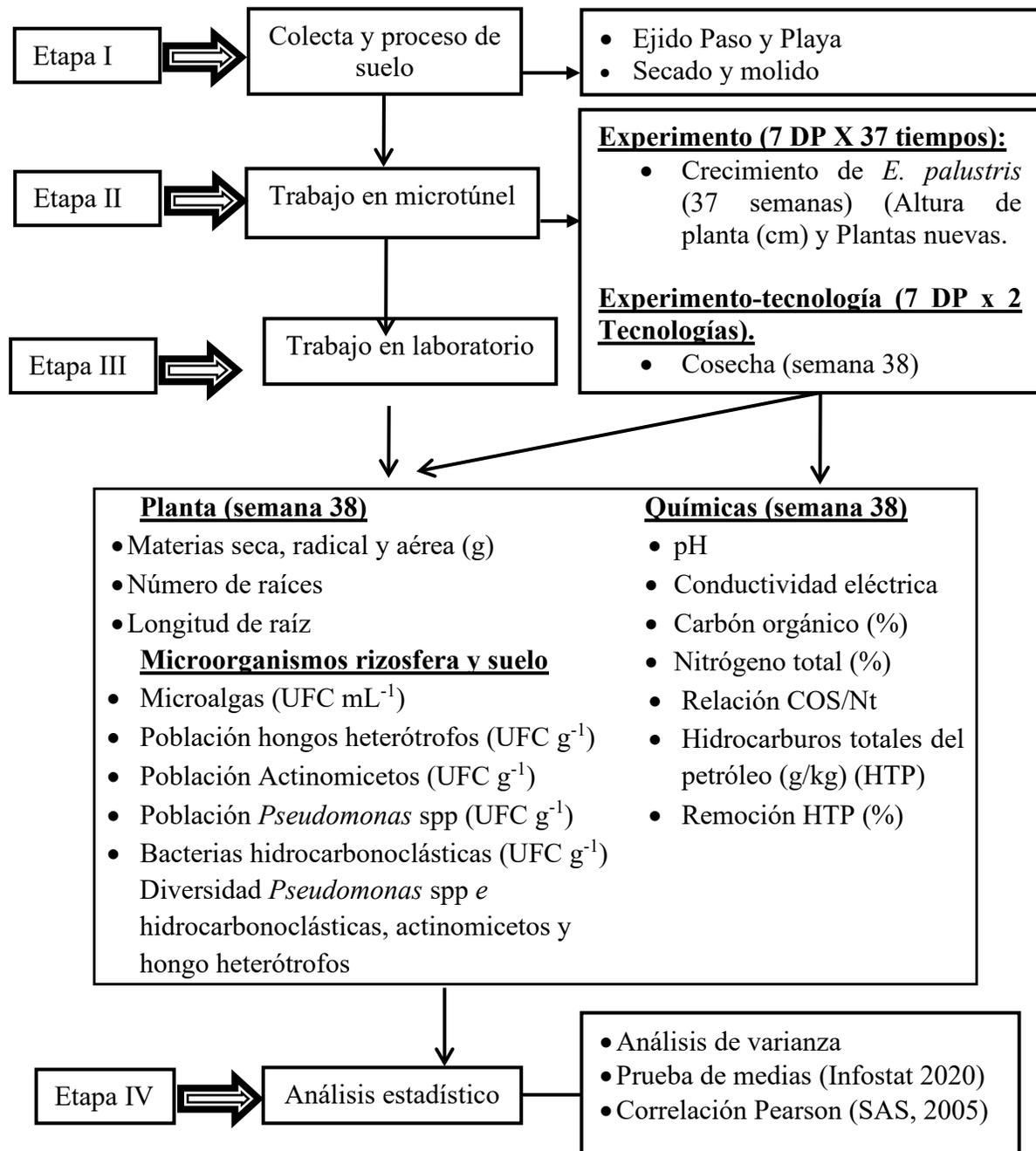


Figura 11. Flujograma del proceso de investigación

*Eleocharis palustris* (Figura 12) es una Cyperaceae nativa de Europa (Portugal e Italia) con nombre común bayunquillo, junco borde, junquillo y junco palustre, en el sureste de México las personas nativas le llaman “Tulillo”. Este género está constituido de aproximadamente 258 especies en el mundo, y está relacionado con muchos ambientes húmedos y acuáticos en Europa, América, Asia y Australia (Goetghebeur 1998; Kearns *et al.*, 1998; Govaerts y Simpson 2007; Gómez-Laurito, 2009; Feijóo y Arriaga 2012; Lastrucci *et al.*, 2018; Asturnatura, 2021).

**Hábitat.** La característica de tulillo es su adaptación a suelos con exceso de humedad o inundación prolongada. Se ha observado que puede sobrevivir y producir follaje en bordes de lagunas y zonas temporalmente inundadas; indiferente edáfico, subnitrófila, desde el nivel del mar a los 2400m (Asturnatura, 2021). También se pueden ubicar en zanjas y a lo largo de estanques y arroyos (Mohlenbrock y Drapalik, 1962).

**Tallo.** Es una hierba perenne con tallos erectos o ascendentes, frecuentemente trígonos, sólidos que alcanzan una altura de 20 a 80 cm (Adams 1994; Anónimo, 2021), posee tallos subterráneos (Figura 13a) que crecen de forma horizontal en donde se desarrollan rizomas (Figura 13b) o entrenudos más o menos largos, de (0,6)1,5-2,5(4) mm de diámetro, rojizo o marrón, cubierto de escamas translúcidas (Asturnatura, 2021). El rizoma emite raíces que se dirigen hacia abajo y brotes que saldrán hacia arriba de la superficie del suelo, y con el tiempo al envejecer mueren y se integra al suelo en forma de carbono orgánico y nutrientes (Anónimo, 2021a).

**Raíz.** El sistema radical es fibroso, difuso o fasciculado, la raíz principal no se desarrolla, pero abundantes raíces primarias crecen formando un manojo y tienen aproximadamente las mismas dimensiones (Figura 13c). Estas raíces crecen en la capa superficial del suelo, logrando más extensión que profundidad (Anónimo, 2021b).

**Hojas.** Generalmente en láminas lineares o filiformes a elípticas (Adams 1994), vainas distales de las hojas persistentes, de coloración verde y rojas a negruzcas cerca del tallo (proximalmente), no infladas, no callosas, membranosas a papel, ápice ampliamente obtuso a agudo (Flora of North America Editorial Committee, 2003).

**Fruto.** Aquenio, lenticular, trígono o subgloboso, obovoide, desnudo o más o menos envuelto en una escama floral modificada (utrículo), en una raquilla modificada o en un hipoginios derivado del perianto (Mohlenbrock y Drapalik, 1962; Adams 1994). De 1.2-1.6 mm de largo, raramente 1.1 mm de largo (excluyendo el tubérculo), amarillo, volviéndose marrón oscuro con la edad (Mohlenbrock y Drapalik, 1962).



Figura 12. Espécimen de *Eleocharis palustris* (L) Roem. & Schult (Lastrucci *et al.*, 2018)



Figura 13. Rizoma (a), tallo subterráneo (b) y raíz fibrosa (c) de *Eleocharis palustris*. Fotografía Rivera-Cruz, 2021.

**Floración.** Inflorescencia parcial (espiguilla) (bisexuales o unisexuales); espiguillas a veces con escamas florales (conocidas como bractéolas) subyacentes y dispuestas en espigas, pelos, o ausente (Adams 1994). Cerdas perianto 4(-5) a veces ausentes, de color marrón medio a estraminoso, delgadas a robustas, estambres 3, anteras de color amarillo oscuro a estraminoso 1.5-2.2 mm, estilos 2 o 3 (Flora of North America Editorial Committee, 2003) (Figura 14).



Figura 14. Proceso de floración y producción de escamas florales y achenios de *Eleocharis palustris*.

### 5.2.2. Propagación de material vegetal

Se utilizó material vegetal (rizomas maduros) de tulillo colectados en el mes de febrero del 2020 en suelo del humedal contaminado con petróleo intemperizado (60.916 a 116.373 g/kg PC) (Rivera-Cruz *et al.*, 2016), en el Ejido José Narciso Roviroso, a dos kilómetros del complejo procesador de Gas la Venta, Huimanguillo, Tabasco (18° 4'37.05'' N y 94° 2'28.3''O), un día después de la colecta se seleccionaron rizomas de 0.5 cm de diámetro y tallos de 5 cm de altura (Figura 15) para usarlos en el establecimiento del experimento.



Figura 15. Selección de los rizomas de *Eleocharis palustris* de 0.5 cm de diámetro y tallos de 5 cm de altura.

### 5.2.3. Petróleo fresco

El petróleo crudo mediano con 10.8° (API), peso específico 0.84g/cm, 50.4, 32.6 y 13 % de hidrocarburos alifáticos, aromáticos, polares resinas y asfaltenos respectivamente (EPA, 1996) cuantificación gravimétrico, y fue obtenido del campo petrolero “Ogarrio Batería 2”, Huimanguillo, Tabasco, México (18°12′11.8″ N y 94° 08′37.8″W).

### 5.2.4. Diseño y configuración experimental

Se establecieron dos experimentos. El experimento 1 consistió de un diseño experimental factorial completamente al azar con dos factores (7x37); factor 1 dosis de petróleo (0, 3, 15, 30, 45, 60 y 75 g/kg) y factor 2 tiempos de evaluación (38 semanas) [2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 semanas después del trasplante (SDT) de *Eleocharis palustris*]. El experimento 2 consistió de un diseño experimental factorial completamente al azar 7x2 (siete dosis de petróleo (DP) y dos tecnologías) por 38 semanas (nueve meses). Las DP 0, 3, 15, 30, 45, 60 y 75 g/kg y las tecnologías de fitorremediación (FT) con *E. palustris* y atenuación natural (AN) estimulada con agua, en total se

tuvieron 14 tratamientos [(0 + con planta (CP); 3 + CP; 15 + CP; 30 + CP; 45 + CP; 60 + CP; 75 + CP; 0 + sin planta (SP); 3 + SP; 15 + SP; 30 + SP; 45 + SP; 60 + SP; 75 + SP].

Los dos experimentos se establecieron bajo condiciones controladas (microtúnel) de lluvia, temperatura ambiental promedio (32 a 40°C) durante 38 semanas, y humedad relativa entre 85 y 90%.

#### 5.2.4.1. Establecimiento de los experimentos

El suelo (2000 g) de cada unidad experimental (UE) se molió y tamizó para ser homogeneizado de forma manual con las cantidades de 6, 30, 60, 90, 120, 150 g/kg de petróleo crudo. La mezcla se colocó en contenedores de plástico. A las 48 h, de cada unidad experimental, se tomó una muestra de suelo para determinar los contenidos iniciales de HTP, usando el método de extracción EPA 418.1 (EPA 1986).

En cada UE se trasplantó un rizoma con tres tallos de 5 cm de altura de *E. palustris* (Figura 16) y se aplicó riego diario a las 56 UE durante las 38 semanas, para estimular el crecimiento de la planta, el establecimiento de los microorganismos en suelo no rizosférico y rizosférico y la degradación de hidrocarburos del petróleo.



Figura 16. Trasplante inicial de rizomas en suelo para establecer los tratamientos de fitorremediación con *E. palustris*.

### 5.2.5. Seguimiento de crecimiento de *E. palustris*

El crecimiento de *E. palustris* se evaluó durante nueve meses cada semana; inicio a la semana 2 continúa hasta la semana 38. Los parámetros de seguimiento fueron; Longitud de planta rizomatosa (LP), plantas nuevas (PN) y tasa de crecimiento relativo (TCR).

Las PN consistieron en contar directamente el número de plántulas que emergen de raíces rizomatosas del tallo (culmos) principal (Figura 17a). La LP consistió en medir la altura directamente con una regla graduada en cm desde la base del tallo hasta el ápice de la hoja (Figura 17b).

La TCR para cada tiempo se determinó usando la LP, aplicando la fórmula de Hunt *et al.*, (2002):

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

Dónde: In: logaritmo natural. w: longitud de las plantas rizomatosas (cm). t: tiempo (días).



Figura 17. a) Conteo directo de plantas nuevas, b) Medición de longitud de planta rizomatosa con regla graduada en *E. palustris*.

### 5.2.6. Levantamiento de experimento

A la semana 38 después de establecimiento del experimento de FT y AN cada unidad experimental (UE) se cosechó. La UE fue separada en sus partes; suelo, rizosfera, raíz y material aéreo (Figura

18 a, b, c, d, e, f). El suelo y rizosfera se homogenizaron y se colectó una muestra para analizar parámetros químicos y microbiológicos. Las muestras para microorganismos se conservaron a 4°C bajo condiciones de temperatura, y las muestras para evaluar variables químicas se secaron bajo sombra. La raíz y materia aérea se separaron, se lavaron con agua de la llave. Las raíces primarias frescas se contaron directamente. Las raíces y el material aéreo se introdujeron en bolsas de papel y se secaron en horno a 65°C de temperatura por 98 horas y se procedió al pesado.

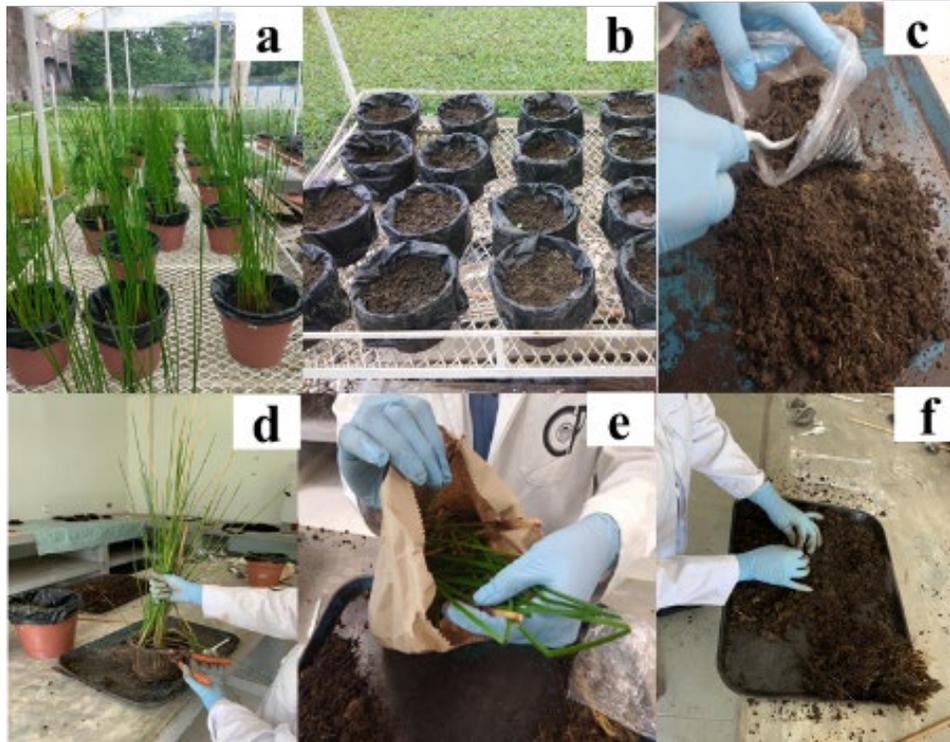


Figura 18. a) UE de la tecnología fitorremediación, b) UE de la tecnología atenuación natural, c) Colecta de suelo, d) Separación de suelo, rizosfera, raíz y material aéreo, e) Colecta de material aéreo, f) Separación de suelo y raíz.

### 5.3. Etapa III. Trabajo en laboratorio

#### 5.3.1. Variables en planta

##### 5.3.1.1. Número de raíces

Las raíces primarias frescas a la semana 38 después de lavarlas, fueron depositadas en bolsas de plásticas con agua destilada (20 mL) y posteriormente se procedió a realizar mediante conteo directo el número de raíces por UE (Figura 19).



Figura 19. Conteo de raíz fresca de *E. palustris* a la semana 38 SDT

### 5.3.1.2. Materia seca de raíz y aérea

Se evaluó a la semana 38 (nueve meses) SDT la materia seca radical y aérea. El material fresco se sometió a secado en una estufa de circulación de aire forzado durante 72 horas a 65°C y posteriormente fue pesada en balanza semianalítica (Ohaus, modelo Scout Pro SP202), los resultados se expresaron en gramos (Figura 20 a, b).

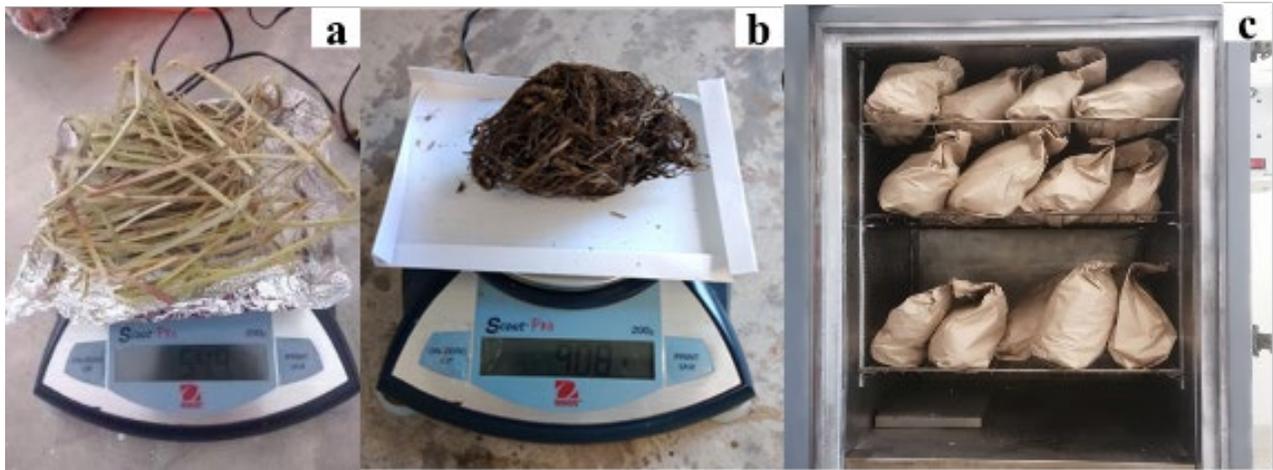


Figura 20. a) Materia seca aérea de *E. palustris*, b) Materia seca de raíz a la semana 38 SDT, c) Materia seca radical y aérea en estufa de secado

### 5.3.2. Variables microbiológicas en suelo y rizosfera

A la semana 38 SDT se colectó de las 56 UE suelo sometido a FT (rizosfera) y AN (suelo). Las muestras frescas se les determinó el porcentaje de humedad y las UFC de microalgas, hongos totales, actinomicetos, bacterias del grupo *Pseudomonas* spp e hidrocarbonoclasticas usando las técnicas que se describen a continuación.

#### 5.3.2.1. Población de microalgas

La técnica directa de recuento microscópico se utilizó para evaluar la población de microalgas (UFC mL<sup>-1</sup>). Muestra líquida de suelo y rizosfera (100 µL) se colocó en la cámara de recuento Neubauer que consiste en una rejilla con cuadrados de áreas conocida gravados en la superficie de un portaobjeto de cristal (Arredondo y Voltolina, 2007; Madigan *et al.*, 2015).

El crecimiento de un cultivo de microalgas se expresa como el incremento de biomasa ya sea en forma de número de células (cél/mL), calculado para un período de tiempo o una fase de crecimiento específica (Arredondo-Vega, 1997). El cálculo de microalgas se determinó usando la siguiente fórmula, para obtener el número de células por mililitro (Sorokin, 1973)

$$\text{Concentración } \left( \frac{\text{Céls}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{No. de células}}{\text{No. de cuadros contabilizados}} \times 10000 \dots \dots \dots (2)$$

La evaluación se realizó en 100 µL tomados de la dilución 10<sup>-1</sup> (1 g de muestra en 9 mL de agua estéril) (Figura 21 a, b, c), se contó el número de células por unidad de área de rejilla, y se obtuvo una medida del número de células por volumen en la cámara de Neubauer (Figura 21d).

#### 5.3.2.2. Población hongos y Actinomicetos

La población hongos y actinomicetos totales (UFC g<sup>-1</sup>) fue mediante la técnica de cuenta viable por dilución seriada en medios de cultivos específicos (Madigan *et al.*, 2015) a la semana 38 SDT (Figura 22).



Figura 21. Proceso del conteo de microalgas. a) Vista de Microalgas sobre la superficie del suelo después de la FT y AN. b) Pesado de muestra (g) y depósito de 9 ml de agua estéril. c) Agitación de muestra suspendida en agua. d) Conteo usando cámara de Neubauer y microscopio compuesto (40X).

El procedimiento se realizó por triplicado y se incubaron a 28 °C durante 72 h y se procedió con el conteo UFC g<sup>-1</sup> (suelo seco). Para el reporte de las UFC de hongos se aplicó la fórmula siguiente:

$$UFC\ g^{-1}\ s.s. = \frac{N.C.D \times P.S.S}{P.S.H} \dots\dots\dots (3)$$

Dónde: UFC g<sup>-1</sup> s.s = Unidades formadoras de colonias en gramos de suelo seco. N.C.D = Número de Colonias por Dilución. P.S.S = Peso de suelo seco. P.S.H = Peso de suelo húmedo (Díaz, 2006).

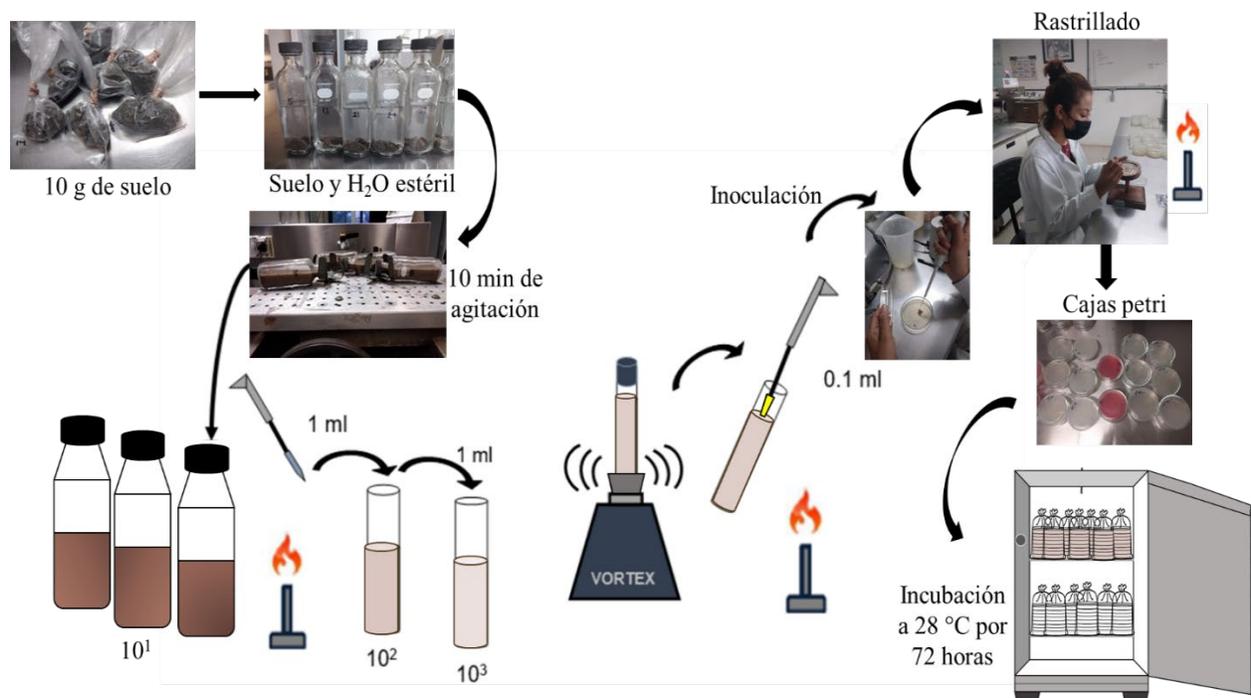


Figura 22. Aislamiento de población de hongos y actinomicetos totales mediante la técnica de cuenta viable por dilución seriada (Madigan *et al.*, 2015)

La población de Hongos totales (HT) en forma unidades formadoras de colonias (UFC g<sup>-1</sup>) en papa dextrosa agar (PDA) (Baker®) se utilizó el colorante de rosa de bengala (Cuadro 8).

