



UNIVERSIDAD POPULAR AUTÓNOMA DEL ESTADO DE PUEBLA

Decanato de Ciencias Biológicas y Facultad de Biotecnología

***“Tagetes erecta y Azotobacter vinelandii inmovilizada para la
biorremediación de diésel en suelos agrícolas en condiciones de
invernadero”***

Tesis para obtener el grado de:

Maestro en Biotecnología

Presenta:

QFBT. Karina Maria Muñoz De la Cruz

Director:

M. en C. Gloria Anaí Valencia Luna

Co-Director:

Dr. Luis Daniel Ortega Martínez

Asesores:

Dra. Beatriz Pérez Armendáriz

Dra. Victoria Conde Ávila

Dra. Veronica Rodríguez Soria

Puebla, Pue.

Septiembre, 2022



UPAEP – Secretaría General

Dirección General de Apoyos Académicos

Dirección del Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación.

Biblioteca Central - **Karol Wojtyla**

Tesis Digitales Restricciones de uso:

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de textos, imágenes, gráficas, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente de donde la obtuvo mencionando el autor o autores involucrados en el documento.

Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Popular Autónoma del Estado De Puebla

Decanato de Ciencias Biológicas

Facultad de Biotecnología

Ingeniería en Biotecnología

Se aprueba la tesis:

“Tagetes erecta y Azotobacter vinelandii inmovilizada para la biorremediación de diésel en suelos agrícolas en condiciones de invernadero”

Autor:

Karina Maria Muñoz De la Cruz

Comité de revisión:

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized letters, positioned above a horizontal line.

M. en C. Gloria Anai Valencia Luna
Director

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized letters, positioned above a horizontal line.

Dr. Luis Daniel Ortega Martinez
Codirector

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized letters, positioned above a horizontal line.

Dra. Beatriz Pérez Armendáriz
Asesor interno

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized letters, positioned above a horizontal line.

Dra. Victoria Conde Ávila
Asesor externo

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized letters, positioned above a horizontal line.

Dra. Verónica Rodríguez Soria
Asesor interno

DEDICATORIA

A Dios

Por la familia y amigos que me dio, los caminos, las puertas abiertas y por años llenos de misterios con infinitos aprendizajes

“Ante Dios somos todos igualmente sabios, igualmente tontos. Lo más hermoso que podemos experimentar es lo misterioso. Es la fuente de todo arte verdadero y la ciencia.”
-Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

A mi madre por el inconmensurable amor y apoyo a lo largo de mi vida, por su amistad fortaleza, dedicación, perseverancia y muestra de lo que es ser un hermoso ser humano.

A mis hermanas Karla y Yesenia por estar en mi vida con sus alegrías, tristezas y las aventuras a mi lado.

A mi directora de tesis la Mtra. Gloria Anaí Valencia Luna por ser no solo una excelente maestra y ejemplo de dedicación y constancia, sino también por el apoyo brindado como profesional y como ser humano desde el primer día, por su amistad invaluable y los bonitos recuerdos que estarán en mis memorias.

A todos los buenos compañeros y amigos que compartieron su amistad, buenos momentos, conocimiento y sabiduría durante mi estancia Damián, Adri, Citlali, Rosí, Vladimir, Gus, Edwin y Miros.

A mis asesores la Dra. Beatriz por su apoyo, cariño e inmensa amabilidad, así como por la pasión por la enseñanza que transmite y por todo lo aprendido durante las clases y seminarios con el grupo de investigación. Al Dr. Luis Daniel, Dra. Victoria y Dra. Verónica por su amabilidad y el conocimiento que me brindaron, que a su vez me permitió culminar mi tesis de manera satisfactoria, que sin su apoyo no hubiese sido posible.

A Mtro. Héctor por todo el apoyo brindado durante mis horas en el laboratorio.

A CONACyT por el apoyo al CVU 1076688 lo cual me permitió conocer el lado bello del crecimiento personal desde el aprendizaje de la ciencia.

INDICE DE CONTENIDO

INDICE DE CONTENIDO	II
INDICE GENERAL	II
INDICE DE TABLAS.....	IV
INDICE DE FIGURAS	V
INDICE DE GRÁFICOS	VI
RESUMEN	VII
ABSTRACT	VIII

INDICE GENERAL

1.ORGANIZACIÓN DEL TRABAJO	2
1.1. ANTECEDENTES	2
1.1. PLANTEAMIENTO	4
1.2. JUSTIFICACIÓN	7
1.3. OBJETIVOS.....	9
1.4.1. GENERAL	9
1.4.2. ESPECÍFICOS	10
1.4. HIPÓTESIS	10
1.5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	10
1.6. ALCANCES Y LIMITACIONES.....	11
2.MARCO TEÓRICO	13
2.1. QUÍMICA DEL DIÉSEL.....	13
2.2. BIORREMEDIACIÓN.....	17
2.3. FITORREMEDIACIÓN DE HIDROCARBUROS	19
2.3.1. Fitodegradación.....	20
2.3.2. Fitoestabilización.....	21
2.3.3. Fitoextracción	21
2.3.4. Fitoestimulación.....	21
2.3.5. Fitovolatilización	21
2.3.6. Rizodegradación.....	22
2.4. ESPECIES ORNAMENTALES FITORREMEDIADORAS	22
2.4.1. <i>Tagetes erecta</i>	24
2.5. BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL EN LA REMOCIÓN DE HIDROCARBUROS.....	25
2.6. AZOTOBACTER VINELANDII.....	26
2.7. CONTAMINANTES BIODEGRADADOS POR AZOTOBACTER VINELANDII	27
2.8. INMOVILIZACIÓN	30
2.9. MECANISMOS DE BIODEGRADACIÓN BACTERIANA PARA COMPUESTOS DE DIÉSEL	32
2.9.1 <i>Biodegradación de hidrocarburos alifáticos saturados</i>	32
2.9.2 <i>Biodegradación de compuestos aromáticos</i>	34
ETAPA 1. SUELO.....	37
3.1. MUESTREO.....	37
3.1.3.1. Porcentaje de remoción de diésel	38
3.1.2. <i>Caracterización de suelo</i>	38
3.1.5. <i>Conteo total de bacterias</i>	38
3.1.6. <i>Análisis de daño genético y celular</i>	39
3.2.1 <i>Propagación de Tagetes erecta</i>	39
3.2.2 <i>Inmovilización de Azotobacter vinelandii</i>	39

3.2.2.1 Cultivo.....	39
3.2.2.2. Curva de crecimiento de <i>Azotobacter vinelandii</i>	39
3.2.2.3. Inmovilización encapsulación en alginato de sodio	40
3.2.2.4. Viabilidad de <i>Azotobacter vinelandii</i> inmovilizada en alginato de sodio	40
3.2.2.5. Conteo de <i>Azotobacter vinelandii</i> inmovilizada	40
3.2.3. <i>Diseño de experimentos</i>	40
ETAPA 3. BIORREMEDIACIÓN	43
3.3.1 <i>Parámetros fisiológicos de la planta</i>	43
3.3.1.1. Medición de Índice de calidad de Dickson (ICD).	43
3.3.2 <i>Análisis de suelo biorremediado</i>	43
3.3.2.1. Cuantificación de diésel residual en suelo biorremediado	43
3.3.2.2. Conteo total de bacterias	44
3.3.2.3. Análisis de daño genético y celular	44
ETAPA 1. SUELO INICIAL.....	46
4.1 CARACTERIZACIÓN DEL SUELO	46
4.2. ETAPA 2. PROPAGACIÓN DE PLÁNTULAS Y BACTERIAS.	50
4.2.1. <i>Cultivo de Azotobacter vinelandii</i>	50
4.2.2. <i>Inmovilización de Azotobacter vinelandii</i>	51
4.3. ETAPA 3	54
4.3.1. <i>pH</i>	55
4.3.2. <i>Conductividad eléctrica</i>	57
4.2.4. <i>Conteo total de bacterias</i>	59
4.2.2. <i>Materia orgánica</i>	61
4.2.3. <i>Cuantificación de diésel residual</i>	63
4.3.1 <i>Parámetros fisiológicos de la planta</i>	67
4.1.8. <i>Genotoxicidad y citotoxicidad</i>	68
5.1. CONCLUSIÓN.....	73
5.2. PERSPECTIVAS	74
6.CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	75
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

INDICE DE TABLAS

TABLA 2.1. ESTRUCTURAS QUÍMICAS DEL DIÉSEL	13
TABLA 2.1.2. RECOPIACIÓN DE ESTUDIOS REALIZADOS DE GENOTOXICIDAD Y CITOTOXICIDAD DE COMPUESTOS ORGÁNICOS, RELACIONADOS A HAPS	15
TABLA 2.2. TÉCNICAS FÍSICOQUÍMICAS, QUÍMICAS Y TÉRMICAS DE RECUPERACIÓN DE SUELOS.	17
TABLA 2.2.1. TÉCNICAS BIOLÓGICAS DE RECUPERACIÓN DE SUELOS.	19
TABLA 2.4. ESPECIES ORNAMENTALES PARA LA FITORREMEDIACIÓN DE HIDROCARBUROS.	23
TABLA 2.5. FUNCIONES DE LAS BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL	25
TABLA 2.7. CONTAMINANTES BIODEGRADADOS POR AZOTOBACTER VINELANDII	28
TABLA 2.8. EJEMPLOS DE MATRICES NATURALES Y ARTIFICIALES Y SUS USOS BIOTECNOLÓGICOS	31
TABLA 3.1.4. PARÁMETROS FÍSICOS Y QUÍMICOS DEL SUELO*	38
TABLA 3.2.3. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	42
TABLA 4.1. CARACTERIZACIÓN DEL SUELO	46
TABLA 4.2. TAMAÑO DE PARTÍCULAS DE ACUERDO CON LA FRACCIÓN DE SUELO	47
TABLA 4.3. PORCENTAJE OBTENIDO DE ARENA, ARCILLA Y LIMO POR 100 GRAMOS DE SUELO CONTAMINADO	48
TABLA 4.4. DENSIDAD APARENTE	48
TIPO DE SUELO.....	48
G/CM ³	48
ORGÁNICOS VOLCÁNICOS.....	48
MENOR DE 1.00.....	48
ARCILLOSOS.....	48
1.00-1.19	48
FRANCOSOS	48
1.20-1.32	48
ARENOSOS.....	48
MAYOR A 1.32.....	48
TABLA 4.4. VALORES DE NITRÓGENO TOTAL Y SU CLASIFICACIÓN*	49
TABLA 4.5. VALORES DE FOSFORO TOTAL Y SU CLASIFICACIÓN*	49
TABLA 4.6. CONTEO BACTERIANO HASTA LAS 72 HORAS DE INCUBACIÓN.	50

TABLA 4.7. CONTEO DEL AZOTOBACTER VINELANDII INMOVILIZADA, ALMACENADA A TEMPERATURA AMBIENTE	53
TABLA 4.8. CUANTIFICACIÓN DE MG KG-1 DE DIÉSEL RESIDUAL POR GRAVIMETRÍA Y PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS INICIAL Y FINALES.	54
TABLA 4.9. VALORES DE PH Y SU CLASIFICACIÓN*	55
TABLA 4.8. VALORES DE CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA*	57
TABLA 4.9. VALORES DE MATERIA ORGÁNICA.....	61
TABLA 4.10. LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES PARA FRACCIONES DE HIDROCARBUROS EN SUELO	64
TABLA 4.11. PARÁMETROS FISIOLÓGICOS DE LA PLANTA.....	67
TABLA 4.15. PARÁMETROS FISIOLÓGICOS DE ALLIUM SATIVUM	69
TABLA 4.16. PARÁMETROS GENÉTICOS Y CELULARES EN PLÁNTULAS DE ALLIUM SATIVUM EXPUESTO A SUELO CONTAMINADO Y BIORREMEDIADO	70

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 2.1. HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS DE PRIORIDAD PARA SU DEGRADACIÓN.....	16
FIGURA 2.3. REPRESENTACIÓN DE LOS MECANISMOS DE FITORREMEDIACIÓN UTILIZADOS POR LAS PLANTAS.....	20
FIGURA 2.4. TAGETES ERECTA.....	24
FIGURA 2.6. AZOTOBACTER VINELANDII	27
FIGURA 2.8. ESQUEMA REPRESENTATIVO DE BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS SATURADOS.....	33
FIGURA 2.9. ESQUEMA REPRESENTATIVO DE BIODEGRADACIÓN DE HAPS*.....	34
FIGURA 3.1. METODOLOGÍA GENERAL DE TRABAJO	36
FIGURA 3.2. ESQUEMA DE ORDENAMIENTO DE UNIDADES EXPERIMENTALES EN DISEÑO DE CUADRADO LATINO	41
FIGURA 3.3. UNIDADES EXPERIMENTALES EN CUADRADO LATINO EN INVERNADERO .	42
FIGURA 4.1. TRIÁNGULO DE TEXTURA DEL SISTEMA DE CLASIFICACIÓN DE LA USDA .	48
FIGURA 4.2. CONTEO BACTERIANO DE AZOTOBACTER VINELANDII	51
FIGURA 4.3. PERLAS DE AZOTOBACTER VINELANDII INMOVILIZADA EN CaCl ₂	52
FIGURA 4.4. BACTERIA INMOVILIZADA ALMACENADA A TEMPERATURA AMBIENTE.....	52
FIGURA 4.5. CUANTIFICACIÓN POR TRIPLICADO DE DIÉSEL RESIDUAL.....	63
FIGURA 4.6. ALLIUM SATIVUM EXPUESTO A SUELO CONTAMINADO INICIAL Y BIORREMEDIADO EN LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS	68

INDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO 4.1. <i>CRECIMIENTO DE AZOTOBACTER VINELANDII HASTA LAS 72 HORAS</i>	51
GRÁFICO 4.2. <i>PRUEBA T TEST PAIRED PARA PH AL INICIO Y FINAL DEL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN</i>	56
GRÁFICO 4.3. <i>ONE WAY ANOVA PARA PH ENTRE TRATAMIENTOS AL FINAL DEL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN</i>	56
GRÁFICO 4.4. <i>PRUEBA T TEST PAIRED PARA CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA AL INICIO Y FINAL DEL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN</i>	58
GRÁFICO 4.5. <i>ONE WAY ANOVA PARA CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA ENTRE TRATAMIENTOS AL FINAL DEL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN</i>	58
GRÁFICO 4.6. <i>PRUEBA T TEST PAIRED PARA UFC/G AL INICIO Y FINAL DEL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN</i>	60
GRÁFICO 4.7. <i>ONE WAY ANOVA PARA UFC/G ENTRE TRATAMIENTOS AL FINAL DEL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN</i>	60
GRÁFICO 4.8. <i>PRUEBA T TEST PAIRED PARA MATERIA ORGÁNICA AL INICIO Y FINAL DEL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN</i>	62
GRÁFICO 4.9. <i>ONE WAY ANOVA PARA MATERIA ORGÁNICA ENTRE TRATAMIENTOS AL FINAL DEL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN</i>	62
GRÁFICO 4.10. <i>PRUEBA T TEST PAIRED PARA DIÉSEL RESIDUAL AL INICIO Y FINAL DEL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN</i>	64
GRÁFICO 4.11. <i>ONE WAY ANOVA PARA MG KG⁻¹ DE DIÉSEL RESIDUAL ENTRE TRATAMIENTOS AL FINAL DEL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN</i>	66

Resumen

La creciente demanda energética del petróleo y sus derivados han ocasionado una alta incidencia de eventos ambientales que afectan negativamente los ecosistemas. En las zonas rurales, han incrementado las afectaciones en las poblaciones dedicadas a la agricultura. Por ello, en las últimas décadas se han buscado alternativas viables que permitan remediar agroecosistemas contaminados sin frenar su producción; entre las que destacan las técnicas de biorremediación, que representan tecnologías biológicas sustentables para la restauración de suelos agrícolas contaminados. Por lo que el objetivo de esta investigación fue la biorremediación de suelo agrícola contaminado con diésel utilizando tratamientos de fitorremediación con *Tagetes erecta* y bioaumento con *Azotobacter vinelandii* libre e inmovilizada en condiciones de invernadero. El ensayo de biorremediación tuvo una duración de 50 días, posteriormente, se cuantificaron las poblaciones microbianas heterótrofas (UFCg⁻¹) por dilución seriada y conteo en placa, así como la concentración residual de hidrocarburos (mgkg⁻¹) por gravimetría, finalmente, se realizó un ensayo de genotoxicidad y citotoxicidad utilizando células de *Allium sativum*. La biorremediación mostró remoción significativa en todos los tratamientos con *T. erecta*, logrando porcentajes de remoción entre 31.92% y 55.96%. Por otra parte, la asociación de *T. erecta* y *A. vinelandii* libre, presentó el mayor incremento de microorganismos heterótrofos totales con 3.83×10^{10} UFC/g de suelo ($P=0.0000$). De igual manera, se evaluaron los parámetros fisiológicos de *T. erecta* mediante el Índice de Calidad de Dickson, revelando un valor óptimo para los tratamientos con plantas sin perlas de alginato ($P=0.0250$). No obstante, se observó efecto citotóxico y genotóxico en todos los tratamientos (Índice mitótico $\leq 50\%$, $\chi^2 \geq 3.84$, respectivamente), puntualizando la importancia de estudios de toxicidad en ensayos de biorremediación.

Abstract

The growing energy demand for oil and its derivatives has caused a high incidence of environmental events that negatively affect ecosystems. In rural areas, the effects on populations dedicated to agriculture have increased. For this reason, in recent decades viable alternatives have been sought to remedy contaminated agroecosystems without slowing down their production; among which bioremediation techniques stand out, which represent sustainable biological technologies for the restoration of contaminated agricultural soils. Therefore, the objective of this research was the bioremediation of agricultural soil contaminated with diesel using phytoremediation treatments with *Tagetes erecta* and bioaugmentation with free and immobilized *Azotobacter vinelandii* under greenhouse conditions. The bioremediation test lasted 50 days, subsequently, the heterotrophic microbial populations (CFUg⁻¹) were quantified by serial dilution and plate count, as well as the residual concentration of hydrocarbons (mgkg⁻¹) by gravimetry, finally, performed a genotoxicity and cytotoxicity assay using *Allium sativum* cells. Bioremediation showed significant removal in all treatments with *T. erecta*, achieving removal percentages between 31.92% and 55.96%. On the other hand, the association of *T. erecta* and free *A. vinelandii* presented the highest increase in total heterotrophic microorganisms with 3.83×10^{10} UFC/g in soil ($P=0.0000$). Similarly, the physiological parameters of *T. erecta* were evaluated using the Dickson Quality Index, revealing an optimal value for treatments with plants without alginate beads ($P=0.0250$). However, a cytotoxic and genotoxic effect was observed in all treatments (mitotic index $\leq 50\%$, $\chi^2 \geq 3.84$, respectively), pointing out the importance of toxicity studies in bioremediation trials.

Capítulo I

ORGANIZACIÓN DEL

TRABAJO

1.Organización del trabajo

1.1.Antecedentes

La creciente demanda energética del petróleo y sus derivados ha ocasionado una alta incidencia de eventos ambientales que afectan negativamente los ecosistemas, relacionados al derrame de combustible (Bernal-Figueroa, 2014), siendo un fenómeno de trascendencia en diferentes culturas a nivel mundial, por lo que es imperativo evaluar procesos que garanticen la sostenibilidad del suelo para bien de la humanidad (Castillo-Rogel *et al.*, 2020).

En ciertos lugares del país, la explotación de hidrocarburos no ha tenido un impacto totalmente positivo en la disminución de los niveles de pobreza, no obstante, ha causado la confiscación de tierras ejidales, ocasionando el abandono de la producción agrícola, la contaminación de suelos y aguas, y, en general, el descontento social (Nuñez-Terrones *et al.*, 2020). En las zonas rurales, han incrementado las afectaciones en las poblaciones dedicadas a la agricultura, teniendo perjuicios socioeconómicos y llevando a la pobreza alimentaria y marginación de la población (Pérez-Muñoz *et al.*, 2019).

Los derrames de hidrocarburos en suelos agrícolas fértiles han causado varios estragos, y pese a que empresas han realizado biorremediación, para volverlos nuevamente productivos posterior a un tiempo prolongado, unos quedan inutilizados, yermos o como muladares (Cavazos-Arroyo *et al.*, 2014).

En estados como Tabasco donde la explotación de hidrocarburos inició desde los años 70s, tornándose un pilar en la economía mexicana (Trujillo-Narcía *et al.*, 2012), se establecieron infraestructuras como pozos, ductos, plantas petroquímicas, entre otras, provocando afectaciones en las actividades agrícolas, así como la marginación, rezago, y

pobreza en la población rural, debilitando el balance de la agricultura tradicional (Méndez-Sánchez *et al.*, 2019).

Tan solo entre los años 2010 a 2014 los estados de Nuevo León, Tamaulipas, Veracruz, Chiapas, Tabasco, Puebla y Campeche fueron afectados por el derrame en suelo y afluentes de agua de un total de 93.32 mdb de petróleo (Domínguez-Sánchez *et al.*, 2018).

Actualmente en México, existen aproximadamente 4 mil 500 sitios contaminados a causa de fugas de gasolina o hidrocarburos en ductos de Petróleos Mexicanos (Ángel, 2018), sumando los derrames de hidrocarburos por “*huachicoleo*” que hasta 2018 se reportaron un total de 12,581 tomas de disposición clandestina (PEMEX, 2018).

El daño ocasionado por los derrames de hidrocarburos, dependen del tipo de petróleo y su procedencia. Los productos livianos como la gasolina y el diésel son más tóxicos que los crudos ya que se evaporan a gran velocidad (Rivas-Trasancos *et al.*, 2020), por tales motivos, el diésel se considera como un contaminante de relevancia, por su amplia distribución y uso en áreas urbanas en distintos sectores (Salinas-Vera, 2019). Se estima que para 2027, este combustible alcanzará una producción de 640.6 mbd, superior a la producción actual, además de que, en los próximos 15 años, se espera que la demanda sea del 31.4% en el sector transporte como resultado de su uso intensivo (SENER, 2013)

1.1.Planteamiento

Las actividades relacionadas con las fases de exploración, refinación, falta de mantenimiento, transporte y almacenamiento del petróleo y sus derivados por Petróleos Mexicanos (PEMEX), han provocado que en México existan 4 mil 509 sitios contaminados (López, 2019). Estas actividades suelen ocasionar derrames, infiltraciones, descargas o vertidos de hidrocarburos, que sumado a la disposición clandestina o “*huachicoleo*”, ha ocasionado graves estragos sociales, económicos y ambientales (Cavazos-Arroyo *et al.*, 2014).

En el informe general de la cuenta pública, se identificaron la existencia de 6,537 tomas clandestinas, de las cuales el 57 por ciento se ubicó en dos sectores de Guanajuato con 3729 tomas (ASF, 2017). Sin embargo, en 2018 se reportaron a Puebla, Hidalgo y Guanajuato, como los estados con mayor disposición clandestina, siendo el primero, el de más tomas con 1,815 (PEMEX, 2018).

Por otro lado, los campos petroleros de mayor producción de barriles de crudo diarios, localizados en la cuenca sureste abarcando principalmente los estados de Tabasco, Veracruz y Chiapas (SENER, 2020), en este sentido, existen diversas investigaciones que enfatizan una relación directa con los impactos negativos al medio ambiente debido a las actividades propias de este sector, y muestran que con el incremento de las intervenciones asociadas con la producción de petróleo crudo, se estimula el riesgo de derrames, conllevando al deterioro de los ecosistemas (Morales-Bautista *et al.*, 2019).

La toxicidad inherente del petróleo crudo causa transformaciones en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, afectando la densidad y diversidad de las bacterias y

hongos rizosféricos, perjudicando secundariamente el desarrollo de especies vegetales, por alteraciones en su crecimiento y reproducción, provocando a su vez la merma de la abundancia y riqueza de la fauna presente (Yóplac *et al.*, 2020).

De igual manera los hidrocarburos se acumulan formando una capa hidrofóbica, causando la reducción y la inhibición de crecimiento vegetal, alterando los microorganismos del ambiente edáfico (Díaz-Martínez *et al.*, 2013), modificando las propiedades físicas y químicas del suelo, afectando la fertilidad del suelo y el rendimiento de las cosechas por los cambios de pH, salinidad, compactación y reducción de nutrientes (Cabrera-Lobelo y Unibio-Salcedo, 2019), provocando consecuencias importantes en el ambiente y el ser humano, ocasionando problemas graves en la salud, principalmente si se incorporan en la cadena trófica (López *et al.*, 2016).

Los hidrocarburos pueden acumularse mediante la inhalación de vapores y partículas, ingestión directa y contacto, lo que representa un riesgo para la población (Martel-Valles *et al.*, 2017), la exposición de manera aguda y crónica pueden desencadenar efectos para la salud afectando diversos órganos del cuerpo humano, dependiendo de sus propiedades químicas (Ministerio de Salud y Protección Social, 2018).

Por tanto, la Alianza Mundial para los suelos aconseja el fomento de regulaciones estrictas, y controles eficaces de los gobiernos, para limitar la acumulación de contaminantes por encima de los límites críticos para la salud humana y disminuir el porcentaje de suelos contaminados (Trejos-Delgado, 2017).

No obstante, las tecnologías o tratamientos de remoción de compuestos petrolíferos en suelo son muy limitadas, demasiado costosas y parcialmente efectivas, persistiendo

residuos de sustancias xenobióticas nocivas en él, que alteran su composición, transformándolo en un suelo extenuado que toma varios años en recuperar su vitalidad (Muñoz-Cuaical, 2016), el diésel posee un contenido elevado de hidrocarburos aromáticos y pocos componentes oxigenados, por lo que suele ser más deletéreo que algunos petróleos crudos y considerarse resistente a la degradación (Periche-Fiestas, 2015), dando relevancia a la investigación y aplicación de técnicas biológicas de descontaminación de suelos.

1.2. Justificación

En México, la creciente contaminación de suelos agrícolas por hidrocarburos es causada por procesos y actividades ligadas a la exploración, extracción, transporte y comercialización del petróleo y sus derivados (Gerónimo-Urrutia y Vázquez-Silva, 2017; Velásquez-Arias, 2017). Por lo que es preciso hallar la forma más efectiva de preservar y restaurar los daños causados al medio ambiente (López, 2019; Martínez-Hernández, 2019).

En la remediación de suelo contaminado por hidrocarburos de manera convencional, se incluyen procedimientos como la excavación, la incineración y la disposición final del suelo contaminado, lo cual, provoca la pérdida de este, un recurso natural invaluable que toma miles de años en formarse (Carrillo *et al.*, 2015), igualmente se llevan un largo tiempo y requieren gran volumen de material y en algunos casos múltiples procesos, para llevarse a cabo, propiciando costos elevados (Cruz-Acosta *et al.*, 2015). En contraste, las técnicas biológicas de descontaminación se reconocen como simples, de fácil aplicación, efectivas y aceptables, que presentan riesgos mínimos para la salud humana, animal o vegetal, y además no requiere algún tratamiento posterior (Rivera-Ortiz *et al.*, 2018).

La biorremediación, se refiere al aprovechamiento de la microbiota autóctona como bacterias individuales o en consorcio que degradan, remueven o transforman hidrocarburos que se encuentran en suelos (Sapuppo, 2017), para llevar a cabo su degradación, disminuyendo la concentración de los mismos hasta niveles permitidos sin la generación de compuestos dañinos (Hernández-De la Cruz, 2019), presentando diversas ventajas con respecto a los métodos de tratamientos comunes, ya que es económico y de bajo costo (Silvana-Álvaro *et al.*, 2017). Dentro de las técnicas de biorremediación, la fitorremediación consiste en la remoción, transferencia, degradación y neutralización de compuestos

orgánicos, inorgánicos y radioactivos perjudiciales, además de que posee un impacto regenerativo en áreas donde se aplica y su capacidad extractiva se mantiene debido al crecimiento vegetal (Buendía-Ríos *et al.*, 2014), la efectividad de esta tecnología reside en la capacidad de la planta en tolerar, absorber o acumular los contaminantes y transformarlos en otras sustancias que no sean nocivas para la salud y el medio ambiente (Bernal-Figueroa, 2014). En ese sentido, las plantas mediante la estimulación de la actividad microbiana promueven la degradación de hidrocarburos y además de oligoelementos que pueden ser absorbidos o acumulados por los tejidos (Robichaud *et al.*, 2019).

Existe una amplia diversidad de especies empleadas como alternativa para la remediación del suelo contaminado por hidrocarburos, ya que son capaces de reducir los niveles de hidrocarburos totales del petróleo e hidrocarburos aromáticos policíclicos (Peña-Murillo *et al.*, 2019), seleccionada principalmente por su potencial fisiológico (Peña-Salamanca *et al.*, 2013).

En este sentido, la especie ornamental *Tagetes erecta* de distribución mundial (Liu *et al.*, 2011), ha sido ampliamente cultivada por su uso con fines decorativos en jardinería y en diversos eventos sociales y religiosos (Tandel *et al.*, 2021) e igualmente con fines curativos dado que los extractos de sus hojas poseen actividad farmacológica hepatoprotectiva, antimicrobiana, antioxidante y analgésica (Gopi *et al.*, 2012), y además de su importancia comercial y económica, son aptas para la fitorremediación de hidrocarburos de petróleo en suelos, tolerando concentraciones de hasta $90 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (Prematuri *et al.*, 2019).

En este mismo contexto, la bioaumentación, es una técnica ampliamente utilizada en ensayos de fitorremediación, donde se inoculan poblaciones viables artificiales al medio con la capacidad de degradación del contaminante (Beltrán-Pineda y Gómez-Rodríguez, 2016).

Azotobacter vinelandii, es una bacteria gramnegativa, diazótrofa del suelo, con la capacidad de producir compuestos nitrogenados importantes, así como de fijar de un 10-30% del nitrógeno total en la rizosfera (Tec-Campos *et al.*, 2020), y que además contribuye de manera significativa en la remoción de contaminantes como los hidrocarburos (Suryatmana *et al.*, 2018; Chaudhary *et al.*, 2019).

No obstante, la bioaumentación precisa inóculos que no solo degraden, sino que además logren sobrevivir al contaminante durante un tiempo, por lo que la inmovilización en portadores de gel polimérico es una manera de proporcionar estabilidad funcional y viabilidad en condiciones desfavorables para el microorganismo (Kuyukina *et al.*, 2013).

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo es evaluar el potencial de *Tagetes erecta* y *Azotobacter vinelandii* inmovilizada en condiciones de invernadero para la remoción de diésel en suelos agrícolas.

1.3.Objetivos

1.4.1. General

- Evaluar el potencial de *Tagetes erecta* y *Azotobacter vinelandii* inmovilizada, mediante la cuantificación de diésel residual, para la remoción del contaminante en suelos agrícolas en condiciones de invernadero.

1.4.2. Específicos

- Estudiar las características físicas, químicas y biológicas del suelo contaminado con diésel muestreado en la región de Acatzingo, Puebla, México, de acuerdo con la NOM-021-RECNAT-2000.
- Implementar inóculos de *Azotobacter vinelandii* (líquido y perlas de alginato).
- Desarrollar ensayos de biorremediación con plántulas de *Tagetes erecta* en asociación con *Azotobacter vinelandii* en suelo agrícola contaminado con diésel.
- Evaluar los parámetros fisiológicos de *Tagetes erecta* de acuerdo con el Índice de Calidad de Dickson.
- Evaluar el potencial daño genético y celular del suelo contaminado y biorremediado a través de técnicas de citotoxicidad y genotoxicidad utilizando *Allium sativum* como bioindicador.

1.4.Hipótesis

- *Ha:* Al menos uno de los tratamientos utilizando *Tagetes erecta* y *Azotobacter vinelandii* permite mayor remoción diésel en suelos agrícolas contaminados en condiciones invernadero.
- *Ho:* *Tagetes erecta* y *Azotobacter vinelandii* no permiten una remoción significativa de diésel en suelos agrícolas contaminados en condiciones invernadero.

1.5.Pregunta de investigación

¿La especie *Tagetes erecta* y *Azotobacter vinelandii* inmovilizada tienen la capacidad de degradar diésel en suelos agrícolas contaminados en condiciones de invernadero?

1.6.Alcances y limitaciones

La investigación se llevará a cabo en condiciones de invernadero en las instalaciones del CITAP-UPAEP, en macetas con suelo muestreado de la región de Acatzingo, Puebla, evaluando la degradación de diésel en un lapso de 50 días, ofreciendo una opción viable de siembra para los agricultores mientras se realiza la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos.

Capítulo II

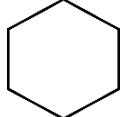
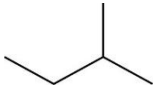
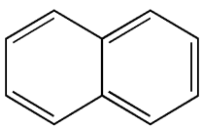
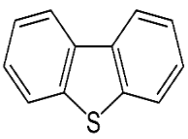
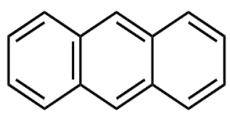
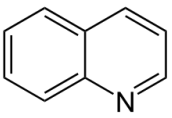
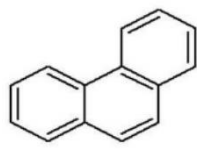
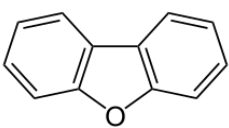
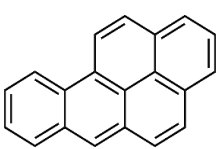
MARCO TEÓRICO

2.Marco teórico

2.1.Química del diésel

Los hidrocarburos se dividen en dos clases principales; los alifáticos, que a su vez se subdividen en alcanos, alquenos, alquinos y sus análogos cíclicos, que puede ser de cadenas abiertas o cerradas, saturados e insaturados, mientras que la segunda clase, los aromáticos, que poseen propiedades especiales asociadas con el anillo del benceno (Riveroll-Larios, 2014). En la Tabla 2, se observan ejemplos de estructuras químicas de cada grupo de los hidrocarburos.

Tabla 2.1. Estructuras químicas del diésel

Alcanos		Iso/cicloalcanos	
	n- propano		Ciclopentano
	n- butano		Ciclohexano
			Isopentano
Hidrocarburos aromáticos policíclicos		Compuestos oxigenados, azufrados y de nitrógeno.	
	Naftaleno		Dibenzotiofeno
	Antraceno		Quinoleína
	Fenantreno		Dibenzofurano
	α -Benzopireno		

Otra clasificación dada por la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, que agrupa los hidrocarburos en 3 fracciones; fracción ligera, cuando las moléculas contienen entre 5 y 10 átomos de carbono; fracción media, cuando las moléculas contienen entre 10 y 28 átomos de carbono y pesada, cuando contengan más de veintiocho átomos de carbono (DOF, 2012).

El diésel, conocido como petrodiesel, integra la fracción mediana del crudo de petróleo y está compuesto por átomos de carbono de entre 10 y 25, predominando los que tienen entre 15 y 17 carbonos, lo que da como resultado puntos de ebullición que oscilan entre los 149 y 371 °C (Lladó-Fernández, 2012; Arias-Gilart *et al.*, 2018), obtenido de la fracción destilada denominada gasóleo (Villanueva-Abanto, 2012).

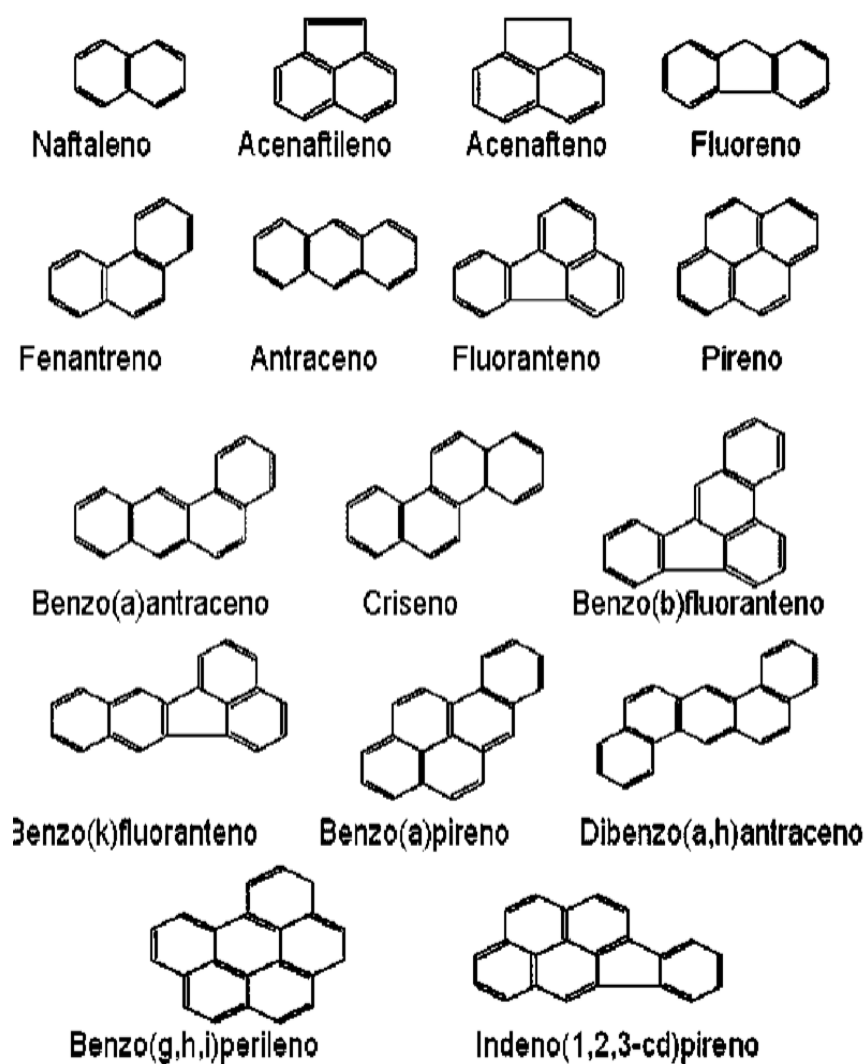
El diésel es líquido y comprende una mezcla compleja de compuestos, siendo aproximadamente el 40% de alcanos, 40% de iso/ciclo alcanos, 20% de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y un porcentaje muy bajo de compuestos oxigenados, azufrados y de nitrógeno (Quispe-Huanca, 2019). Los HAPs son los compuestos orgánicos más tóxicos del diésel calificados como agentes carcinogénicos, no obstante, algunos elementos como la toxicidad penden de su estructura química, sin embargo, todos poseen una elevada recalcitrancia (Onofre-Dolores *et al.*, 2013), ya que no se queman con pericia y se acumulan prolongadamente en el ambiente (Gran-Scheuch, 2015). En el ser humano, entran fácilmente por el tracto gastrointestinal y en la piel pueden absorberse hasta en un 75%, algunos de estos compuestos se relacionan con problemas de replicación cromosómica y defectos en el ADN, desarrollando riesgo de cáncer, mutagénesis y teratogénesis en fetos (Barois *et al.*, 2018). En la Tabla 2.2 se pueden observar algunas de las consecuencias por exposición relacionada a los componentes de los HAPs.

Tabla 2.1.2. Recopilación de estudios realizados de genotoxicidad y citotoxicidad de compuestos orgánicos, relacionados a HAPs

Contaminante	Matriz	Resultados relevantes	Bioensayo	Referencias	País
Fenantreno	Agua	Formación de micronúcleos y alteraciones morfológicas nucleares en eritrocitos.	<i>Astyanax bimaculatus</i>	gr. Santamaría <i>et al.</i> , 2012	Colombia
Mezcla compleja de hidrocarburos	Aire	Daño progresivo al ADN en un 80 %, por exposición crónica.	Sangre heparinizada humana	Torres <i>et al.</i> , 2015.	Colombia
MP<2.5 µm	Aire	Se encontraron quiebres del ADN, en concentración 30 µg/mL se mostró mayor daño genotóxico (65%).	Líneas celulares CHO-K1 y Jurka	Betancur-Sánchez, 2016	Colombia
Residuos mineros, industriales, agrícolas, petroleros	Agua	Alta citotoxicidad, alteraciones de los índices de fases y presencia de aberraciones cromosómicas.	<i>Vicia faba</i>	Beltrán-Orbegoso, 2017.	Perú
Mezcla de contaminantes orgánicos.	Agua	Alto porcentaje de daño al ADN por rotura de una simple cadena, atribuido a compuestos como hidrocarburos alifáticos, n- alcanos y HAPs	<i>Heleobia australis</i>	cf. Martínez, 2017.	Uruguay
Benzo[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, indeno[1,2,3-c,d]pireno y dibenzo[a,h] antraceno	Aire	Índice de mutagenicidad >2 ocasionando daño en el material genético.	Linfocitos	Meléndez-Gélvez <i>et al.</i> , 2017.	Colombia

Los HAPs, contienen una estructura de anillos aromáticos conjugados, que les dota de una resistencia a agentes químicos, poseen poca solubilidad en agua, la cual decrece al incrementar su peso molecular, volviéndolos más lipofílicos, lo que los hace potencialmente bioacumulables, impactando en mayor medida en el medio ambiente (Mireles-Morales *et al.*, 2013), en su estructura hay al menos dos anillos aromáticos, 16 de ellos se considera de vital importancia su degradación, (Véase Figura 2.1), ya que pueden residir más de 20 años en el ambiente (Ortiz-Salinas *et al.*, 2012).

Figura 2.1. Hidrocarburos aromáticos policíclicos de prioridad para su degradación



2.2.Biorremediación

La descomposición microbiana de hidrocarburos es de considerable importancia económica (Pérez-Vargas, 2015), y ha demostrado ser eficiente y propicia, por no causar impactos negativos en el sitio afectado, puede ser útil para retirar algunos de los compuestos tóxicos del petróleo, lo que brinda una solución más fácil y completa que otras tecnologías mecánicas y de un costo menor (Acuña *et al.*, 2012). En la Tabla 2.3 se describen algunas de las técnicas convencionales fisicoquímicas, químicas y térmicas utilizadas para la recuperación de suelo

Tabla 2.2. *Técnicas fisicoquímicas, químicas y térmicas de recuperación de suelos.*

Clasificación	Técnica	Descripción	Referencias
Fisicoquímicas	Lavado de suelo	Técnica que se basa en el uso de compuestos químicos, que reaccionan con el contaminante para aumentar la movilidad del contaminante y así eliminarlo.	Hernández-López, 2012.
	Extracción de vapores	También conocida como venteo la cual se fundamenta en la generación de un flujo de aire controlado, generándose un gradiente de presión, creando un vacío a través de pozos verticales o trincheras horizontales.	Yagu al-Barzola, 2020.
	Electromigración	Técnica aplicable a suelos de baja permeabilidad, con una diferencia de potencial de bajo voltaje, mediante el movimiento de especies iónicas del suelo disueltas en un fluido mediante un campo eléctrico, principalmente compuestos orgánicos polares.	Martínez-Barrios, 2020; Martínez-Prado, y Soto-Álvarez, 2017.
Químicas	Oxidación	Se basa en la oxidación química con diversas sustancias como el reactivo de Fenton, el ozono, peróxido-ácido, KMnO_4 , H_2O_2 , persulfato de sodio	Cuartas, 2012.
<i>Continuación de tabla 2.2</i>			

Clasificación	Técnica	Descripción	Referencias
	Fotocatálisis	Se fundamenta en que un material conductor como el TiO ₂ , se aplica luz ultravioleta conllevando a la generación de radicales libres, hidroxilo, provenientes de la hidrólisis del agua y del oxígeno del aire, generando los procesos avanzados de oxidación y reducción de los contaminantes.	Martínez-Jara, 2017.
Térmicas	Desorción térmica	Proceso que hace uso de calor directo o indirecto para volatilizar los contaminantes, pasándolos de la fase sólida que los contiene a la fase vapor, utilizando gas de combustión o gas inerte, puede ser Ex situ o In situ.	Marín-San Pedro, 2010.
	Vitrificación	Técnica que hace uso de temperaturas de entre 1,000-1,700°C para calentar el suelo, lo cual resulta en una vitrificación de este.	Ledezma-Villanueva, 2016.

Por su parte, la biorremediación es una tecnología de remoción de contaminantes mediante el uso de microorganismos con capacidad de integrar el contaminante a su material celular (Onofre-Dolores *et al.*, 2013) y consta de diversas técnicas biológicas para la recuperación de suelos, puesto que las bacterias contribuyen a la remoción de HAPs por mineralización o cometabolismo (Torri *et al.*, 2018), las cuales se describen en la Tabla 2.4. Sin embargo, las técnicas de biorremediación comunes son el bioaumento y la bioestimulación, ambas con la posibilidad de ser aplicadas *in situ* o *ex situ* (Trujillo-Toro y Ramírez-Quirama, 2012), que, en conjunto con otras técnicas como la fitorremediación, aceleran la velocidad de eliminación del contaminante (Medina, 2017), mediante el uso de la interacción planta-microorganismo, en la cual las plantas brindan nutrientes a los

microorganismos, los cuales a su vez promueven el crecimiento vegetal al disminuir y neutralizar los contaminantes del suelo (Borowik y Wyszowska, 2018).

Tabla 2.2.1. Técnicas biológicas de recuperación de suelos.