Cuadro 8. Reactivos del medio de cultivo para Hongos Totales (Riker y Riker 1936 cit. Johnson y Curl, 1972)

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

Para la población de actinomicetos (ACT) se utilizó el medio de cultivo Czapek, el cual es un medio de cultivo adaptado originalmente de Czapek (1902, 1903) por Dox (1910). Las variaciones menores en las cantidades aparentemente no afectan las reacciones. Dado que el propósito de la fórmula de Czapek es asegurar la presencia de los elementos químicos requeridos en cantidades suficientes para mantener un buen crecimiento, con frecuencia se modifica en cuanto a las cantidades y nutrientes introducidos (Cuadro 9).

Cuadro 9. Reactivos del medio de cultivo para actinomicetos (Czapek (1902-1903) por Dox (1910); (Williams y Wilkins, 1945)

Reactivo	Cantidad
Agar	15g
Cloruro de potasio	0.5g
Fosfato dipotásico	1 g
Nitrato de sodio	2g
Sacarosa	30g
Sulfato ferroso	0.01g
Sulfato de magnesio	0.5g

### 5.3.2.3. Población de bacterias

Las UFC de bacterias del género *Pseudomonas* spp e hidrocarbonoclasticas (BHID) se evaluaron usando la técnica de cuenta viable en medio de cultivo selectivo. La población de *Pseudomonas* spp se evaluó en medio de cultivo Agar cetrimida + glicerol (Garrity *et al.*, 2005) (Cuadro 10).

Cuadro 10. Reactivos del medio de cultivo agar cetrimida para bacterias del género *Pseudomonas* spp formula por litro (pH final:  $7.2 \pm 0.2$ ) (Garrity *et al.*, 2005)

Reactivo	Cantidad
Digerido pancreático de gelatina	20 g
Cloruro magnésico MgCl <sub>2</sub>	1.4 g
Sulfato de potasio K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10 g
Cetrimida (bromuro de tetradecil trimetil amonio)	0.3g
Agar agar	13.6 g
Glicerol	10 mL

Las bacterias hidrocarbonoclasticas con el medio de cultivo carbón combinado modificado está compuesta por dos tipos de solución la A y la solución B (Cuadro 11).

Una vez que se obtiene las dos soluciones (A y B), se adiciona a la solución B 0.1 mL de Biotina + ácido aminobenzoico y se procede a unir las soluciones A y B con precaución para evitar el surgimiento de burbujas y se vierte de manera habitual en las cajas petri. Una vez solidificado el medio se agregan 100 µL de petróleo sobre el medio de cultivo solido contenido en caja petri.

Cuadro 11. Reactivos del medio de cultivo carbón combinado modificado para bacterias hidrocarbonoclasticas, fórmula por litro (Rennie, 1981)

Reactivo	Cantidad
NH <sub>3</sub> Cl	0.2g,
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.8g,
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2g,
KCl	0.1g,
Na <sub>2</sub> FeEDTA	0.56g,
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.025g,
Extracto de levadura	0.025g,
Agua destilada	900 mL,
Lactato de Sodio	0.5 mL,
Agar-agar	15g,
Agua destilada	900 mL
<b>Para la solución B:</b>	
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.4g,
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.12g,
Agua destilada	100 mL

#### 5.3.2.4. Diversidad de bacterias

La diversidad de actinomicetos, *Pseudomonas* spp e Hidrocarbonoclasticas se evaluó usando las características morfológicas de las UFC (color, tamaño, forma, borde y elevación (Figura 23) Ramírez *et al.*, 1998, Rojas 2011, Madigan *et al.*, 2015).

#### 5.3.2.5. Seguimiento de pigmentos fluorescentes de *Pseudomonas* spp

La diversidad de *Pseudomonas* spp basada en los pigmentos fluorescentes de colores de la masa celular para *P. fluorescentes* y no fluorescentes (Garrity *et al.*, 2005). Fueron seleccionadas 13 colonias individuales; 7 derivadas del suelo tratado con fitorremediación y seis de atenuación

natural. Los pasos secuenciales para dar seguimiento de pigmentos fueron; 1. Aislamiento con el fin de purificar la colonia y observar los cambios de color a través del tiempo.

El aislamiento fue la técnica de estría en zig-zag en estría cruzada (Figura 24), sobre el medio de cultivo sólido Agar Cetrimida + glicerol, posteriormente se incubaron (30 °C) los asilados durante un tiempo de 192 horas. Cada 24 horas hasta las 192 horas se observaron los cambios de pigmentos fluorescentes, comparando el color del aislado con la tabla Munsell para plantas y telas (Figura 25).



Figura 23. Descripción morfológica en placa de agar en medios de cultivo sólido (Ramírez *et al.*, 1998).

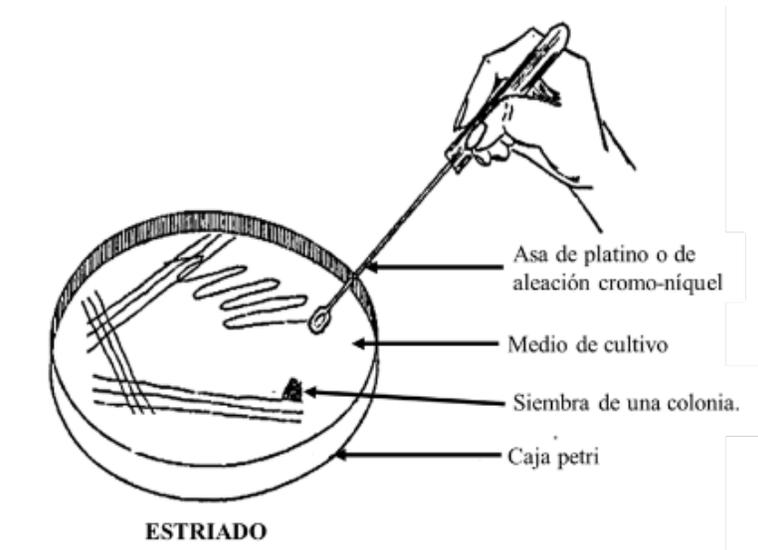


Figura 24. Aislamiento por siembra por estría en placa (CIAT, 1988).



Figura 25. Tabla Munsell para plantas y telas (Munsell, 1952).

#### 5.3.2.5.1. Características microscópicas Tinción Gram de cepa *Pseudomona spp*

La forma microscópica (cocos, básicos, estafilococos, racimos) en cepas del suelo rizosférico 1.3 FT, 1.4 FT, 2.6 FT, 2.6 FTV, 2.7 FT, 2.8 FT, 4.10 FT y en suelo no rizosférico 1.1 AN, 1.2 AN, 1.3 AN, 1.4 AN y 2.6 AN de los aislados puros de *Pseudomonas spp* se realizó con la técnica directa en microscopio compuesto.

Los pasos fueron: (a) frotis de masa celular sobre el portaobjetos, (b) fijación de las microscópicas de *Pseudomona spp*. La fijación se realizó mediante la exposición a calor durante unos segundos, el reverso del frotis del portaobjeto a la llama del mechero de Bunsen (Forbes *et al.*, 2009). Se continuó con la tinción de Gram a baño María a temperatura de ebullición.

Se cubrieron los portaobjetos con la solución cristal violeta y se dejó actuar durante 1 min, posteriormente se eliminó el exceso de reactivo lavando con agua destilada. En seguida se cubrió con lugol por 1 min, se limpió nuevamente el exceso con agua.

Después por 40 s se cubrió el aislado con alcohol, se eliminó el exceso con agua. Finalmente se cubrió el frotis con safranina para dejar en reposo durante 1min y se retiró el exceso con agua (Ramírez *et al.*, 1998). Se dejó secar a temperatura ambiente. A los 4 días se procedió a observar los preparados en el microscopio con los objetivos 40X y 100X (Figura 26).



Figura 26. Proceso de tinción Gram de las cepas de *Pseudomonas* spp

### 5.3.3. Variables químicas en suelo y rizosfera

#### 5.3.3.1. pH, conductividad eléctrica, materia orgánica y nitrógeno total

El potencial hidrogeno (pH) y la conductividad eléctrica (CE) fue evaluado según la técnica AS-02 NOM- 021-RECNAT-2000 (DOF, 2002). 5 g de muestra seca y tamizada a 2 mm de diámetro El potencial hidrógeno (pH) y la conductividad eléctrica (CE) fue evaluado según la técnica AS-02 NOM- 021-RECNAT-2000 (DOF, 2002). 5 g de muestra seca y tamizada a 2 mm de diámetro (previamente secada 24 h a 105°C) se suspendió en 20 mL de agua desionizada se agitó por intervalos de 5 minutos, durante 30 minutos y reposo durante 15 min. Se usó un potenciómetro y conductímetro (marca HANNA, modelo HI 9811-5).

Carbono orgánico (COS) fue con la técnica gravimétrica. Se utilizó 10 g de muestra seca y tamizada (2mm) se colocó en crisol previamente destarado y se introdujo en mufla a 320°C por 24 h, para lograr la calcinación del material orgánico (Etchevers, 1992). La materia orgánica (MOS) se calculó multiplicando el resultado del COS por 1.724 (factor de Van Benmelen para estimar el carbono orgánico) según la técnica AS-07 (DOF, 2002). El nitrógeno total (Nt) se realizó por el método micro-Kjeldahl tras digerir con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Page *et al.*, 1982).

#### 5.3.3.2. Degradación de Hidrocarburos Totales de Petróleo

La prueba de degradación de petróleo se realizó determinando el porcentaje de pérdida de HTP de la rizosfera y suelo a las 38 SDT respecto a los HTP inicial, tiempo de establecimiento de los

rizomas de *E. palustris* en el experimento. La extracción de los HTP se realizó en equipo soxhlet (EPA, 1996), se utilizó el diclorometano con 99.5% de pureza (110 ml de solvente por UE). Se utilizó 10 g de muestra de suelo (húmedo) y sometió a reflujo en dedales durante 8 h, en el equipo soxhlet (Figura 27), el sobrenadante se concentró en matraces con un rotavapor. Los matraces+concentrado de petróleo permanecieron por 24 horas en desecador. La concentración de HTP residual se calculó según la ecuación siguiente:

$$\text{HTP (g/kg suelo seco)} = \frac{(\text{HTP's g})(1\ 000\ \text{g kg})}{\text{Ps g}} \dots\dots\dots (4)$$

Dónde: HTP = (PM + HTP extraídos del suelo) - (PM) PM = peso del matraz de extracción a peso constante. Ps = peso del suelo de extracción (EPA 1986).

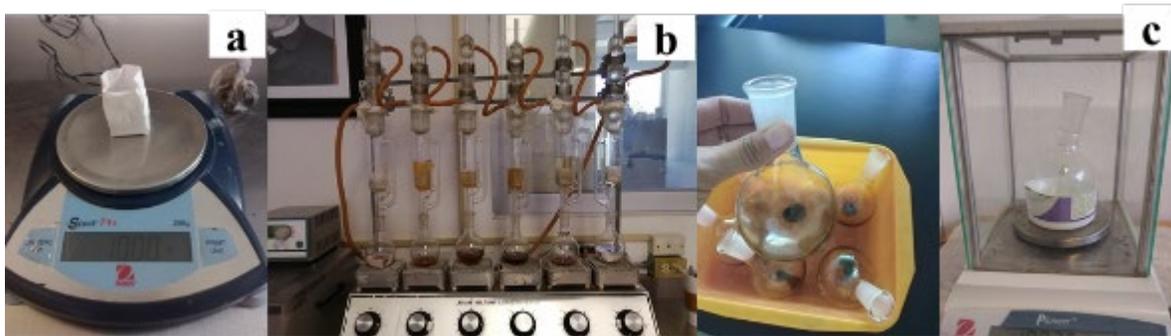


Figura 27. Extracción de hidrocarburos totales del petróleo con equipo soxhlet y cuantificación. a) Peso de muestra fresca. b) Extracción con diclorometano y c) peso de hidrocarburos totales del petróleo.

### 5.3.4. Índice hormesis a petróleo

El índice hormético fisiológico (IHF) y el índice hormético microbiológico (IHM) se calculó para cada variable (x). Para medir el efecto de tratamiento, los IHF(x) e IHM de cada variable fueron comparados con la correspondiente del testigo (0 g/kg petróleo). El IHF(x) e IHM se obtuvo de la división del tratamiento con petróleo entre el tratamiento testigo, ya que esto permite evaluar la respuesta biológica a un suelo contaminado. Índice hormético fisiológico total (IHFT) e índice hormético microbiológico total (IHMT) se obtuvo de la suma de todos los IHF(x) y/o IHM(x), dividido entre el total de las variables estudiadas cuyo valor representa la respuesta de la planta para IHF y microorganismos rizosféricos para IHM al contaminante en función de todas las

variables fisiológicas y de producción y/o microbiológicas estudiadas para ellos se utilizaron las ecuaciones siguientes:

$$IHF(x) \text{ o } IHM(x) = \frac{TpR1}{TtR1} \dots\dots\dots(5)$$

$$IHFT(x) = \sum_{i=1}^n \left( \frac{IHF(x)}{n} \right) \dots\dots\dots i=1, 2, 3 \dots t \dots\dots\dots(6)$$

$$IHMT(x) = \sum_{i=1}^n \left( \frac{IHM(x)}{n} \right) \dots\dots\dots i=1, 2, 3 \dots t \dots\dots\dots(7)$$

Dónde:

IHF(x): índice hormético fisiológico para la variable x. IHM(x): Índice hormético microbiológico para la variable x; Tp: concentración de petróleo; Tt: testigo; R1: repetición 1...n; n= número de variables.

### 5.3.5. Etapa IV. Análisis estadísticos

Los datos obtenidos de longitud de planta, plantas nuevas y tasa de crecimiento relativo por 37 tiempos, y los datos obtenidos a las 38 SDT de producción de *E. palustris*, población de microalgas, hongos totales, actinomicetos, población de *Pseudomonas* spp, hidrocarbonoclastas y remoción de HTP, se procesaron usando una base de Excel, y se normalizaron, se verificó el análisis de varianza (ANOVA), se utilizó el procedimiento de Duncan ( $p \leq 0.05$ ) con el programa estadístico Infostat 2020 (Di Rienzo *et al.*, 2020). Se aplicó correlación de Pearson a las variables obtenidas a las 38 SDT (SAS v.9.4) (SAS, 2005).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Propiedades químicas de suelo y rizosfera

El Cuadro 12 muestra las medias de pH, conductividad eléctrica (CE), materia orgánica (MOS), carbono orgánico (COS), nitrógeno total (Nt) y COS/Nt a la 38 SDT en suelo y rizosfera de *E. palustris* sin y con 3, 15, 30, 45, 60 y 75 g/kg de PC. Las medias para las seis variables presentan diferencias estadísticas significativas por efecto de la dosis de petróleo (DP) y la tecnología de tratamiento (Duncan  $p \leq 0.05$ ). En suelo (AN) testigo y con petróleo crudo (PC) 3, 15 y 30 g/kg registró un pH de 7.1, 6.9, 6.6 y 6.6, respectivamente, se clasifica como pH neutro. El suelo con 45, 60 y 75 g/kg PC es moderadamente ácido (6.1 a 6.4) según la clasificación de la fertilidad del suelo NOM-021-RECNAT-2000 (DOF, 2002). La CE ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) en suelo sometido a la AN estuvo en el rango de 0.190 a 0.227 dS/m sin y con petróleo, con bajos en contenido salino.

Los contenidos de COS para los suelos con 0, 3 y 15 g/kg de PC los valores fueron 3 a 3.2%, clasificación agronómica mediana, y los suelos con 30, 45, 60 y 75 g/kg de PC los valores fueron muy altos (3.5 a 4.6%). El Nt con valores para suelo sin PC de 0.12% (medianamente pobre), pero en los suelos con 3, 15, 30, 45, 60 y 75 g/kg de PC oscilaron entre 0.15 a 0.16 % (mediano) según Rodríguez y Rodríguez, (2011). La relación COS/Nt osciló entre 18 a 35.6, siendo menor con 18 el suelo con 3 g/kg de PC, indicando mayor mineralización del carbono de origen biogénico y petrolífero. En el suelo sometido a la fitorremediación (FT) los tratamientos sin y con 3, 15, 30, 45, 60 y 75 g/kg de PC presentan un pH moderadamente alcalino entre 6.6 y 8. La CE en el rango de 0.712 a 0.887 dS/m para suelo sin y con seis DP, clasificándose como de bajo contenido salino. El COS fue clasificación agronómica mediana (3.1 y 3) suelo sin y con 3 g/kg de PC, mientras que con 14, 30, 45, 60 y 75 g/kg el COS se clasifica como alto (3.6 a 6) incrementando al aumentar el PC en el suelo. El Nt fue medianamente pobre (0.12%) para suelo sin PC, mediano en suelo con 3, 15, 30 y 45 g/kg PC alcanzando valores medianos (0.15 a 0.18%), y en suelo con 60 y 75 g/kg PC el contenido fue medianamente rico, alcanzó valores de 0.24 y 0.25%.

La relación COS/Nt presentó valores de 25 en suelo sin PC, pero entre 28 a 18.5 en suelo con diferentes DP. El menor valor de esta relación fue de 18.5 en suelo con 3 g de PC, indicando una mayor mineralización de carbono en suelo de origen biogénico y petrolífero.

Al respecto Porta *et al.* (2014) indica que entre menor sea la relación COS/Nt habrá mayor mineralización en la solución del suelo, provocando la liberación de componentes inorgánicos

como H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> etc., estos pueden ser aprovechables, pero también tóxicos para las plantas y los microorganismos.

El efecto de la FT incrementó ligeramente el pH, CE, COS en suelo respecto a la AN, esto posiblemente se debe a los exudados orgánicos e inorgánicos que según Marschner (2012), la raíz deposita en el suelo, los cuales inducen cambios significativos en sus propiedades químicas.

El efecto del petróleo también fue evidente después del proceso de FT y AN al incrementar el pH, CE, COS y Nt con respecto a la AN, esto ha sido reportado por Caravaca y Roldán, (2003). Por su parte, Shukry *et al.* (2013) indican que los hidrocarburos del petróleo alteran los contenidos de carbono orgánico, macro y micronutrientes.

Cuadro 12. Propiedades químicas en suelo y rizosfera de *E. palustris* contaminado con petróleo a 38 SDT.

Espacio /Petróleo (g/kg)	pH (1:4 H <sub>2</sub> O)	CE (μS/cm)	MOS (%)	COS (%)	Nt (%)	COS/Nt
<u>Sin planta (AN)</u>						
0 (testigo)	7.1 c	0.23 d	5.5 f	3.2 g	0.14 g	22.8 bcd
3	6.9 c	0.23 d	5.2 f	3 g	0.16 de	18.5 e
15	6.6 d	0.22 d	5.3 f	3.1 g	0.15 fg	20.6 cde
30	6.6 d	0.2 d	6 ef	3.5 ef	0.16 de	21 cde
45	6.2 e	0.19 d	6.9 de	4 de	0.16 de	24 abc
60	6.4 de	0.19 d	7 de	4 de	0.16 def	25 ab
75	6.1 e	0.20 d	7.9 bc	4.6 bc	0.16 def	28 a
<u><i>E. palustris</i> (Fitorremediación)</u>						
0 (testigo)	8 a	0.997 a	5.4 f	3.1 g	0.12 h	25 ab
3	7.6 b	0.90 b	5.2 f	3 g	0.15 ef	19.8 e
15	7.7 ab	0.82 b	6.2 ef	3.6 ef	0.16 cd	21 bcde
30	7.9 ab	0.89 b	6.6 de	4 de	0.17 c	21 bcde
45	7.9 ab	0.86 b	7.4 cd	4.3 cd	0.18 c	23.9 bcd
60	7.8 ab	0.85 b	8.5 b	5 b	0.24 b	20.8 cde
75	7.8 ab	0.712 c	9.6 a	6 a	0.25 a	23.5 bcd
<u>Tecnología</u>						
AN	6.5 B	0.209 B	6.2 A	3.6 A	0.16 B	22.8 A
FT	7.8 A	0.863 A	6.9 A	4 A	0.18 A	22.1 A
<u>Petróleo</u>						
Sin	7.5 A	0.612 A	5.4 B	3.1 B	0.13 B	23.9 A
Con	7.1 A	0.522 B	6.8 A	4 A	0.17 A	22.3 B

CE: Conductividad eléctrica; MOS: Materia Orgánica; COS: Carbón Orgánico; Nt: Nitrógeno total. Letras minúsculas diferentes por columna y letras mayúsculas por columna indican diferencias estadísticas significativas (Duncan p≤0.05 n=4).

## 6.2. Cinética de crecimiento de *Eleocharis palustris* en suelo con petróleo

El análisis de varianza de LP y PN de *E. palustris* mostró diferencias estadísticas altamente significativas entre tratamientos ( $p \leq 0.01$ ) semana 2 y 36, según el efecto de DP (Figura 28a, b). En los tratamientos sin y con DP la fase logarítmica de LP se presenta entre las semanas dos a la ocho, la fase lineal entre las semanas 9 a 29, y senescencia o asintótica de la 30 a 38, siendo mayor en tratamientos con las seis DP, respecto al testigo (Figura 28a). La mayor LP (94 a 95 cm) se encontró en tratamientos de la semana 30 a 38 con 60 g/kg de PC, pero menor LP (63 cm) a partir de la semana 11 hasta la 38 en planta no se expuso a PC. Lo anterior coincide con lo encontrado mediante el índice hormesis fisiológico (IHF) para LP (IHFLP), el cual mostró ser 9, 27, 45, 41, 50 y 34% respectivamente mayor al testigo al final de la prueba.

Al final de la prueba (semana 38) *E. palustris* mostró capacidad de crecimiento y adaptación a suelos con altas DP. Este efecto positivo de altas DP en LP, también fue reportado por Orocio-Carrillo *et al.*, (2019) e indica que LP de *L. hexandra* incrementa 117, 120 y 138% el día 40, y 114, 124 y 117% al día 90 expuesta a 7.9, 54, y 102 g/kg PC. Arias-Trinidad *et al.*, (2017) encontraron un efecto negativo en altura del pasto *L. hexandra* expuesto a 1.5, 3, 4.5, 6, 7.5 y 9 g/kg de PC días 12, 25, 39, 54, 68, 82 y 96.

La LP de *E. palustris* en tratamientos sin y con PC presenta la fase logarítmica entre la semana dos a ocho, lineal (semana 9 a 29), y senescencia o asintótica de la 30 a 38, siendo mayor en los tratamientos integrando con las seis DP, respecto al testigo (Figura 28a). Estos resultados indican que la planta se adapta y presenta un crecimiento normal similar a las plantas que crecen en ambientes sin estrés reportadas por Salisbury y Ros, (2000). Hausen, (2006) y Ogle *et al.*, (2012) indican que *E. palustris* es una monocotiledónea  $C_3$  que se establece en humedales que por el tipo de morfología y fisiología, estimula la adaptación y crecimiento vegetal a condiciones desfavorables. También puede ser que *E. palustris* como respuesta al estrés induzca una producción de auxinas en el tallo lo que incrementa su crecimiento (Azcón-Bieto *et al.*, 2013).