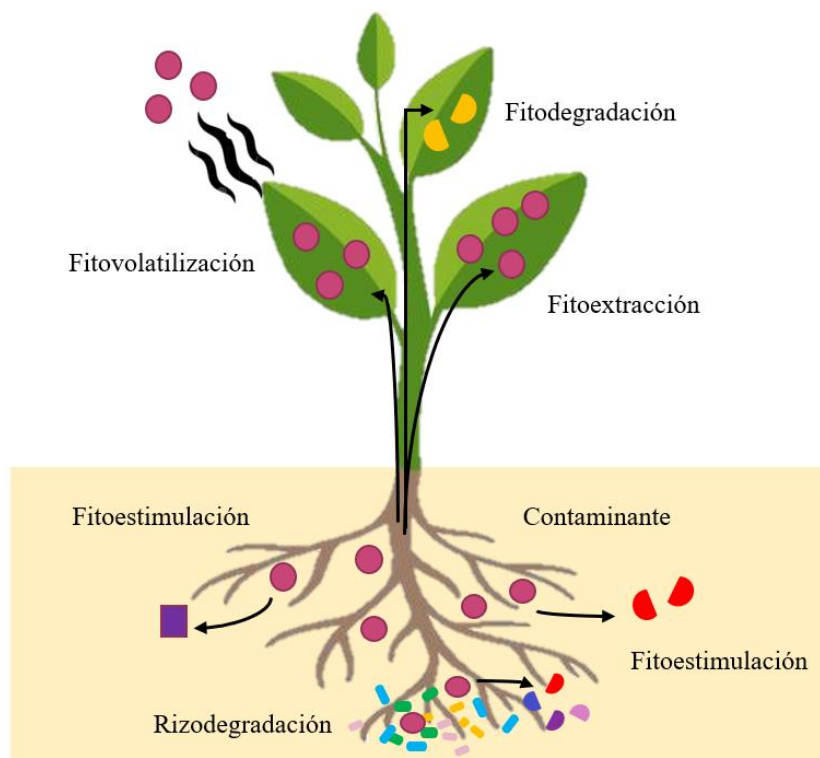
Técnicas	Descripción	Autor
Bioaumentación	Tecnología que hace uso de la adición de microorganismos exógenos o el incremento de microorganismos nativos con capacidad de degradación de los compuestos contaminantes para aumentar la microbiota autóctona.	Pérez-Vargas, 2015.
Bioestimulación	Es la aplicación de humedad y nutrientes básicos como nitrógeno y fósforo, con el objetivo aumentar la actividad de la microbiota autóctona e inducir la mineralización de compuestos orgánicos	Rivera-Ortiz <i>et al.</i> , 2018.
Fitorremediación	Es la capacidad de ciertas plantas para absorber, acumular, metabolizar, volatilizar o estabilizar contaminantes presentes en el suelo, aire, agua o sedimentos	Delgadillo-López <i>et al.</i> , 2011.
Biosurfactantes	Consiste en la disminución de la tensión superficial para aumentar la solubilidad de los hidrocarburos.	Prakash <i>et al.</i> , 2020
Atenuación natural controlada	Consiste en aprovechar y potencializar los procesos naturales para reducir o eliminar los contaminantes, es de bajo costo, sin embargo, se requiere de un tratamiento previo.	Leal-Castellanos, 2011.

2.3.Fitorremediación de hidrocarburos

El proceso de descontaminación por plantas depende de varios factores como las características fisicoquímicas del contaminante y del sitio contaminado, la cantidad, así como de las propiedades fenotípicas y genotípicas de cada especie vegetal, su tolerancia y capacidad para captar, absorber, acumular y/o degradar los contaminantes (Peralta-Pérez y

Volke-Sepúlveda, 2012). En la Figura 2.2, se observan los diferentes mecanismos de fitorremediación.

Figura 2.3. Representación de los mecanismos de fitorremediación utilizados por las plantas



Nota: Modificado de *Mecanismos de fitorremediación aplicables a metales pesados*, Muñoz Castellanos *et al.*, 2010. Revista Internacional de Ciencia y Tecnología Biomédica.

2.3.1. Fitodegradación

El metabolismo se da por medio de enzimas que catalizan la degradación, en los tejidos de la planta, activando reacciones de fase I, II y III (Schwitzguébel, 2015), siendo efectiva para remoción de compuestos orgánicos e inorgánicos como benceno, tolueno, etilbenceno, HAPs y xilenos (BTX) (Arenas-Moya y Hernández-Caro, 2012).

2.3.2. Fitoestabilización

Reside en la estabilización del contaminante en el entorno de la rizosfera promoviendo principalmente la disminución de la disponibilidad de metales, no obstante, también se utiliza para componentes de tipo orgánico hidrofóbicos como los PCBs, hidrocarburos derivados del petróleo tales como los HAPs, considerada un método más viable para la recuperación de grandes superficies de terreno contaminado (Bárcenas-Calero, 2012; IRNAS, 2015; Alcántara-Andonaire y Llatas-Llúncor, 2019).

2.3.3. Fitoextracción

También llamada fitoacumulación, emplea la capacidad de las plantas para absorber y extraer mediante las raíces de las plantas, los contaminantes (principalmente metales) y acumularlos en tallos y hojas, que posteriormente pueden ser extraídos, destruidas o recicladas, retirando el metal del suelo, así también se ha utilizado para la remoción de hidrocarburos (Bárcenas-Calero, 2012; Benigno-Vega, 2018).

2.3.4. Fitoestimulación

Se beneficia de la relación simbiótica de los exudados radiculares producidos entre la planta y ciertos microorganismos, dado por procesos fisiológicos como la producción de fitohormonas, compuestos volátiles, enzimas líticas, y sideróforos, esta técnica permite la eliminación de metales pesados (Jiménez-Reascos y Ramos-Collaguazo, 2019).

2.3.5. Fitovolatilización

Las plantas por medio de las raíces absorben contaminantes del suelo y los transforman en formas volátiles para ser liberados al medio, sirve para contaminantes orgánicos e inorgánicos, metales como el mercurio y el selenio son removidos con eficacia (Alcántara-Andonaire y Llatas-Llúncor, 2019; Beltran-Mallqui y Capristán-Terán 2020).

2.3.6. Rizodegradación

Se da la interacción entre la raíz y los microorganismos rizosféricos, los cuales toman como fuente de carbono los hidrocarburos del petróleo, convirtiéndolos en dióxido de carbono (CO₂), agua y biomasa, degradándolos y facilitando que la planta pueda tener una fácil asimilación de nutrientes (Pérez-Elizalde, 2018; Aparecida-Viesser *et al.*, 2020).

2.4. Especies ornamentales fitorremediadoras

El uso de plantas ornamentales con valía estética para el uso en investigaciones de fitorremediación, permite la observación y registro de las respuestas de las plantas al estrés (Jianv *et al.*, 2017). Además, proporcionan el embellecimiento de entornos resultando beneficioso en el ser humano, siendo ventajas de utilizar plantas ornamentales, el hecho de que no se incorporan en la cadena alimentaria (Ikeura *et al.*, 2015), pudiéndose desarrollar ecoturismo en el área contaminada, posterior al cultivo artificial, venderse como plantas de interior, convirtiéndose en un beneficio económico que minimiza una gran cantidad de gastos de disposición final (Liu *et al.*, 2018). En la tabla 2.4 se describen algunas plantas degradadoras de hidrocarburos de uso ornamental.

Tabla 2.4. Especies ornamentales para la fitorremediación de hidrocarburos.

Planta	Remoción	Condición experimento	del	Contaminante	Duración	País	Referencias
<i>Helianthus annuus</i>	10 ± 2%	Macetas Invernadero	en	Hidrocarburos totales de petróleo	40 días	Brasil	Martins <i>et al.</i> , 2014.
<i>Fire Phoenix</i>	99.40%	Macetas en cámara de crecimiento.	de	Fluranteno, pireno, Benzo[α]antraceno, criseno, Benzo[β] fluoranteno, Benzo[κ] fluoranteno, Benzo [α] pireno, dibenzo [α, h]antraceno	150 días	China	Liu <i>et al.</i> , 2014
<i>Tagetes patula</i> y <i>Mirabilis jalapa</i>	79.5-99.8% y 71.1-99.9%	Experimento cultivo en maceta	de	Benzo [α] pireno	92 días	China	Sun y Zhou, 2016.
<i>Fire Phoenix</i>	99.40%	Experimento cultivo en maceta	de	Hidrocarburos aromáticos policíclicos	150 días	China	Xiao <i>et al.</i> , 2015.
<i>Bassia Scoparia</i>	31.2-57.7%	Área vallada expuesta al ambiente natural		Hidrocarburos de petróleo y HAPs	5 meses	Egipto	Moubasher <i>et al.</i> , 2015.
<i>Iris dichotoma</i> y <i>Pall, Iris lactea</i>	19.36% y 19.35%	Macetas invernadero	en	Hidrocarburos totales de petróleo	90 días	China	Cheng <i>et al.</i> , 2016.
<i>Hylotelephium spectabile</i>	37.6–53.3%	Macetas invernadero	en	Hidrocarburos totales de petróleo	90 días	China	Cheng <i>et al.</i> , 2019.
<i>Zinnia hybrida</i> “Profusion White”	32%	Macetas en cámara de crecimiento	de	Hidrocarburos totales de petróleo	60 días	Japón	Kai <i>et al.</i> , 2018.
<i>Fire Phoenix</i> (Mezcla de <i>Festuca L.</i>)	64.57% y 40.93%	Macetas en cámara de crecimiento	de	Hidrocarburos aromáticos policíclicos- Cadmio	150 días	China	Dai <i>et al.</i> , 2020.
<i>Tagetes spp.</i>	21%-32%	Experimento cultivo en maceta	de	Hidrocarburos totales de petróleo	3 meses	Indonnesia	Prematuri <i>et al.</i> , 2019

2.4.1. *Tagetes erecta*

Es una especie ampliamente comercializada en México y el mundo, mejor conocida como “cempasúchil” o “flor de muerto”, utilizada como ornamento en ceremonias y rituales en el día de los muertos y como fuente de remedios medicinales, gracias a sus propiedades farmacológicas (Ventura-Martínez *et al.*, 2018).

Figura 2.4. *Tagetes erecta*



Es una planta de ramificación anual, de entre 60-90 cm de alto, erecta y de color que varían entre amarillo brillante, amarillo pardusco y naranja, con un interés comercial por los compuestos activos biológicos que posee y por su uso en tecnologías de fitorremediación redituables, por su uso en floricultura (Abrile *et al.*, 2021), así como por su empleo en el sector alimentario como aditivo y cosmético, por su contenido en xantofilas, estimándose que el cultivo de esta especie en distintas partes del mundo abarca más de 7000 hectáreas (Burlec *et al.*, 2021). para la comercialización de sus flores que tienen gran demanda en el mercado nacional e internacional, generando ingresos económicos tanto para los agricultores que la cultivan, así como, para quienes lo industrializan y lo exportan (Gutiérrez, 2007).

Se refiere que la especie *Tagetes erecta* además de ser usado para la producción de aceites esenciales, posee propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y citotóxicas, así como un potencial antidiabético y antilipidémico (Pérez-Ortega *et al.*, 2017).

Igualmente, la biomasa de sus raíces le confiere subsistencia y un elemento determinante para la remediación de TPH en suelos contaminados (Prematuri *et al.*, 2019). En un estudio realizado para la remoción de pireno, demostró una tasa de remoción de 68.61%, cuando se le aplicó bioaugmentación (Rajkumari *et al.*, 2021).

El pH óptimo para el crecimiento es ácido, sin embargo, también puede crecer en suelos de pH neutro o alcalino. Extiende sus raíces en cualquier tipo de textura de suelo ya sea seco o húmedo, sin embargo, no debe excederse la humedad por lo que se prefieren suelos bien drenados (Reyes-Robalino, 2019)

2.5. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en la remoción de hidrocarburos

La fitorremediación se combina con otras técnicas, como la inoculación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal para remoción de HAPs, que mejoran el crecimiento de las plantas en un 23% (Corona-Galicia, 2018). Las bacterias asociadas con las plantas que habitan la rizosfera pueden proporcionar un mejor crecimiento vegetal, debido al aumento de los nutrientes, la solubilización de fósforo inorgánico y la mineralización de fosfato, así como la producción de fitohormonas como las auxinas y el ácido indolacético, a partir de triptófano inoculado o derivados de hidrocarburos (Rojas-Contreras *et al.*, 2010; Esquivel-Cote *et al.*, 2013). En la Tabla 2.5, se muestran algunas de las funciones de las BPCV.

Tabla 2.5. Funciones de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal

Función	Descripción	Especies	Referencias
Solubilización de fosfato	Los fosfatos insolubles se transforman, en formas asimilables por medio de la captación o producción de sustancias por los microorganismos o por la quelación de elementos inhibidores de la solubilización	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus thioeparans</i> , <i>Paenibacillus rhizospherae</i> , <i>Paenibacillus lautus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> .	Restrepo-Franco <i>et al.</i> , 2015.
Producción de fitohormonas	Se estimula la germinación de semillas en etapas de envejecimiento, así como el crecimiento vegetal a causa de la producción de auxinas, lo que además aumenta la biomasa y alargamiento de las raíces.	<i>Rhizobium tropici</i> , <i>Bradyrhizobium sp.</i> , <i>Sinorhizobium sp.</i> , <i>Azospirillum sp.</i>	Marquina <i>et al.</i> , 2018.
Control biológico de fitopatógenos	Ciertos microorganismos promueven el crecimiento mediante la producción de sustancias insecticidas, antibióticos, o sideróforos que pueden inhibir el crecimiento de fitopatógenos.	<i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Pantoea ananatis</i> , <i>Brassica napus</i>	Ortiz-Galeana <i>et al.</i> , 2018.

Continuación tabla 2.5

Función	Descripción	Especies	Referencias
Fijación biológica de nitrógeno	Evitan la pérdida de una forma asimilable de N mediante la fijación de nitrógeno atmosférico, lo que incrementa la germinación y fructificación de las raíces conllevando a la disponibilidad de nutrientes para la planta.	<i>Pseudomonas</i> spp., <i>Agrobacterium</i> spp., <i>Pantoea</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp., <i>Bacillus</i> spp., <i>Klebsiella</i> spp., <i>Stenotrophomonas</i> spp., <i>Azotobacter vinelandii</i>	Gaviria-Giraldo et al., 2018.

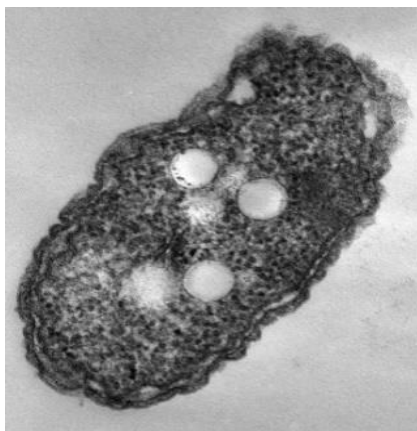
Ciertas especies bacterianas logran cumplir diversas funciones al mismo tiempo (González y Fuentes, 2017; Leal-Almanza et al., 2018).

Bacterias diazotrófas como el género *Azotobacter*, además del aporte de nitrógeno que hacen a través de la Fijación Biológica de Nitrógeno, pueden promover de forma directa el crecimiento de las plantas mediante diferentes mecanismos de acción (Hernández-Rodríguez et al., 2014).

2.6. *Azotobacter vinelandii*

Azotobacter vinelandii es una bacteria del suelo perteneciente a la gammaproteobacteria, fijadora de nitrógeno (Baars et al., 2016). El género *Azotobacter* considerado de vida libre y metabolismo heterotrófico aeróbico (Véase Figura 2.7), predomina en los suelos agrícolas, con concentraciones menores a 10^4 células por g de suelo, (Ebrahimi et al., 2017) y se exhibe tres formas diferenciales de su ciclo vegetativo, las células jóvenes se observan como bacilos móviles y las adultas esféricas grandes o pequeñas, mientras que las avejentadas se enquistan formando células cocoideas de tamaño mayor (Nava-López et al., 2017).

Figura 2.6. *Azotobacter vinelandii*



Nota: Recuperado de *Pon Azotobacter vinelandii en tu escape*, Nauka, 2010. Blog.

Pertenece a las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) puesto que acelera e incrementa el crecimiento de las plantas por su habilidad de producción de fitohormonas (Hindersah *et al.*, 2017) y diferentes tipos de sustancias como aminoácidos, antibióticos antifúngicos y sideróforos, y citoquininas (Chennappa *et al.*, 2019), lo cual favorece el desarrollo de macroporos, aumentando la velocidad de infiltración, permeabilidad y aireación, disminuyendo la plasticidad y la compactación del suelo (Molina-Solís, 2020), además, los cultivos fertilizados con estas bacterias y con nitrógeno químico, consiguen un aumento de producción, sobre las cosechas que únicamente es obtenido con fertilizante químico concentrado al 100 % (Díaz-Paredes, 2015).

2.7. Contaminantes biodegradados por *Azotobacter vinelandii*

Así también, la especie *Azotobacter vinelandii* posee la capacidad de degradar contaminantes orgánicos relacionados a hidrocarburos, así como compuestos inorgánicos tal y como se observa en la Tabla 2.7

Tabla 2.7. Contaminantes biodegradados por *Azotobacter vinelandii*

Contaminante	Remoción	Condición del experimento	Resultados importantes	Duración	Referencias
Petróleo crudo	66.83- 69.6%	Reactor de secuenciación por lotes	Los diazótrofos más allá de su función en la fijación biológica de nitrógeno, pueden utilizarse para contribuir a la mejora de la tasa de biodegradación. Los resultados con el consorcio <i>Azotobacter vinelandii</i> sugieren el cometabolismo de algunos productos microbianos solubles de <i>Pseudomonas sp.</i> , del petróleo crudo.	96 horas	Onwurah y Nwuke, 2004.
Cianuro de Sodio	69,7%	Fermentador de 3 L	Se comprobó por medio de la producción de metano la actividad de la nitrogenasa en el proceso de remoción de cianuro.	66 horas	Koksunan <i>et al.</i> , 2013.
Nitritos (NO ₂)	84.06 %	Biorreactor air lift de 1 L	Degrada concentraciones de hasta 25 mg/L y a mayor inóculo de biomasa la eficiencia de degradación se incrementa.	7 días	Díaz-Paredes, 2015.
Aceite de petróleo al 5%	60,29%	Escala de microcosmos en invernadero	Demostó un potencial de degradación mayor en comparación con el tratamiento control.	42 días	Suryatmana <i>et al.</i> , 2018.
Diésel 40 g/kg y petróleo 60 g/kg	95-97%	Laboratorio	El consorcio bacteriano que incluye <i>Azotobacter vinelandii</i> favoreció la supervivencia de <i>Dendrobena veneta</i> en concentraciones mayores de aceite.	5 meses	Chachina <i>et al.</i> , 2019.

Continuación tabla 2.7

Contaminante	Remoción	Condición del experimento	Resultados importantes	Duración	Referencias
Diésel	83.1%	Laboratorio en recipientes de poliestireno	El consorcio desarrollado con <i>Azotobacter vinelandii</i> compensó la limitación de nitrógeno y eliminó la necesidad de nitrógeno exógeno en la biorremediación.	40 días	Chaudhary <i>et al.</i> , 2019.
Clorpirifos al 1%	88%	Laboratorio	El crecimiento de <i>Azotobacter</i> se redujo ligeramente mediante la adición de 3% - 5% de forato al medio de cultivo, pero no al 1%	8 días	Chennappa <i>et al.</i> , 2019.
Iones de zinc	95.5216%	Laboratorio	Se obtuvo mayor absorción de iones de zinc en medio utilizando oxalato de amonio, como fuente de nitrógeno.	24 horas	El-Barbary y El-Badry, 2019.
Níquel (II)	88 %	Laboratorio en agitador rotatorio	Se aplicaron dos etapas con condiciones especiales con tamaño de inóculo de 0,1 x 10 ²⁹ UFC a o pH 7 y fuente de energía glucosa y oxalato de amonio como fuente de carbono y nitrógeno.	24 horas	El-Barbary y El-Badry, 2019.
Médula de Bonote	17%	Área cubierta en macetas	Reducción del contenido de lignocelulosas y tamaño de partícula, mejora del contenido de NPK y el producto resultante se considera efectivo estiércol para plantas.	25 días	Kumar y Shankar, 2019.
Aceite residual automotriz	De 35000 ppm se redujo a 1152 ppm	Invernadero	El suelo enriquecido facilita que <i>P. vulgaris</i> con <i>A. vinelandii</i> y <i>P. polymyxa</i> reduzcan la concentración en menor cantidad a la máxima permitida.	33 días	Marques-Benavides, 2020.

2.8. Inmovilización

La bioaumentación con microorganismos libres pueden verse afectado por diversos factores ambientales como la falta de control sobre el crecimiento, así como la exposición de estos a un ambiente nuevo relativamente hostil, sin embargo, la inmovilización ofrece ventajas como la adaptación microbiana y formación de microambientes para la degradación de compuestos recalcitrantes (Pérez-García, 2015)

Recientemente, se ha hecho uso de la inmovilización celular en el área biotecnológica para procesos como la biorremediación y biodegradación de contaminantes, observando que, a diferencia de las bacterias de vida libre, las inmovilizadas son más activas y exhiben diferencias en la expresión génica (Žur, *et al.*, 2016).

La preservación de los microorganismos en un material protector garantiza la supervivencia y viabilidad de las bacterias que degradan los hidrocarburos (Zhang *et al.*, 2019). Estudios revelan que la inmovilización en bioportadores, aumentan la biodegradación del petróleo crudo, la población y actividad bacteriana total a causa de la mejora del oxígeno, el traspaso de nutrientes y la capacidad de retención de agua (Bayat *et al.*, 2015).

El polímero orgánico más utilizado en procesos de inmovilización por su fácil manejo, baja o nula toxicidad y bajo costo es el alginato, el cual favorece a las células inmovilizadas, por otra parte, en recientes investigaciones las bases de poliuretano igualmente ofrecen una buena opción (Reyes-Reyes *et al.*, 2018).

Existen 2 tipos de inmovilización: la artificial en la cual las células se incorporan en una matriz formada mediante técnicas químicas o físicas, que consisten en suspender al microorganismo en una solución líquida con los monómeros de la macromolécula de

inmovilización y la natural dada por la adsorción espontánea de células a diferentes tipos de soportes, en los cuales las células se unen por interacciones no específicas débiles formando una matriz de polímeros extracelulares que las mismas secretan (Britos, 2012). En la tabla 2.8, se muestran ejemplos de matrices de inmovilización naturales y artificiales, y los usos en el área ambiental para la remoción de contaminante.

Tabla 2.8. Ejemplos de matrices naturales y artificiales y sus usos biotecnológicos

Matriz	Célula inmovilizada	Uso biotecnológico	Referencias
Espuma de poliuretano	<i>Prototheca zopfii</i>	Remoción de hidrocarburos en suelo	Garzón-Jiménez y Barragán-Huerta, 2008.
Zeolita clinoptilolita	Biomasa sulfato-reductora.	Tratamiento de efluentes con metales pesados	Gastélum-Rosas, 2014
<i>Luffa cylindrica</i>	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Fusarium solani</i> y <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Candida orthopsilosis</i> y <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , <i>Pseudomonas putida</i> y <i>Klebsiella variicola</i>	Degradación de hidrocarburos en ambientes acuáticos	Acosta Rubí, 2017
Goma gellan	<i>Rhodococcus</i> UKMP-5M	Degradación de cianuro	Maniyam <i>et al.</i> , 2017
Alginato de calcio	<i>Aspergillus niger</i>	Degradación de hexadecano	Baldera Saavedra y Noriega Pérez, 2018.
Esponja Luffa	<i>Scenedesmus sp.</i>	Remoción de nitrógeno, fósforo y cromo.	Rosales <i>et al.</i> , 2018
Perlas alginato	<i>Chlorella sp</i>	Remoción de plomo	Triviño-Tonato, 2018
Alginato de calcio	<i>Sphingomonas pseudosanguinis</i> y <i>Pseudomonas stutzeri</i>	Degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos de tres y cuatro anillos fenantreno y fluoranteno	Wang <i>et al.</i> , 2019

Continuación de tabla 2.8

Matriz	Célula inmovilizada	Uso biotecnológico	Referencias
Ácido bórico- CaCl ₂ en alcohol polivinílico- Alginato de sodio-Nano alúmina. Goma gellan	<i>Klebsiella sp</i> <i>Thalassospira profundimaris</i> strain M02	Degradación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos Biodegradacion de Carbazol	Xu <i>et al.</i> ,2019 Maliki <i>et al.</i> ,2020
Carbón activado	<i>Azotobacter sp</i>	Biofertilizante acuacultura.	en Gallegos <i>et al.</i> , 2014

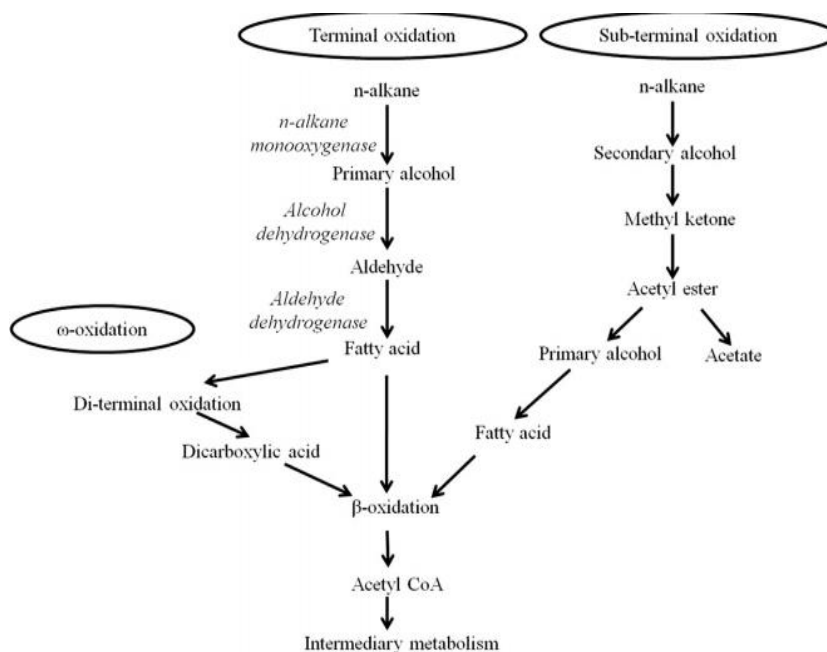
Investigaciones señalan que el método más adecuado para mantener la viabilidad de *Azotobacter* es la conservación mediante liofilización e inmovilización en polímeros secos como el alginato de sodio, polyox, goma de acacia y carragenina (Rojas-Tapias, 2013).

2.9. Mecanismos de biodegradación bacteriana para compuestos de diésel

2.9.1 Biodegradación de hidrocarburos alifáticos saturados

Los alcanos son más susceptibles a la biodegradación en comparación a los compuestos aromáticos (Abbasian *et al.*, 2015), y puede llevarse en condiciones anaerobias y aerobias, siendo esta última la más rápida, las vías de oxidación de alcanos se inician por una etapa de activación que implica la oxidación del sustrato por mecanismos, como son la oxidación terminal, diterminal y subterminal (Muskus-Morales *et al.*, 2013; Di-Martino 2015).

Figura 2.8. Esquema representativo de biodegradación de hidrocarburos alifáticos saturados



Nota: Recuperado de Varjani, 2017.

La oxidación terminal por acción de la enzima alcano-monooxigenasa (Figura 2.8), convierte a alcohol de cadena larga a los grupos metilo terminantes, consecutivamente el alcohol es oxidado por la enzima deshidrogenasa a aldehído y ácidos grasos, los cuales son degradados por medio de la β - oxidación a Acetil-CoA (Nzila, 2018; Muskus-Morales *et al.*, 2013).

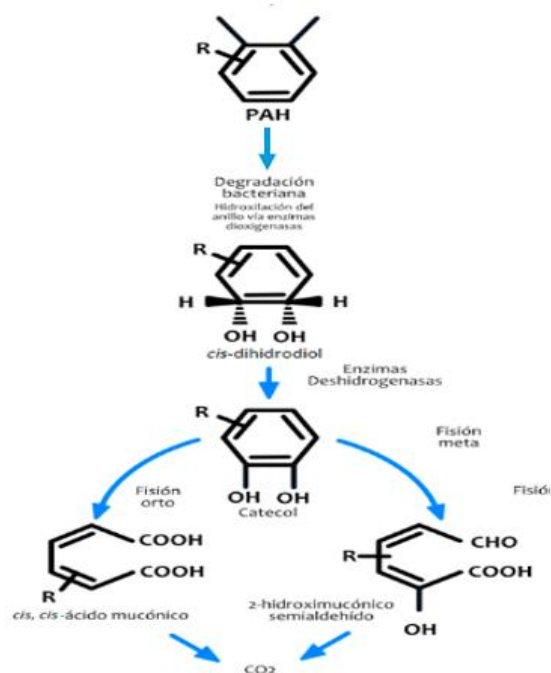
Las bacterias degradadoras de alcanos y cicloalcanos de entre 5 a 10 carbonos contienen alcano hidroxilasas pertenecientes a una familia específica de monooxigenasas citocromo P450 solubles, que son proteínas que catalizan la adición de oxígeno de diversos compuestos relacionados a hidrocarburos promoviendo su degradación (Izquierdo-Romero, 2013; Kothari *et al.*, 2013).

2.9.2 Biodegradación de compuestos aromáticos

La tasa de consumo disminuye a mayor número de anillos aromáticos a causa del incremento de hidrofobicidad, por lo que no son aprovechables a los microorganismos, por lo que tarda un tiempo estimado de 16 a 126 días para el fenantreno y de hasta 1 400 días para el benzo[α]pireno (García-Cruz y Aguirre-Macedo, 2015).

Para la biodegradación de los HAP existen diferentes mecanismos que esencialmente buscan romper el anillo aromático, las bacterias utilizan mono y dioxigenasas para la formación de un diol en los anillos aromáticos (Figura 2.9), lo cual facilita su ruptura formando ácido dicarboxílico que ingresan posteriormente como intermediarios del metabolismo del ciclo de ácido tricarboxílico (Varjani, 2017; Chiriví-Salomón, 2020).

Figura 2.9. Esquema representativo de biodegradación de HAPs*



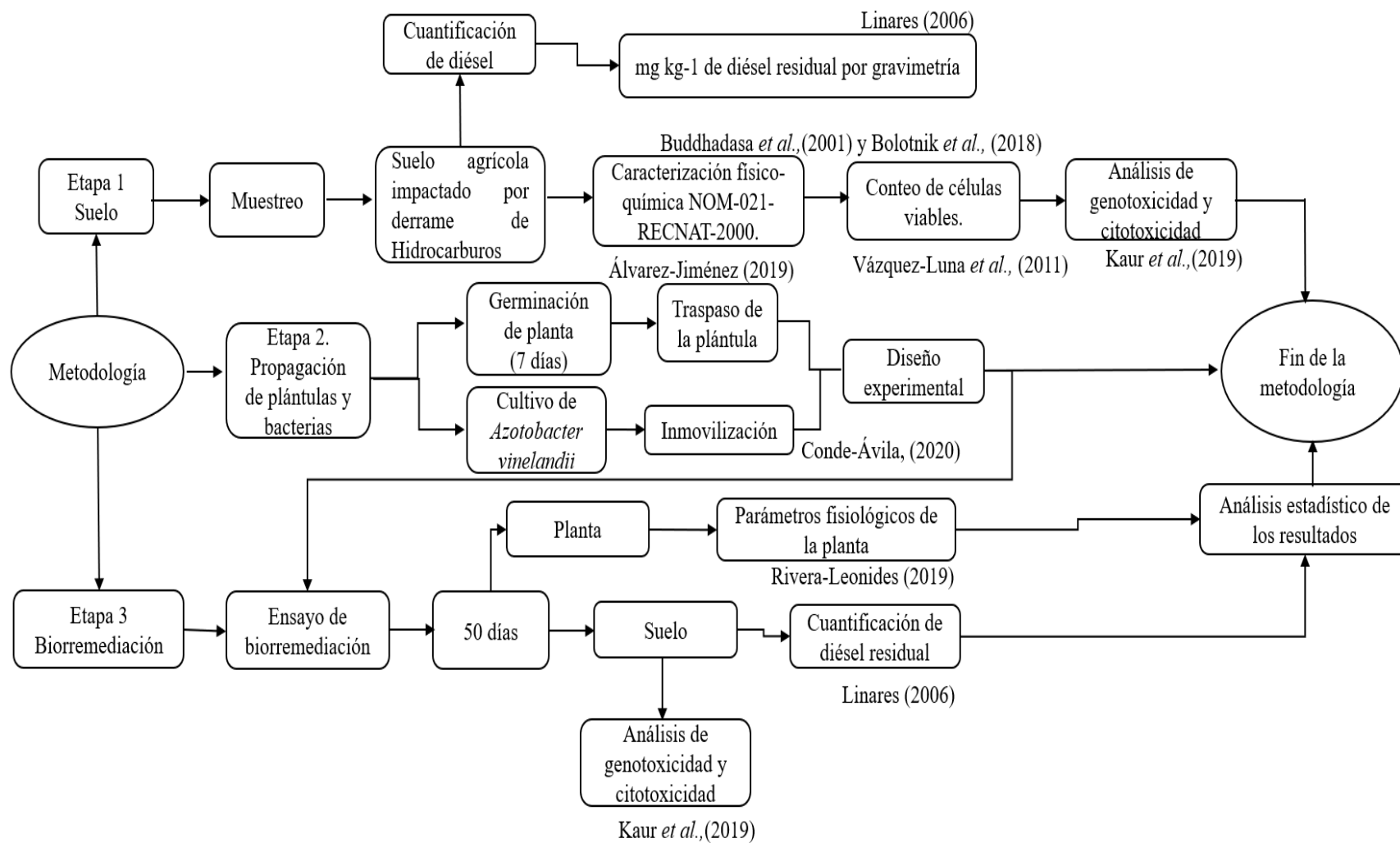
Nota: Esquema recuperado y modificado de Cota-Ruiz, 2019

Capítulo III

ESTRATEGIA

METODOLÓGICA

Figura 3.1. Metodología general de trabajo



Etapla 1. Suelo

3.1. Muestreo

Se identificó una zona agrícola impactada por derrame de hidrocarburos en la región de Acatzingo, Puebla, recolectándose 20 kg de suelo contaminado.

3.1.3. Cuantificación de mg kg⁻¹ de Diésel residual por gravimetría

La extracción del diésel contenido se cuantifico de acuerdo con el método de Linares (2006). Se pusieron a peso constante los tubos de ensaye de 15 ml con sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄), colocándolos en la estufa a 105°C por 24 horas.

Por triplicado, se procedió a la extracción del hidrocarburo de cada muestra, se realizó por baño ultrasónico, con una metodología adaptada de los procedimientos utilizados por Buddhadasa, *et al.* (2001) y Bolotnik *et al.* (2018). Se pesaron y mezclaron 3 g de suelo con sulfato de sodio anhidro, con una adición posterior de 15 ml de una solución diclorometano-acetona 1:1 (v/v) y se sometió a baño ultrasónico por 45 min con intervalos de 10 min de ultrasonicación y 5 min de reposo. Posteriormente, las muestras se transfirieron a tubos falcón de 15 ml para centrifugarse por 10 min a 2000 rpm. Por último, se recuperó el sobrenadante en los tubos previamente tarados y se dejó evaporar el disolvente en campana de extracción hasta sequedad. El diésel residual contenido en los tubos de ensayo, se utilizaron para los análisis gravimétricos en la determinación de partes por millón (ppm) de diésel residual, tomando en cuenta los siguientes cálculos:

RA= peso (mg) del tubo vacío a peso constante

RB= peso (mg) del tubo con el extracto de hidrocarburos

P = cantidad de suelo utilizado (g)

3.1.3.1. Porcentaje de remoción de diésel. El porcentaje de remoción del hidrocarburo para ambos métodos se calculará con la siguiente fórmula:

Donde:

$$\% \text{ Remoción HTPs} = \frac{HTPs \text{ inicial} - HTPs \text{ final}}{HTPs \text{ inicial}} \times 100$$

HTPs Inicial= Sumatoria de HTPs al inicio del Ensayo de biorremediación.

HTPs Final= Sumatoria de HTPs al final del Ensayo de biorremediación.

3.1.2. Caracterización de suelo

La caracterización física y química del suelo muestreado se realizó en base a la NOM-021-RECNAT-2000 (Álvarez-Jiménez *et al.*, 2019), los parámetros que se tomaron en cuenta y el método que se utilizó, se muestra en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1.4. Parámetros físicos y químicos del suelo*

Parámetro	Método
pH	AS-02
Materia orgánica	Ignición
Contenido de humedad	<i>Dager et al., 2018</i>
Textura del suelo	AS-09
Conductividad eléctrica	AS-18
Capacidad de Campo	Cap. Campo de Nápoles <i>et al.</i> ,2015
Nitrógeno total (%)	Kjeldahl
Fósforo (ppm)	Espectometría
* NOM-021-RECNAT-2000	

3.1.5. Conteo total de bacterias

El conteo bacteriano inicial del suelo contaminado se realizó por triplicado con un volumen de inóculo de 0.1 ml sobre agar nutritivo y se incubó a 29°C durante 48 horas. Se realizó el conteo de las colonias en las cajas de entre 30 y 300 colonias (Vargas Gutiérrez, 2010). Se realizaron diluciones seriadas base 10, utilizando el protocolo modificado de Orozco Corral *et al.*, (2016), diluyendo 1 g de suelo en 9 ml de agua estéril.

3.1.6. Análisis de daño genético y celular

Para observar la toxicidad del suelo contaminado (Galindo-Pérez *et al.*, 2017), se realizarán bioensayos con semillas de *Allium sativum* crecidas en suelo contaminado, para posteriormente evaluar la genotoxicidad y citotoxicidad del contaminante de acuerdo con el protocolo de Fiskesjö (1985) mediante el índice mitótico y conteo de aberraciones cromosómicas.

Etapas 2. Propagación de plántulas y bacterias.

3.2.1 Propagación de *Tagetes erecta*

Se realizó la siembra de 40 semillas *Tagetes erecta* de la marca Hortiflor® del Rancho los Molinos y se colocaron en invernadero casero de la marca Café Vita® con pellets de germinación de musgo canadiense, durante un periodo de 20 días. Después de la aparición de dos pares de hojas verdaderas se realizó el trasplante a las unidades experimentales (Tabla 3.2.3)

3.2.2 Inmovilización de *Azotobacter vinelandii*

3.2.2.1 Cultivo. Para la propagación de la cepa *A. vinelandii*, se realizó su cultivo en medio NBRC (composición en gr × L-1: extracto de levadura, 1; D-manitol, 5; K₂HPO₄, 0.7; KH₂PO₄, 0.1; MgSO₄ × 7H₂O, 1; pH 7 ± 0.05). Se inocularán matraces Erlenmeyer de 500 ml con 100 ml de medio de cultivo NBRC y se cultivarán a 28 °C durante 72 horas 200 rpm para obtener la población bacteriana máxima (Conde-Ávila 2020).

3.2.2.2. Curva de crecimiento de *Azotobacter vinelandii*. Para la evaluación del crecimiento de *Azotobacter v.*, se tomó la alícuota de 1 ml de un preinoculo reposado una noche previa, y se inoculo en matraces con cultivo NBRC para la propagación de la bacteria, posteriormente, se realizaron muestreos de 3 ml a las 0h, 0.5h, 1h, 1.5h, 2h, 2.5h , 4h ,5h ,22h ,24h, 26h, 28h, 48h,50h, 52h, 72h (Herrera-Gutiérrez y Millán-Arboleda, 2018), para el

registro de la densidad óptica por triplicado a 600 nm, y a su vez se tomó una alícuota de 1ml para la realización de diluciones seriadas y siembra en placa para la determinación de las unidades formadoras de colonia a los intervalos de tiempo establecidos para la lectura de las absorbancias (Stephenson, 2010).

3.2.2.3. Inmovilización encapsulación en alginato de sodio. La biomasa obtenida de *A. vinelandii* se encapsuló mediante la técnica descrita por Conde-Ávila (2020), se realizó la mezcla de 2 ml de inóculo, en una solución estéril de alginato de sodio a una concentración final de 2% (p / v), y se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. Posteriormente para la obtención de las perlas de encapsulación, se adicionó gota a gota una alícuota de la suspensión de alginato con *A. vinelandii* a una solución estéril de cloruro de calcio 0.1 M (CaCl₂). Las células inmovilizadas se conservarán a 15 °C y 40 ± 2% de humedad relativa (Rojas-Tapias, 2013).

3.2.2.4. Viabilidad de *Azotobacter vinelandii* inmovilizada en alginato de sodio. Se realizó la siembra de *Azotobacter vinelandii*, a la hora 0, 24, 48 y 72 horas, en placas Petri con medio NBRC con dos repeticiones por caja, dividiéndose en dos grupos de almacenamiento, a temperatura ambiente y en refrigeración.

3.2.2.5. Conteo de *Azotobacter vinelandii* inmovilizada. Para la obtención de la concentración bacteriana encapsulada, se procedió a macerar 1 gramo de las perlas obtenidas en un mortero esterilizado por Luz UV, durante 20 min, los residuos resultantes terminaron de disolverse en una solución salina a 0.85% estéril con agitación a 30° C, posteriormente se realizó el conteo por diluciones seriadas y siembra en placa de acuerdo con el protocolo modificado de Reyes-Reyes *et al.*, (2018) y su incubación a 29° C por 48 horas.

3.2.3. Diseño de experimentos

Se utilizaron 40 unidades experimentales de manera aleatoria para observar la remoción de diésel, los cuales se dividieron en 7 grupos de tratamientos con suelo contaminado en condiciones de invernadero y un tratamiento 0 para la observación de la microbiota autóctona (control negativo). Las unidades experimentales fueron macetas de 500 g para la plantación e inoculación de *Azotobacter* v. por maceta de acuerdo con el diseño experimental mostrado en la tabla 3.1. El diseño fue completamente aleatorizado con diseño de cuadrado latino (Véase figura 3.1), y las variables de respuesta serán; peso seco (g), peso húmedo (g), largo aéreo (cm), largo raíz (cm), ancho (cm), para la planta. Mientras que en el suelo se midió diésel residual (ppm), pH, conductividad eléctrica y materia organica.

Figura 3.2. *Esquema de ordenamiento de unidades experimentales en diseño de cuadrado latino*

T7	T6	T5	T4	T3
T6	T5	T4	T3	T2
T5	T4	T3	T2	T1
T4	T3	T2	T1	T0
T3	T2	T1	T0	T7
T2	T1	T0	T7	T6
T1	T0	T7	T6	T5
T0	T7	T6	T5	T4

Figura 3.3. *Unidades experimentales en cuadrado latino en invernadero*



Tabla 3.2.3. *Diseño experimental*

Tratamientos	Suelo contaminado	Repeticiones
T0	X	5
T1	X	5
T2	X	5
T3	X	5
T4	X	5
T5	X	5
T6	X	5
T7	X	5

* T0= Atenuación natural

T1= Planta

T2=bacteria (Líquido)

T3= bacteria (Líquido) + Planta

T4= bacteria (perlas de alginato de sodio)

T5= bacteria (perlas de alginato de sodio) +Planta

T6= Perlas de alginato de sodio+ Planta

T7= Perlas de alginato de sodio

Etapa 3. Biorremediación

El ensayo de biorremediación tuvo una duración de 50 días, y se midieron los siguientes parámetros.

3.3.1 *Parámetros fisiológicos de la planta*

3.3.1.1. Medición de Índice de calidad de Dickson (ICD). Para observar las consecuencias del diésel y el efecto de *Azotobacter vinelandii* en las plantas, se realizaron mediciones de largo aéreo (cm), largo de raíz (cm), peso húmedo (g) y peso seco (g) para cada unidad experimental. Posteriormente se obtuvo el índice de calidad de Dickson (Villalón-Mendoza, 2016) de acuerdo con la siguiente fórmula.

$$\text{Índice de calidad de Dickson (IDC)} = \frac{PST}{\frac{A}{D} + \frac{PSA}{PSR}}$$

Donde:

PST: peso seco total de la planta (g)

PSA: peso seco de la parte aérea de la planta (g)

PSR: peso seco de la parte radical de la planta (g)

A: altura de la planta (cm)

D: diámetro de la planta (mm)

3.3.2 *Análisis de suelo biorremediado*

3.3.2.1. Cuantificación de diésel residual en suelo biorremediado. Para la cuantificación del diésel residual, se realizó por muestra compuesta en la cual, se homogeneizó la tierra de cada uno de los 8 tratamientos y de la mezcla se tomaron 3 alícuotas para realizar por triplicado por tratamiento.

3.3.2.2. Conteo total de bacterias. Se realizó la cuenta de microorganismos totales en suelo biorremediado mediante la técnica de diluciones seriadas y siembra en placa.

3.3.2.3. Análisis de daño genético y celular. La evaluación de la genotoxicidad y la citotoxicidad en los diferentes tratamientos se realizará de acuerdo con el protocolo de Fiskesjö (1985), mediante el índice mitótico y conteo de aberraciones cromosómicas.

3.3.2.4. Extracción de ADN y PCR en tiempo real tratamientos con *Azotobacter vinelandii*. Para la extracción de ADN de suelo se obtuvo con el Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit de la corporación de Zymo research, de acuerdo con el protocolo descrito por el fabricante, y se realizó PCR.

Capítulo IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Etapa 1. Suelo inicial

4.1 Caracterización del suelo

En la tabla 4.1 se muestran todos los parámetros iniciales obtenidos para la caracterización inicial del suelo, así como de la concentración inicial de diésel residual por gravimetría, materia orgánica, pH, conductividad eléctrica y UFC/g, previo al proceso de biorremediación, de acuerdo con la NOM-021-RECNAT-2000.