Las PN de *E. palustris* en suelo sin y con DP presentan una tendencia directamente proporcional al tiempo de exposición a DP; 3 ( $R^2=0.9931$ ), 15 ( $R^2=0.9937$ ), 30 ( $R^2=0.9893$ ), 45 ( $R^2=0.9749$ ), 60 ( $R^2=0.9856$ ) y 75 ( $R^2=0.9942$ ) g/kg. Las PN es mayor en la semana 6 en los tratamientos con 6 DP, y en las semanas del 15 a 38 existió mayor cantidad de PN expuestas a 60 g de PC, alcanzando 299 a la semana 38, lo cual fue 33.8% mayor que el testigo, logrando éste 198 PN (Figura 28b).

El índice hormético fisiológico para PN (IHFPN) a la semana 38, incrementó 8, 15, 18, 23, 54 y 44 % al estar expuesta a 3, 15, 30, 45, 60 y 75 g/kg de PC respectivamente, respecto al tratamiento testigo. Resultado similar fue reportado por González-Moscoso *et al.* (2017) al día 60, 120 y 180 con la estimulación de 45.45, 100 y 85.71% respectivamente., en suelos contaminado con 90 g/kg de petróleo, respecto al suelo testigo. Una explicación al incremento del número de PN puede ser a lo que informa Azcón-Bieto *et al.* (2013) generalmente cuando la planta se expone al estrés, el ciclo celular se incrementa cuando se dispone de nutrientes esenciales en el suelo y por la biosíntesis de hormonas en órganos vegetativos o reproductivos. Posiblemente en el órgano reproductor (rizomas) de *E. palustris* se demanda por estrés la producción o por recepción de ácido indolacético (AIA) para la producción de nuevas plantas.

Las medias de TCR según LP y PN en 37 tiempos evaluados en suelos sin y con seis DP muestran diferencias estadísticas significativas (Duncan  $p \leq 0.05$ ) (Figura 29a, b). A la tercera semana de exposición a PC, la TCR según la LP, es incrementada en 54.7% para los suelos con 30 y 75 g/kg (Figura 29a). Sin embargo, conforme el tiempo aumenta la TCR disminuye ante las seis DP. Orocio-Carrillo *et al.* (2019) encontraron que al exponer *Leersia hexandra* ante DPs de 7.9, 54 y 102 g/kg, a los días 45 y 90, la TCR aumentó (119, 159 y 146%, y 102, 113 y 109%, respectivamente) en comparación con el testigo.

En la Figura 29a se aprecia que en la quinta semana, la TCR respecto a PN incrementó 1.6, 1.10, 2.3, 1.5, 1.6 y 2.4% en suelos contaminados con 3, 15, 30, 45, 60 y 75 g/kg respecto al suelo sin contaminación. Entre la semana 6 y 12, la cinética de PN disminuyó según las DP, respecto al testigo. La TCR en 15 y 75 g/kg fue mayor a las 36 SDT.

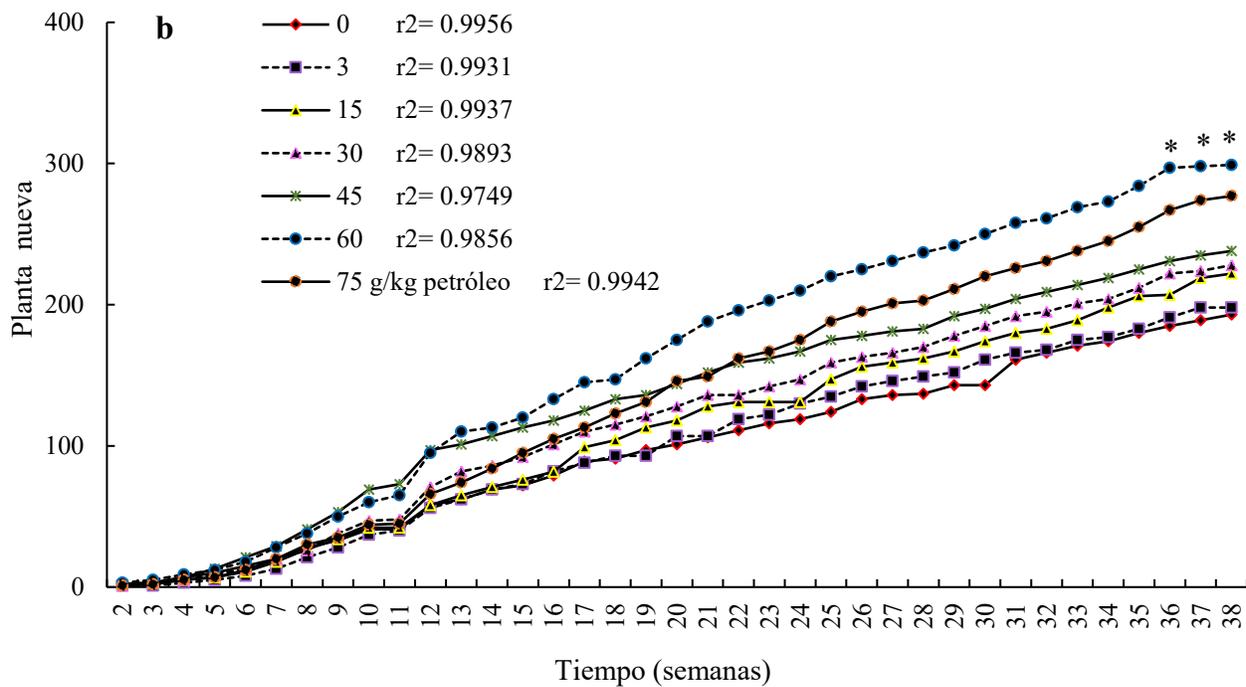
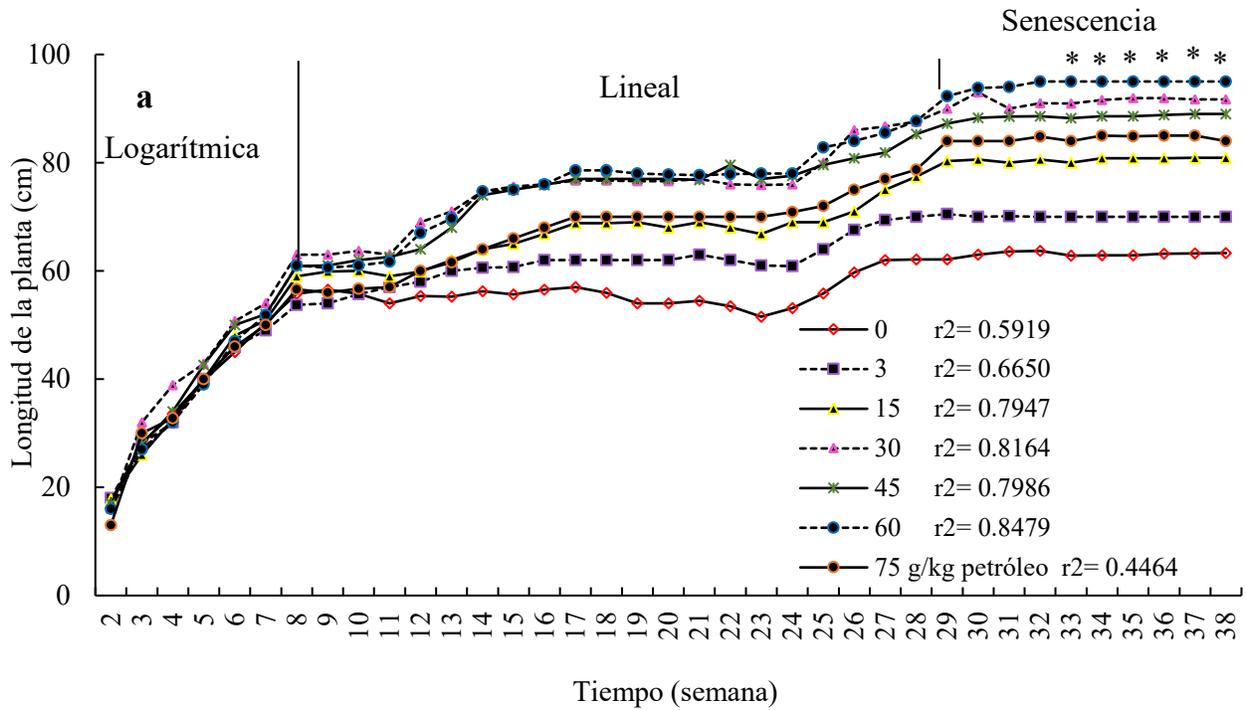


Figura 28. Cinética de crecimiento lineal en el tiempo de *Eleocharis palustris* en suelo sin y con seis dosis de petróleo. 38 SDT. a) Longitud de planta. b) Planta nueva en macollo. (Duncan  $p \leq 0.05$ ,  $n=4$ ). \*: Significativo.

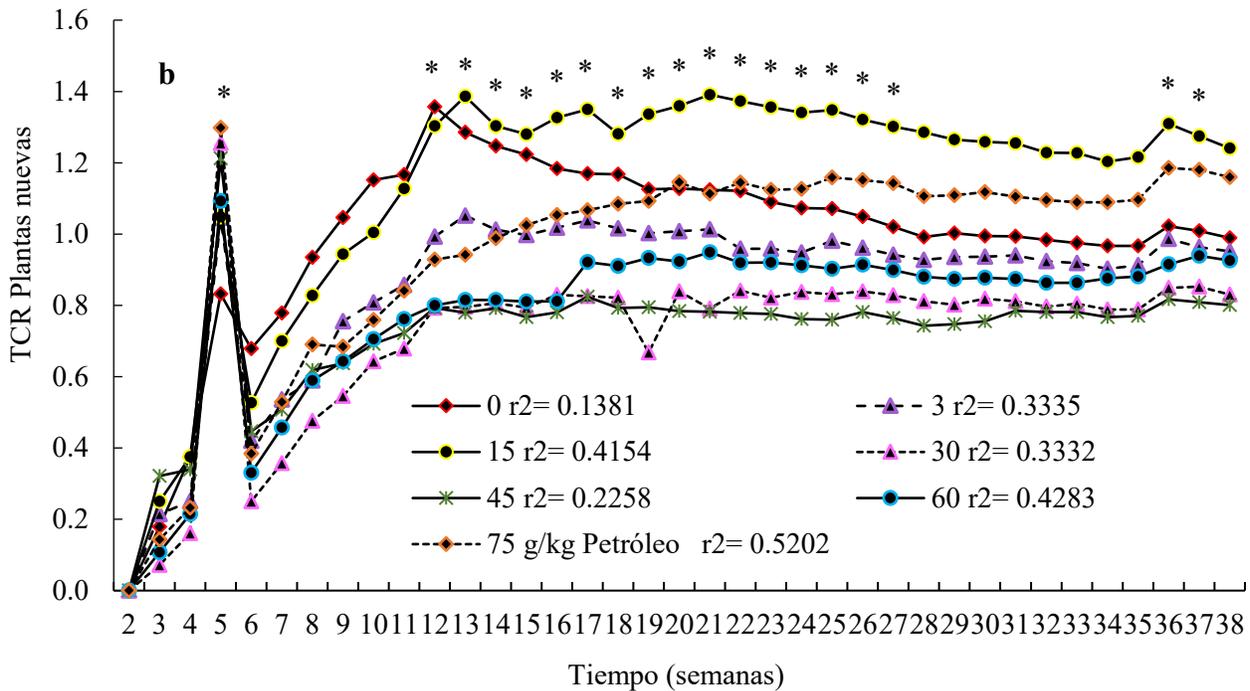
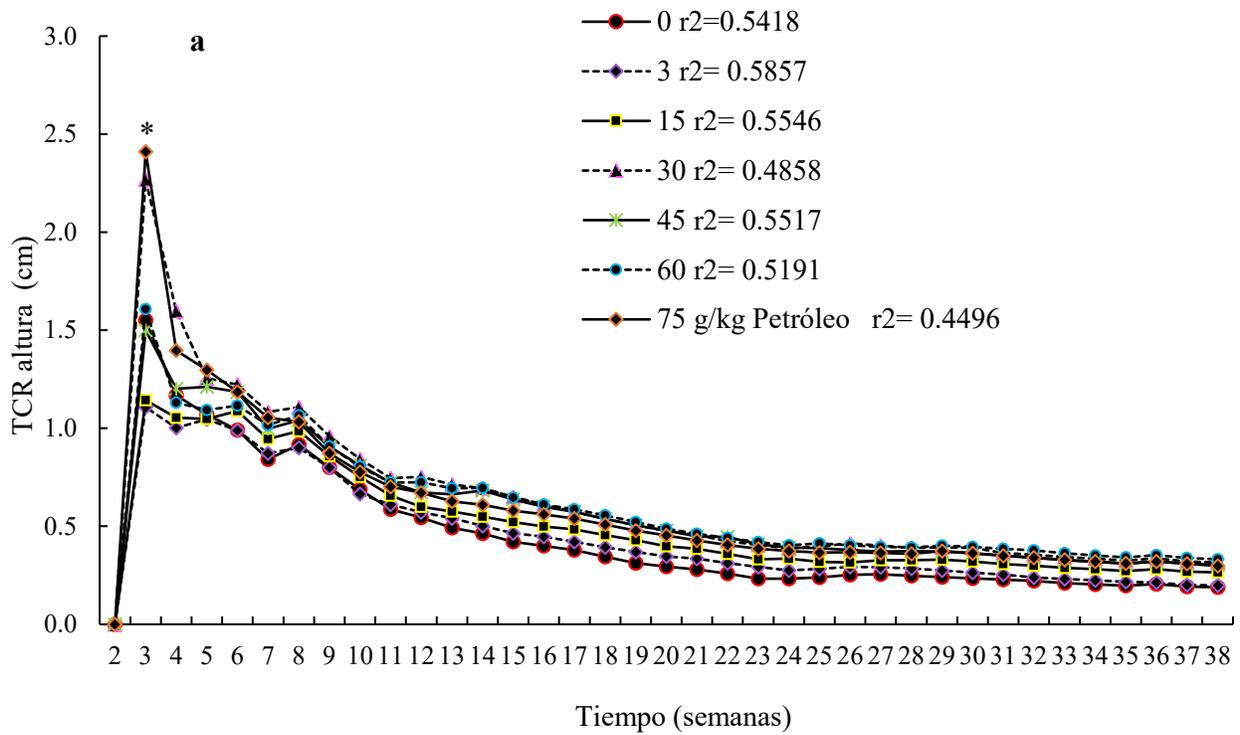


Figura 29. Cinética de la tasa de crecimiento de *Eleocharis palustris* en suelo sin y con seis dosis de petróleo en 38 semanas. A) Longitud de planta. B) Plantas nuevas en macollo. (Duncan  $p \leq 0.05$ ,  $n=4$ ). \*: Significativo.

### 6.3. Índices hormesis a petróleo

#### 6.3.1. Índice hormético fisiológico

##### 6.3.1.1. Crecimiento y producción de *Eleocharis palustris*

Los IHF basados en el crecimiento (LP y PN) por 37 tiempos de exposición a *E. palustris* expuesta a diferentes DP, mostraron diferencias estadísticamente significativas (Figura 30a, b). A la semana dos de la exposición al PC hubo efecto negativo para la LP; sin embargo, con la prolongación del tiempo a partir de la tercera semana a la seis, se observó una estimulación positiva de 3, 15, 30, 45, 60 y 75 g/kg petróleo, mostrando un IHFAP  $\geq 1$ . Las PN a partir de la segunda hasta la octava semana de exposición ante DP de 3, 15, 30 y 75 g/kg tuvieron un estímulo negativo, y de la semana 9 hasta la 38, se observó un estímulo positivo del petróleo, al obtener un IHFPN  $\geq 1$ .

La hormesis en plantas ha sido probada por diferentes investigadores; por ejemplo, Cedergreen *et al.* (2007) expuso a la planta acuática *Lemna minor* ante herbicidas Orocio-Carrillo *et al.* (2020) al pasto semi-acuático *Leersia hexandra* a PC. Nuestros resultados muestran que el crecimiento de *E. palustris* evaluado en 37 tiempos, es indicador de hormesis fisiológica (IHFAP y IHFPN  $\geq 1$ ), por lo que esta especie puede ser sostenible durante las fases de crecimiento en el humedal con suelo arcilloso, contaminado e inundado.

Esta respuesta ha sido confirmada por Cabrese y Blain (2009) quienes sugieren que algunos valores de variables fisiológicas que muestren hormesis son significativos para la sostenibilidad del ecosistema. La respuesta hormesis para LP y PN se relaciona con la actividad fotosintética mejorada que la planta adopta en condiciones de estrés, y que estimula el desarrollo vegetal (Jia *et al.*, 2015; Azcón-Bieto *et al.*, 2013). Los mecanismos del sistema antioxidante están relacionados con la hormesis para brotes aéreos y evolucionan de manera conjunta con su metabolismo aeróbico para contrarrestar consecuencias oxidativas y evitar la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Fu y Huang, 2001) que inducen la muerte celular. Entre los cuales, el superóxido dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1.) convierte  $O_2$  a  $H_2O_2$ , y la catalasa (CAT) (EC 1.11.1.6) y las peroxidases (principalmente ascorbato peróxidasa: EC 1.11.1.11) desencadena la conversión de  $H_2O_2$  en  $H_2O$  (Jeffrey, 2002).

Por otro lado, IHF basados en variables de producción (número de raíces primarias (NRP), materia seca de raíz (MSR), aérea (MSA) y total (MST) de *E. palustris*, presentaron un estímulo positivo a las seis DP. La mayor estimulación de NRP (2.37) es la dosis de 60 g/kg PC. La mayor MSR se

registró en el suelo con 75 g/kg de PC, aunque fue estadísticamente igual al tratamiento con 30 y 60 g/kg de PC. La mayor MSA (1.38) fue en 30 g/kg y MST mayor se estimula en 15, 30, 60 y 75 g/kg.

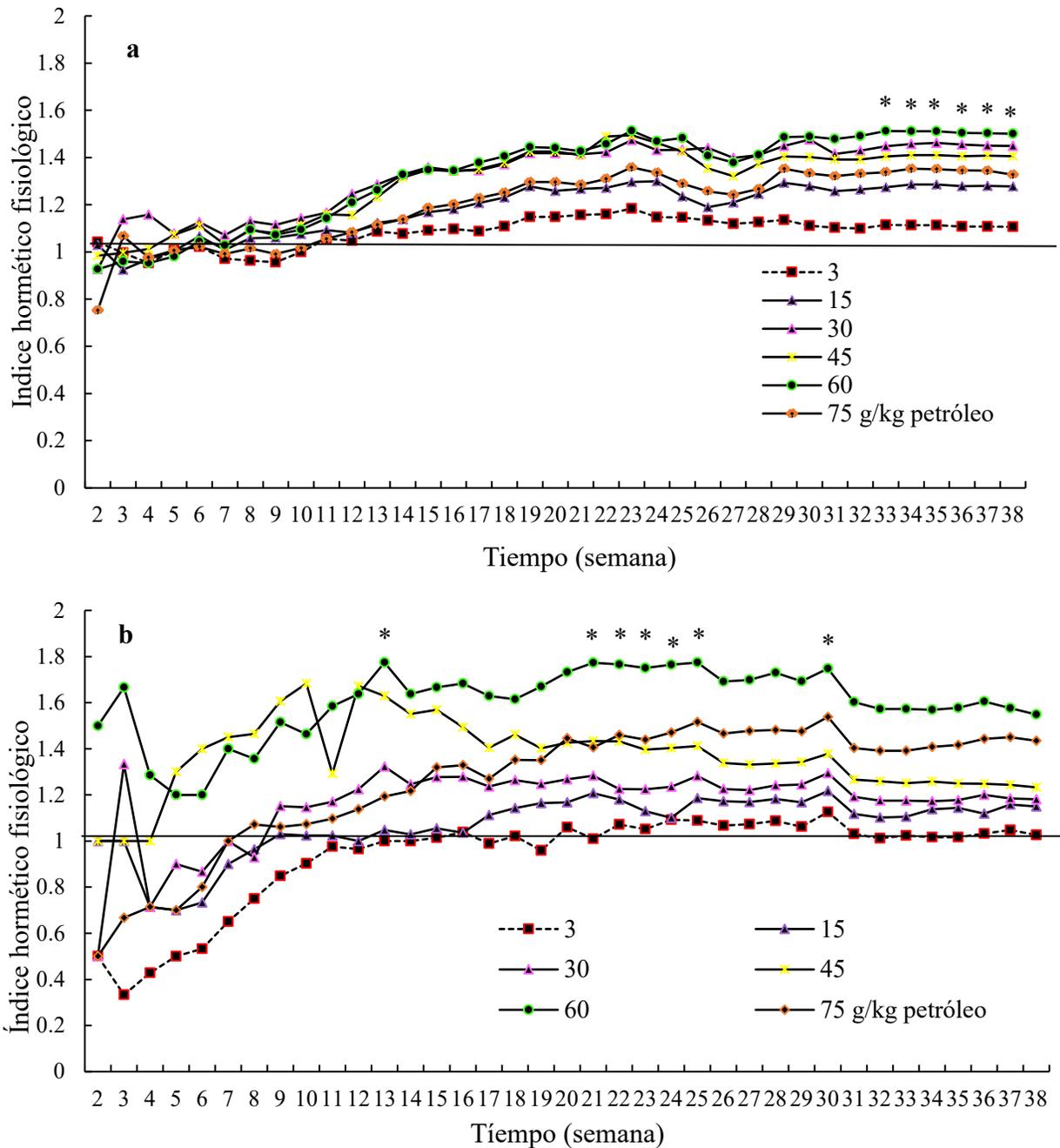


Figura 30. Índice hormético semanal a exposición a petróleo del crecimiento de *E. palustris*. (a) Longitud de planta. (b) Plantas nuevas. (Duncan  $p \leq 0.05$ ,  $n=4$ ): Significativo.  $IHF \geq 1$  indica hormesis. La línea continua horizontal que inicia en el número uno en el eje Y, indica el valor de fondo del daño, por encima del cual se cree que está el efecto de estrés.

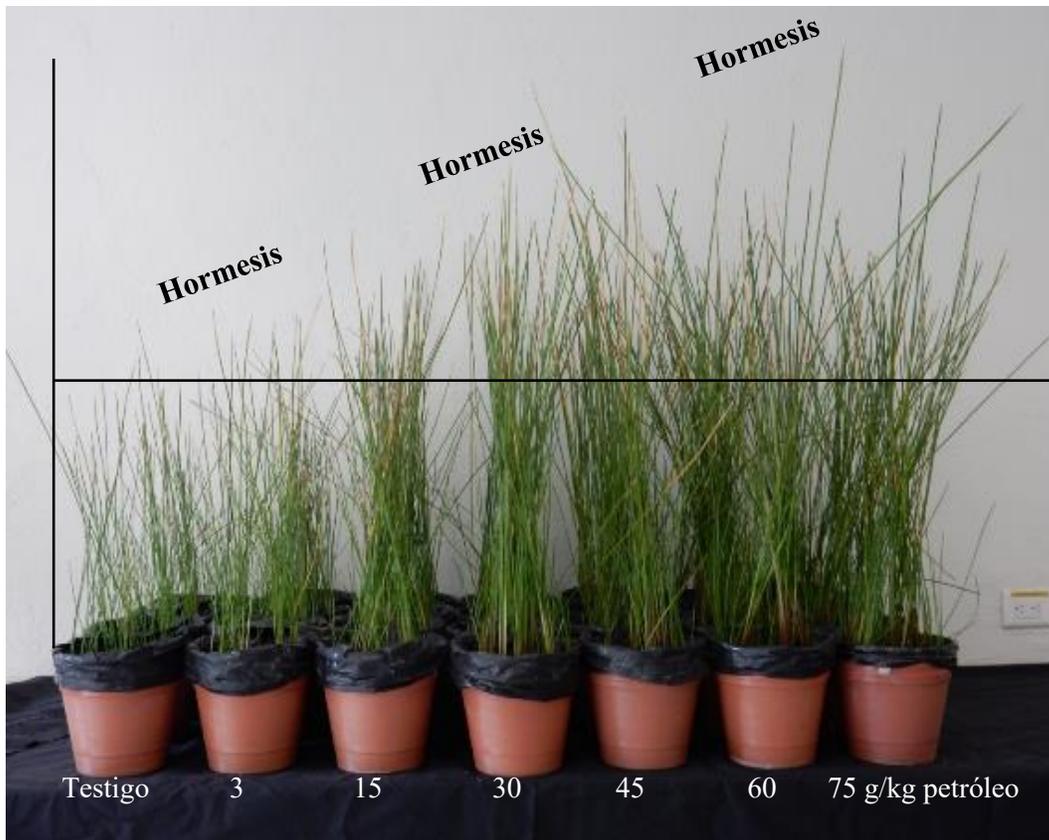


Figura 31. Efecto de dosis del petróleo en crecimiento de *E. palustris* 38 SDT.

En la Figura 31 se muestra el efecto hormético de *E. palustris* expuestas a las diferentes DP a las 38 SDT. Se observa por debajo de la línea continua (horizontal) el valor de fondo del daño y por encima se cree que esta el efecto de estrés.

Las medias de los índices horméticos fisiológicos de las variables número de raíces primarias (NRP), materia seca de raíz (MSR), materia seca aérea (MSA) y materia seca total (MST) mostraron diferencias significativas por efecto de DP a 38 SDT (Duncan  $\leq 0.05$   $n=4$ ) (Figura 32a, b, c). Los valores de los IHFNRP, IHFMSR, IHFMSA e IHFMT fueron  $\geq 1$ , a las 38 SDT ante las seis DP, indicando una respuesta positiva al estrés. La respuesta de cada órgano de *E. palustris* en el humedal artificial mostró diferentes respuestas al estrés inducido por el PC. En mayor IHF (2.38) para el NRP se obtuvo ante 75 g PC; el mayor valor de IHF (1.45) para la MSR se obtuvo ante 75 g; y los mayores valores para MSA (1.37) y MST (1.8 y 1.7) se obtuvieron ante 60 g y 75 g, respectivamente (Cuadro 13). EL IHFT representa el promedio de los índices en las variables fisiológicas y producción de *E. palustris* a las 38 SDT. Los IHFT obtenidos ante 3, 15, 30, 45, 60 y 75 g/kg PC fueron 1.08, 1.22, 1.38, 1.31, 1.63 y 1.46, respectivamente. Estos índices respaldan a

*E. palustris* por su respuesta positiva al estrés del petróleo en el humedal. Según Maliszewska-Kordybach y Smreczak (2000) una respuesta hormética en las plantas significa que los procesos bioquímicos y fisiológicos en los órganos vegetales son realizados de manera eficiente, sin alterar la fotosíntesis, respiración y transpiración. Resultados similares obtuvieron Mezzari *et al.* (2011) y González-Moscoso *et al.* (2017) al exponer plantas tropicales a hidrocarburos totales del petróleo.

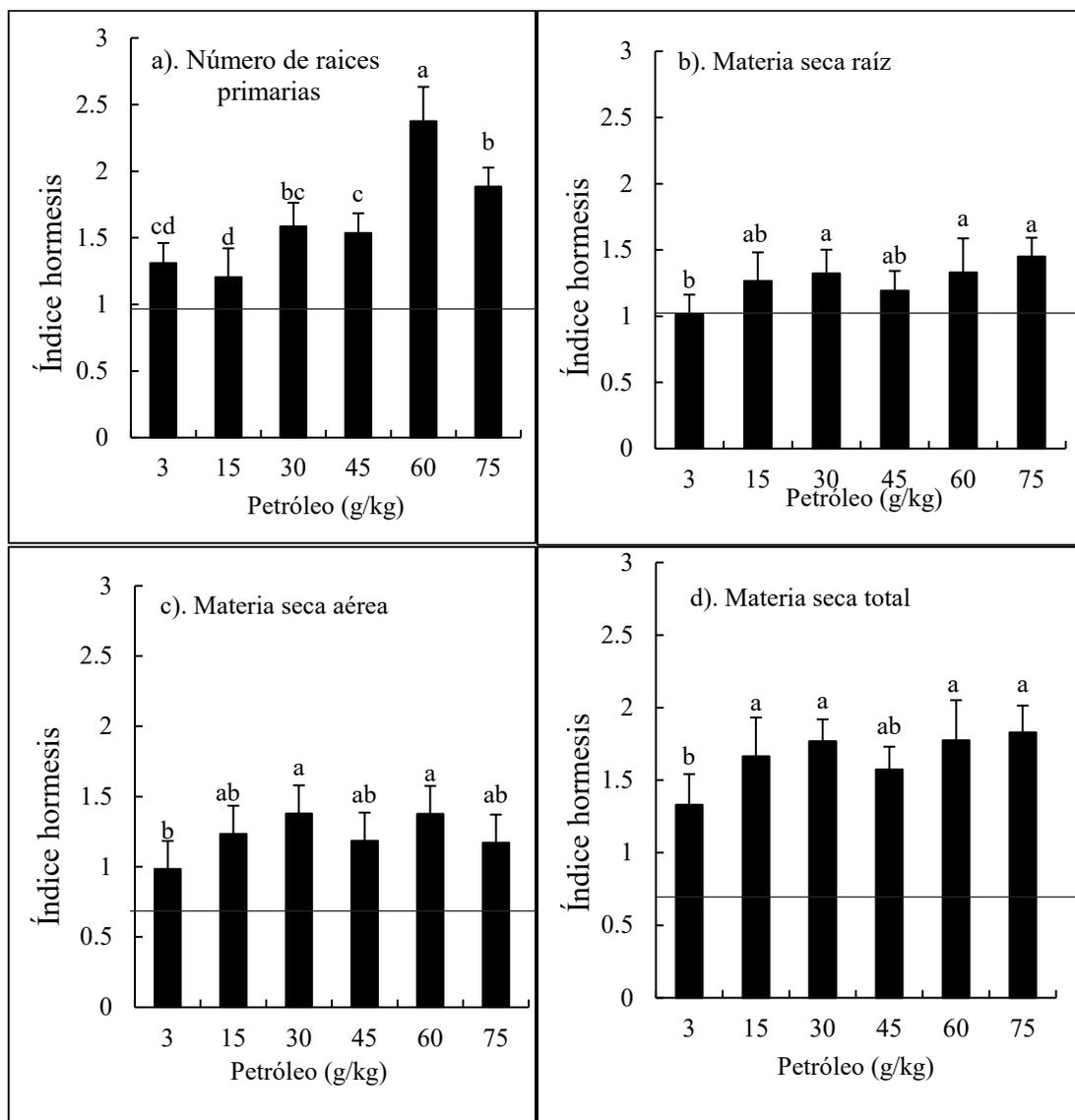


Figura 32. Índices de hormesis de producción a petróleo fresco. a). Raíces primarias, a). Materia seca raíz, c). Materia seca aérea y d). Materia seca total de la Cyperaceae *E. palustris*. Letras diferentes indican entre columnas indican diferencias estadísticas significativas (Duncan  $p \leq 0.05$ ,  $n=4$ ).  $IHF \geq 1$  indica hormesis. La línea continua horizontal que inicia en el número uno en el eje Y, indica el valor de fondo del daño, por encima del cual se cree que está el efecto de estrés.

### 6.3.1.2. Índice hormético en microorganismos rizosféricos

El análisis de varianza del índice hormético microbiológico (IHM) para las UFC de microalgas (MIAL), hongos totales (HT), actinomicetos (ACT), *Pseudomonas* spp (PSE), y bacterias hidrocarbonoclasticas (BHID) rizosféricas, mostró diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre las DP (3, 15, 30, 45, 60 y 75 g/kg). Los IHMMIAL, IHMHT, IHMACT, IHMPSE, IHMBHID mostraron que en cada una de las DP incrementaron las UFC, con índice hermético de  $\geq 1$  (Figura 33).

La población de microalgas mostró mayor IHM (3.15 y 3.26) ante 60 y 75 g/kg de PC, con incrementos de 71.4 y 69.3 %, respecto al testigo. Los HT y ACT con tuvieron IHM mayores de 3.12 y 1.36 ante 60 g/kg de PC, con incrementos de 67.9 y 73.5% respecto al testigo.

Las UFC de *Pseudomonas* spp y bacterias hidrocarbonoclasticas incrementaron al aumentar la DP. Sobresalen los IHM muy altos inducidos por *Pseudomonas* spp e hidrocarbonoclasticas (6 y 173, respectivamente) ante 75 g/kg de PC, y con incrementos respecto al suelo testigo de 83.3% y 99.4%, respectivamente (Figura 34).

Los índices de hormesis obtenidos en cada grupo microbiano, se confirman a través del índice hormético microbiológico total (IHMT)  $\geq 1$  (por ejemplo, 2.66, 7.12, 5.9, 30, 31.8 y 37) en suelo con 3, 15, 30, 45, 60 y 75 g/kg de PC, respectivamente (Cuadro 13). Esto sugiere que la rizosfera de *E. palustris* del humedal artificialmente contaminado, es capaz de sostener el crecimiento de grupos microbianos que toleran el estrés por la presencia de PC. La raíz en ambientes anóxicos provee un hábitat para que el biofilm microbiano pueda adherirse a ella, esto influenciado por propiedades fisicoquímicas, oxígeno y exudados radicales (Tordera *et al.*, 2020), además del desarrollo fisiológico, disponibilidad y extracción de nutrientes por la planta (Marschner, 2012).

Los grupos microbianos en ambientes anóxicos según George *et al.* (2012), utilizan aceptores de electrones para la respiración diferentes al  $O_2$ , como H,  $NO_3$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  y  $H_2S$ , y reducción de  $CO_2$  a  $CH_4$ , habilidades que les permite colonizar ambientes contaminados con PC. Sin embargo, Mier y Gentry (2015) informan que este tipo de microorganismos inducen cambios genéticos en ellos como mutaciones o transferencia genéticas, modificaciones para el desarrollo de nuevas capacidades metabólicas, que les permita utilizar al PC como fuente de carbono y energía.

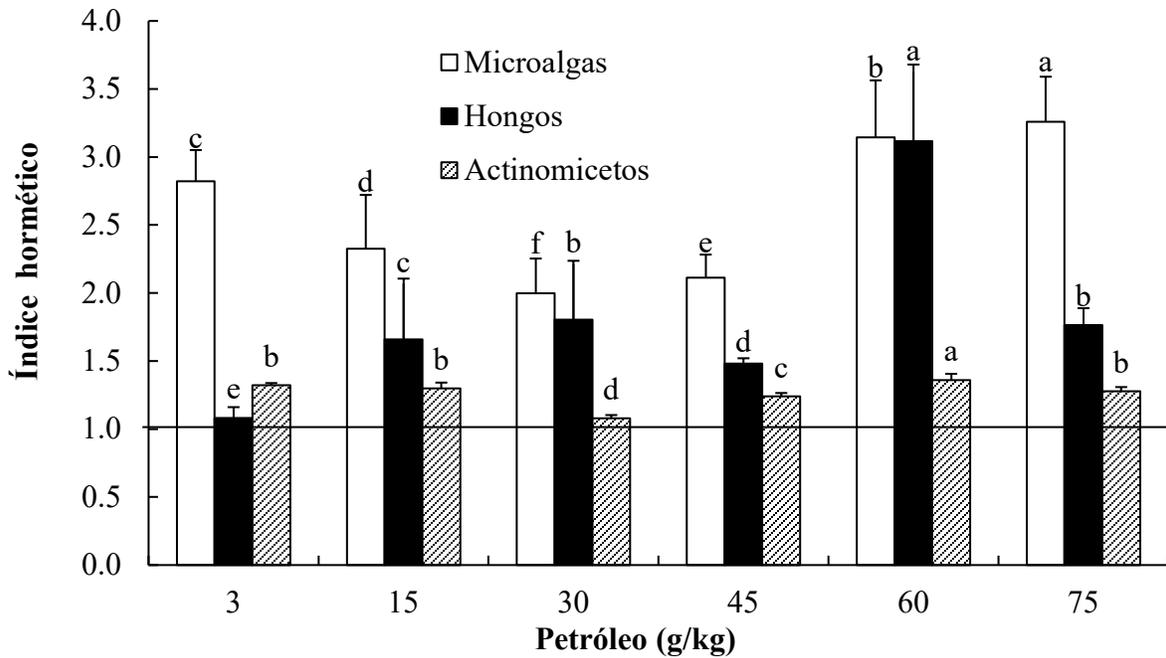


Figura 33. Índice hormético microbiológico en rizosfera de Microalgas, Hongos totales y Actinomicetos. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Duncan  $p \leq 0.05$ ,  $n=4$ ).  $IHF \geq 1$  indica hormesis. La línea continua horizontal que inicia en el número uno en el eje Y, indica el valor de fondo del daño, por encima del cual se cree que está el efecto de estrés

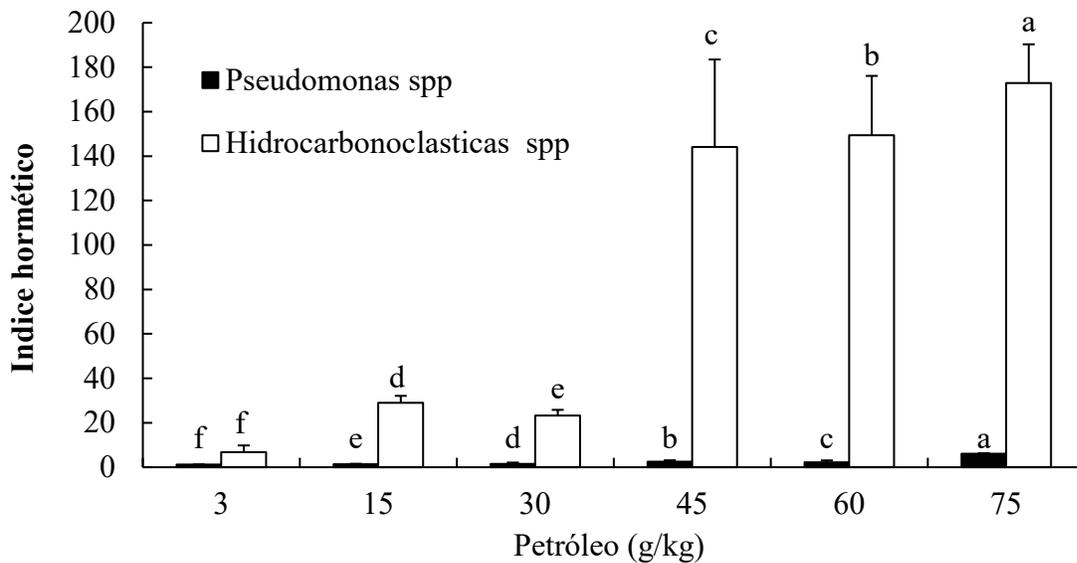


Figura 34. Índice hormético microbiológico en *Pseudomonas* spp y bacterias hidrocarbonoclastas. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Duncan  $p \leq 0.05$ ,  $n=4$ ).  $IHF \geq 1$  indica hormesis. La línea continua horizontal que inicia en el número uno en el eje Y, indica el valor de fondo del daño, por encima del cual se cree que está el efecto de estrés.

Cuadro 13. Índices hormético fisiológico y microbiológico total 38 SDT de *E. palustris* expuesta a diferentes dosis de petróleo crudo.

Petróleo (g/kg)	AP	PN	NRP	MSR	MSA	IHFT
Fisiológico						
3	1.09	1.03	1.31	1.01	0.98	1.084 e
15	1.28	1.15	1.26	1.27	1.23	1.228 d
30	1.45	1.18	1.58	1.32	1.38	1.382 bc
45	1.41	1.23	1.53	1.19	1.19	1.31 cd
60	1.51	1.55	2.38	1.33	1.38	1.63 a
75	1.35	1.44	1.89	1.45	1.17	1.46 b
Petróleo (g/kg)	MIAL	HT	ACT	PSE	BHID	IHMT
Microbiológico						
3	2.82	1.08	1.32	1.24	6.83	2.66 b
15	2.33	1.66	1.30	1.31	29.02	7.12 b
30	2.00	1.80	1.08	1.55	23.19	5.93 b
45	2.11	1.48	1.24	2.46	144.14	30.29 a
60	3.15	3.12	1.36	2.20	149.34	31.83 a
75	3.26	1.76	1.28	6.01	172.83	37.03 a

Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Duncan  $p \leq 0.50$ ,  $n=5$ ). AP: Altura de planta. PN: Plantas nuevas. NRP: Número de raíces primarias. MSR: Materia seca raíz. MSA: Materia seca aérea. IHFT: Índice hormético fisiológico total. IHMT: Índice hormético microbiológico total. MIAL: Microalgas. HT: Hongos totales. ACT: Actinomicetos. PSE: *Pseudomonas* spp. BHID: Bacterias hidrocarbonoclasticas.

#### 6.4. Actividad microbiana rizosférica y remoción de hidrocarburos totales del petróleo

##### 6.4.1. Los microorganismos según dosis de petróleo y tecnología aplicada

La media de la población de MIAL, ACT, HT, SPE, BHID muestran diferencias estadísticas significativas (Duncan  $p \leq 0.05$ ) causado por el efecto combinado de DP y de las tecnologías (AN y FT) (Cuadro 14 y 15). La FT con *E. palustris*, ante 75 g/kg de PC, indujo mayor población de MIAL ( $94 \times 10^3$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ), SPE ( $64 \times 10^2$  UFC  $\text{g}^{-1}$  r.s) e BHID ( $1885 \times 10^2$  UFC  $\text{g}^{-1}$  r.s), y mayor población de ACT ( $507 \times 10^3$  UFC  $\text{g}^{-1}$ ), y HT ( $22 \times 10^2$  UFC  $\text{g}^{-1}$ ) ante 60 y 15 g/kg de PC, respecto a la AN.

Estos resultados sugieren que el efecto de la FT en condiciones anaeróbicas, estimula el incremento de cuatro grupos microbianos en suelo contaminado con 60 y 75 g/kg de PC, y para HT ante 15 g/kg de PC. En general, se demuestra que la FT respecto a la AN induce un 53, 59, 58, 37 y 52 %, mayor población de microalgas, actinomicetos, hongos, bacterias del grupo *Pseudomonas* spp e hidrocarbonoclasticas, respectivamente (Cuadros 14 y 15).

El efecto rizosfera observado en los cinco grupos microbianos mencionados muestra el potencial del sistema radical de *E. palustris* para ser colonizado en el humedal contaminado con petróleo. Diversos investigadores reportan incrementos de bacterias por efecto de la presencia del sistema radical y petróleo. Rivera-Cruz *et al.* (2016) encontraron bacterias fijadoras de N en cantidades de  $94 \times 10^2$  UFC  $g^{-1}$  en rizosfera de *E. palustris* con 92 g/kg de PC. González-Moscoso *et al.* (2019) detectaron mayor UFC de bacterias heterótrofas ( $121 \times 10^4$ ) en la rizosfera de *L. hexandra* con 76 g/kg de PC, respecto al suelo sin planta. Rodríguez Uribe *et al.* (2021) registraron mayor población de *Pseudomonas* spp. y *Rhodococcus* spp. en rizosfera de *E. palustris* respecto al suelo sin planta expuesta a 51 g/kg PC.

Una explicación al incremento de las poblaciones microbianas en la rizosfera en ambientes bajo condiciones de estrés, puede atribuirse a que los microorganismos tienen la habilidad de utilizar cosustratos en su metabolismo, además de exudados radicales y otros contaminantes orgánicos (Atlas y Bartha, 2002; García-Rivera y Peralta-Pérez, 2008).

Cuadro 14. Población de microalgas, hongos totales y actinomicetos en suelo y rizosfera de *E. palustris* contaminado con petróleo 38 SDT.

Petróleo (g/kg)	Microalgas ( $10^3$ cel. mL)		Efecto	Hongos $10^2$ UFC $g^{-1}$		Efecto	Actinomicetos $10^3$ UFC $g^{-1}$		Efecto
	FT	AN		FT	AN		FT	AN	
	0	23gh		26fgh	0.88		10b	11b	
3	73b	18fgh	4.06	8cd	4df	2.00	492abc	451c	1.09
15	73b	15h	4.87	22a	9bc	2.44	475abc	18g	26.39
30	60bc	40de	1.50	12cd	8cd	1.50	401d	40g	10.03
45	55c	48cd	1.15	10c	6de	1.67	462cd	204c	2.26
60	69b	33ef	2.09	12b	4fg	3.00	507a	105f	4.83
75	94a	30def	3.13	13b	2g	6.50	475abc	33g	14.39
Petróleo									
Sin	23	26	0.88	10	11	0.91	372	492	0.76
Con	70.66	30.66	2.30	12.83	5.5	2.33	468.66	141.83	3.30

En columna letras similares indican que los valores son estadísticamente iguales (Duncan,  $p \leq 0.05$ ). n=3. FT: Fitorremediación. AN: Atenuación natural.

Cuadro 15. Población de bacterias en suelo y rizosfera de *E. palustris* contaminado con petróleo crudo 38 SDT.

Petróleo (g/kg)	<i>Pseudomonas</i> spp 10 <sup>2</sup> UFC g <sup>-1</sup>		Efecto	Hidrocarbonoclasticas 10 <sup>2</sup> UFC g <sup>-1</sup>		Efecto
	FT	AN		FT	AN	
	0	11c		17c	0.65	
3	13c	11c	1.18	74c	59c	1.254
15	14c	11c	1.27	32c	20c	1.6
30	16c	16c	1	253c	20c	12.65
45	26b	13c	2	1572a	150c	10.48
60	23c	24b	0.96	1629a	864b	1.885
75	64a	15c	4.27	1885a	1426a	1.322
Petróleo						
Sin	11	17	0.65	10	53	0.19
Con	26	15	1.78	907.5	423.2	4.86

En columna letras similares indican que los valores son estadísticamente iguales (Duncan,  $P \leq 0.05$ ). n=6. FT: Fitorremediación. AN: Atenuación natural.

#### 6.4.2. Diversidad *Pseudomonas* spp en rizosféra y suelo

La diversidad de bacterias *Pseudomonas* spp. presentó diferencias en los suelos, según la tecnología aplicada y las DP. En suelo con 0, 3, 15, 30, 45, 60 y 75 g/kg de PC sometido a la FT, se encontraron 5, 6, 4, 5, 5, 3 y 6 aislados diferentes respectivamente (Cuadro 16). En contraste, en el suelo con AN que contenían 0, 3, 15, 30, 45, 60 y 75 g/kg de PC se obtuvieron 4, 4, 2, 3, 3, 2, 2 aislados, respectivamente (Cuadro 17). Lo anterior indica que los suelos fitorremediados permitieron el establecimiento de mayor diversidad de colonias diferentes.