Tabla 4.1. Caracterización del suelo

Parámetro	Método	Valores
Contenido de humedad	AS-05	2.14210%
Capacidad de campo	Retención de agua	35 %
Textura del suelo	AS-09	Arenoso
Densidad aparente	Probeta	1.29 g/ml
Nitrógeno total	Kjeldahl	0.39% de N
Fósforo	Espectrofotometría	20.32 mg/Kg
Materia orgánica	Calcinación	9.2457%
Diésel	Gravimetría	8710.15
UFC	Dilución seriada y siembra en placa	9.17×10^7
pH	AS-02	7.47
CE	AS-18	0.214 dS/m

La capacidad de campo obtenida fue de 35% , lo cual puede ser debido a que suelos con hidrocarburos tienden a retener poco contenido de agua (Adams *et al.*,2015), no obstante, Peluffo (2016), menciona que valores de entre 28 y 39% de humedad mejoran el proceso de biodegradación de hidrocarburos aromáticos, sin embargo, en porcentajes bajos puede favorecerse la degradación por organismos aeróbicos por medio de la adición de humedad en el suelo, incrementando el oxígeno disponible, el valor obtenido para el suelo contaminado de 2.14210%, y fue aumentada con la adición de 35 ml/100 g de agua cada 24 horas,

alcanzando una humedad relativa de 35 %, favoreciendo el desarrollo y crecimiento de los microorganismos presentes en suelo (Brutti *et al.*, 2018).

Para la textura del suelo se han presentado diversas clasificaciones para las fracciones de suelo de acuerdo con el tamaño de partículas, en tabla 4.2 se muestran la correspondiente a la Sociedad Internacional de la Ciencia del Suelo.

Tabla 4.2. *Tamaño de partículas de acuerdo con la fracción de suelo*

Fracción del suelo	Departamento de Agricultura de Estados Unidos	Diámetros límites en mm
Arena muy gruesa	2.00 - 1.00	
Arena gruesa	1.00 - 0.50	2.00-0.20
Arena media	0.50 - 0.25	
Arena fina	0.25 - 0.10	0.20-0.002
Arena muy fina	0.10 - 0.05	
Limos	0.05 - 0.002	0.02-0.002
Arcilla	Menos de 0.002	Menos de 0.002

**Rucks et al., 2004*

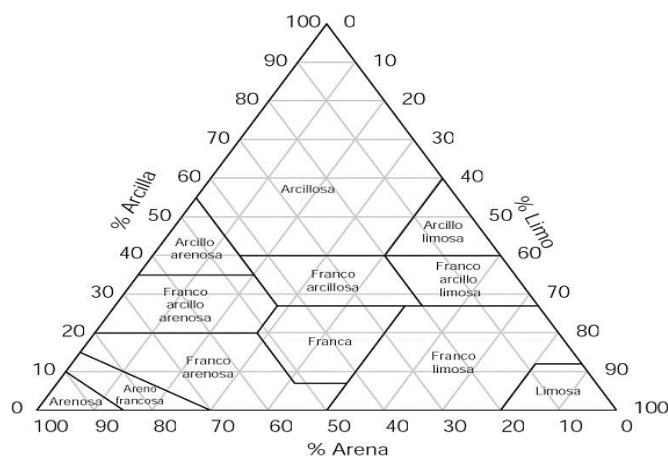
Con los pesos obtenidos por fracción y clasificados de acuerdo con el tamaño de partícula presentado en la tabla 4.2, se determinaron los porcentajes de limo, arena y arcilla, mostrados en la tabla 4.3 para el suelo contaminado, obteniendo un tipo de suelo areno.francoso con los porcentajes ubicados de acuerdo con la figura 4.1. En este sentido, Eskandary *et al.* (2017), concluyen que los suelos arcillosos reportan los niveles más altos de degradación, sin embargo, a menor contenido de arcilla menor adsorción de los hidrocarburos, favoreciendo la degradación microbiana. Por otro parte los suelos arcillosos y limosos reducen la entrada de oxígeno por sus grados de compactación y el tamaño de sus agregados, a diferencia de los suelos arenosos los cuales poseen espacios porosos que permiten el drenaje del agua y una mejor aireación en los espacios entre partículas (Pineda *et al.*, 2020), por lo que el crecimiento de *Azotobacter* v. se vería favorecido por su

metabolismo aeróbico (Tec- Campos *et al.*,2020). Por otra parte, la densidad aparente obtenida fue menor a 1.32 densidad propia de suelos arenosos lo cual evita problemas de compactación y porosidad permitiendo la aireación (Álvarez-Jiménez *et al.*, 2019)

Tabla 4.3. Porcentaje obtenido de arena, arcilla y limo por 100 gramos de suelo contaminado

Tipo de suelo	Tamaño de partículas	Porcentajes obtenidos por 100 g de suelo
Grava fina	≥ 2.0	22.92
Arena	0.10-2.00	76.82
Limo	0.02-0.002	0.26
Arcilla	Menos de 0.002	0

Figura 4.1. Triángulo de textura del sistema de clasificación de la USDA



*NOM-021-RECNAT-2000.

Tabla 4.4. Densidad aparente

Tipo de suelo	g/cm^3
Orgánicos volcánicos	Menor de 1.00
Arcillosos	1.00-1.19
Francosos	1.20-1.32
Arenosos	Mayor a 1.32

La densidad aparente corresponde a un suelo francoso, lo cual, se ajusta a la textura del suelo obtenida areno-francosa, los suelos con alta densidad aparente tienden a presentar problemas de compactación y aireación (Álvarez-Jiménez *et al.*, 2019).

Por otro lado, de acuerdo con la tabla 4.4, el nitrógeno total obtenido de 0.39% se clasifica en un valor muy alto, relacionado con la fertilización de suelos agrícolas, lo cual puede resultar favorable dado que el nitrógeno es precursor para la síntesis de aminoácidos y enzimas (Nápoles, *et al.*,2015)

Tabla 4.4. *Valores de Nitrógeno total y su clasificación**

Clase	Nitrógeno total (%)
Muy bajo	<0.05
Bajo	0.05-0.10
Medio	0.10-0.15
Alto	0.15-0.25
Muy alto	> 0.25

**NOM-021-RECNAT 2000*

Igualmente, la tabla 4.5 muestra que el fosforo presente en el suelo se encuentra en un valor muy alto, con un total de 20.32 mg/kg, por lo que la presencia de estos nutrientes no se considera factor limitante para el crecimiento microbiano en el suelo contaminado (*Cruz et al.*, 2016).

Tabla 4.5. *Valores de fosforo total y su clasificación**

Clase	mg kg⁻¹ de P
Bajo	<5.5
Medio	5.5-11
Alto	>11

**NOM-021-RECNAT 2000*

4.2. Etapa 2. Propagación de plántulas y bacterias.

4.2.1. Cultivo de *Azotobacter vinelandii*

La incubación de *Azotobacter vinelandii* a las 72 horas de incubación, generó un inóculo de concentración final de 1.41×10^{10} como se muestra en la tabla 4.6, alcanzando la fase estacionaria a las 48 horas de cultivo, tal como se muestra en el gráfico 4.1., en donde se observa el comportamiento del crecimiento, estos resultados son similares a los obtenidos por Herrera-Gutiérrez y Millán-Arboleda (2018), con la cepa de *Azotobacter sp.* C4T, en donde alcanzaron la fase estacionaria a las 40 horas de incubación Ashby-manitol.

Tabla 4.6. *Conteo bacteriano hasta las 72 horas de incubación.*

T(h)	DO	UFC/mL
0.5	0.021	7.35×10^4
1	0.036	7.40×10^3
1.5	0.04	1.55×10^5
2	0.044	2.30×10^5
2.5	0.058	1.60×10^5
4	0.08	1.90×10^5
5	0.082	2.45×10^5
22	7.272	7.05×10^9
24	8.88	7.60×10^9
26	9.954	7.80×10^9
28	9.999	9.50×10^9
48	20.115	2.75×10^{10}
50	20.097	1.90×10^{10}
52	20.52	2.05×10^{10}
54	20.493	9.0×10^{10}
72	20.52	1.005×10^{11}

Gráfico 4.1. Crecimiento de *Azotobacter vinelandii* hasta las 72 horas

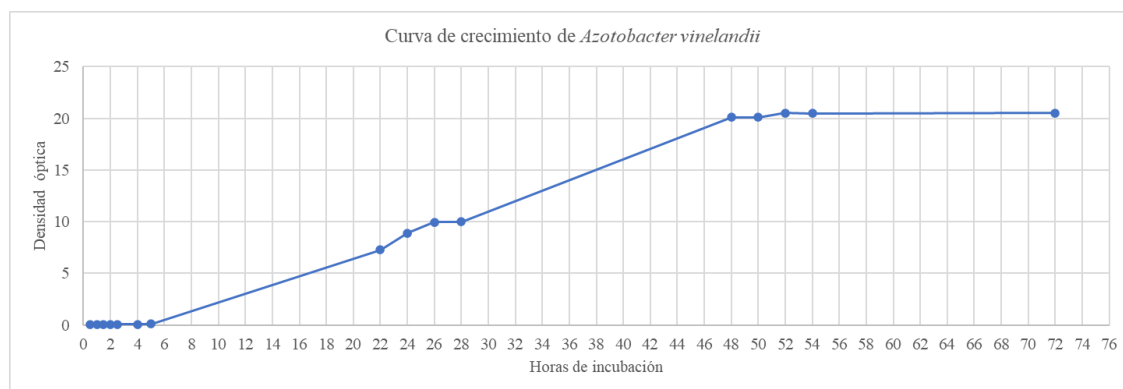
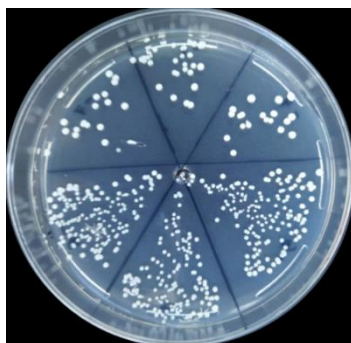


Figura 4.2. Conteo bacteriano de *Azotobacter vinelandii*

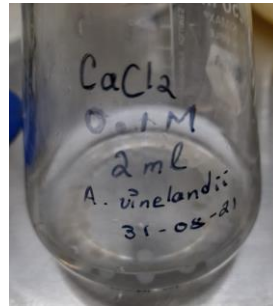


Nota: Las colonias de Azotobacter vinelandii se observan blancas, redondas y bien definidas

4.2.2. Inmovilización de *Azotobacter vinelandii*

Se obtuvo un promedio de 23 perlas/ml de alginato de sodio con una concentración bacteriana de 1.08×10^9 UFC/g de perlas, cercano a lo reportado por Reyes-Reyes *et al.*, (2018), quienes reportan la inmovilización de un consorcio petrolífero con una concentración de 5.5×10^7 UFC/mL, siendo el alginato un excelente material bioportador de *Azotobacter vinelandii* (Rojas-Tapias, 2013),

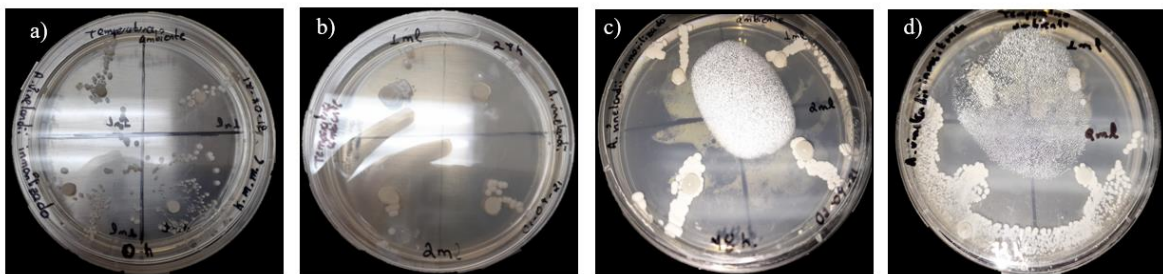
Figura 4.3. Perlas de *Azotobacter vinelandii* inmovilizada en CaCl_2



4.2.2.1. Viabilidad de *Azotobacter vinelandii* inmovilizada

Se colocaron las perlas en medio NBRC en dos condiciones de almacenamiento, observándose que, a las 48 horas de siembra del inmovilizado en las cajas almacenadas a temperatura ambiente a las 0h, 24h, 48h y 72h (Véase figura 4.4), se observó crecimiento de UFC, las cuales se indican en la Tabla 4.7. Sin embargo, las almacenadas en refrigeración, mostraron crecimiento hasta los 14 días de almacenamiento, indicando un periodo útil de almacenamiento fuera de la solución de CaCl_2 , posterior a este periodo, el contenido de las perlas es liberado mostrando la viabilidad de crecimiento a temperaturas inferiores a la ambiental.

Figura 4.4. Bacteria inmovilizada almacenada a temperatura ambiente.



Nota: a) *Azotobacter v.* inmovilizada a las 0 h, b) *Azotobacter v.* inmovilizada a las 24 h, c) *Azotobacter v.* inmovilizada a las 48 h, d) *Azotobacter v.* inmovilizada a las 72 h.

Tabla 4.7. *Conteo del Azotobacter vinelandii inmovilizada, almacenada a temperatura ambiente*

Hora de siembra en agar	Cel/perla
0	64
24	11
48	54
72	198

4.3. ETAPA 3

Tabla 4.8. Cuantificación de mg kg⁻¹ de Diésel residual por gravimetría y parámetros fisicoquímicos inicial y finales.

Día	Tratamiento	pH	Conductividad eléctrica dS/m ⁻¹	UFC/g	Carbono orgánico (g)	Diésel residual mg kg ⁻¹	% de remoción
1	Suelo contaminado inicial	7.47 ± 0.10	0.214 dS/m	9.17×10 ⁷ ±2.08×10 ⁷	0.0925±0.09	8710.15±1032.90	N/A
50	T0=Atenuación natural	8.02 ± 0.02 c	0.7067 ± 0.05 c	4.83×10 ⁸ ± 1.44×10 ⁸ b	0.0626±0.62 bc	6132.84±255.13 abc	42.19±5.92
	T1=Planta	7.99 ± 0.07 c	0.3600 ± 0.02 d	5.33×10 ⁹ ± 2.02×10 ⁹ b	0.0616±0.14 c	6270.89±1061.07 abc	41.63±24.31
	T2=Bacteria (Líquida)	8.61 ± 0.01 b	1.1190 ± 0.04 b	5.17×10 ⁸ ± 1.26×10 ⁸ b	0.0719±0.81 abc	7121.06±245.55 abc	25.86±7.24
	T3=Bacteria (Líquida)+ Planta	8.70 ± 0.04 ab	1.4770 ± 0.22 a	3.83×10 ¹⁰ ± 1.15×10 ¹⁰ a	0.0624±0.06 bc	5624.74±24.63 bc	54.85±0.68
	T4=Bacteria (perlas de alginato de sodio)	8.74 ± 0.08 ab	0.9643 ± 0.13 bc	3.67×10 ⁸ ± 1.15×10 ⁸ b	0.0765±0.34 a	7229.85±543.22 ab	25.60±11.91
	T5=Bacteria (perlas de alginato de sodio) + Planta	8.83 ± 0.05 a	0.8307 ± 0.05 bc	8.00×10 ⁸ ± 3.00×10 ⁸ b	0.0701±0.20 abc	5595.91±298.00 c	55.96±8.54
	T6=Perlas de alginato de sodio+ Planta	8.66 ± 0.04 b	0.9040 ± 0.09 bc	1.08×10 ⁹ ± 1.76×10 ⁸ b	0.0735±0.17 ab	6327.34±171.79 abc	31.92±3.74
	T7=Perlas de alginato de sodio	8.64 ± 0.03 b	0.8990 ± 0.18 bc	5.67×10 ⁸ ± 1.04×10 ⁸ b	0.0758±0.29 a	7281.72±239.99 a	24.05±8.42
	P value	0.014	0.0000	0.0000	0.001	0.0009	

Las medias que no comparten la misma letra son significativamente diferentes, nivel de significancia $\alpha=0.05$
NA=No aplica

4.3.1. pH

El resultado obtenido de pH es de 7.47 para el suelo contaminado inicial, indicando condiciones para crecimiento adecuadas para *Azotobacter vinelandii*, dado que su abundancia se incrementa en pH generalmente neutros y superiores a 6.5 (Ebrahimi *et al.*, 2017), de acuerdo con la tabla 4.9, se observa que los valores se encuentran en pH mediano y fuertemente alcalino, lo que refiere una baja capacidad tampón provocada por cambios en la materia orgánica y arcillas las cuales disminuyen variaciones del pH (Casals-Pérez *et al.*, 2020).

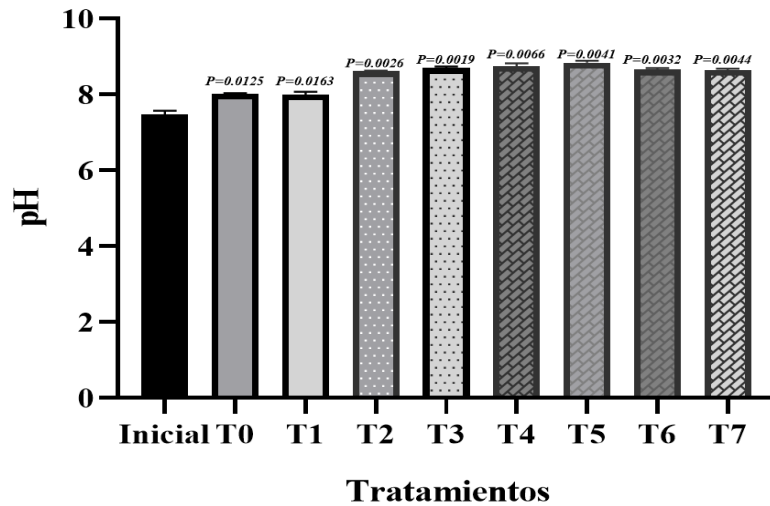
Tabla 4.9. Valores de pH y su clasificación*

Clasificación	pH
Fuertemente ácido	≤ 5.0
Moderadamente ácido	5.1-6.5
Neutro	6.6-7.3
Medianamente alcalino	7.4-8.5
Fuertemente alcalino	≥ 8.5

*NOM-021-RECNAT 2000

El pH óptimo para los microorganismos en suelo se considera en un rango de 5.0 a 8.0, no obstante, pH alcalinos de entre 7.5 y 10.0 permiten degradación microbiana mínima (Kebede *et al.*, 2021), aunque el pH alcalino afecta la disponibilidad de nutrientes (Cancho y Silva, 2015), el aumento no bloqueó la degradación en los tratamientos con *Azotobacter vinelandii* y *Tagetes erecta* (Véase tabla 4.8) en el grafico 4.2, se observan diferencias significativas en todos los tratamientos con respecto al pH.

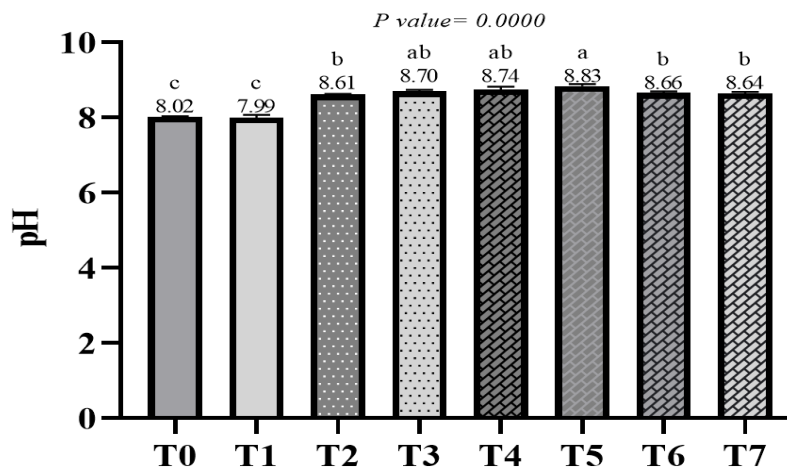
Gráfico 4.2. Prueba T test paired para pH al inicio y final del proceso de biorremediación



Nota: Valores superiores $\alpha=0.05$ son estadísticamente significativos

En el gráfico 4.3 se muestra el ANOVA one way para pH, mostrando que el tratamiento utilizando *Tagetes erecta* y *A. vinelandii* inmovilizada (T5), obtuvo el mayor aumento de pH, sin embargo, no limitó la capacidad biodegradativa (Tabla 4.8), probablemente a causa de que *Azotobacter vinelandii* posee la capacidad de crecer en suelos alcalinos (Sivasankar *et al.*, 2020)

Gráfico 4.3. One way ANOVA para pH entre tratamientos al final del proceso de biorremediación



4.3.2. Conductividad eléctrica

Se realizó la medición de la conductividad eléctrica obteniendo un valor inicial de 0.240 dS/m, de acuerdo con la tabla 4.8, los valores menores a 1.0 dS/m revelan salinidad despreciable, por lo que esta variable no tuvo efecto en el crecimiento de la planta. Dado que este parámetro es afectado por la concentración de iones solubles, al ser despreciable la salinidad no intervino en el crecimiento de los microorganismos (Jiménez-Hernández y Guerra-Sánchez, 2016).

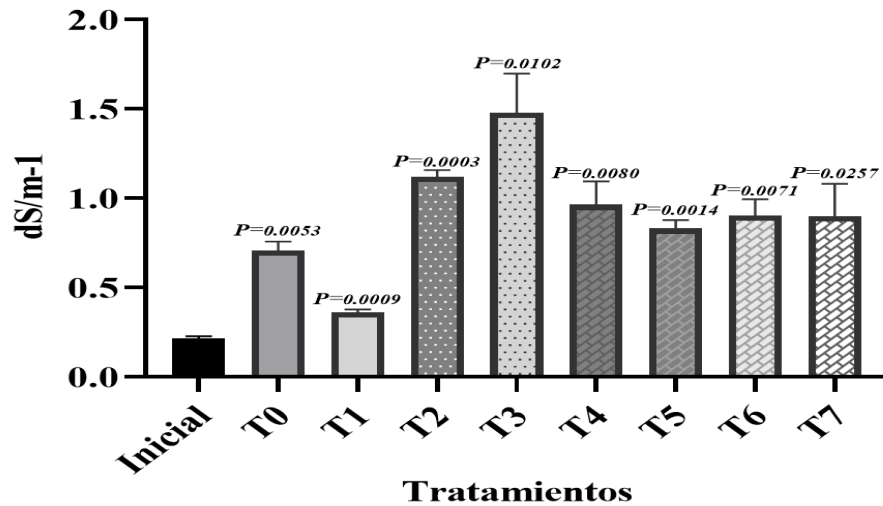
Tabla 4.8. Valores de conductividad eléctrica*

CE dS m ⁻¹ a 25° C	Efectos
≤1.0	Efectos despreciables de la salinidad
1.1-2.0	Muy ligeramente salino
2.1-4.0	Moderadamente salino
4.1-8.0	Suelo salino
8.1-16.0	Fuertemente salino
≥16.0	Muy fuertemente salino

*NOM-021-RECNAT 2000

No obstante, el gráfico 4.4 se observa que el valor de conductividad eléctrica después del ensayo de biorremediación aumentó significativamente en todos los tratamientos con respecto al suelo inicial, sin embargo, de acuerdo con la norma se encuentran en valores con salinidad despreciable y muy ligeramente salinos, fenómeno que implica actividad degradativa microbiana y liberación de compuestos salinos propios del hidrocarburo y procesos de oxidación y reducción (Zamora *et al.*, 2012).

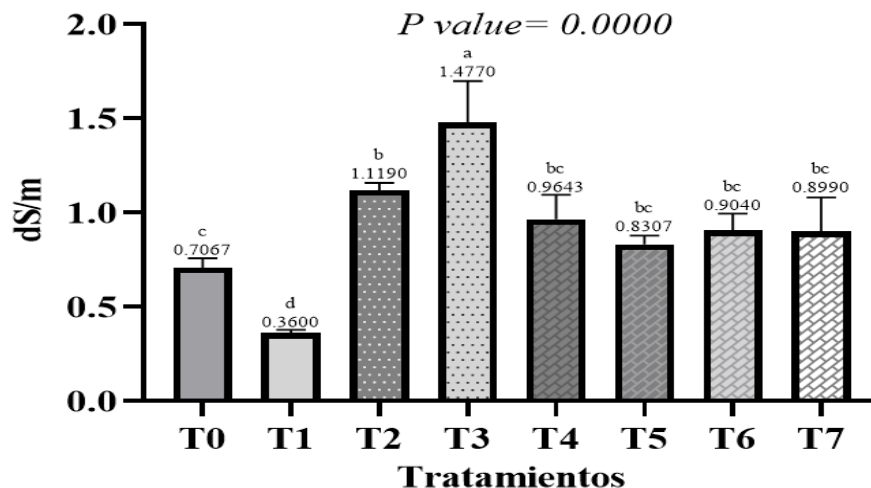
Gráfico 4.4. Prueba T test paired para conductividad eléctrica al inicio y final del proceso de biorremediación



Nota: Valores superiores $\alpha=0.05$ son estadísticamente significativos

Se realizó ANOVA para observar diferencias entre los tratamientos, sin embargo, solo el tratamiento de *Tagetes erecta* y *Azotobacter v. líquida* (T3), presenta la mayor conductividad eléctrica como se observa en el gráfico 4.5.

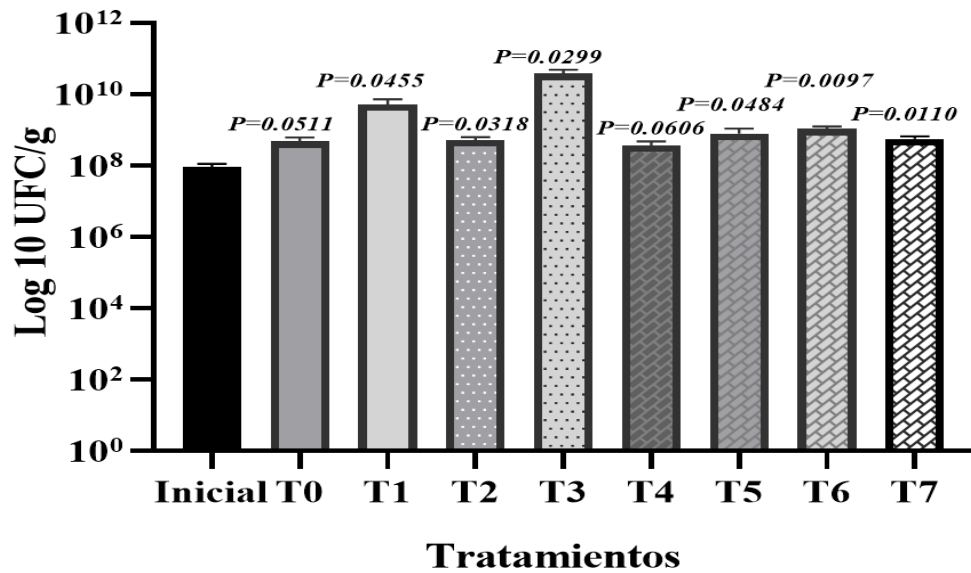
Gráfico 4.5. One way ANOVA para conductividad eléctrica entre tratamientos al final del proceso de biorremediación



4.2.4. Conteo total de bacterias

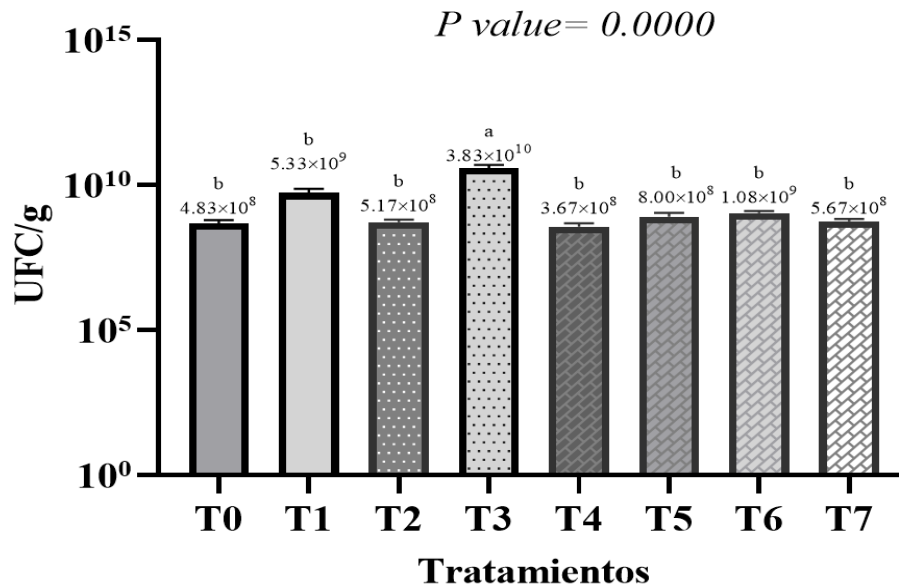
El conteo inicial de microorganismos previo a los tratamientos fue de 9.17×10^7 UFC/g (Tabla 1), similar a lo reportado por Quintero *et al.*, (2016), donde se estimó 2.02×10^6 UFC/g para un suelo contaminado con hidrocarburos totales de petróleo. Por otro lado, la prueba de T-student mostró un aumento estadísticamente significativo en la mayoría de los tratamientos (Gráfico 4.6). Por otra parte, el crecimiento bacteriano en los tratamientos con *Tagetes erecta*, demuestra que una fracción de la microbiota rizosférica logró utilizar el diésel como fuente de carbono o energía (Diaz *et al.*, 2021). Resultados similares fueron obtenidos por Chuluun y Rhee, 2014, con *Perennial ryegrass (Lolium perenne L.)*, en donde se observó el aumento de microorganismos heterótrofos cultivables en todos los tratamientos con plantas en órdenes de 10^8 y 10^9 , concluyendo que los exudados segregados por la planta pudieron servir como fuente de nutrientes y carbono para los microorganismos (Liu *et al.*, 2014). Finalmente, el efecto de rizoestimulación pudo observarse en el tratamiento T3 (*Tagetes erecta* + *Azotobacter vinelandii*), cuya media de crecimiento bacteriano de 3.83×10^{10} UFC/g de suelo, fue estadísticamente mayor a los otros tratamientos ($P=0.0000$) (Gráfico 4.7), esto debido a que plantas mejoran la porosidad del suelo y estimulan la actividad microbiana por medio de nutrientes y cosustratos exudados (Salim *et al.*, 2020).

Gráfico 4.6. Prueba T test paired para UFC/g al inicio y final del proceso de biorremediación



Nota: Valores superiores $\alpha=0.05$ son estadísticamente significativos

Gráfico 4.7. One way ANOVA para UFC/g entre tratamientos al final del proceso de biorremediación



4.2.2. Materia orgánica

Se presentó un contenido de materia orgánica para el suelo contaminado con hidrocarburos de 9.25 %, considerado alto contenido de materia orgánica de acuerdo con lo indicado en la tabla 4.9, esto se explica por la presencia de compuestos carbonados implícitos en el diésel, parámetro que incrementa con la presencia de hidrocarburos en suelo (Martínez, 2001).

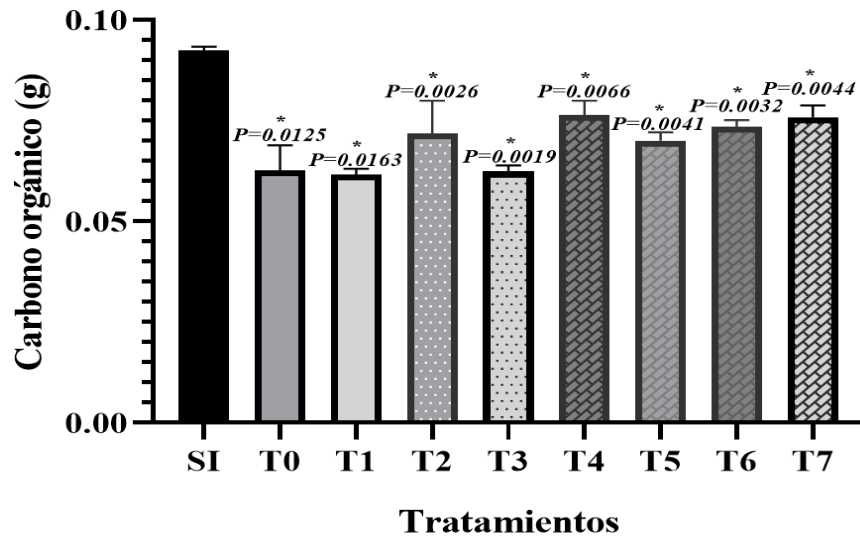
Tabla 4.9. Valores de materia orgánica

Clase	Materia orgánica (%)	
	Suelos volcánicos	Suelos no volcánicos
Muy bajo	≤ 4.0	≤ 0.5
Bajo	4.1-6.0	0.6-1.5
Medio	6.1-10.9	1.6-3.5
Alto	11-16	3.6-6.0
Muy alto	≥ 16.1	≥ 6.1

**NOM-021-RECNAT 2000*

No obstante, la actividad de la microbiota autóctona adaptada, se estimula por la presencia de hidrocarburos por ser fuente de carbono, la cual se incrementa en suelos rizosfericos (Hajabbasi,2016), por lo que, probablemente los tratamientos T1= Planta ($P=0.0163$), T3=Planta+bacteria líquida ($P=0.0019$), T5= Planta+bacteria inmovilizada ($P=0.0041$), mostraron menor contenido de carbono orgánico con respecto al suelo inicial (Tabla 4.8). En el gráfico 4.8, se observa que hubo diferencias significativas en todos los tratamientos.

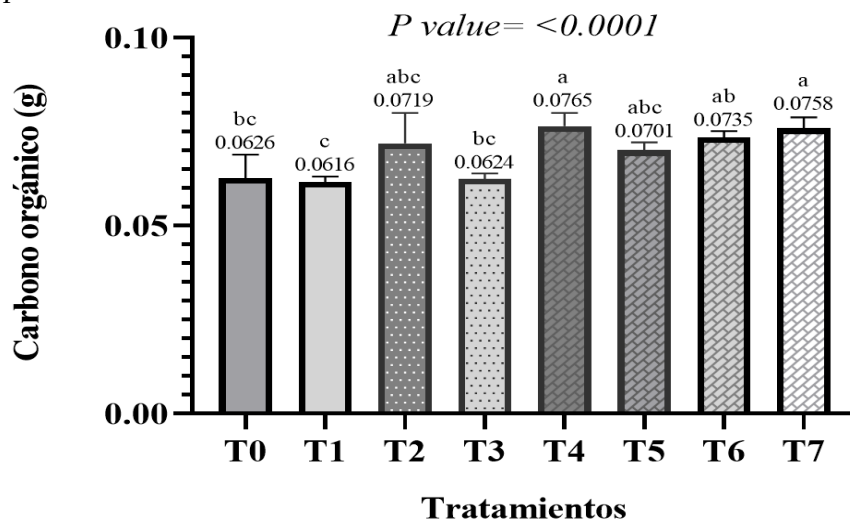
Gráfico 4.8. Prueba *T* test paired para materia orgánica al inicio y final del proceso de biorremediación



Nota: Valores superiores $\alpha=0.05$ son estadísticamente significativos

Se realizó ANOVA para observar las diferencias entre los tratamientos, en el gráfico 4.9, puede visualizarse que no hubo correlación entre los porcentajes de degradación y la materia orgánica, dado que el tratamiento 5, pese a que presentó estadísticamente el mayor porcentaje de remoción con 55.96% no obtuvo el menor contenido de materia orgánica.

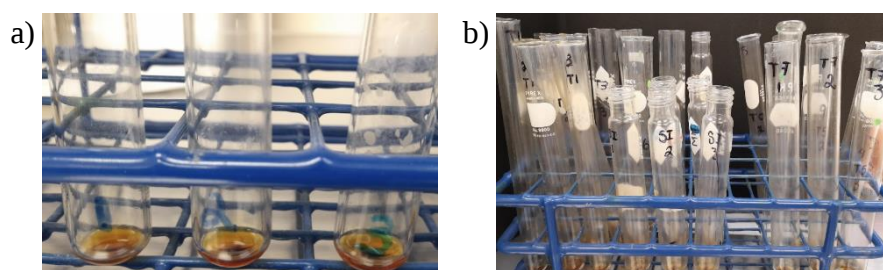
Gráfico 4.9. One way ANOVA para materia orgánica entre tratamientos al final del proceso de biorremediación



4.2.3. Cuantificación de diésel residual

La concentración inicial de hidrocarburos fue de $8710.1480 \text{ mg/kg}^{-1}$, Rodríguez *et al.*, (2012), concluye que una concentración de 6270 mg/kg^{-1} se considera como el límite inferior de tolerancia de hidrocarburos para los microorganismos, por lo que pudo haber sido un factor limitante para la biodegradación de diésel, igualmente en la Tabla 4.10 se observa que el valor obtenido rebasa los límites permitidos de la fracción media en suelo agrícola de acuerdo con la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, incrementándose la hidrofobicidad del suelo afectando el crecimiento de las plantas por la pérdida de capacidad del suelo de retener y absorber la humedad (Hewelke *et al.*, 2018), suponiendo un grave riesgo para la salud humana debido a su recalcitrancia y a sus propiedades mutagénicas, teratogénicas y carcinogénicas (Onofre-Dolores *et al.*, 2013; Rodriguez-Campos *et al.*, 2019). En la Figura 4.5 se muestra el extracto de diésel después de la evaporación del solvente para todas las extracciones.

Figura 4.5. Cuantificación por triplicado de diésel residual



Nota: a) Día 1, b) Día 60

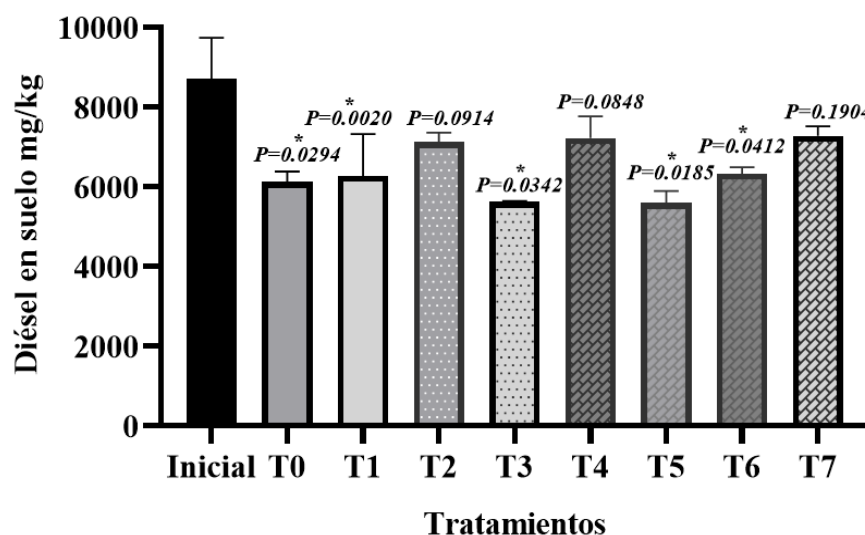
Tabla 4.10. Límites máximos permisibles para fracciones de hidrocarburos en suelo

FRACCIÓN DE HIDROCARBUROS	USO DE SUELO (mg/kg)		
	Agrícola, forestal, pecuario y de conservación	Residencial y recreativo	Industrial y comercial
Ligera	200	200	500
Media	1200	1200	5000
Pesada	3000	3000	6000

*NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012

Los suelos agrícolas contaminados con hidrocarburos sufren la modificación de las propiedades físicas y químicas del suelo, afectando su fertilidad y el rendimiento de las cosechas por los cambios de pH, salinidad, compactación y reducción de nutrientes (Cabrera-Lobelo y Unibio-Salcedo, 2019).

Gráfico 4.10. Prueba *T* test paired para diésel residual al inicio y final del proceso de biorremediación



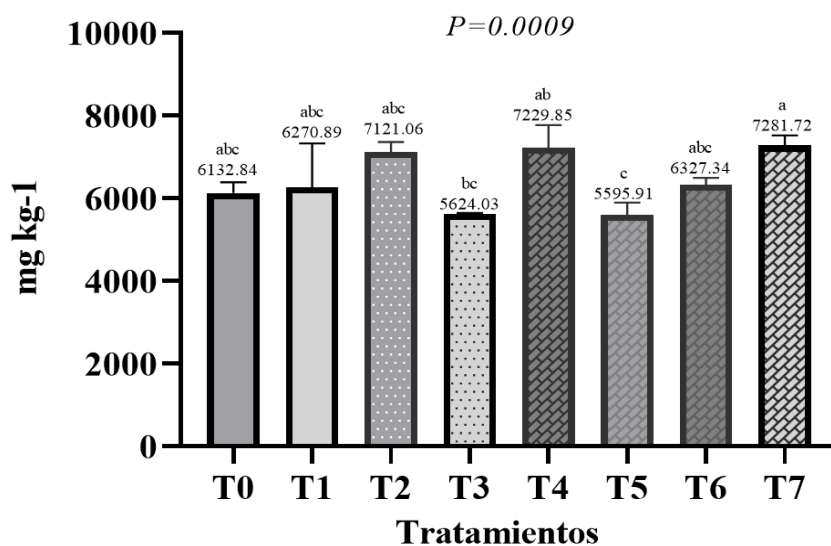
Nota: Valores superiores $\alpha=0.05$ son estadísticamente significativos

Por otro lado, la prueba de *T* pareada para concentración de diésel mostró diferencias significativas para el T0= Microbiota autóctona ($P=0.0294$), debido a que la microbiota autóctona estimulada por factores abióticos como la humedad, oxígeno y temperatura logra promover la degradación mediante el uso de hidrocarburos como fuente de energía (Silva

Castro *et al.*,2015). Igualmente, los tratamientos T1= *Tagetes erecta* ($P=0.0020$), T3= *Tagetes erecta* + *Azotobacter vinelandii* ($P= 0.0342$), T5= *Tagetes erecta* + *Azotobacter vinelandii* inmovilizada ($P=0.0185$) y T6= *Tagetes erecta* + Perlas de alginato ($P=0.0412$), fueron estadísticamente significativos con respecto al suelo inicial (Gráfico 4.10), fenómeno atribuido al sistema denso de raíces de la especie *Tagetes erecta*, que permite el desarrollo de microorganismos asociados, promoviendo la biodegradación (Rajkumari *et al.*, 2021), que, al ser bioestimulada por *A.vinelandii*, la cual posee distintos mecanismos para la remoción de hidrocarburos tales como la fijación de nitrógeno esencial para el crecimiento de raíces, incrementa la presencia de exudados que contribuyen a la degradación (Suryatmana *et al.*,2019). Igualmente, *A. vinelandii* tiene la capacidad de producir biosurfactantes, reduciendo la tensión superficial de los hidrocarburos, favoreciendo la interacción de los microorganismos con el contaminante (Suryatmana *et al.*,2018), por otro lado, se sabe que la presencia de enzimas oxidativas y cometabolismo con otras bacterias degradadoras conllevan a la disminución de diésel en suelo (Chaudhary *et al.*, 2019; Onwurah y Nwuke, 2004). Por otra parte, en la figura 2a, se observa que la ausencia de *Azotobacter vinelandii* en el tratamiento T7= Perlas de alginato de sodio, impidió una remoción significativa ($P=0.1904$), diversas investigaciones demuestran la importancia de la bioaumentación principalmente bacterias exógenas en procesos de descontaminación debido a su capacidad catalítica de compuestos hidrocarbonados (Laothamteep *et al.*, 2022). No obstante, los tratamientos T2= *Azotobacter vinelandii* y T4 = *Azotobacter vinelandii* inmovilizada no presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto al suelo inicial ($P=0.0914$ y $P=0.0848$, respectivamente), esto pudiera estar relacionado con que la bacteria fue cultivada en un medio optimo, impidiendo aclimatación al contaminante, sumado a los factores bióticos y abióticos perjudicando su crecimiento y por tanto, el proceso de biodegradación (Innemanová

et al., 2018). Al realizar ANOVA one way (Grafico 4.11), se observan diferencias estadísticas significativas entre las concentraciones de diésel residual en los tratamientos (Tabla 4.8), no obstante, no se logra establecer un factor común que determine el tratamiento con mayor eficacia en la remoción de hidrocarburos, dado que los tratamientos comparten grupos estadísticos iguales. Sin embargo, se observa que los tratamientos T3=*Tagetes erecta* + *A.vinelandii* y T5= *Tagetes erecta* + *A.vinelandii* inmovilizada, son estadísticamente diferentes al tratamiento T7 = Perlas de alginato de sodio sin *Azotobacter vinelandii*, el cual en la prueba T-student, no mostro remoción significativa con respecto al suelo inicial, enfatizando que la presencia de la planta influye en la mejora del proceso de biodegradación del contaminante, mejorando las tasas de remoción, debido a que se promueve la aireación del suelo, esencial para los procesos aeróbicos de remoción de hidrocarburos (McIntosh et al., 2017) y que además, cuando la rizoremediación se asiste por microorganismos, provoca cambios en la microbiota autóctona, que favorecen la degradación (Pandey et al., 2021).