Los pigmentos fluorescentes de la masa celular de las colonias de *Pseudomonas* spp. enriquecidas con glicerol según la clasificación de Garrity *et al.* (2005), fueron diferentes según la tecnología aplicada y la DP (Cuadros 16 y 17), sobresaliendo mayor tipo de pigmentos fluorescentes en masa celular de las UFC aisladas de suelos fitorremediados (Cuadro 16), respecto a suelos con AN (Cuadro 17). La masa celular de *Pseudomonas* sin pigmento (fijadoras de N) y con pigmento mendocina y flovercens (amarilla-naranja), fue la predominante, particularmente en suelos contaminados con PC, sometidos a la FT y AN. El pigmento Piorrubina (rosa claro, rojizo o marrón oscuro) fue más abundante en suelo con 3, 15, 45 y 75 g /kg de PC sometido a FT, y mientras que con AN, solo se observó en 0 y 45 g/kg de PC. El pigmento Pioverdina (amarillo

verdoso) es mayor en los aislados obtenidos en suelo con 0, 15, 30, 45, 60 y 75 g/kg de PC, con fitorremediación. Sin embargo, los aislados de color verde (Clororatina) se encontraron en suelos con 0, 3, 15 y 45 g/kg de PC, sometidos a la AN, en tanto que en suelo con FT, solo se localizaron en 3 g/kg de PC.

En los Cuadros 18 y 19 se muestran las formas microscópicas de bacterias aisladas de suelo sometido a la FT y AN. Se destaca que en el suelo fitorremediado con *E. palustris* y con AN se detectaron cuatro formas microscópicas diferentes. En suelo con FT se encontraron bacilos cortos, cocobacilos, bacilos en cadena y diplococos, y en suelo con AN se encontraron cocobacilos, bacilos cortos, diplococos y cocos. Así mismo, el total de aislados es gran negativo según la tinción de Gram.

Cuadro 16. Diversidad de *Pseudomonas* spp a 38 semanas después de la fitorremediación con *E. palustris*.

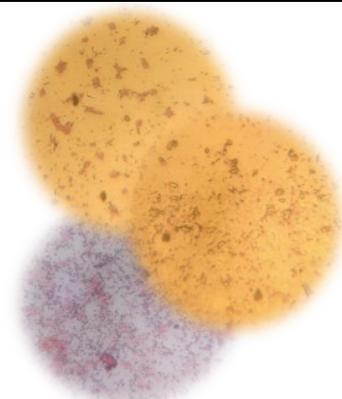
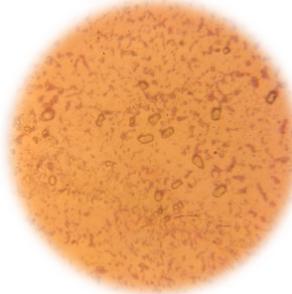
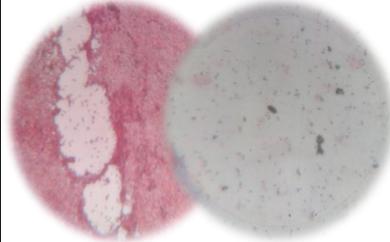
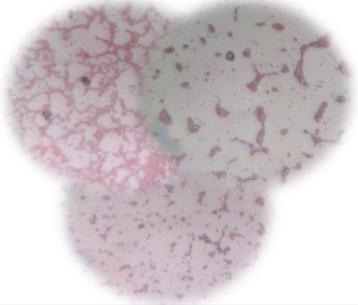
Petróleo (g/kg)	Fitorremediación		
	Cepa	Pigmento fluorescente	Características de bacterias (colonia)
0	1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5	Sin pigmento (fij. de N <sub>2</sub> ), Mendocina y flovercens, Oxifenazina, Pioverdina.	Cinco con pigmentos crema, amarillo, naranja claro y amarillo verdoso. Forma: Puntiforme, circular y amiboide. Borde: Entero y ondulado. Elevación: Plana y convexa. Tamaños: 0.05 a 0.8 cm
3	1.1, 2.6, 2.7, 2.8, 1.4, 1.2	Sin pigmentos (fij. de N), Clororatina, Piorrubina, Mendocina y flovercens.	Seis con pigmentación crema, verde, amarillo, rosa claro, amarillo verdoso. Forma: Circular y amiboide. Borde: Entero y ondulado. Elevación: Plana, elevada y convexa. Tamaños: .9 a 1 cm
15	1.4, 1.2, 2.7, 3.9	Pioverdina, Mendocina y flovercens, Piorrubina, Sin pigmentos (fij. de N).	Cuatro con pigmentos crema, amarillo, rosa claro y amarillo verdoso. Forma: Circular y amiboide. Borde: Entero y ondulado. Elevación: plana, convexa y elevada. Tamaño: 0.6 a 0.9 cm
30	4.10, 1.5, 1.4, 1.1, 2.8	Sin pigmentos (fij. de N), Pioverdina.	Seis con pigmentos crema y amarillo verdoso. Forma: Puntiforme, circular y amiboide. Borde: Entero y ondulado. Elevación: plana, convexa y plana. Tamaño: 0.4 a 2.3 cm
45	4.10, 1.4, 1.3, 2.7, 5.11	Sin pigmentos (fij. de N), Pioverdina, Piorrubina.	Cinco con pigmentos crema, amarillo verdoso, marrón claro, rosa claro y transparente. Forma: Circular. Borde: Entero y ondulado. Elevación: plana y convexa. Tamaño: 0.6 a 1.7.

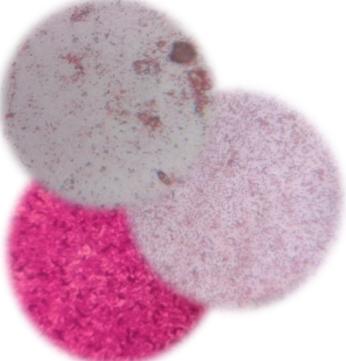
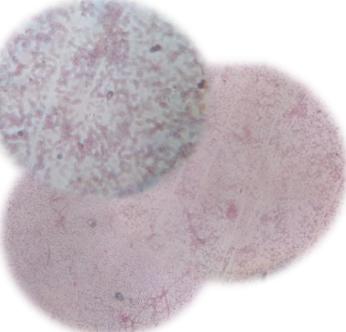
60	1.2, 4.1, 1.4,	Mendocina y flovercens, Sin pigmentos (fij. de N), Pioverdina.	Cuatro con pigmentos crema, amarillo y amarillo verdoso. Forma: Circular. Borde: Entero y ondulado. Elevación: Convexa y plana. Tamaño: 0.3 y 0.5 cm
75	2.6, 2.7, 1.2, 4.1, 1.3, 1.1	Pioverdina, Piorrubina, Mendocina y flovercens, Sin pigmentos (fij. de N).	Seis con pigmentos crema, amarillo, rosa claro y amarillo verdoso. Forma: Puntiforme, circular y amiboide. Borde: Entero, lobulado y ondulado. Elevación: Convexa y plana. Tamaños: 1.8, 1.9, 0.4, 0.3, 0.9 y 0.1 cm

Cuadro 17. Diversidad de *Pseudomonas* spp en suelo contaminado con petróleo crudo

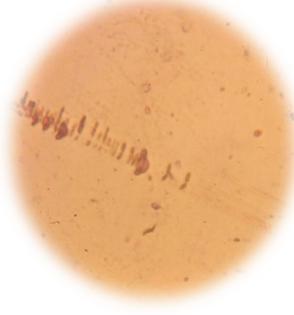
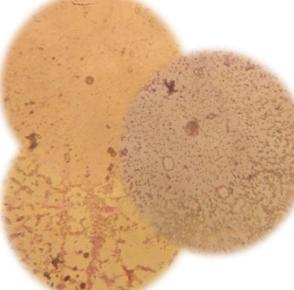
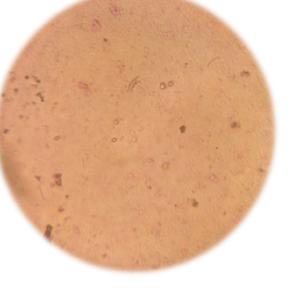
Petróleo (g/kg)	Atenuación natural (suelo)		
	Cepa	Pigmento fluorescente	Características de bacterias (colonia)
0	1.2, 3.9, 2.6, 1.4	Mendocina y flovercens, Sin pigmentos (fij. de N), Clororatina, Pioverdina.	Cuatro colonias con pigmentos; crema, amarillo, verde y amarillo verdoso. Forma: Circular y amiboide. Borde: Entero y ondulado. Elevación: Plana, elevada y convexa. Tamaños: 0.7, 0.5 0.7 y 0.8 cm
3	2.6, 1.1, 1.4, 3.9	Clororatina, Sin pigmentos (fij. de N), Pioverdina	Cuatro con pigmentos; crema, verde y amarillo verdoso. Forma: Puntiforme, circular y amiboide. Borde: Entero y ondulado. Elevación: Plana y elevada. Tamaños: 0.3, 0.1 y 1 cm
15	2.6, 1.2,	Clororatina, Mendocina y flovercens	Dos colonias con pigmentos; verde y amarillo. Forma: Circular. Borde: Entero y ondulado. Elevación: Plana y elevada. Tamaños: 0.5 y 1 cm
30	1.2, 1.4, 1.1	Mendocina y flovercens, Pioverdina, Sin pigmentos (fij. de N).	Tres colonias con pigmentos; crema, amarillo y amarillo verdoso. Forma: Puntiforme y circular. Borde: Entero. Elevación: Plana y elevada. Tamaños: 0.09, 0.3 y 0.4 cm
45	2.6, 1.3, 1.1	Clororatina, Piorrubina, Sin pigmentos (fij. de N).	Tres colonias con pigmentos; transparente, marrón claro y verde. Forma: Circular. Borde: Entero. Elevación: Plana y convexa. Tamaños: 0.5, 0.3 y 1.3 cm
60	1.2, 1.1	Mendocina y flovercens, Sin pigmentos (fij. de N).	Dos colonias con pigmentos; crema y amarillo. Forma: Puntiforme y circular. Borde: Entero. Elevación: Plana y elevada. Tamaños: 0.3 y 0.1 cm
75	1.2, 1.1	Mendocina y flovercens, Sin pigmentos (fij. de N).	Dos colonias con pigmentos; crema y amarillo. Forma: Puntiforme y circular. Borde: Entero. Elevación: Plana y convexa. Tamaños: 0.3 y 0.1 cm

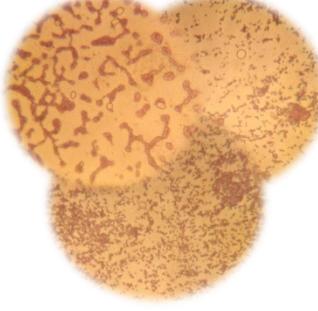
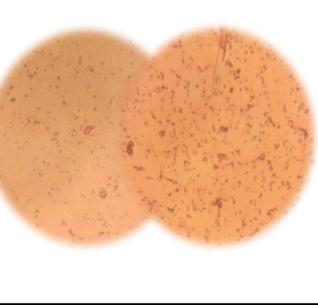
Cuadro 18. Características macroscópicas y microscópicas de *Pseudomonas* fluorescentes en suelo 30 semanas después de la fitorremediación.

Características Macroscópicas		Características Microscópicas	
	<p>Cepa: 1.3                      Color: 2.5Y 7/10                      Tamaño: 0.5 cm                      Elevación: convexa                      Forma: circular                      Borde: ondulado</p>		<p>Bacilos cortos                      Cocobacilos                      Bacilos en cadena</p>
	<p>Cepa: 1.4                      Color: 5Y 8/6                      Tamaño: 0.8 cm                      Elevación: plana                      Forma: circular                      Borde: ondulado</p>		<p>Bacilos cortos                      Bacilos en cadena                      Cocobacilos                      Diplococos</p>
	<p>Cepa: 2.6                      Color: 7.5G 3/4                      Tamaño: 1.8 cm                      Elevación: plana                      Forma: amiboide                      Borde: lobulado</p>		<p>Bacilos cortos                      Bacilos en cadena</p>
	<p>Cepa: 2.6v                      Color: 2.5GY 8/8                      Tamaño: 1.2 cm                      Elevación: plana                      Forma: circular                      Borde: entero</p>		<p>Bacilos cortos                      Bacilos curvos                      Bacilos en cadena                      Cocobacilos</p>

	<p>Cepa: 2.7  Color: 2.5Y 6/6  Tamaño: 0.4 cm  Elevación: plana  Forma: circular  Borde: entero</p>		<p>Bacilos cortos  Bacilos en cadena  Cocobacilos</p>
	<p>Cepa: 2.8  Color: 2.5Y 8/4  Tamaño: 0.4 cm  Elevación: convexa  Forma: circular  Borde: entero</p>		<p>Bacilos cortos  Bacilos curvos  Cocobacilos  Bacilos en cadena</p>
	<p>Cepa:4.10  Color: 2.5Y 8/4  Tamaño: 0.8 cm  Elevación: plana  Forma: circular  Borde: entero</p>		<p>Bacilos cortos  Bacilos en cadena  Bacilos curvos  Cocobacilos  Diplococo  Cocos</p>

Cuadro 19. Características macroscópicas y microscópicas de *Pseudomonas* fluorescentes en suelo 30 semanas después de la atenuación natural.

Macroscópicas		Microscópicas	
	<p>Cepa: 1.1 AN                      Color: 2.5Y 8/4                      Tamaño: 0.1 cm                      Elevación: plana                      Forma: puntiforme                      Borde: entero</p>		<p>Cocobacilos                      Bacilos cortos                      Diplococos</p>
	<p>Cepa: 1.2 AN                      Color: 2.5Y 8/4                      Tamaño: 0.3 cm                      Elevación: plana                      Forma: circular                      Borde: entero</p>		<p>Cocos                      Cocobacilos                      Bacilos cortos                      Bacilos en cadena</p>
	<p>Cepa: 1.3 AN                      Color: 5Y 8/8                      Tamaño: 0.5 cm                      Elevación: plana                      Forma: circular                      Borde: entero</p>		<p>Bacilos cortos</p>
	<p>Cepa: 1.3 ANV                      Color: 5Y 8/6                      Tamaño: 0.5 cm                      Elevación: plana                      Forma: circular                      Borde: entero</p>		<p>Bacilos cortos                      Bacilos en cadenas</p>

	<p>Cepa: 1.4 AN          Color: 2.5GY 8/4          Tamaño: 0.3 cm          Elevación: plana          Forma: circular          Borde: entero</p>		<p>Bacilos cortos          Bacilos en cadena          Cocos          Cocobacilos</p>
	<p>Cepa: 2.6 AN          Color: 2.5 GY 5/4          Tamaño: 1 cm          Elevación: plana          Forma: circular          Borde: ondulado</p>		<p>Bacilos cortos          Bacilos en cadena</p>

### 6.4.3. Remoción de hidrocarburos totales del petróleo

Se detectaron diferencias significativas (Duncan  $\leq p0.05$ ) en la remoción de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) entre tratamientos, a las 38 SDT. El más alto porcentaje de remoción (85%) fue obtenido en suelo con 3 g/kg de HTP tratado con AN, el cual fue 16 % mayor respecto a la FT; el menor porcentaje de remoción (23%) se obtuvo en el suelo con 75 g, con sistema de FT (Figura 35). La FT fue (16, 3, 24, 23, 41 y 38%) menos eficiente respecto a la AN para descontaminar suelo anegado contaminado con 3, 15, 30, 45, 60 y 75 g al remover 71, 72, 56, 42, 33 y 23%, respectivamente del microcosmo del Gleysol.

El análisis de correlación negativo, pero altamente significativo de la remoción respecto a MSR (.400\*\*), MIAL (-.341\*\*), ACT (-.265\*\*), SPE (-.624\*\*) y BHID (.775\*\*) no favoreció la remoción de HTP usando la atenuación natural (Cuadro 20). Sin embargo, la relación de la remoción (REM) con la mineralización de carbono orgánico (COS/Nt) fue negativa (-.558\*\*) (Cuadro 20), lo que indica que el proceso de mineralización del COS coincide con la remoción de los HTP, y la disponibilidad de Nt en el suelo anaeróbico el cual utilizan las plantas y microorganismos para su metabolismo se encuentra disponible.

La remoción de hidrocarburos del petróleo en condiciones anaeróbicas ha sido reportada por diversos investigadores (Pravecek *et al.*, 2005; Afzal *et al.*, 2019). La eficiencia de la AN en comparación con la FT en la eliminación de los hidrocarburos del suelo anegado encontrada en este estudio coincide con González-Moscoso *et al.*, (2019) e indica que la utilización de la FT tiene ventajas ecológicas respecto a la AN.

En el presente estudio la remoción de 72 a 23% a la semana 38, obtenida por la FT con *E. palustris* en suelo con 3 a 75 g/kg HTP fue aproximada a los valores inducidos por plantas acuáticas reportados por Rivera-Cruz *et al.*, (2016) con la *L. hexandra*, *C. articulatus* y *E. palustris* remueven 40 % al mes 12 de 60 g/kg de TPH; Por su parte, Gonzales-Moscoso *et al.* (2019) usando *L. hexandra* en suelo con 26 a 76 g/kg de TPH, se obtuvo una remoción entre 74 a 57% a los nueve meses.

Alanbary *et al.* (2019) establecieron *Ludwigia octovalvis* en suelo enriquecido con 100% de lodo de perforación contribuyendo en una remoción del 46.2%; Al-Mansoori *et al.* (2017) removieron 79.8% a partir de un suelo con 2g/kg de gasolina con el uso de *L. octovalvis*; por su parte, Al-Baldawi *et al.* (2015) reportaron 66.6% de remoción diésel a partir de suelo contaminado, utilizando *Scirpus grossus*. Atzal *et al.* (2019) obtuvieron 99.13% de remoción de hidrocarburos a los 18 meses, usando *Typha domingensis*, *Phragmites australis*, *Leptochloa fusca* y *Brachiaria mutica* en un humedal contaminado con 319 mg L<sup>-1</sup> de petróleo.

La remoción de HTP en Gleysol que permanece bajo inundación al menos por seis meses al año, ha sido reportada muy lenta y requiere de tiempos prolongados para su descontaminación. Entre las limitantes se tienen (a) la baja disponibilidad de hidrocarburos en la fase líquida para ser degradados o transformados en condiciones aeróbicas (Pravecek *et al.*, 2005); (b) altos contenidos de carbono orgánico que utilizan los microorganismos como fuente de carbono y energía a los de origen biogénicos que son menos tóxicos que el COS derivado de los hidrocarburos del petróleo, y dejan en segundo lugar a los hidrocarburos Atlas y Bartha, 2002); (c) los hidrocarburos se acumulan en sedimento (Mair y Gerry, 2015), y (d) la raíz de plantas acuáticas y semiacuáticas como *E. palustris*, cuya raíz fibrosa y extensiva en los primeros 20 cms del suelo, puede atrapar el petróleo por tiempos prolongados, y posiblemente degradarlos mas lento respecto al suelo sin raíz, esto último se comprobó en esta investigación, ya que la FT fue 15.6 % menos eficiente respecto a la AN.

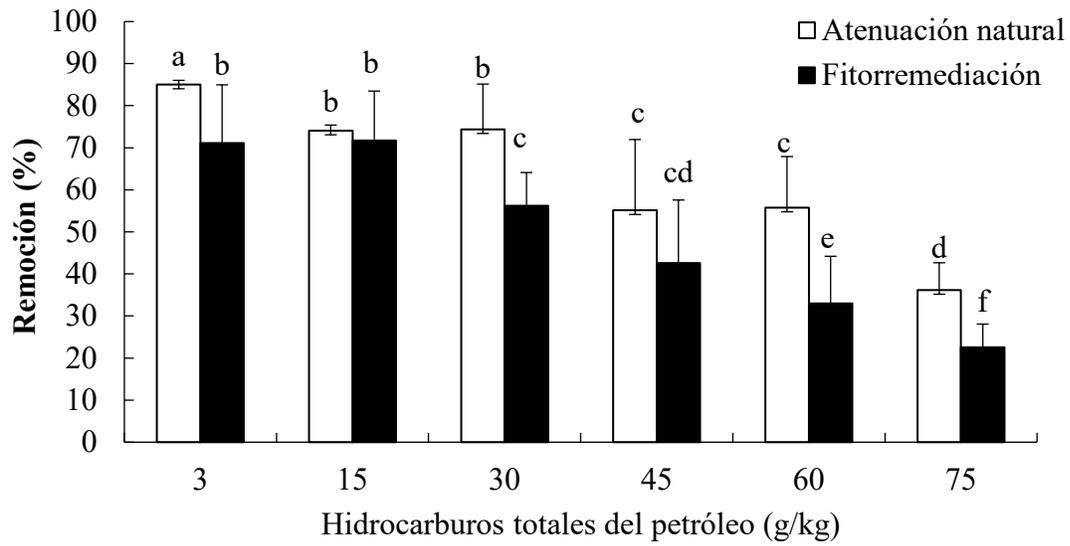


Figura 35. Remoción de hidrocarburos totales del petróleo según las tecnologías de fitorremediación (suelo rizosférico) y atenuación natural (suelo no rizosférico) a las 38 semanas (nueve meses). Letras diferentes por columna indican diferencias estadísticas significativas (Duncan  $\leq 0.05$  n=4).

Cuadro 20. Correlación de la degradación de HTP, tecnología, raíces y microorganismos.

Parámetros	TEC	REM	MIAL	HT	ACT	PSE	BHID	COS	Nt	COS/Nt	MSR	NRAP
DP	NS	NS	.266*	NS	-.275*	.608**	.788**	.837**	.940**	NS	NS	NS
TEC		NS	.567**	.547**	.687**	.302*	.287*	.264*	NS	.334*	.970**	.921**
REM			-.341**	NS	-.265*	-.624*	-.775*	-.293*	NS	-.558**	-.400**	NS
MIAL				.380**	.372**	.425**	.403**	.457**	NS	NS	.609**	.637**
HT					.475**	NS	NS	NS	NS	.363**	.574**	.482**
ACT						NS	NS	NS	-.274*	.500**	.681**	.664**
PSE							.680**	.740**	.566**	NS	.413**	.431**
BHID								.793**	.741**	NS	.384**	.456**
COS									.772**	.264*	.368**	.466**
NT										-.388**	NS	NS
COS/Nt											.315*	.280*
MSR												.927**

DP: Dosis de petróleo. TEC: Tecnología. REM: Remoción de HTP. MIAL: UFC mL<sup>-1</sup> Microalgas. HT: Hongos totales (UFC g<sup>-1</sup>suelo o rizosfera seca). ACT: Actinomicetos. PSE: Bacterias *Pseudomonas* spp. BHID: Bacterias hidrocarbonoclastas. COS: Carbón orgánico. Nt: Nitrógeno total. COS/Nt: Relación COS/Nt. MSR: Materia seca raíz. NRAP: Número de raíces primarias. NS: No significativa \*. La correlación es significativa en el nivel 0,05 (bilateral). \*\*. La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).