Gráfico 4.11. One way ANOVA para mg kg^{-1} de diésel residual entre tratamientos al final del proceso de biorremediación



4.3.1 Parámetros fisiológicos de la planta

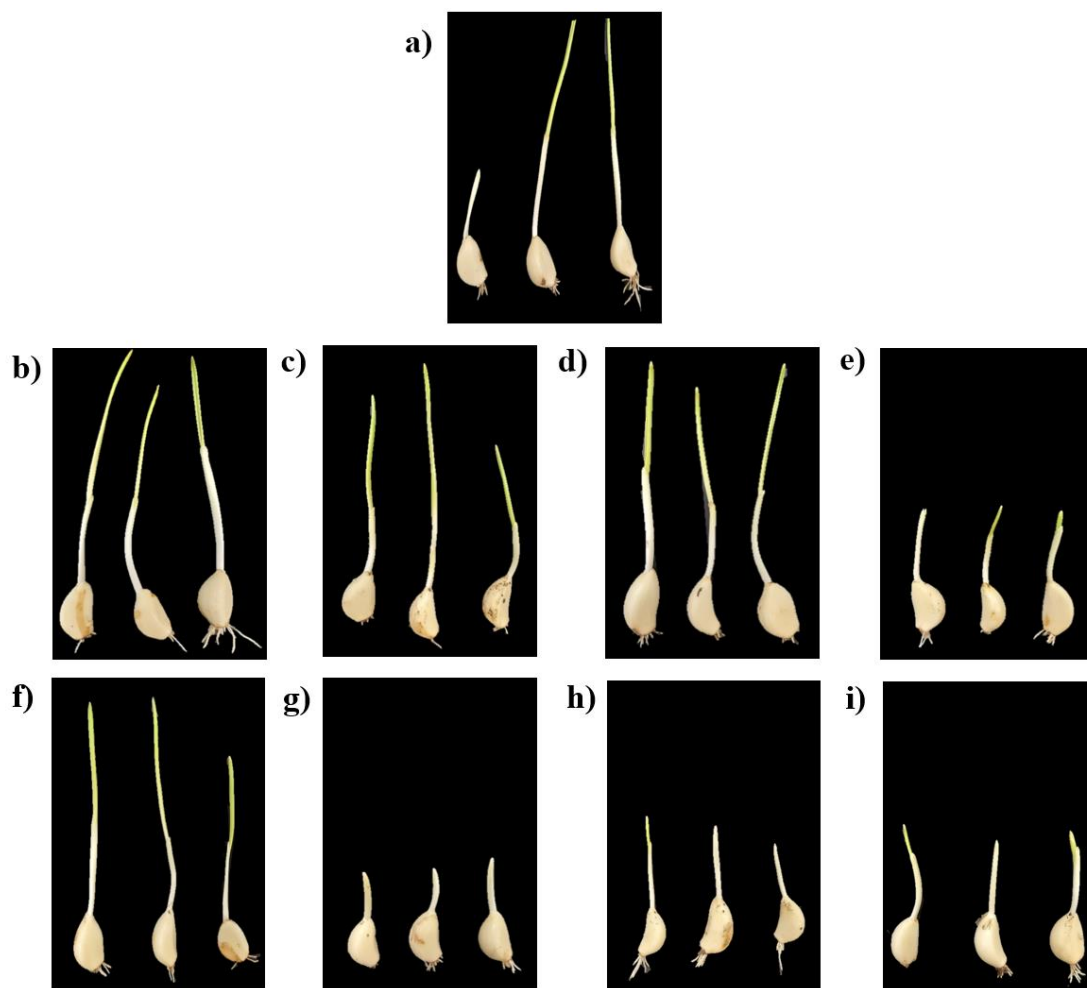
Tabla 4.11. Parámetros fisiológicos de la planta

Tratamiento	Largo aéreo (cm)	Largo raíz (cm)	Diámetro (mm)	Peso húmedo total(g)	Peso seco total (g)	Peso seco aéreo (g)	Peso seco raíz (g)	ICD
T1	6.4000 ± 0.5568 a	4.7333± 1.2097 a	2.1000 ± 0.2000 ab	0.7957 ± 0.2065 a	0.1241 ± 0.0299 a	0.0581± 0.0085 a	0.0661± 0.0250 a	0.9857 ± 0.3067 b
T3	6.3000± 2.8688 a	6.9000± 3.9230 a	2.3333± 0.3215 a	0.8406 ± 0.1332 a	0.1303± 0.0264 a	0.0596± 0.0139 a	0.0707± 0.0129 a	0.8907± 0.0568 b
T5	4.8333 ± 1.3051 a	6.4667 ± 1.4844 a	2.0333 ± 0.9018 ab	0.7539 ± 0.4687 ab	0.1217 ± 0.0403 a	0.0676 ± 0.0268 a	0.0541 ± 0.0229 ab	1.4568 ± 0.6365 a
T6	3.4333 ± 0.2082 a	2.3000 ± 0.2646 a	0.8667 ± 0.0577 b	0.1231 ± 0.0501 b	0.0557 ± 0.0186 a	0.0419 ± 0.0104 a	0.0138 ± 0.0102 b	3.8809 ± 1.9705 a
<i>P value</i>	<i>0.1547</i>	<i>0.1134</i>	<i>0.0252</i>	<i>0.0326</i>	<i>0.0484</i>	<i>0.3488</i>	<i>0.0224</i>	<i>0.0250</i>

El índice de calidad de Dickson (Tabla 4.11), muestra que la presencia de las perlas de alginato de sodio sin *Azotobacter vinelandii* en los tratamientos T6= *Tagetes erecta* + Perlas de alginato y T7= Perlas de alginato, conllevan a un efecto poco favorable en la fisiología de la planta (ICD=1.4568±0.6365 y 3.8809±1.9705 respectivamente). Estudios refieren que el alginato de sodio como portador de microorganismos en procesos de biorremediación, puede obstaculizar la interacción de los exudados de la planta con los microorganismos (Pino *et al.*, 2016), que, sumado a la compactación y poca retención de humedad, así como a las características fisicoquímicas adversas del suelo, disminuyen la calidad de la planta (Hajabbasi, 2016).

4.1.8. Genotoxicidad y citotoxicidad

Figura 4.6. *Allium sativum* expuesto a suelo contaminado inicial y biorremediado en los distintos tratamientos



Nota: a) Suelo inicial, b) T0= Atenuación natural, c) T1= Planta, d) T2= Bacteria (Líquida), e) T3= Bacteria (Líquida)+ Planta, f) T4= Bacteria (perlas de alginato de sodio), g) T5=Bacteria (perlas de alginato de sodio) + Planta, h) T6= Perlas de alginato de sodio+ Planta, i) T7=Perlas de alginato de sodio

Tabla 4.15. *Parámetros fisiológicos de Allium sativum*

Tratamientos		Raíces	Largo tallo (cm)
SI	Suelo inicial	2.067±0.351 a	10.63±5.91 ab
T0	Atenuación natural	1.67±0.29 ab	12.300±0.693 a
T1	Planta	0.50±0.52 d	10.80±2.65 ab
T2	Bacteria (Líquida)	0.70±0.10 cd	9.833±0.808 abc
T3	Bacteria (Líquida)+ Planta	0.97±0.11 bcd	4.433±0.577 bcd
T4	Bacteria (perlas de alginato de sodio)	0.97±0.21 bcd	10.500±1.646 abc
T5	Bacteria (perlas de alginato de sodio) + Planta	0.80±0.10 cd	2.600±0.400 d
T6	Perlas de alginato de sodio+ Planta	1.13±0.06 bcd	4.033±1.007 cd
T7	Perlas de alginato de sodio	1.30±0.10 bc	4.233±0.551 bd
<i>P value</i>		0.000	0.000

Tabla 4.16. *Parámetros genéticos y celulares en plántulas de Allium sativum expuesto a suelo contaminado y biorremediado*

Tratamientos	%ÍM con respecto al control	Anormalidades nucleares	Micronúcleos	χ^2
B= Blanco	19±0.6	2.33± 0.58 a	0.67± 0.58 b	-
SI= Suelo inicial	9.33±0.55*	18.33±1.16 a	4.33±1.00 ab	14.22*
T0= Atenuación natural	9.27±0.85*	15±3.61 a	4±1.53 ab	10.86*
T1= Planta	9.60±0.78	19.67±7.77 a	3.67±1.00 ab	15.38*
T2= Bacteria (Líquida)	12.10±1.1	14±5.20 a	3±0.58 a	9.78*
T3= Bacteria (Líquida)+ Planta	11.77±1.08	17.67±8.96 a	3±2.08 ab	13.09*
T4= Bacteria (perlas de alginato de sodio)	10±0.92	17.33±5.51 a	2.667±1.73 ab	10.86*
T5= Bacteria (perlas de alginato de sodio) + Planta	9.60±0.62	14.33±3.51 a	2.67±1.16 ab	9.78*
T6= Perlas de alginato de sodio+ Planta	11.03±1.10	12±1.00 a	2.33±0.58 ab	7.68*
T7= Perlas de alginato de sodio	11.40±1.04	17±7.81 a	1.67±1.16 ab	13.09*
<i>P value</i>		0.735	0.055	

* = Daño citotóxico (IM=Índice mitótico $\leq 50\%$ del testigo)

*= Daño genotóxico, $\chi^2=3.84$

Finalmente, los ensayos de toxicidad indicaron presencia de citotoxicidad con índices mitóticos $\leq 50\%$, igualmente se presentaron anomalías cromosómicas y micronúcleos en todos los tratamientos (Tabla 4.16). Investigaciones refieren que suelos con diésel presentan normalmente dos tipos de aberraciones cromosómicas, yemas nucleares y pérdida de cromosomas a causa de la expulsión del exceso de ADN en forma de yemas y/o micronúcleos (Cruz *et al.*, 2019; Alavi *et al.*, 2022). Sin embargo, otros autores concluyen que la toxicidad no logra correlacionarse con la concentración de diésel en suelo, por lo que se infiere la influencia de otros factores (Leme *et al.*, 2008), tales como la formación de intermediarios de hidrocarburos aromáticos homocíclicos y heterocíclicos azufrados, gracias a la

degradación incompleta que ocurre en procesos de degradación bacteriana, los cuales suelen ser más tóxicos que sus precursores e impactan de manera importante los sistemas biológicos (Mazzeo *et al.*, 2017; Idowu *et al.*, 2019).

Capítulo V

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1. Conclusión

El uso de técnicas de biorremediación como la fitorremediación y bioaumentación, utilizando *Tagetes erecta* y *Azotobacter vinelandii*, demuestran ser tecnologías de fácil aplicación y asequibles, con capacidad degradativa, enfatizando el papel de la rizoestimulación en proceso de biodegradación.

El estudio sugiere que el uso de matrices de inmovilización como el alginato de sodio, en procesos de rizoremediación, no mejora de manera significativa las tasas de remoción de diésel en suelos agrícolas en condiciones de invernadero, por el contrario, afecta el crecimiento óptimo de la planta en ambientes de estrés. Sin embargo, el uso de microorganismos exógenos preadaptados al contaminante podría mejorar el proceso de bioaumentación y rizoestimulación (Innemanová *et al.*, 2018).

Por otro lado, las tasas de remoción no garantizan la seguridad del suelo, dado que todos los tratamientos presentaron daño genético y celular en células de *Allium sativum* expuestas, por lo que se sugiere la realización de estudios complementarios posteriores al proceso de biorremediación, dado que la exposición aguda o crónica de estos contaminantes mutagénicos, teratogénicos y carcinogénicos en las poblaciones agrícolas, puede causar graves efectos negativos en la salud, por lo que el uso de plantas ornamentales con valor económico en procesos de biorremediación cobra relevancia, puesto que no generan riesgo por ingreso en la cadena trófica.

5.2. Perspectivas

Para una posible mejora del proceso de biorremediación, se propone

- Para el caso de la planta, realizar el trasplante en un periodo mayor a 14 días, para garantizar una mejor resistencia de esta al suelo contaminado y mejorar la calidad de la planta para su uso comercial.
- En el caso de la bacteria, se propone su cultivo en medio mineral con diésel para adaptar la cepa previo a la inoculación.

6.Cronograma de actividades

Actividades	2020				2021												2022							
	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto
Revisión bibliográfica																								
Elaboración de protocolo de tesis																								
Presentación de protocolo de tesis																								
Planteamiento del problema																								
Justificación																								
Objetivos																								
Hipótesis																								
Diseño experimental																								
Escritura de tesis (Marco teórico y metodología)																								
Etapla 1. Suelo (Cuantificación de diésel residual y caracterización fisicoquímica)																								
Etapla 2. Propagación de plántulas y bacterias																								
Etapla 3. Biorremediación																								
Escritura de tesis, resultados, análisis y conclusiones																								

[illegible]

Referencias bibliográficas

- Abbasian F, Lockington R, Mallavarapu M, Naidu, R.A. (2015). Comprehensive Review of Aliphatic Hydrocarbon Biodegradation by Bacteria. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 176 (3), 670–699. Doi: 10.1007 / s12010-015-1603-5
- Abrile, M. G., Fiasconaro, M. L., Gervasio, S., Antolín, M. C., & Lovato, M. E. (2021). Evaluation of the sensitivity and production of flowers in *Tagetes erecta* L. exposed to high doses of sodium from irrigation with landfill leachates. *Int. J. Recycl. Org. Waste Agric.*, 10(1), 63-75. Doi: 10.30486/IJROWA.2021.1900504.1078.
- Acosta Rubí, S.M. (2017). Inmovilización de un cultivo mixto asociado al grano de café para la degradación de hidrocarburos en ambientes acuáticos. [Tesis doctoral, Centro De Investigación y De Estudios Avanzados Del Instituto Politécnico Nacional]. <https://repositorio.cinvestav.mx/bitstream/handle/cinvestav/1327/SSIT0014608.pdf?sequence=1>
- Acuña, A. J., Tonín, N. L., Díaz, V., Pucci, G. N., y 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, R. H., Álvarez-Ovando, A. L., & Castañón, N. (2015). Efecto de la concentración de hidrocarburos sobre la producción del pasto (*Brachiaria humidicola*) en Texistepec, Veracruz. *Phyton (Buenos Aires)*, 84(1), 222-232.
- Agnello, A. C., Bagard, M., van Hullebusch, E. D., Esposito, G., & Huguenot, D. (2016). Comparative bioremediation of heavy metals and petroleum hydrocarbons co-contaminated soil by natural attenuation, phytoremediation, bioaugmentation and bioaugmentation-assisted phytoremediation. *Science of the Total Environment*, 563, 693-703. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.061>

Alavi, E., Tajadod, G., Marandi, S. J., & Arbabian, S. (2022). Vicia faba seed: A bioindicator of phytotoxicity, genotoxicity, and cytotoxicity of light crude oils. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1423421/v1>

Alcántara-Andonaire, M. C., y Llatas-Llúncor, C. L. (2019). Efecto del estiércol de *Cavia porcellus* en el potencial de malezas para la remediación de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo. [Tesis de obtención de grado, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo]. Repositorio institucional. <http://repositorio.unprg.edu.pe/handle/UNPRG/5505>

Álvarez-Jiménez, M. F., Chávez, M. D. J. A., Bautista, C. M. M., Olán, C. M., y García, C. E. L. (2019). Evaluación del suelo contaminado con hidrocarburo e intemperizado en Cárdenas, Tabasco. *Journal of Basic Sciences*, 5(15), 27-38. <https://doi.org/10.19136/jobs.a5n15.3567>

Ángel A. (2 de noviembre, 2018). Pemex se niega a limpiar 4,500 lugares contaminados por fugas de sus ductos; dice que no le toca. Animal político. <https://www.animalpolitico.com/2018/11/pemex-contaminacion-ductos-asf/>

Aparecida-Viesser J, Sugai-Guerios MH, Centa-Malucelli L, Pincerati MR, Karp SG y Teresinha Maranhão L. (2020). Petroleum-Tolerant Rhizospheric Bacteria: Isolation, Characterization and Bioremediation Potential. *Sci. Rep.*,10, 2060. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59029-9>

Arenas Moya, S., y Hernández Caro, S. A. (2012). Fitotoxicidad del Cadmio (Cd) y el Mercurio (Hg) en la especie *Brassica nigra* [Tesis de obtención de grado de licenciatura, Universidad de Medellín]. Repositorio institucional. <https://repository.udem.edu.co/handle/11407/1233>

Arias-Gilart, R., Falcón-Hernández, J., Campos-Sofía, M., Silveira-Font, Y., y López-Galarza, Ó. (2018). Efecto del tratamiento magnético en el comportamiento reológico del diésel. *Tecnol. Quím.*, 38(2), 412-427.

Auditoría Superior de la Federación. (2017). Informe general ejecutivo (Cuenta pública 2017). https://www.asf.gob.mx/Trans/Informes/IR2017c/documentos/informegeneral/Informe_feb_2019_CP.pdf

Baars, O., Zhang, X., Morel, F.M., & Seyedsayamdost, M.R. (2016). The siderophore metabolome of *Azotobacter vinelandii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 82(1), 27-39. Doi: 10.1128 / AEM.03160-15.

Baldera-Saavedra, J.P.C., y Noriega-Pérez, L.J. (2018). Electrobiodegradación de suelos contaminados con hexadecano utilizando *Aspergillus niger* inmovilizado. [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional de Trujillo]. Repositorio institucional. <https://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/11548>

Bárcenas-Calero, M. J. (2012). Determinación de los niveles de tolerancia a hidrocarburos y potencial de fitorremediación en cuatro especies vegetales nativas procedentes del sector Baeza-El Chaco, Ecuador. [Tesis para obtención de grado, Universidad Politécnica Salesiana Sede Sequito]. <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/5709>

Bayat, Z., Hassanshahian, M. & Cappello S. (2015). Immobilization of Microbes for Bioremediation of Crude Oil Polluted Environments: A Mini Review. *Open Microbiol J.*, 9, 48-54. Doi: [10.2174 / 1874285801509010048](https://doi.org/10.2174/1874285801509010048)

Beltran-Mallqui D.A. y Capristán-Terán CM. (2020). Técnicas de fitorremediación en el tratamiento de la DBO5 y DQO en aguas residuales municipales e industriales. [Tesis de obtención de grado, Universidad César Vallejo] Repositorio institucional. <http://repositorio.ucv.edu.pe/handle/20.500.12692/49044>

Beltrán-Orbegoso, R. A. y Gonza-Carnero, K. A. (2017). Citotoxicidad y genotoxicidad de las aguas de los ríos Jequetepeque y Moche mediante el bioindicador ambiental *Vicia faba L.* *Scientia Agropecuaria*, 8(3), 203-213.

Beltrán-Pineda, M.E. y Gómez-Rodríguez, A.M. (2016). Biorremediación de metales pesados Cadmio (Cd), Cromo (Cr) Y Mercurio (Hg) mecanismos bioquímicos e ingeniería genética: una revisión. *Facultad de ciencias básicas*, 12(2), 172-197.
<https://doi.org/10.18359/rfcb.2027>

Benigno Vega, R. E. (2018). Evaluación de fitoextracción por *Chenopodium ambrosioides* y *Trifolium repens* de zinc y plomo del relave de la planta concentradora de minerales “Santa Rosa de Jangas”, año 2017. [Tesis de obtención grado, Universidad Nacional Santiago Antúnez de Mayolo] <http://repositorio.unasam.edu.pe/handle/UNASAM/2446>

Bernal-Figueroa, A.A. (2014). Fitorremediación en la recuperación de suelos: una visión general. *Rev. investig. agrar. ambient.*, 5(2), 245-258. <https://doi.org/10.22490/21456453.1340>

Betancur-Sánchez, A. (2016). Evaluación de la citotoxicidad y genotoxicidad del material químico en filtros PM2.5 de las estaciones de monitoreo de la red de calidad del aire del Valle de Aburrá. [Trabajo de obtención de grado, Universidad Nacional de Colombia]. Repositorio institucional. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/56265>

Bolotnik, T. A., Timchenko, Yu. V., Plyushchenko, I. V., Levkina, V. V., Pirogov, A. V., Smolenkov, A. D., Popik, M. V., & Shpigun, O. A. (2019). Use of Chemometric Methods of Data Analysis for the Identification and Typification of Petroleum and Petroleum Products. *Journal of Analytical Chemistry*, 74(13), 1336–1340.
<https://doi.org/10.1134/s1061934819130045>

- Bolotnik, T.A., Plyushchenko, I.V., Smolenkov, A.D. et al. Identification of Spillages of Semi-Volatile Hydrocarbon Fuels in Soils by Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *J Anal Chem.*, 73, 570–575 (2018) Doi:10.1134/S1061934818060035
- Borowik, A., & Wyszowska, J. (2018). Remediation of soil contaminated with diesel oil. *J. Elem.*, 23(2). Doi: 10.5601/jelem.2018.23.1.1583
- Britos, C. N. (2012). Bioprocesos con microorganismos inmovilizados en polímeros macroporosos. [Tesis doctoral, Universidad Nacional de Quilmes]. Repositorio institucional. <https://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/789>
- Brutti, L. N., Beltran, M. J., & García de Salamone, I. (2018). *Biorremediación de los recursos naturales*. Ediciones INTA.
- Buddhadasa SC, Barone S, Bigger SW, Orbell JD. (2001). *J. Jpn. Petrol. Inst.*, 44, 378–383
- Buendía-Ríos, H., Cruz-Reyes, F., Meza-Arquiñigo, C. y Arévalo-Zumaeta, J. (2014). Fitorremediación de suelos contaminados por Hidrocarburos de Petróleo. *ALMA MÁTER*, 1(1), 113-121
- Burlec, A. F., Pecio, Ł., Kozachok, S., Mircea, C., Corciovă, A., Vereștiuc, L., Cioancă, O., Oleszek, W. & Hăncianu, M. (2021). Phytochemical Profile, Antioxidant Activity, and Cytotoxicity Assessment of *Tagetes erecta* L. Flowers. *Molecules*, 26(5), 1201.
- Cabrera-Lobelo, L.M. y Unibio-Salcedo, M.T. (2019). Evaluación de la remoción de grasas y aceites en suelo contaminado con diésel B10 y biodiésel aplicando la tecnología ose II implementada por EOM Consulting S.A.S. [Proyecto de grado, Fundación Universidad de América]. Repositorio institucional. <http://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/7711/1/6142384-2019-2-IQ.pdf>

- Cambarieri, L., Pucci, G. N., & Acuña, A. J. (2021). Optimización de un proceso de bioestimulación en un suelo de Río Gallegos, Argentina, para su utilización en biorremediación de hidrocarburos. *Ecosistemas*, 30(1), 2084-2084. <https://doi.org/10.7818/ECOS.2084>
- Carrillo-Niquete, G.A., Andrade J.L., Hernández-Terrones, L. y Cobos-Gasca, V. (2015). La fitorremediación: una opción limpia para un problema sucio. *Bioagrociencias*, 8(2), 22-27.
- Casals-Pérez, E., Rabassa, D., Viera Ribot, O. M., Gutiérrez Benítez, O., & Castro Rodríguez, D. J. (2020). Comportamiento de factores abióticos en la biorremediación de residuos petrolizados mediante biopilas a escala semi-piloto. *Centro Azúcar*, 47(3), 36-46.
- Castillo-Rogel, R.T., More Calero, F.J., Cornejo La Torre, M., Fernández Ponce, J. N., y Mialhe Matonnier, E.L. (2020). Aislamiento de bacterias con potencial biorremediador y análisis de comunidades bacterianas de zona impactada por derrame de petróleo en Condorcanqui-Amazonas-Perú. *Rev. Investig. Altoandin.*, 22(3), 215-225. <http://dx.doi.org/10.18271/ria.2020.656>
- Castro-Mancilla, Y.V., Castro-Meza, B.I., de la Garza-Requena, F.R., Rivera-Ortiz, P., Heyer-Rodríguez, L. y Ortiz-Carrizales, Y.P. (2013). Variación de las poblaciones microbianas del suelo por la adición de hidrocarburos. *Terra Latinoamericana*, 31(3), 221-230.
- Cavazos-Arroyo, J., Pérez-Armendáriz, B. y Mauricio-Gutiérrez, A. (2014). Afectaciones y consecuencias de los derrames de hidrocarburos en suelos agrícolas de Acatzingo, Puebla, México. *Agric. soc. desarro.*, 11(4), 539-550.
- Chachina, SB, Voronkova, NA, Shadrin, MA y Evdokimov, NS (2019). El recultivo de los suelos, contaminados con gasolina y gasóleo, con la ayuda de la lombriz *Dendrobena veneta* y el complejo de microorganismos. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, 315(59), 052-065.