## CONCLUSIONES

### 7.1. General

*Eleocharis palustris* es una ciperácea hidrófita que crece en humedal contaminado con petróleo. La adaptación a estas condiciones de estrés indujo variables indicadoras de hormesis durante las 38 semanas del bioensayo. El petróleo crudo promovió el crecimiento vegetativo, la producción de biomasa vegetal y la actividad microbiológica rizosférica. La remoción de los hidrocarburos totales del petróleo, mediante esta técnica de fitorremediación, alcanzó 72 % en la semana 38. Se propone a esta ciperácea para la recuperación química de Gleysol e Histosol ubicados en humedales. **Por lo tanto, se acepta la hipótesis.**

### 7.2. Particulares

El crecimiento de *E. palustris* medido por altura de planta y generación de plantas nuevas durante 37 tiempos expuestas a 3, 15, 30, 45, 60 y 75 g/kg de petróleo crudo, y la producción de raíces primarias, materia radical y aérea presentaron respuesta de hormesis fisiológica  $\geq 1$ , por lo tanto, son variables sensibles al estrés, por lo que se proponen como bioindicadoras positivas de humedales contaminados. **Hipótesis aceptada**

La población de microalgas, hongos totales, actinomicetos y bacterias *Pseudomonas* spp e hidrocarbonoclastas en rizosfera de *E. palustris* al final del proceso de fitorremediación, presentaron respuesta hormesis microbiológica  $\geq 1$ , por lo tanto, son variables biológicas sensibles al estrés, por lo que se propone como bioindicadores positivos de humedales contaminados. **Hipótesis aceptada**

La diversidad por fluorescencia de *Pseudomonas* spp fue mayor en suelo sometido a la fitorremediación respecto al suelo con atenuación natural, lo que sugiere que este género se asocia con la rizosfera de *E. palustris*. **Hipótesis aceptada**

La remoción de hidrocarburos totales del petróleo en Gleysol del humedal artificial no es estimulada en mayor porcentaje por la fitorremediación con *E. palustris*, ya que la atenuación natural tuvo 15.6% más remoción; además, se obtuvo una relación negativa de las poblaciones microbianas, y una relación positiva de la mineralización del carbono orgánico con la remoción al final del proceso de descontaminación del suelo. **Por lo tanto hipótesis rechazada**

## LITERATURA CITADA

- Acevedo F., Pizzul L., Castillo M., Cuevas R and Diez M.C. 2011. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the Chilean white-rot fungus *Anthraco-phyl-lum discolor*. *Journal of Hazardous Materials*. 185: 212-219.
- Acuña A., Tonín N., Díaz V., Pucci G.N and Pucci O.H. 2012. Optimización de un sistema de biorremediación de hidrocarburos a escala de laboratorio. *Ingeniería Investigación y Tecnología*. 13 (1): 105-112.
- Adams C. D. 1994. Cyperaceae, Flora Mesoamericana. In Davidse, G., Sousa, M. and Chater, A. (Eds.) *Alismataceae a Cyperaceae*. Vol. 6. Universidad Autónoma de México, Missouri Botanical Garden, The Natural History Museum, Londres, Inglaterra. 402-485.
- Adams R.H., Olán-Castro D., Guzmán-Osorio F.J and Díaz-Ramírez I.J. 2009. Relationship between geomorphology and Contamination With Weathered Hydrocarbons in Old River Levee/Marsh Association. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 6(4): 527-538.
- Afzal M., Rehman K., Shabir G., Tahseen R., Ijaz A., Hashmat J.A and Brix H. 2019. Large-scale remediation of oil-contaminated water using floating treatment wetlands. *npj Clean Water*. 2(3): 1-10.
- Agathokleous E., Barcelo D., Tsatsakis A and Calabrese J.E. 2020. Hydrocarbon-induced hormesis: 101 years of evidence at the margin?. *Environmental Pollution*. 265: 114846.
- Agathokleous E and Calabrese E.J. 2020a. A global environmental health perspective and optimisation of stress. *Science of The Total Environment*. 704: 135263.
- Agathokleous E and Calabrese E.J. 2020b. Environmental toxicology and ecotoxicology: how clean is clean? Rethinking dose-response análisis. *Science of the Total Environment*. 746: 138769.
- Agathokleous E., Kitao M and Calabrese E.J. 2020. Hormesis: Highly Generalizable and Beyond Laboratory. *Trends in Plant Science*. 25(11): 1076-1086
- Agráz-Hernández C., Noriega-Trejo R., López-Portillo J., Flores-Verdugo F.J y Jiménez-Zacarias J.J. 2006. Guía de Campo. Identificación de los Manglares en México. Universidad Autónoma de Campeche. Campeche, México. 45 p
- Alanbary S.R.N., Abdullah S.R.S., Al-Baldawi I.A.W., Abu Hasan H., Anuar N., Othman A.R and Suja F. 2019. Phytotoxicity of Contaminated Sand Containing Crude Oil Sludge on *Ludwigia octovalvis*. *Journal of Ecological Engineering*. 20 (11): 246-255.
- Al-Baldawi AI., Abdullah SRS., Anuar N., Suja F and Mushrifah I. 2015b. Phytodegradation of total petroleum hydrocarbon (TPH) in diesel-contaminated water using. *Scirpus grossus*. *Ecological Engineering* 74: 463-473.
- Al-Baldawi I.A., Abdullah S.R.S., Suja F., Anuar N and Idris M. 2013. Phytotoxicity test of *Scirpus grossus* on diesel-contaminated water using a subsurface flow system. *Ecol Eng* 54:49–56
- Al-Baldawi W.A.I., Siti Rozaimah Sheikh Abdullah SRS., Suja F., Anuar N., Idris M. 2015a. The Ratio of Plant Numbers to the Total Mass of Contaminant as One Factor in Scaling-up Phytoremediation Process. *Jurnal Teknologi*. 74 (3): 111–114.
- Ali M.I.A. Khalil N.M and Abd El-Ghany M.N. 2012. Biodegradation of some polycyclic aromatic hydrocarbons by *Aspergillus terreus*. *African Journal of Microbiology Research*. 6(16): 3783-3790

- Al-Mansoori A.F., Idris M., Abdullah S.R.S and Anur N. 2017. Phytoremediation of contaminated soils containing gasoline using *Ludwigia octovalvis* (Jacq.) in greenhouse pots. *Environmental Science and Pollution Research*. 24(13): 11998-12008. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5261-5>
- Al-Mansoori A.F., Idris M., Abdullah S.R.S., Anuar N and Kurniawan BS. 2021. Response and capability of *Scirpus mucronatus* (L.) in phytotreating petrol-contaminated soil. *Chemosphere*. 269 (128760): 1-9.
- Al-Mutairi N., Bufarsan A and Al-Rukaibi, F. 2008. Ecorisk evaluation and treatability potential of soils contaminated with petroleum hydrocarbon-based fuels. *Chemosphere* 74 (1): 142-148.
- Alvarado-Cárdenas L., Calderón R.G., Diego-Pérez N., Domínguez-Licona E., Espejo A., Galván V.R., García-Cruz J., García-Mendoza A.J., Herrera Y., Lascurain M., López-Ferrari A.R., Lot A., Martínez D.C.E., Martínez M., Medina L.R., Mora L.J.L., Mora O.A., Olvera G.M.V., Peterson P.M., García-Armora P.R., Sánchez K.G., Sosa V y Zepeda C. 2013. Plantas acuáticas mexicanas una contribución a la Flora de México. 1ra Edición. Impresos San Jorge. México, D.F. 398 p.
- Alveal M., Ferrario E., Oliveira E y Sar E. 1995. Manual de Métodos Ficológicos. Universidad de Concepción, Concepción, Chile 863 p.
- Anónimo 2021. *Eleocharis palustris*. [https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Eleocharis\\_palustris&action=edit&section=1](https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Eleocharis_palustris&action=edit&section=1). Consultada 01, 10, 2021.
- Anónimo 2021a. Qué es el rizoma. <https://www.jardineriaon.com/que-es-el-rizoma.html>. Consultado 01,10, 2021.
- Anónimo 2021b. Clasificación de raíces. <https://sites.google.com/site/botanicalicaro/clasificacion-de-la-raices>. Consultado 01, 10, 2021.
- Arias M.T., Martínez A.J., Cañizares R.O. 2013. Producción de biodiesel a partir de microalgas: parámetros de cultivo que afectan la producción de lípidos. *Acta Biológica Colombiana* 18: 1-19.
- Arias-Trinidad A., Rivera-Cruz M.C., Roldán-Garrigós A., Aceves-Navarro L.A., Quintero-Lizaola R y Hernández-Guzmán J. 2017. Uso de *Leersia hexandra* (Poaceae) en la fitorremediación de suelos contaminados con petróleo fresco e intemperizado. *Biología Tropical*. 65(1): 21-30.
- Asturnatura. 2013. Revista Asturnatura. 412. 1-4. Disponible en <http://www.asturnatura.com>. Consultado el 14 de julio de 2021.
- Asturnatura. com 2021. <https://www.Revistaasturnatura.com/revista/412.pdf>. 4 p. Consultada 03/09/21
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry Division of Toxicology and Environmental Medicine). 1999. Toxicological profile for total petroleum hydrocarbons (TPH), Public Health Service, U.S. Department of health and human services. Atlanta. G.A. USA. 315 p.
- Atlas M.R y Bartha R. 2002. Ecología microbiana y Microbiología ambiental. Pearson Educación S.A. Madrid España. 677 p.
- Aylward B., Bandyopadhyay J and Belausteguigotia J.C. 2005. Freshwater ecosystem services. *Ecosystems and human well-being: Policy responses*. 3: 213-256.

- Azcón-Bieto J y Talón M. 2013. Fundamentos de Fisiología Vegetal. McGraw-Hill. Interamericana de España, S.L. Aracavaca, Madrid. 669 p.
- Bánki, O., Roskov, Y., Vandepitte, L., DeWalt, R. E., Remsen, D., Schalk, P., Orrell, T., Keping, M., Miller, J., Aalbu, R., Adlard, R., Adriaenssens, E., Aedo, C., Aescht, E., Akkari, N., Alonso-Zarazaga, M. A., Alvarez, B., Alvarez, F., Anderson, G. 2021. *Eleocharis palustris* (L.) Roem. & Schult. Catalogue of Life Checklist (Version 2021-08-25). Catalogue of Life.
- Barba-Macias E., J Rangel-Mendoza, y R Ramos-Reyes. 2006. Classification of Tabasco wetlands using a geographic information system. *Universidad y Ciencia Trópico Húmedo*. 22 (2):101-110
- Basumatary B., Saikia R and Bordoloi S. 2012. Phytoremediation of crude oil contaminated soil using nut grass, *Cyperus rotundus*. *Journal of Environmental Biology*. 33. 891-896.
- Bellin CA, Rao PSC. 1993. Impact of bacterial biomass on contaminant sorption and transport in a subsurface soil. *Appl Environ Microbiol* 59:1813–1820.
- Benavides L.M.J., Quintero G., Guevara L.A.V., Jaimes C.D.C., Gutiérrez R.S.M y Miranda G.J. 2006. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova*. 4(5): 82-90
- Besaltpour A.A., Hajabbasi M.A. y Khoshgoftar manesh A.H. 2010. Reclamation of a petroleum-contaminated calcareous soil using phytostimulation. *Soil Sediment. Contam*. 19 (5), 547-559.
- Berlanga-Robles, C., Ruiz-Luna, A y De la Lanza, G. 2008. Esquema de clasificación de humedales de México. *Investigaciones Geográficas, Boletín del Instituto de Geografía, UNAM*. 66: 25-46
- Binkley, D and P. Vitousek. 1989. Soil nutrient availability. pp. 75- 96. In: R. W. Pearcy, J. R. Ehleringer, H. A. Mooney, and P. W. Rundel (eds.). *Plant physiological ecology. Field methods and instrumentation*. Chapman and Hall. London.
- Borowitzka, M.A. 1998. Vitamins and fine Chemicals from MicroAlgae, in *Micro-Algal Biotechnology*, Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J. (eds.). Cambridge Univ. Press. Cambridge. pp: 153-196.
- Brady C.N and Weil R.R. 2008. *The nature and properties of soils*. Pearson Prentice Hall, New Jersey. Columbus Ohio, USA. 975 p.
- Bramley-Alves J., Wasley J., King C.K., Powell S., Robinson S.A. 2014. Phytoremediation of hydrocarbon contaminants in subantarctic soils: an effective management option. *Journal of Environmental Management*. 142(1): 60-69.
- Brimecombe M.J., Leij F.A., and Lynch J.M. 2001. The effect of root exudates on rhizosphere microbial populations. In: Pinton R., Varanini Z., and Nannipieri P. (ed.), *The Rhizosphere Biochemistry and Organic Substances at the soilplant interface*. Marcel Dekker, Inc., New York, USA. pp. 95-140
- Brusseau, M.L. 2019. Ecosystems and Ecosystem Services. *Environmental and Pollution Science*. 89–102.
- Calabrese E.J., 2013. Hormetic mechanisms. *Critical Reviews in Toxicology*. 43 (7): 580-606
- Calabrese E.J and Agathokleous E. 2020. Theodosius Dobzhansky’s view on biology and evolution v.2.0: “Nothing in biology makes sense except in light of evolution and evolution’s dependence on hormesis-mediated acquired resilience that optimizes biological performance and numerous diverse short and longer term protective strategies”. *Environmental Research*. 186: 109559

- Calabrese E.J and Agathokleous E. 2021. Accumulator plants and hormesis. *Environmental Pollution*. 274: 116526.
- Calabrese, E.J., Baldwin, L.A., 2000. Chemical hormesis: its historical foundations as a biological hypothesis. *Hum. Exp. Toxicol.* 19, 2–31. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.12.020>.
- Calabrese E.J and Baldwin L.A. 2001. Hormesis: U-shaped dose responses and their centrality in toxicology. *Trends in Pharmacological Sciences*. 22(6): 285-291
- Calabrese E.J and Baldwin L.A. 2003a. Toxicology rethinks its central belief: hormesis demands a reappraisal of the way risks are assessed. *Nature*. 421: 691-692
- Calabrese E.J and Baldwin L.A. 2003b. Hormesis: the hormetic dose response model is more common than threshold model in toxicology. *Toxicological Sciences*. 71: 246–250
- Calabrese E.J and Blain R.B. 2009. Hormesis and plant biology. *Environmental Pollution*. 157(1): 42-48. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.07.028>
- Calabrese E.J and Blain R.B. 2011. The hormesis database: the occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literatura. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 61(1): 73-81.
- Calabrese E.J and Mattson M.P. 2017. How does hormesis impact biology, toxicology, and medicine?. *NPJ Aging and Mechanisms of Disease*. 3: 13
- Calabrese E.J and Agathokleous E., 2020. Theodosius Dobzhansky’s view on biology and evolution v.2.0: “Nothing in biology makes sense except in light of evolution and evolution’s dependence on hormesis-mediated acquired resilience that optimizes biological performance and numerous diverse short and longer term protective strategies”. *Environmental Research*. 186: 109559 <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109559>.
- Calvo G.S. 2011. Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. Universidad de Salamanca. Esp. 14: 173-186
- Cañas, J. y Jerez, T. 2003. Aislamiento e identificación de hongos con capacidad degradadora de hidrocarburos. Biorremediación fase III. Bucaramanga: Universidad de Santander.
- Cao Z., Liu X., Zhang X., Chen L., Liu S and Hu Y. 2012. Short-term effects of diesel fuel on rhizosphere microbial community structure of native plants in Yangtze estuarine wetland. *Environmental Science and Pollution Research*. 19 (6): 2179-2185.
- Castillo R.F., Roldán R.M.D., Blasco P.R., Huertas R.M.J., Caballero D.F.J., Moreno V.C. y Martínez L.R.M. 2005. Biotecnología ambiental. Madrid, España: Editorial Tébar. 616 p
- Caravaca F and Rodán A. 2003. Assessing changes in physical and biological properties in soil contaminated by oil sludges under semiarid Mediterranean conditions. *Geoderma*. 117 (1): 53-61
- Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1988. El coquito (*Cyperus rotundus* L.): Biología, manejo y control. Cali, Colombia. 71 p.
- Chaîneau, C.H., Morel, J., Dupont, J., Bury, E., Oudot, J. 1999. Comparison of the fuel oil biodegradation potential of hydrocarbonassimilating microorganisms isolated from a temperate agricultural soil. *Science Total Environment*. 227: 237–247.
- Chaîneau C.H., Yepremian C., Vidalie J.F., Ducreux J. y Ballerini D. 2003. Bioremediation of a crude oil-polluted soil: biodegradation, leaching and toxicity assessments. *Water Air Soil Pollution*. 144 (1): 419-440.

- Chaudhry Q., Blom-Zandstra M., Gupta S., Joner E.J. 2005. Utilizing the synergy between plants and rhizosphere microorganisms to enhance breakdown of organic pollutants in the environment. *Environmental Science and Pollution Research International*. 12(1): 34-48
- Chávez-Gómez B., Quintero R., Esparza-García F., Mesta-Howard A.M., Zavala Díaz de la Serna F.J., Hernández-Rodríguez C.H., Gillén T., Poggi-Varaldo H.M., Barrera-Cortés J. and Rodríguez-Vázquez R. 2003. Removal of phenanthrene from soil by cocultures of bacteria and fungi pregrown on sugarcane bagasse pith. *Bioresource Technology*. 89: 177-183.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1988. Simbiosis leguminosa-rizobio; manual de métodos de evaluación, selección y manejo agronómico. Cali, Col. 194 p.
- CNH, (Comisión Nacional de Hidrocarburos) 2014. Reporte de derrames de petróleo crudo en el periodo 2000 al 2014. <http://cofemersimir.gob./mex/expedite/>
- Collins M. E. and Kuehl R.J. 2000. Organic matter accumulation and organic soils. pp. 137-162. In: J. L. Richardson and M.J. Vepraskas (eds.). *Wetland soils: genesis, hydrology, landscapes and classification*. Lewis Publishers. Boca Raton, FL, USA.
- CONABIO. 2018. Manglares de México: actualización y exploración de los datos del sistema de monitoreo 1970/1980-2015. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. México DF. 128 p.
- Contreras H y Carreño C. 2018. Eficiencia de la biodegradación de hidrocarburos de petróleo por hongos filamentosos aislados de suelo contaminado. *Ciencias Naturales e Ingeniería*. 1(1): 27-33
- Cunningham S.D., Anderson T.A., Schwab A.P and Hsu F.C. 1996. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. *Advances in Agronomy*. 56: 55–114. doi:10.1016/S0065-2113(08) 60179-0.
- Daehler C.C. 1998. The taxonomic distribution of invasive angiosperm plants: Ecological insights and comparison to agricultural weeds. *Biological Conservation*. 84 (2): 167–180.
- Dahal, B., Nanda-Kafle G., Perkins L and Brozel V.S. 2017. Diversity of free-living nitrogen fixing Streptomyces in soils of the badlands of South Dakota. *Microbiological Research* 195: 31-39.
- Das N. and P. Chandran. 2010. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology Research International*. 2011: 1-13.
- Delgadillo-López A.E., González-Ramírez C.A., Prieto-García F., Villagómez-Ibarra J.R., Acevedo-Sandoval O. 2011. Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*.14: 597-612.
- Delgado J.G. 2006. Asfaltenos. Composición, agregación, precipitación. Laboratorio de formulación, interfases, reología y procesos. Version 1. Universidad de los Andes. Facultad de ingeniería. Escuela de ingeniería química. Mérida, Venezuela. 36 p
- Dejonghe, W., Boon, N., Seghers, D., Top, E.M., and Verstraete, W. 2001. Bioaugmentation of soils by increasing microbial richness: missing links. *Environ Microbiol*. 3: 649 – 657.
- Díaz S.C. 2006. Estudio del comportamiento de las bacterias en suelos contaminados con petróleos nuevos e intemperizados de la Venta, Tabasco. Tesis Universitaria. Universidad popular de la Chontalpa.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>

- DOF, (Diario Oficial De La Federación). 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000 Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. 2a sec. México. 27 p
- Dominic V.J., Murali S & Nisha M.C. 2009. Phycoremediation efficiency of three algae *Chlorella vulgaris*, *Synechocystis salina* and *Gloeocapsa gelatinosa*. *Academic Review*. 16(2): 138-146.
- Doušková I., Kaštánek F., Maléterová Y., Kaštánek P., Doucha J & Zachleder V. 2010. Utilization of distillery stillage for energy generation and concurrent production of valuable microalgal biomass in the sequence: Biogascogeneration-microalgae-products. *Energy Conversion and Management* 51: 606-611.
- Dox, A. W. 1910. The intracellular enzymes of *Penicillium* and *Aspergillus*- U. S. Dept. Agr., Bur. Anim. Ind. Bui. 120, 70 pp
- Dodor D.E., Hwang H.M and Ekunwe S.I.N., 2004. Oxidation of anthracene and benzo (a) pyrene by immobilized laccase from *Trametes versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology*. 35: 210-217. doi:10.1016/j.enzmictec.2004.04.007
- Dutta S and Podile A.R 2010. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): the bugs to debug the root zone. *Critical Reviews in Microbiology*. 36 (3): 232-244. <https://doi.org/10.3109/10408411003766806>
- Dwivedi, S., Srivastava, S., Mishra, S., Kumar, A., Tripathi, R., Rai, U., Dave, R., Tripathi, P., Charkrabarty, D. and Trivedi, P. 2010. Characterization of native microalgal strains for their chromium bioaccumulation potential: Phytoplankton response in polluted habitats. *Journal of Hazardous Materials*. 173(1-3): 95–101.
- Dzionic A., Wojcieszynska D., Guzik U. 2016. Natural carriers in bioremediation: A review. *Electronic Journal of Biotechnology*. 23: 28-36.
- Ecosostenibile. 2021. *Eleocharis palustris*. <https://antropocene.it/es/2021/03/17/eleocharis-palustris/>. Consultado el 13 de septiembre 2021.
- Emeka N.P., Abdulwakil O.S., Deborah O.O., Ndimele C.C., Anetekhai M.A. y Erondy E.S. 2018. Chapter 24 - Remediation of Crude Oil Spillage, Editor(s): Prince E. Ndimele, The Political Ecology of Oil and Gas Activities in the Nigerian Aquatic Ecosystem, Academic Press. 369-384 p
- EPA (Environment Protection Agency). 1996. Method 3540C Mod. Soxhlet Extraction. Washington, DC. USA. 8 p.
- EPA. 1986. Method 418.1 modif. Petroleum Hydrocarbons Total Recoverable Spectrophotometric Infrared. Environmental Protection Agency. Wahsington, DC, USA. 8 p.
- Etchevers B.I.D. 1992. Manual de métodos para análisis de suelos, plantas, aguas y fertilizantes. Analisis rutinarios en estudios y programas de fertilidad. Laboratorio de fertilidad, Centro de edafología. Colegio de postgraduados en Ciencias Agrícolas, Montecillo, Edo. De México. 125 p.
- Eyherabide JJ, Leaden MI, and Alonso S. 2001. Yellow and purple nutsedges survey in the southeastern. Buenos Aires Province, Argentina. *Pesq Agropec Bras* 36: 205–209.
- Fadhile A.A., Idris M., Sheikh A.R.S., Anuar N and Budi K.S. 2021. Response and capability of *Scirpus mucronatus* (L.) in phytotreating petrol-contaminated soil. *Chemosphere*. 269: 128760

- Fahid M., Ali S., Shabir G., Rashid A.S., Yasmeen T., Afzal M., Arslan M., Hussain A., Hashem A., Abd A.E.F., Alyemeni M.N and Ahmad P. 2020. *Cyperus laevigatus* L. Enhances Diesel Oil Remediation in Synergism with Bacterial Inoculation in Floating Treatment Wetlands. *Sustainability*. 12 (6): 2353
- Falkova M., Vakh C., Shishov A., Zubakina E., Moskvina A., Moskvina L and Bulatov A. 2016. Automated IR determination of petroleum products in water based on sequential injection analysis. *Talanta*. 148: 661-665.
- Fan C., Qing X and LU-KWANG J. 2003. Aerobic Denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* monitored by online NAD(P)H Fluorescence. *Applied And Environmental Microbiology*, 69 (11): 6715–6722.
- Fan D., Wang S., Guo Y., Liu J., Agathokleous E., Zhu Y., and Han J. 2021. The role of bacterial communities in shaping Cd-induced hormesis in ‘living’ soil as a function of land-use change. *Journal of Hazardous Materials*. 409: 124996. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124996>.
- FAO. 2001. Soil carbon sequestration for improved land management. World soil reports 96. Rome, 58 p.
- FAO. 2019: Fisheries Topics: Ecosystems. Ecosistemas costeros y marinos. Topics Fact Sheet [en línea]. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma. Actualizado el 28 de diciembre de 2015. [Citado el 25 de junio de 2021]. <http://www.fao.org/fishery/>
- Fauzul I.M., Budi K.S and Sulistiyaning T.H. 2019. Potential of bacteria isolated from diesel-contaminated seawater in diesel biodegradation. *Environmental Technology Innovation*. 14: 100368.
- Fauzul I.M., Budi K.S., Izzati Ismail N and Sheikh A.S.R. 2020. Future challenges in diesel biodegradation by bacteria isolates: a review. *Journal of Cleaner Production*. 251: 119716
- Feijóo M y Arriaga M. 2012. Sinopsis del género *Eleocharis* (Cyperaceae) de la Patagonia Argentina. *Kurtziana* 37 (2): 5-21.
- Ferrera-Cerrato R., Alarcón A., Mendoza-López M. R., SanGabriel W., Trejo-Aguilar D., Cruz-Sánchez J., López-Ortiz S.C., Delgadillo-Martínez J. 2007. Fitorremediación de un suelo contaminado con combustóleo utilizando *Phaseolus coccineus* y fertilización orgánica e inorgánica. *Agrociencia*. 41(8): 817-826.
- Fleeger JW, Carman KR, Riggio MR, Mendelssohn IA and others. 2015. Recovery of salt marsh benthic microalgae and meiofauna following the Deepwater Horizon oil spill linked to recovery of *Spartina alterniflora*. *Mar Ecol Prog Ser* 536:39-54. <https://doi.org/10.3354/meps11451>
- Flora of North America Editorial Committee. 2003. Flora of North America: Volume 23: Magnoliophyta: Commelinidae (in Part): Cyperaceae. Editorial committee. Oxford University Press. New York, USA. 23: 460
- Florencia. B. M., Plasencia A., Corbella R.D., Andina G. D., Sanzano A., Sosa F. A y Fernández U.J. 2019. El nitrógeno Del Suelo. Facultad de Agronomía y Zootecnia. Universidad Nacional de Tucumán. 1- 11 p.
- Forbes B., Sahn D.F. y Weissfeld A.S. 2009. Diagnóstico Microbiológico. 12a. ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Arg. 1160 p.

- Gallego J.R., Fernández L.R., Diez-Sanz F., Ordoñez S., Sastre H., González- Rojas, E., Peláez A.I., Sánchez J. 2007. Bioremediation for Shoreline Cleanup: In Situ vs. On-Site Treatments. *Environmental Engineering Science*, 24 (4): 493-504.
- Gallego J.R., Loredó J., Llamas J.F., Vázquez F., Sánchez J. 2001. Bioremediation of diesel – contaminated soils: Evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation. *Biodegradation*, 12(5): 325-335.
- Gallego R.J.L., Menéndez-Vega D., González-Rojas E., Sánchez J., García-Martínez M.J., Llamas J.F. 2005. Oleophilic fertilizers and bioremediation: a new perspective. Book of abstracts, Biomicroworld. In: 1st Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology. Badajoz (Spain), pp. 714–715.
- García-Cruz U.N y Aguirre-Macedo L.M. 2014. Biodegradación de petróleo por bacterias: algunos casos de estudio en el Golfo de México. p. 641-652.
- García-Rivero M y Peralta-Pérez M.R. 2009. Cometabolismo en la biodegradación de hidrocarburos. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 7(1): 1-12.
- Gary J.H and Handwerk G.E. 2003. Refino de petróleo. Ed. Reverté. Sevilla, España. 408 p.
- Garrity G.M., Bell J.A., Lilburn T. 2005. Pseudomonadales Orla-Jensen 1921, 270AL. In: Brenner D.J. et al. (eds) *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. Springer, Boston, MA. [https://doi.org/10.1007/0-387-28022-7\\_9](https://doi.org/10.1007/0-387-28022-7_9)
- Genovese M., Denaro R., Cappello S., Di Marco G., La Spada G., Giuliano L., Genovese L. and Yakimov M.M. 2008. Bioremediation of benzene, toluene, ethylbenzene, xylenes-contaminated soil: a biopile pilot experiment. *J. Appl. Microbiol.* 105: 1694- 1702.
- Giraldo Naranjo S.J., y Villa R.A.F. 2016. Caracterización morfológica y metabólica de los hongos filamentosos asociados a la rizosfera de plantas arvenses en la zona cafetera. Universidad Católica de Manizales. Caldas, Colombia. 66 p.
- Goetghebeur P. 1998. Cyperaceae. En: *The families and genera of vascular plants*. Vol. III: Flowering plants, monocotyledons, Liliaceae (except Orchidaceae) (Kubitzki, K., ed.), pp. 141-190. Springer, Hamburg, Germany.
- Govaerts R. y Simpson D. 2007. *World Checklist of Cyperaceae sedges*. Kew Publishing. Royal Botanic Gardens, Kew. USA. 765 p
- Gómez-Laurito J. 2009. Las ciperáceas (Cyperaceae) de la Estación Biológica La Selva, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*. 57 (1): 93-110
- González-López C.V., Acién F.G., Fernández-Sevilla J.M y Molina E. 2011. Uso de microalgas como alternativa a las tecnologías disponibles de mitigación de emisiones antropogénicas de CO<sub>2</sub>. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental Algal*. 2(2): 93-106.
- González-Moscoso M., M. C. Rivera-Cruz, J. Delgadillo-Martínez y L. C. Lagunes-Espinoza. 2017. Growth analysis and plant production of *Leersia hexandra* swartz in tropic wet mexican in fuction on petroleum and surfactant. *Polibotánica*. 43: 177-196.
- González-Moscoso M., Rivera-Cruz M.C and Trujillo-Narcía A. 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>
- Haritash A.K. y Kaushik C.P. 2009. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*. 169 (1–3). pp. 1-15.
- Harman O.J.F. 2013. Petróleo. Instituto de Estudios para el Desarrollo y la Paz. Bogotá, Col. 68p.

- Hauser, A. S. 2006. *Eleocharis Palustris*. In Fire Effects Information System. Accessed 25.02.2020. S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station, Fire Sciences Laboratory (Producer). <http://www.fs.fed.us/database/feis>
- Hernández E.M. 2009. Suelos de humedales como sumideros de carbono y Fuentes de metano. Xalapa, Veracruz, México. *Terra Latinoamericana* 28: 139-147.
- Hernández P.A y Labbé J.I. 2014. Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 49(2): 157-173 p.
- Hernández S. J. M., Ortiz P. M. A., Méndez L. A. P., y Gama C. L. 2008. Morfo dinámica de la línea de costa del estado de Tabasco, México: tendencias desde la segunda mitad del siglo XX hasta el presente. Investigaciones Geográficas, Boletín del Instituto de Geografía, UNAM. Núm. 65. México. pp. 7-21.
- Hernández-Valencia I., Navas G., Infante C. 2017. Fitorremediación de un suelo contaminado con petróleo extra pesado con *Megathyrus maximus*. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*. 33(3): 495-503
- Hestir E.L., Brando V.E., Bresciani M., Giardino C., Matta E., Villa P and Dekker A.G. 2015. Measuring freshwater aquatic ecosystems: the need for a hyperspectral global mapping satellite misión. *Remote Sensing of Environment*. 167: 181-195
- Hunt R., D. R. Causton, B. Shipley, and P. Askew. 2002. A modern tool for classical plant growth analysis. *Ann Botany*. 90: 485-488
- Hussain I, Puschenreiter M, Gerhard S, Schöftner P, Yousaf S, Wang A, Hussain SJ, Reichenauer TG. 2018. Rhizoremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soils: improvement opportunities and field applications. *Environ Exp Bot*. 147:202-219. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.12.016>
- Ibrahim H.M.M. 2016. Biodegradation of used engine oil by novel strains of ochrobactrum anthropi HM-1 and Citrobacter freundii HM-2 isolated from oil-contaminated soil. 3 *Biotec*. 6: 226. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0540-5>
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía (México)). 2001. Hoja E15B61, Felipe Carrillo Puerto, a escala 1:50000, Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, México D.F.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística Geografía e informática). 2005. Cárdenas, Tabasco. Cuaderno estadístico municipal 2005-2004. En línea <http://www.inegi.org.mx//est/contenidos/espanol/sistemas/cem05/estatal/tab/m002/index.htm>. Consultado 18 de julio de 2021
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía (México)). 2017. Anuario estadístico y geográfico de Tabasco 2017 / Instituto Nacional de Estadística y Geografía. México.D.F. 440 p.
- Isiodu G. G., Stanley H.O., Ezebuio V and Okerentugba P.O. 2016. Role of plasmid-borne genes in the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by consortium of aerobic heterotrophic bacteria. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*. 07: 1-7.
- Iturbe R., Flores C., Castro A and Torres L.G. 2007. Sub-soil contamination due to oil spills in zones surrounding oil pipeline-pump stations and oil pipeline right-of-ways in Southwest-Mexico. *Environmental Monitoring and Assessment*. 133(1-3): 387-398. <https://doi.org/10.1007/s10661-006-9593-y>
- IUSS (Working Group WRB). 2015. Base referencial mundial del recurso suelo 2014. Actualización 2015. Sistema internacional de clasificación de suelos para la

- nomenclatura de suelos y la creación de leyendas de mapas de suelos. Informes sobre recursos mundiales de suelos 106. FAO, Roma. 206 p.
- Jackson M.L. 1964. Análisis químico de suelos (Traducido por J. Bertrán). Ediciones Omega, S. A. Barcelona, España. 662 p.
- Janzen SJ, Teresinha ML. 2018. Rhizospheric microorganisms as a solution for the recovery of soils contaminated by petroleum: a review. *J Environ Manag.* 210:104-113. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.01.015>
- Jeffrey A.A., 2002. Catalase activity, hydrogen peroxide content and thermotolerance of pepper leaves. *Scientia Horticulturae.* 95 (4): 277-284.
- Jia L., X. He, W. Chen, Z. Liu, Y. Huang, and S. Yu. 2013. Hormesis phenomena under Cd stress in a hyperaccumulator-*Lonicera japonica* Thunb. *Ecotoxicology.* 22: 476-485.
- Johnson F.L and Curl A.E. 1972. Methods for research on the ecology of soil-borne plant pathogens. Burgess Publishing Company. Minneapolis, MN, U.S.A. 247 p.
- Kearns D., Thomas W, Tucker G, Kral R, Camelbeke K., Simpson D., Reznicek A. González-Elizondo G., Strong y Goetghebeur P. 1998. Cyperaceae. En: Flora of the Venezuelan Guayana. Vol. 4: Caesalpinaceae-Ericaceae (Berry, P., B. Holst y K. Yatskievych, eds.), Missouri Botanical Garden Press. St. Louis. pp. 487-663.
- Kenawy E.R., Worley S.D and Broughton R. 2007. The chemistry and applications of antimicrobial polymers: a state of the art review. *Biomacromolecules.* 8: 1359-1384.
- Kowalchuk, G. A. and J. R. Stephen. 2001. Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology. *Annual Review Microbiology.* 55: 485-529.
- Kristanti R.A. 2011. Bioremediation of crude oil by white rot fungi *Polyporus* sp. S133. *J Microbiol Biotechn.* 21 (9): 995-1000.
- Lamichhane S., Bal K.K.C and Sarukkalgige R. 2016. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) removal by sorption: a review. *Chemosphere.* 148: 336-353
- LAN (Ley de Aguas Nacionales México). 2020. Diario Oficial de la Federación. Citado el 07 de julio de 2021. [http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/16\\_060120.pdf](http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/16_060120.pdf)
- Lastrucci L., Cecchi L and Viciani D. 2018. Typification of *Eleocharis palustris* (L.) Roem. & Schult. var. *reptans* Parl. *Phytotaxa.* 375(3): 243-245
- Ławniczak L., Wozniak-Karczewska M., Loibner A.P., Heipieper H.J and Chrzanowski L. 2020. Microbial degradation of hydrocarbons-basic principles for bioremediation: A review. *Molecules.* 25 (4): 856. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25040856>
- Leahy, J.G. and Colwell, R. R. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews.* 54 (3) 305-315.
- Lee S.H., Lee S., Kim D.Y. and Kim J.G. 2007. Degradation characteristics of waste lubricants under different nutrient conditions. *J. Hazard. Mater.* 143, 65-72
- Lefeuvre J.C., Laffaille P., Feunteun E., Bouchard v and Radureau A. 2003. Biodiversity in salt marshes: from patrimonial value to ecosystem functioning. The case study of the Mont-Saint-Michel bay Biodiversité dans les marais salés: de la valeur patrimoniale au fonctionnement de l'écosystème. Le cas de la baie du Mont-Saint-Michel. *Comptes Rendus Biologies.* 326: P 125-131
- León C y Chaves D. 2010. Tratamiento de residual vacuno utilizando microalgas, la lenteja de agua *Lemna aequinoctiales* y un humedal subsuperficial en Costa Rica. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental Algal* 1(2): 155-177.

- Leonardi V., Sasek V., Petruccioli M., D'Annibale A., Erbanova P and Cajthaml T. 2007. Bioavailability modification and fungal biodegradation of PAHs in aged industrial soils. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 60: 165-170
- Liu P.W., Chaing C.T., Whang L.M., Kao C.H., Pan P.T., Cheng S.S. 2011. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil: effects of strategies and microbial community shift. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 65(8): 1119-1127.
- Lladó F.S. 2012. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos pesados y caracterización de comunidades microbianas implicadas. Tesis Doctoral microbiología ambiental y biotecnología. Universidad de Barcelona. Ministerio de Ciencia e Innovación. Barcelona, España. 274 p.
- Logeshwaran P., M. Megharaj, S. Chadalavada, M. Bowman, and R. Naidu. 2018. Petroleum hydrocarbons (PH) in groundwater aquifers: An overview of environmental fate, toxicity, microbial degradation and risk-based remediation approaches. *Environmental Technology*. 10: 175-193
- López-Jiménez, J.G., Rivera-Cruz, M.C., Trujillo-Narcía, A., Aceves-Navarro, L.A., Sol-Sánchez, A. y Sarracino-Martínez, O. 2019. Laguncularia racemosa (Combretaceae) y bacterias terrestres asociadas medio siglo después de la contaminación crónica por hidrocarburos. *Revista de Biología Tropical*. 67(6): 1194-1209.
- López J.L.N. 2019. Tabasco es el edén de los humedales, "Kuxulkab". 25(52): 39-51
- López M. J. B., G. Quintero, A. L. Guevara V., D. C. Jaimes C., S. M. Gutiérrez R. y J. M. García. 2006. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova*. 4: 82-90.
- Lum A.F., Ngwa E.S., Chikoye D., Suh C.E. 2014. Phytoremediation potential of weeds in heavy metal contaminated soils of bassa industrial zone of Doukala. *International Journal of Phytoremediation*. 16(3): 302-319
- Madigan M.T., Martinko J.M., Bender K.S., Buckley D.H., Stahl D.A. 2015. Biología de los Microorganismos. 14a edición. Pearson Educación S.A. Madrid, España. 1099 p.
- Maier M.R and Gentry J.T. 2015. Microorganisms and organic Pollutants. In: Pepper L.I., Gerba P.Ch., Gentry J.T. (eds). *Environmental Microbiology.Elsevier*. San Diego CA. USA. pp: 377-413.
- Maldonado-Chávez E., Rivera-Cruz M.C., Izquierdo-Reyes F y Palma-López D.J. 2010. Efectos de rizosfera, microorganismos y fertilización en la biorremediación y fitorremediación de suelos con petróleos crudo nuevo e intemperizado. *Universidad y Ciencia*. 26(2): 121-136.
- Mager D. y Hernández-Valencia I. 2013. Actividad microbiana durante la fitorremediación de un suelo contaminado con un crudo liviano. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 30(1): 52-71.
- Mancera-López, M., Espaza-García, F., ChavezGomez, B., Rodríguez-Vázquez, R., Saucedo-Castaneda, G., Barrera-Cortes, J. 2008. Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation/bioaugmentation with filamentous fungi. *Int Biodeter Biodegr*. 612: 151-160.
- Martin Cilenšek, 2008. *Eleocharis palustris* (L.) Roem. & Schult. escaneado a 600 ppp y retocado en 2008 Fuente Escaneado de NaÅ¼e Å¼kodljive rastline (1892). EOL V3. Enciclopedia De La Vida. 1p.

- Marroquín S.G.S. 2007. Formación de sedimentos durante el hidrotreamiento catalítico de crudos pesados. Tesis Doctor en Tecnología Avanzada. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada. México D.F. 129 p.
- Marschner P. 2012. Rhizosphere Biology. In: Marschner P (ed). Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants. Elsevier San Diego CA. USA. pp. 369-373.
- Martínez H.E., Fuentes E.J.P y Acevedo H. E. 2008. Carbono Orgánico y Propiedades del Suelo. *Ciencia del Suelo y Nutrición Vegetal*. 8(1): 68-96.
- Martínez-Hernández I.A., Rivera-Cruz M.C., Carballar-Hernández S., Trujillo-Narcía A., Ortíz-García C.F., Hernández-Galvez G and Alarcón A. 2021. Arbuscular Mycorrhizal Colonization in a Mangrove Forest Exposed to Weathering Oil for Half a Century. *Water, Air, and Soil Pollution*. 232: 34. p 18.
- Masojídek J and Torzillo G. 2008. Mass cultivation of freshwater microalgae. In: *Encyclopedia of Ecology*, pp. Oxford: Academic Press, 2226– 2235.
- Mata, T.M., Martins, A.A. & Caetano, N.S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 14. 217– 232.
- McNally D.L., Mihelcic, J.R. y Lueking D.R. 1998. Biodegradation of Three- and Four-Ring Polycyclic Aromatic Hydrocarbons under Aerobic and Denitrifying Conditions. *Environmental Science & Technology*. 32 (17): 2633–2639.
- Merkel N., Schultze-Kraft R and Infante C. 2004. Phytoremediation of petroleum-contaminated soils in the tropics-Pre-selection of plant species from eastern Venezuela. *Journal of Applied Botany and Food Quality*. 78 (3):185-192
- Meysami, P., Baheri, H. 2003. Pre-screening of fungi and bulking agents for contaminated soil bioremediation. *Adv Environ Res*. 7: 881-887.
- Mezzari M.P, Hoffmann Z.D.M., Corseuil H.X and Verzani N.A. 2011. Potential of grasses and rhizosphere bacteria for bioremediation of diesel-contaminated soils. Mezzari. *Revista Brasileira de Ciencia Do Solo*. 35(6): 2227–2236. doi:10.1590/s0100-06832011000600038
- Milić, J.S., Beškoski, V.P., Ilić, M.V., Ali S.A.L., Gojgić-Cvijović G.D y Vrvic M.M. 2009. Bioremediation of soils heavily contaminated with crude oil and its products: composition of the microbial consortium. *Journal of the Serbian Chemical Society*. 74 (4): 455-460.
- Mishra S., Jyot J., Kuhad R and Lal B. 2001. Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily-sludge-contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(4):1675-1681
- Mitsch, W.J., Bernal, B., Nahlik, A.M. Mander Ü., Zhang L., Anderson C.J., Jørgensen S.E and Brix H. 2013. Wetlands, carbon, and climate change. *Landscape Ecology*. 28: 583– 597.
- Mnif S., Chebbi A., Mhiri N., Sayadi S and Chamkha M. 2017. Biodegradation of phenanthrene by a bacterial consortium enriched from Sercina oilfield. *Process Safety and Environmental Protection*. 107: 44\_53.
- Mohlenbrock, R.H and Drapalik, D.J. 1962. The Cyperaceae of Illinois. *American Midland Naturalist*. 67(2): 398-423.
- Moghimi H., Heidary T.R and Hamedi J. 2017. Assessing the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and laccase production by new fungus *Trematophoma* sp. UTMC 5003. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 33(7): 136

- Molina M. C., González N., Bautista L.F., Sanz R., Simarro R., Sánchez I., Sanz J.L. 2009. Isolation and genetic identification of PAH degrading bacteria from a microbial consortium. *Biodegradation*. 20 (6): 789–800.
- Mooney, A.; O’leary, N.D. and Dobson, A.D.W. 2006. Cloning and functional characterization of the styE gene, involved in styrene transport in *Pseudomonas putida* CA-3. *Applied and Environmental Microbiology*. 72: 1302-1309.
- Morales Terrés I.M., Doval M.M., González F.E., Baeza C.A and Barberá R.J. 2010. Assessing the impact of petrol stations on their immediate surroundings. *Journal of Environmental Management*. 91(12): 2754 – 276
- Moreno-Casasola P y Infante-Mata D.M. 2016. Conociendo los manglares, las selvas inundables y los humedales herbáceos. INECOL - OIMT - CONAFOR. México. 128 p.
- Moreno-Casasola P y Travieso-Bello A.C. 2007. Los humedales. In: P. Moreno-Casasola (ed.). Entornos Veracruzanos: la costa de la Mancha. Instituto de Ecología A. C. Xalapa, Veracruz, México. pp. 233-260
- Morales Terrés I.M., Doval M.M., González F.E., Baeza C.A and Barberá R.J. 2010. Assessing the impact of petrol stations on their immediate surroundings. *Journal of Environmental Management*. 91(12): 2754 – 276
- Morris L.A. 2004. Soil Development And Properties - Nutrient Cycling. Encyclopedia of Forest Sciences. University of Georgia, Athens, GA, USA. 1227-1235
- Mosa K., Saadoun I., Kumar K., Helmy M., Dhankher O.P. 2016. Potential Biotechnological Strategies for the Cleanup of Heavy Metals and Metalloids. *Frontiers in Plant Science*. 7: 1-14.
- Moubasher H.A., Hegazy A.K., Mohamed N.H., Moustafa Y.M., Kabiell H.F and Hamad A.A. 2015. Phytoremediation of soils polluted with crude petroleum oil using *Bassia scoparia* and its associated rhizosphere microorganisms. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 98: 113–120.
- Munsell A. H. 1952. Munsell color charts for plant tissues. Baltimore, Maryland U.S.A. 14 p.
- Nahlik A.M and Mitsch W.J. 2011. Methane emissions from tropical freshwater wetlands located in different climatic zones of Costa Rica. *Global Change Biology* 17(3):1321–1334.
- Nahlik A.M and Fennessy M.S. 2016. Carbon storage in US wetlands. *Nature Communications*. 7: 1-9.
- Nelson K.E., Weinel C., Paulsen I.T., Dodson R.J., Hilbert H., Martins dos Santos V.A.P., Fouts D. E., Gill S. R., Pop M., Holmes M., Brinkac L., Beanan M., DeBoy R. T., Daugherty S., Kolonay J., Madupu R., Nelson W., White O., Peterson J., Khouri H., Hance I., Chris Lee P., Holtzapple E., Scanlan D., Tran K., Moazzez A., Utterback T., M. Rizzo M., Lee K., Kosack D., Moestl D., Wedler H., Lauber J., Stjepandic D., Hoheisel J., Straetz M., Heim S., Kiewitz C., Eisen J., Timmis K.N., Dusterhöft A., Tümmler B and Fraser C.M. 2002. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology*. 4 (12): 799-808.
- Neumann G and Römheld V. 2012. Rhizosphere Chemistry in Relation to Plant Nutrition. In: Marschener P (ed). Marschener’s Mineral Nutrition of Higher Plants. Elsevier San Diego CA. USA. p.p. 347-368

- Newman M.M., Lorenz N., Hoilett N., Lee N.R., Dick R.P., Liles M.R., Ramsier C and Kloepper J.W. 2016. Changes in rhizosphere bacterial gene expression following glyphosate treatment. *Science of the Total Environment*. 15(553): 32-41.
- Ñústez C.D.C., Paredes C.D and Cubillos V.J. 2014. Bioremediation for degradation of total hydrocarbons present in the sediments of a fuel service station. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia*. 37(1): 20-28
- Nwinyi O.C., Ajayi O.O y Amund O.O. 2016. Biodegradation of phenanthrene by a bacterial consortium enriched from Sercina oilfield. *Brazilian Journal of Microbiology*. 47 (3); pp. 551-562.
- Obi L.U., Atagana H.I. and Adelek R.A. 2016. Isolation and characterisation of crude oil sludge degrading bacteria. Springer Plus. 5. 1946
- Odum, E.P y Barret, G.W. 2008. Fundamentos de Ecología. 5ta edición. CENGAGE. México D.F. 598 p.
- Olalekan, A., 2014. “The effect of palm kernel oil (PKO) biodiesel contaminated soil on morphological and biochemical properties of *Zea mays*”. *Journal of Plant Biochemistry and Physiology*., 2: 1-6.
- Oliveros-Bastidas A.J., Macías F.A., Carrera F.C., Marín D. y Molinillo J.M.G. 2009. Root exudates and their relevance to the allelopathic interactions. *Química Nova*. 32(1): 198-213.
- Omari K., Revitt M., Shutes B and Garelick H. 2003. Hydrocarbon removal in an experimental gravel bed constructed wetland. *Water Science and Technology*. 48 (5): 275-281.
- Orocio-Carrillo J.A., Rivera-Cruz M.C., Aranda-Ibáñez E.M., Trujillo-Narcía A., Hernandez-Galvez G and Mendiza-López M.R. 2019. Hormesis under oil-induced stress in *Leersia hexandra* Sw. used as phytoremediator in clay soils of the Mexican humid tropic. *Ecotoxicology*. 28(9): 1063-1074
- Ortiz P.M.A. y Lanza E.G. 2006. Diferenciación del espacio costero de México: un inventario regional, Serie Textos Universitarios, núm. 3. Instituto de Geografía, UNAM. México. 138 p.
- Oyuela L.M.A., Fernández G.W.D and Gutiérrez S.M.C. 2017. Native herbaceous plant species with potential use in phytoremediation of heavy metals, spotlight on wetlands — A review. *Chemosphere*. 168: 1230-1247.
- Palleroni, N. 1984. Family I. Pseudomonaceae. Baltimore, MD: Williams and Wilkins.
- Page A.L., Miller R.H. and Keeney D.R. 1982. Nitrogen total. En: Page A.L., Miller R.H., Keeney D.R. (Eds.). *Methods of soil analysis*. Part 2. Chemical and microbiological properties. 2 ed. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, U.S.A. 1159 p.
- Palleroni, N. 1984. Family I. Pseudomonaceae. Baltimore, MD: Williams & Wilkins.
- Parra, O y Bicudo C. 1996. Introducción a la biología y sistemática de las algas continentales. Universidad de Concepción, Concepción, Chile 268 p.
- Parra, O. 2006. Estado de conocimiento de las algas dulceacuícolas de Chile (Excepto Bacillariophyceae). *Gayana* 70(1): 8-15.
- Peixoto R.S., Vermelho A.B. and Rosado A.S. 2011. Petroleum Degrading Enzymes: Bioremediation and New Prospects. *Enzyme Research*. 1-7
- Pentreath V., Gonzalez E., Barquin M., Rios S.M y Perales S. 2015. *Revista Salud ambiental*. 15 (1): 4-12.

- Peña-Castro J.M., Barrera-Figueroa B.E., Ruiz-Medrano R., Xoconostle-Cázares V. 2006. Bases moleculares de la fitorremediación de hidrocarburos totales del petróleo. *Terra Latinoamericana*. 24(4): 529-539
- Pepper L.I and Gentry J.T. 2015. Microorganisms Found in the Environment. In: Pepper L.I., Gerba P.C., Gentry T.J. (Eds). *Environmental Microbiology*. Elsevier. San Diego CA. USA. pp: 9-34.
- Pepper L.I., Gerba P. C and Gentry J.T. 2016. *Environmental Microbiology*. Academic Press is an imprint of Elsevier. 3ra Edition. United States of America. 705 p.
- Pérez-Armendáriz B., Martínez-Carrera D., Calixto-Mosqueda M., Alba, J and Rodríguez-Vázquez R. 2010. Filamentous Fungi Remove Weathered Hydrocarbons From Polluted Soil Of Tropical México. *International Journal of Environmental Pollution*. 26 (3): 193–199.
- Pérez E., Garrido P y Laca M. 2008. Indicadores microbiológicos como marcadores de la contaminación y recuperación de suelos contaminados con queroseno. *Ecosistemas*. 17 (3): 133-138.
- Pérez-Hernández V., Ochoa-Gaona S., Hernández-Pérez I y Urrieta-Saltijeral J.M. 2015. Efecto del petróleo sobre microorganismos cultivables de la rizosfera de árboles tropicales. 4o Congreso Internacional Multidisciplinario de Ingenierías- Instituto Tecnológico Superior de Cintalapa. 10 p.
- Pérez P.H., Luccini, E., Herrera L.A., Parodi M., Matar M., Barrea L., Mechni M y Masramón E. 2015. Cuantificación de la captura de CO<sub>2</sub> por la flora nativa de totora en un humedal costero de Perú. *Energía*. 13(13). 73-80.
- Pérez S.R.M., Camacho P.M.I., Gómez M De O.J.M., Ábalos R.A., Viñas M. & Cantero M.D. 2008. Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo. *Revista CENIC, Ciencias biológicas*. 39 (1); pp. 44–51.
- Pignolet O., Jubeau S., Vaca-Garcia C. & Michaud P. 2013. Highly valuable microalgae: biochemical and topological aspects. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 40. 781- 796.
- Philippot, L. and J. Germon. 2005. Contribution of bacteria to initial input and cycling of nitrogen in soils. In: Varma A., Buscot F (eds). *Microorganisms in soil: Roles in Genesis and Functions*. Soil Biology. Vol.3. Springer. Berlin, Heridelberg. pp. 159-176. <https://doi.org/10.1007/3-540-26609-7-8>
- Porta C.J., López A.R.M and Poch. C.R.M. 2014. *Edafología. Uso y protección de suelos*. Tercera edición. Mundo-Prensa. Madrid, España. 608 p.
- Puentes S.E.A. 2014. *Consortios Microalgas – Bacterias*. Departamento de Ciencias Biológicas Programa Biología. Universidad de los Andes. 20 p.
- Purwanti I.F., Abdullah S.R.S., Hamzah A., Idris M., Basri H., Mukhlisin M and Latif M.T. 2015. Biodegradation of diesel by bacteria isolated from *Scirpus mucronatus* rhizosphere in diesel-contaminated sand. *Advanced Science Letters*. 21 (2): 140-143
- Pravecek L.T., Christman F.R and Pfaender K.F. 2005. Impact of imposed anaerobic conditions and microbial activity on aqueous-phase solubility of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 24(2): 286-293.
- Qurratu, W.N., Wan Manan, A., Santanaraja, J., Sajab, M.S., Wan Isahak, W.N.R., HuaChia, C. 2018. Discoloration of batik effluent by chemically modified oil palmempty fruit bunchfibers. *Jurnal Kejuruteraan*. 1(4):87-92

- Raisman J.S y González A.N. 2007. Hipertextos del área de biología; las plantas y su estructura II, raíz. Chaco, AR. Facultad de Agroindustrias, Universidad Nacional del Nordeste. (Disponible en: <http://www.biologia.edu.ar/plantas/planta2.htm>. consultado 22 de julio de 2021)
- Ramírez G.M., Luna M.B., Mejía Ch.A., Velázquez M.O., Tsuzuki R.G., Vierna G., Hernández G.L. y Müggenburg R.I. 1998. Manual de Prácticas de Microbiología General. Facultad de Química, UNAM. México, D.F. 300 p
- RAMSAR. 2016. Introducción a la Convención sobre los Humedales. Secretaría de la Convención de Ramsar. Gland, Suiza. 117 p.
- RAMSAR. 2018. Perspectiva mundial sobre los humedales: Estado de los humedales del mundo y sus servicios a las personas. Secretaría de la Convención de Ramsar. Gland. Suiza. 85 p.
- Rashid N., Rehman M.S.U., Sadiq M., Mahmood T and Han J. I. 2014. Current status, issues and developments in microalgae derived biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 40: 760-778.
- Rawat I., Ranjith-Kumar R., Mutanda T & Bux F. 2011. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*. 88: 3411-3424.
- Rennie R. J. 1981. A single medium for the isolation of acetylenereducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Canadian Journal Microbiology*. 27: 8-14.
- Rivera-Casado NA, Montes-Horcasitas MC, Esparza-Garcia FJ, Ariza-Castolo A, Gómez-Guzmán O, Pérez Vargas J, et al., 2010. Phytotreatment of oil spill impacted soils: interaction between polyaromatic hydrocarbons, phenolics and oxidative enzymes. *Revista CENIC Chemical Sciences* 41:1-11.
- Rivera-Cruz MC. 2011. Bacterias y hongos en suelos contaminados con petróleo en Tabasco. En: Gamboa A.M., Rojas H.R (eds). Recursos Genético Microbianos en la zona Golfo-Sureste de México. Sistema Nacional de Recursos Genéticos Microbianos. Secretaria de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural y Pesca y Alimentación. México D.F. 1:78-87.
- Rivera-Cruz M.C y Trujillo-Narcía A. 2004. Estudio de toxicidad vegetal en suelos con petróleo nuevo e intemperizado. *Interciencia*. 29: 369-376.
- Rivera-Cruz M.C., Trujillo-Narcía A., Trujillo-Rivera E.A., Arias-Trinidad A and Mendoza-López M.R. 2016. Natural attenuation of weathered oil using aquatic plants in a farm in southeast Mexico. *International Journal of Phytoremediation* 18(9): 877-884
- Rivera O.P., Rivera L.J.E., Andrade L.E.C., Heyer R.L., De la Garza R.F.R., Castro M.B.I. 2018. Bioestimulación y biorremediación de recortes de perforación contaminados con hidrocarburos. *Revista Intinternacional de Contaminación Ambiental*. 34(2): 249-262
- Rockne, K.J., Chee-Sanford, J.C., Sanford, R.A., Hedlund, B.P., Staley, J.T. and Strand, S.E. 2000. Anaerobic Naphthalene Degradation by Microbial Pure Cultures under Nitrate-Reducing Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(4): 1595-1601.
- Rodríguez F.H y Rodríguez A.J. 2011. Métodos de análisis de suelos y plantas. Criterios de interpretación. 2ª edición. Editorial Trillas. México D.F. 239 p.
- Rodríguez-Rodríguez N., Rivera-Cruz M.C., Trujillo-Narcía A., Almaráz-Suárez J.J and Salgado-García S. 2016. Spatial distribution of oil and biostimulation through the rhizosphere of *Leesria hexandra* in degraded soil. *Water Air and Soil Pollution*. 227: 319.

- Rodríguez-Uribe M.L., Peña-Cabriales J.J., Rivera-Cruz M.C and Délano-Frier J.P. 2021. Native bacteria isolated from weathered petroleum oil-contaminated soils in Tabasco, Mexico, accelerate the degradation petroleum hydrocarbons in saline soil microcosms. *Environmental Technology and Innovation*. 23: 101781
- Rojo F. 2009. Degradation of alkanes by bacteria. *Environmental Microbiology*. 11: 2477-2490.
- Rosen D., Hatch S y Carter R. 2007. Intraspecific taxonomy and nomenclature of *Eleocharis acutangula* (Cyperaceae). *J. Bot. Res. Inst. Texas*. 1 (2): 875-888
- Rügnitz M. T., Chacón M. L. y Porro R. 2009. Guía para la determinación de carbono en pequeñas propiedades rurales. Primera edición. Lima, Perú: Centro Mundial Agroflorestal (ICRAF)/Consorcio Iniciativa Amazônica (IA). 79p.
- Salisbury F.B y Ross C.W. 2000. Fisiología de las Plantas: Desarrollo de las Plantas y Fisiología Ambiental. Thomson Editores, Madrid, España. 529-988 p
- Salleh A.B., Ghazali F.M., Rahman R.N.A and Basri M. 2003. Bioremediation of petroleum hydrocarbon pollution. *Indian Journal of Biotechnology*. 2: 411-425.
- Samanez G.E. 2008. Biodegradación bacteriana por bioestimulación en suelos contaminados con petróleo crudo. Tesis de grado de Magíster en Biotecnología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. 84 p
- Sammarco P.W., Kolian S.R., Warby R.A.F., Bouldin J.L., Subra W.A., Porter S.A., 2013. Distribution and concentrations of petroleum hydrocarbons associated with the BP/Deepwater Horizon Oil Spill, Gulf of Mexico, *Mar. Pollut. Bull.*,73:129-143
- Sand-Jensen K and Frost-Christensen H. 1999. Plant growth and photosynthesis in the transition zone between land and stream. *Aquatic Botany*. 63: 23-35
- Sammarco P.W., Kolian S.R., Warby R.A.F., Bouldin J.L., Subra W.A., Porter S.A., 2013. Distribution and concentrations of petroleum hydrocarbons associated with the BP/Deepwater Horizon Oil Spill, Gulf of Mexico. *Mar. Pollut. Bull.* 73:129-143
- Saraswathy A. and Hallberg R. 2002. Degradation of pyrene by indigenous fungi from a former gasworks site. *FEMS Microbiol. Lett.* 210: 227-232.
- SAS (Statistical Analysis Systems). 2005. "User's guide", versión 9.1.3. SAS Institute, Inc, Cary, NC, p 664
- Sela G. 2019. El Nitrógeno en las Plantas. Agricultura, Nutrición vegetal, Suelos, Croapaia. <https://croapaia.com/es/blog/nitrogeno-en-las-plantas/>.
- SENER (secretaría de energía). 2018. Indicadores de Exploración y Extracción de Hidrocarburos. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/395327/Indicadores\\_Julio\\_publicaVF.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/395327/Indicadores_Julio_publicaVF.pdf) . Consultado el 18 de junio del 2021.
- Senthil K.P. 2020. Modern Treatment Strategies for Marine Pollution. Elsevier. 212 pp.
- SGM (Servicio Geológico Mexicano). 2017. Características del petróleo. [www.sgm.gob.mx/Web/MuseoVirtual/Aplicaciones\\_geologicas/Caracteristicas-del-petroleo.html](http://www.sgm.gob.mx/Web/MuseoVirtual/Aplicaciones_geologicas/Caracteristicas-del-petroleo.html) . Consultado el 18 de Junio del 2021.
- Shekoohiyan S., Moussavi G., Naddafi K. 2016. The peroxidase-mediated biodegradation of petroleum hydrocarbons in a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced SBR using in-situ production of peroxidase: biodegradation experiments and bacterial identification. *Journal Hazardous Materials*. 313: 170-178.

- Shukry M.W., Al-Hawas G.H.S. Al-Moaik R.M.S and El-Bendar M.A. 2013. Effect of petroleum crude oil on mineral nutrient elements and soil properties of jojoba plant (*Simmondsia chinensis*), *Acta Botanica Hungarica* 55 (1–2): 117-133. DOI: 10.1556/ABot.55.2013.1–2.8
- Sikkema, J., de Bont, J. A. M., and Poolman, B. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews*. 59: 201-222.
- Silva, R. C., M. Gómez, J. Rodríguez, A. Viñas, M. y Cantero, D. 2008. Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 39(1): 44-51.
- Smith L.J., Collins P.H., Crump R.A., and Bailey L.V. 2015. Management of soil biota and their processes. In: Paul A. (Ed). *Soil Microbiology, Ecology, and biochemistry*. Elsevier. San Diego, CA. USA. 539-572.
- Soliman, R.M., El-Gendy, N.S., Deriase, S.F., Farahat, L.A., and Mohamed, A.S. 2014. The Evaluation of Different Bioremediation Processes for Egyptian Oily Sludge Polluted Soil on a Microcosm Level. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*. 36 (3): 231–241.
- Soroa-Bell M.R., Hernández-Fernández A., Soto-Carreño F., Terry-Alfonso E. 2009. Identificación de algunas especies de microorganismos benéficos en la rizosfera de *Gerbera* y su efecto en la productividad. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 15(2): 41-48.
- Spain O., Plöhn M., Funk C. 2021. The cell wall of green microalgae and its role in heavy metal removal. *Physiologia Plantarum*. 1-10.
- SSS (Soil Survey Staff). 2014. *Keys to Soil Taxonomy*. 12a. ed. United States Department of Agriculture. Natural Resources Conservation Service. Washington, D.C. p 373.
- Subashchandrabose S.R., Ramakrishnan B., Megharaj M., Venkateswarlu K and Naidu R. 2011. Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: Biotechnological potential. *Biotechnology Advances*. 29(6): 896-907.
- Svenson, H. 1929. Monographic studies in the genus *Eleocharis*. I. *Rhodora* 31: 121-135, 152-163, 167-191, 199-219, 224-242
- Tang J., Wang M., Wang F., Sun Q and Zhou Q. 2011. Eco-toxicity of petroleum hydrocarbon contaminated sand. *Journal of Environmental Sciences*. 23: 845–851.
- Tilley, D., and John, L. 2012. Plant Guide for common spikerush (*Eleocharis palustris*). USDA-Natural Resources Conservation Service, Aberdeen Plant Materials Center. Aberdeen, Idaho 83210. Recovered on 17.09.2021. From: [https://www.nrcs.usda.gov/Internet/FSE\\_PLANTMATERIALS/publications/idpmcfs11627.pdf](https://www.nrcs.usda.gov/Internet/FSE_PLANTMATERIALS/publications/idpmcfs11627.pdf)
- Timmis, K.N. 2002. *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par excellence. *Environmental Microbiology*. 4: 779 – 781
- Titah H.S., Pratikno H., Moesriati A., Imron M.F and Putera R.I. 2018. Isolation and screening of diesel degrading bacteria from ship dismantling facility at Tanjungjati, Madura, Indonesia. *Journal of Engineering and Technological Science*. 50(1): 99
- Tortella G.R., Diez M.C. and Durán N. 2005. Fungal diversity and use in decomposition of environmental pollutants. *Crit. Rev. Microbiol.* 31: 197-212.
- Trujillo-Narcía A., Rivera-Cruz M.C., Trujillo-Rivera E.A and Roldán G.A. 2018. Reintroducing plant coverage in a tropical wetland contaminated with oil and sulfate: Rhizosphere effects on *Desulfovibrio* populations. *Revista de biología tropical*. 66(2): 1-11.

- USDA/NRCS. 2006. Field indicators of hydric soils in the United States, version 6.0. In: Hurt GW, Vasilas LM (eds) USDA, NRCS, in cooperation with the National Technical Committee for Hydric Soils. p 27.
- USEPA-3540C 1996. Soxhlet extraction organics. SW-846 test methods for evaluating solid waste physical/chemical methods. <http://www.epa.gov/wastes/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3540c.pdf> [accessed 2021 nov 20].
- Valencia H.I., Navas G y Infante C. 2017. Fitorremediación de un suelo contaminado con petróleo extra pesado con *Megathyrus maximus*. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 33(3): 495-503
- Vallejo Q.V.E., Sandoval C.J.J., Garagoa B.S.C., Bastos A.J. 2016. Evaluación del efecto de la bioestimulación sobre la biorremediación de hidrocarburos en suelos contaminados con alquitrán en Soacha. Cundinamarca - Colombia. *Acta Agronómica*. 65(4): 354 – 361
- Vallejo V., Salgado L., Roldan F. 2005. Evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de TPHs en suelos contaminados con petróleo. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 7(2): 67 – 78
- Varjani S.J. 2014 Hydrocarbon Degrading and Biosurfactants (Bioemulsifiers) Producing Bacteria from Petroleum Oil Wells. (Ph.D. Thesis, Kadi SarvaVishwavidyalaya).
- Varjani S.J., and Upasani V.N. 2013. Comparative studies on bacterial consortia for hydrocarbon degradation. *Int. J. Innovative Res. Sci. Eng. Technol.* 2(10): 5377-5383
- Vázquez-Luna M., Montiel-Flores A., Vázquez-Luna D., Herrera-Tenorio MF. 2011. Impacto del petróleo crudo en suelo sobre la microbiota de vida libre fijadora de nitrógeno. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 13 (3): 511-523.
- Velasco, N. 2004. Efecto de Pretratamientos Físicoquímicos en la Biodegradación de Hidrocarburos del Petróleo en un Suelo Intemperizado, por Composteo. Trabajo de grado Especialista en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa, México D.F. 55p
- Volke T. y Velasco J. 2002. Tecnologías de remediación para suelos contaminados. Instituto Nacional de Ecología, México, D.F. 64 p.
- Walkley A. and Black I.A. 1934. An examination of degtjareff method for determining soil organic matter and aprosed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*. 37: 29-38. <http://dx.doi.org/10.1097/00010694-193401000-00003>
- Walton T.B., Guthrie E.A., Holyman A.M. 1995. Toxican degradation in the rhizospheretechnology. In: Bioremediation through rhizosphere technology. Anderson T.A. and Coats J.R. American Chemical Society, Washington, D.C. USA. 25-26 p
- Wan N., Hwang E.Y., Park J.S. and Choi J.Y. 2002. Bioremediation of diesel-contaminated soil with composting. *Environmental Pollution*. 119, 23–31.
- Watanabe K. 2001. Microorganisms relevant to bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*. 12(3): 237-241
- Were D., Kansime F., Fetahi T and Hein T. 2021. Carbon Dioxide and Methane Fluxes from Various Vegetation Communities of a Natural Tropical Freshwater Wetland in Different Seasons. *Environmental Processes*. 8: 553-571.
- Widdel Friedrich y Rabus Ralf. 2001. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*. 12 (3): 259–276.
- Williams and Wilkins Co. 1945. A Manual of the Aspergilli, Thom C and Raper K. B. Baltimore Md. United States of America. 374 p.

- Winqvist E., Björklöf K., Schltz E., Räsänen M., Salonen K., Anasonye F., Cajtham T., Steffen K.T., Jorgensen K.S and Tuomela M. 2014. Bioremediation of PAH-contaminated soil with fungi-from laboratory to field scale. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 86: 238e247
- Xu, Y. y Lu, M. 2010. Bioremediation of crude oilcontaminated soil: Comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. *Journal of Hazardous Materials*. China. 183: 395-401.
- Zavala-Cruz J., Gavi-Reyes F., Adams-Schroeder R.H., Ferrera-Cerrato R., Palma-López D.J., Vaquera-Huerta H y Domínguez-Ezquivel, J.M. 2005. Derrames de petróleo en suelos y adaptación de pastos tropicales en el Activo Cinco Presidentes. Tabasco, México. *Terra Latinoamericana*. 23(3): 293-302.