- Chaudhary, DK, Bajagain, R., Jeong, SW y Kim, J. (2019). Development of a bacterial consortium comprising oildegraders and diazotrophic bacteria for elimination of exogenous nitrogen requirement in bioremediation of diesel contaminated soil. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 35 (7), 99. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2674-1>
- Cheng, L., Wang, Y., Cai, Z., Liu, J., Yu, B., & Zhou, Q. (2016). Phytoremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated saline-alkali soil by wild ornamental Iridaceae species. *Int. J. Phytoremediation*, 19(3), 300–308. Doi:10.1080/15226514.2016.1225282
- Cheng, L., Zhou, Q., & Yu, B. (2019). Responses and roles of roots, microbes, and degrading genes in rhizosphere during phytoremediation of petroleum hydrocarbons contaminated soil. *Int. J. Phytoremediation*, 21(12), 1161-1169. <https://doi.org/10.1080/15226514.2019.1612841>
- Chennappa, G., Udaykumar, N., Vidya, M., Nagaraja, H., Amaresh, YS y Sreenivasa, MY (2019). Azotobacter—A Natural Resource for Bioremediation of Toxic Pesticides in Soil Ecosystems. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, 267–279. Doi: 10.1016 / b978-0-444-64191-5.00019-5
- Chiriví-Salomón, J.S. (2020). Biorremediación de hidrocarburos saturados y aromáticos policíclicos, 32 – 49. *Libros Universidad Nacional Abierta y a Distancia*.
- Chuluun, B., Shah, S. H., & Rhee, J. S. (2014). Bioaugmented phytoremediation: A strategy for reclamation of diesel oil-contaminated soils. *Int. J. Agric. Biol*, 16, 624-628.
- Conde-Avila, V., Ortega-Martínez, L. D., Loera, O., El Kassis, E. G., Dávila, J. G., Valenzuela, C. M., & Armendáriz, B. P. (2020). Pesticides degradation by immobilised microorganisms. *Int J. Environ. Anal. Chem.*, 1–31. <https://doi.org/10.1080/03067319.2020.1715375>

- Corona Galicia, A. M. (2018). Evaluación de cepas bacterianas promotoras del crecimiento vegetal para degradar hidrocarburos ligeros y compuestos aromáticos (BTX) [Tesis de obtención de grado, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla]. Repositorio institucional. <https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/7730>
- Cota-Ruiz, K., Nuñez-Gastelúm, J.A., Delgado-Rios, M. y Martinez-Martinez A. (2019). Biorremediación: actualidad de conceptos y aplicaciones. *Biotechnia*, XII (1). 37-44. <https://doi.org/10.18633/biotechnia.v21i1.811>
- Cruz, H. G. A., Calleja, P. D. O., Herrera, R. G., Marín, A. R., Medinilla, E. E., Salinas, R. I. M., ... & Toledo, P. V. (2016). Biorremediación de suelos contaminados con aceite automotriz usados mediante sistema de biopilas. *Espacio I+ D Innovación más desarrollo*, 5(12).
- Cruz, J. M., Corroqué, N. A., Montagnoli, R. N., Lopes, P. R. M., Morales, M. A. M., & Bidoia, E. D. (2019). Comparative study of phytotoxicity and genotoxicity of soil contaminated with biodiesel, diesel fuel and petroleum. *Ecotoxicology*. <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02037-x>
- Cruz-Acosta, Y.R., Caraveo-Martínez, I., Pastrana-Pacho, A. y Díaz-Ramírez, I.J. (2015). Medición de la enzima lipasa en suelos contaminados con hidrocarburos: desarrollo de un método en microplacas [póster]. XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Guadalajara, Jalisco, México.
- Cuartas, D. C. Ñ. (2012). Biorremediación para la degradación de hidrocarburos totales presentes en los sedimentos de una estación de servicio de combustible [Tesis de obtención de grado licenciatura, Universidad Tecnológica de Pereira]. <https://core.ac.uk/download/pdf/71396871.pdf>
- Dager, M. R., de Cori, C. E. C., Sosa, F., Aular, L. M., Mora, R., Castillo, L., Ramírez E., Rodríguez, J., León M., Silva, Tovar M.R. C., Martínez A., Reverón A.M., y Gámez, F. (2018).

Comparación De Métodos Para Analizar Materia Orgánica En Materiales Orgánicos.
Memorias del XXII Congreso Venezolano de la Ciencia del Suelo.

Dai, Y., Liu, R., Zhou, Y., Li, N., Hou, L., Ma, Q., & Gao, B. (2020). Fire Phoenix facilitates phytoremediation of PAH-Cd co-contaminated soil through promotion of beneficial rhizosphere bacterial communities. *Environ. Int.*, 136, 105421.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105421>

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. *Trop. Subtrop. Agroecosystems*, 14(2), 597-612.

Diario Oficial de la Federación (DOF). (2013/10/09) Norma Oficial Mexicana-138-SEMARNAT/SSA1-2012. Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación.
https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5313544&fecha=10/09/2013

Díaz, S. A., San Martín, Y. B., León, H. T., García, Y. C., & Jiménez, K. A. (2021). Evaluación de la capacidad hidrocarburoclástica de un consorcio bacteriano aislado de zonas costeras de Cuba. *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 079-088.

Díaz-Martínez, M.E., Alarcón, A., Ferrera Cerrato, R., Almaraz Suarez, J.J. y García Barradas, O. (2013). Crecimiento de *Casuarina equisetifolia* (Casuarinaceae) en suelo con diésel, y aplicación de bioestimulación y bioaumentación. *Rev. biol. trop.*, 61(3), 1039-1052.

Díaz-Paredes, J. M. (2015). Biorremediación de agua con nitritos mediada por *Azotobacter spp.* en biorreactores air lift. [Tesis de obtención de grado, Universidad Nacional Agraria de la Selva]. Repositorio institucional <http://repositorio.unas.edu.pe/handle/UNAS/1103>

- Di-Martino, C. (2015). Estudio de bacterias del género *Pseudomonas* en la degradación de hidrocarburos y síntesis de biosurfactantes: análisis del efecto de los polihidroxialcanoatos [Tesis de obtención de grado, Universidad de Buenos Aires]. Repositorio institucional.
https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n5752_DiMartino.pdf
- Domínguez-Sánchez, S., Martínez-Montoya, H., Hernández-Jiménez, M. C., Torres-Rodríguez, H. F., & Rodríguez-Castillejos, G. (2018). Los microorganismos como una alternativa para la remediación de contaminación por hidrocarburos. *Mex. J. Biotechnol.* 3(4):70-83.
<https://doi.org/10.29267/mxjb.2018.3.4.70>
- Ebrahimi, M., Safari Sinegani, A. A., Sarikhani, M. R., & Mohammadi, S. A. (2017). Comparison of artificial neural network and multivariate regression models for prediction of *Azotobacteria* population in soil under different land uses. *Comput. Electron. Agric.*, 140, 409–421. Doi:10.1016/j.compag.2017.06.019
- El-barbary, TAA y El-Badry, MA (2019). Nickel (II) biorecovery from industrial wastewater by *Azotobacterial vineland* during two stage processes. *Global Journal of Environmental Science and Technology*, 7(2), 568-576
- Esquivel-Cote, R., Gavilanes-Ruiz, M., Cruz-Ortega, R. y Huante P. (2013). Importancia agrobiotecnológica de la enzima ACC desaminasa en rizobacterias, una revisión. *Rev. fitotec. Mex.*, 36 (3), 251-258.
- Fiskesjo, G., 1985. The "Allium test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, 102, 99–112.
- Galindo-Pérez, E. J., Ocaña Soto, R. R., Chávez Sandoval, B. E., Naranjo Castañeda, F. A., Martínez García, M., Campos Contreras, J.E., & García Franco, F. (2017). Evaluación de la

fitotoxicidad de aceite automotriz usado con *Vicia faba* y *Phaseolus coccineus*. *Rev. Int. Contam. Ambient.*, 33(3), 421-435. <https://doi.org/10.20937/rica.2017.33.03.06>

Gallegos, A. C. F., González, V., Aguilar, C. N., & Cristóbal, N. (2014). Biofertilizantes microbianos. Plaza y Valdés, SA de CV.

García-Cruz, N. U., y Aguirre-Macedo, M. L. (2015). Biodegradación de petróleo por bacterias: algunos casos de estudio en el Golfo de México. *Golfo de México: Contaminación e Impacto Ambiental, Diagnóstico y Tendencias*; Botello, AV, Rendón von Osten, J., Benítez, JA, Gold-Bouchot, G., Eds, 641-652.

Garzón-Jiménez, R., & Barragán-Huerta, B. (2008). Inmovilización microbiana: técnicas y usos en el tratamiento de residuos tóxicos. *Revista Sistemas Ambientales*, 2(1), 23-34

Gastélum-Rosas, C. D. J. (2014). Inmovilización de biomasa sulfato reductora en zeolita clinoptilolita en un reactor anaeróbico de lecho fijo. [Tesis grado de licenciatura, Universidad de Sonora]. Repositorio institucional. <http://repositorioinstitucional.uson.mx/handle/unison/2328>

Gaviria-Giraldo, J., Restrepo-Franco, G.M., Galeano-Vanegas, N.F., y Hernández-Rodríguez, A. (2018). Bacterias diazotróficas con actividad promotora del crecimiento vegetal en *Daucus carota* L. *Cien.Aгри.*, 15(2). 19-27. <https://doi.org/10.19053/01228420.v15.n1.2018.7753>

Gerónimo-Urrutia, A.E. y Vásquez-Silva, C.E. (2017). Determinación de la eficiencia de biorremediación con lodos activados en suelo contaminado por hidrocarburos. [Tesis de obtención de grado, Universidad Nacional Del Callao]. Repositorio institucional. http://209.45.55.171/bitstream/handle/UNAC/3255/Geronimo%20urrutia%20y%20Vasquez%20Silva_TITULO%20AMBIENTAL_2017.pdf?sequence=1&isAllowed=y

- González F., H., & Fuentes M., N. (2017). Action mechanism of five microorganism promoters of plant growth. *Revista De Ciencias Agrícolas*, 34(1), 17-31.
<https://doi.org/10.22267/rcia.173401.60>
- Gopi, G., Elumalai, A., & Jayasri, P. (2012). A concise review on *Tagetes erecta*. *Int. J. Phytopharm. Res.*, 3(1), 16-19.
- Gran-Scheuch, A.A. (2015). Aislamiento y caracterización de bacterias antárticas capaces de metabolizar fenantreno en presencia de metales pesados. [Tesis de grado, Universidad de Chile]. Repositorio institucional.
<http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/138517/Aislamiento-y-caracterizacion-de-bacterias-antarticas-capaces-de-metabolizar-fenantreno-en-presencia-de-metales-pesados.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Gutiérrez, S. N. M. (2007). Nematodos fitoparásitos asociados al cultivo de *Tagetes erecta* en el distrito Virú, La Libertad, Perú. *Neotropical Helminthology*, 1(1), 15-20.
- Hajabbasi, M. A. (2016). Importance of soil physical characteristics for petroleum hydrocarbons phytoremediation: A review. *African Journal of Environmental Science and Technology*, 10(11), 394-405. Doi: 10.5897/AJEST2016.2169
- Hernández-De la Cruz, Y. (2019). Uso de *Bacillus coagulans* para la biorremediación de sedimento contaminado por hidrocarburos en el ejido el Sacrificio Tuxpan, Veracruz. [Tesis de obtención de grado, Universidad Veracruzana]. Repositorio institucional:
<https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/1944/50002/HernandezDelaCruzYolanda.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Hernández-López, W.A. (2012). Efecto de la variación de la concentración del surfactante Triton X-100 en la remediación de una muestra de suelo contaminada con hidrocarburos a escala laboratorio, utilizando la técnica de remediación lavado de suelo. [Proyecto de grado,

Universidad Pontificia Bolivariana]. Repositorio institucional.
https://repository.upb.edu.co/bitstream/handle/20.500.11912/1741/digital_22713.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Hernández-Rodríguez, A., Rives-Rodríguez, N., Acebo-Guerrero, Y., Diaz-de la Osa, A., Heydrich-Pérez, M., y Divan-Baldani, V.L. (2014). Potencialidades de las bacterias diazotróficas asociativas en la promoción del crecimiento vegetal y el control de *Pyricularia oryzae* (Sacc.) en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Rev. prot. veg.*, 29(1), 1-10.

Hewelke, E., Szatyłowicz, J., Hewelke, P., Gnatowski, T., & Aghalarov, R. (2018). The Impact of Diesel Oil Pollution on the Hydrophobicity and CO₂ Efflux of Forest Soils. *Water Air Soil Pollut*, 229(2). Doi:10.1007/s11270-018-3720-6

Hindersah, R., Mulyani, O., & Osok, R. (2017). Proliferation and exopolysaccharide production of *Azotobacter* in the presence of mercury. *Biodivers. J.*, 8(1), 21-26.

Hipkins, M.F., y Baker, N.R. (1986) Photosynthesis Energy Transduction. En: Hipkins, M.F., & Baker, N.R. (Eds.) Spectroscopy, IRL Press, Oxford, Washington, pp. 51101.

Idowu, O., Semple, K. T., Ramadass, K., O'Connor, W., Hansbro, P., & Thavamani, P. (2019). Beyond the obvious: Environmental health implications of polar polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environment International*, 123, 543–557. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.12.051>

Ikeura, H., Kawasaki, Y., Kaimi, E., Nishiwaki, J., Noborio, K. y Tamaki, M. (2015). Screening of plants for phytoremediation of oil-contaminated soil. *Int. J. Phytoremediation*, 18 (5), 460–466. Doi: 10.1080 / 15226514.2015.1115957

Innemanová, P., Filipová, A., Michalíková, K., Wimmerová, L., & Cajthaml, T. (2018). Bioaugmentation of PAH-contaminated soils: A novel procedure for introduction of bacterial degraders into contaminated soil. *Ecological engineering*, 118, 93-96. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2018.04.014>

Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS) (07/03/2015). WOCAT. <https://digital.csic.es/handle/10261/164373>

Izquierdo-Romero, A.R. (2013). Biodegradación de HAPs durante la biorremediación aeróbica del petróleo. Análisis de poblaciones bacterianas y genes funcionales. [Tesis doctoral de obtención de grado, Universitat de Barcelona]. Repositorio institucional. <https://www.tdx.cat/handle/10803/132994#page=1>

Jaulis C.C.J. y Alejandro Pacheco A. (2015). Producción de marigold (*Tagetes patula* cv. *Durango orange*) en diferentes medios de crecimiento, bajo condiciones de vivero de la Universidad Nacional Agraria La Molina. *In Anales científicos*, 76(1), 38-43. <https://doi.org/10.21704/ac.v76i1.762>

Jianv, L.; Xin, X.; Qixing, Z. (2017). Phytoremediation of contaminated soils using ornamental plants. *Environ. Rev.*, 26(1), 43–54. <https://doi.org/10.1139/er-2017-0022>

Jiménez-Reascos, E.G., y Ramos-Collaguazo, B. A. (2019). Evaluación de la eficiencia fitorremediadora de *Lupinus pubescens*, *Plantago major* y *Scirpus californicus* en suelos contaminados con arsénico [Tesis para obtención de grado, Universidad Politécnica Salesiana]. Repositorio institucional]. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/17488/1/UPS-QT13975.pdf>

Jiménez-Reascos, E.G., y Ramos-Collaguazo, B. A. (2019). *Evaluación de la eficiencia fitorremediadora de Lupinus pubescens, Plantago major y Scirpus californicus en suelos contaminados con arsénico* [Tesis para obtención de grado, Universidad Politécnica

- Kai, T., Ikeura, H., Ozawa, S., & Tamaki, M. (2018). Effects of basal fertilizer and perlite amendment on growth of zinnia and its remediation capacity in oil-contaminated soils. *Int. J. Phytoremediation*, 20(12), 1236–1242. Doi:10.1080/15226514.2018.1460310
- Kaur, M., Sharma, A., Soodan, R. K., Chahal, V., Kumar, V., Katnoria, J. K., & Nagpal, A. K. (2019). *Allium cepa* root chromosomal aberration assay: a tool to assess genotoxicity of environmental contaminants. Evaluation of environmental contaminants and natural products: a human health perspective. Bentham eBooks, Singapore, 65-93.
- Kebede, G., Tafese, T., Abda, E. M., Kamaraj, M., & Assefa, F. (2021). Factors influencing the bacterial bioremediation of hydrocarbon contaminants in the soil: mechanisms and impacts. *Journal of Chemistry*, 2021.
- Koksunan, S., Vichitphan, S., Laopaiboon, L., Vichitphan K y Han, J.(2013).Growth and Cyanide Degradation of *Azotobacter vinelandii* in Cyanide-Containing Wastewater System. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 23(4): 572-578. <https://doi.org/10.4014/jmb.1209.09026>
- Kothari, V.; Panchal, M.; Srivastava, N. (2013). *Microbial Degradation of Hydrocarbons*; Institute of Science, Nirma University: Ahmedabad,Gujarat, India.
- Kumar, SS y Shankar, S. (2019). *Pleurotus florida* and nitrogen fixing organism (*Azotobacter vinelandii*) for the biodegradation of coir pith. *J. Pharmacogn. Phytochem.*, 8 (3), 2521-2525.
- Kuyukina, M. S., Ivshina, I. B., Kamenskikh, T. N., Bulicheva, M. V., & Stukova, G. I. (2013). Survival of cryogel-immobilized *Rhodococcus* strains in crude oil-contaminated soil and

their impact on biodegradation efficiency. *Int. Biodeterior. Biodegradation*, 84, 118–125.
Doi: 10.1016/j.ibiod.2012.05.035

Laothamteep, N., Naloka, K., & Pinyakong, O. (2022). Bioaugmentation with zeolite-immobilized bacterial consortium OPK results in a bacterial community shift and enhances the bioremediation of crude oil-polluted marine sandy soil microcosms. *Environmental Pollution*. 292, 118309. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118309>

Leal-Almanza, J., Gutiérrez-Coronado, M.A., Castro-Espinoza, L., Lares-Villa, F., Cortes-Jiménez, J.M., y De los Santos-Villalobos, S. (2018). Microorganismos promotores de crecimiento vegetal con yeso agrícola en papa (*Solanum tuberosum* L.) bajo casa sombra. *Agrociencia*, 52(8), 1149-1159.

Leal-Castellanos MC. (2011). Planteamiento de alternativas fisicoquímicas para remediación de agua subterránea y suelos contaminados con hidrocarburos apoyados en la aplicación de software visual modflow para un área de interés de Ecopetrol S.A. [Tesis de grado, Universidad Pontificia Bolivariana]. Repositorio Institucional. <https://repository.upb.edu.co/handle/20.500.11912/1240>

Ledezma-Villanueva A. (2016). Estudio De La Población Microbiana En Un Sistema De Biorremediación In Situ De Un Suelo Impactado Con Hidrocarburos De Petróleo. [Tesis para obtención de grado, Universidad Autónoma De Nuevo León]. Repositorio institucional. <http://eprints.uanl.mx/13661/1/1080238042.pdf>

Leme, D. M., & Marin-Morales, M. A. (2008). Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water—A case study. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 650(1), 80–86. Doi:10.1016/j.mrgentox.2007.10.006

- Liu, J., Xin, X. y Zhou, Q. (2018). Phytoremediation of Contaminated Soils Using Ornamental Plants. *Environ. Rev.*, 26 (1), 43–54. Doi: 10.1139 / er-2017-0022
- Liu, L.Z., Gong, Z.Q., Zhang, Y.L., & Li, P.J. (2011). Growth, Cadmium Accumulation and Physiology of Marigold (*Tagetes erecta* L.) as Affected by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Pedosphere*, 21(3), 319–327. Doi:10.1016/s1002-0160(11)60132-x
- Liu, R., Xiao, N., Wei, S., Zhao, L., & An, J. (2014). Rhizosphere effects of PAH-contaminated soil phytoremediation using a special plant named Fire Phoenix. *Science of The Total Environment*, 473-474, 350–358. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.12.027
- Lladó-Fernández, S. (2012). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos pesados y caracterización de comunidades microbianas implicadas. [Tesis de grado, Universitat de Barcelona]. Repositorio institucional.
https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/37060894/curdo_pesado.pdf?1426959970=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DCrudo_pesado.pdf&Expires=1602201698&Signature=aiDfWQ2G0Me3JuRTJancu2gJPEAftJoR~M0SPLagRFNxZcaPNp25cXhsGjA1TYy-eVn4YxQr4IcbahBHD7tPNIH6rVtJaW4-40m74Veas33GY~TisLIWieYqe4SzqO2u7TFac8oY2gUmaZManDy6t44vIm6L37GiVP6rgd~suy6wOb1s9lHENMu1C~LPGFrUQpukL~ASZmBvzt87iSYCJuYb91MGgWNZ9kIIwLZtK0ITvFGaxAzqXUTAcWDD5hT6BW0vANX9jtdi1phRsfIVaJ1uZ5VBhP~NE-Tm8wyMFy3iiW4ovlENFPVoW8MLR8ZMyeO4oXXvveDXXAf2PjQiw_&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA
- López, E., Cisneros, S. y Ochoa, J. (2016). Procesos de bioestimulación para la remediación de suelos agrícolas contaminados con tebuconazol y λ -cialotrina. *Simulación y Laboratorio*, 3(8), 1-9.

López, R. (2019, 17), En rutas del 'huachicol', 4 mil 500 sitios contaminados por Pemex. Milenio Diario. <https://www.milenio.com/policia/rutas-huachicol-4-mil-500-sitios-contaminados-pemex>

Maliki, I., Abdul-Manas, N., Ahmad, S., Fuse, H., Ramírez-Moreno, N., & Zulkharnain, A. (2020). Removal of heterocyclic compound carbazole using cell immobilization of *Thalassospira profundimaris* strain M02. *Rev Mex Ing Quim.*, 20(1), 413-422. <https://doi.org/10.24275/rmiq/Bio1808>

Maniyam, M. N., Ibrahim, A. L., & Cass, A. E. G. (2017). Enhanced cyanide biodegradation by immobilized crude extract of *Rhodococcus* UKMP-5M. *Environ. Technol.*, 1–13. Doi:10.1080/09593330.2017.1393015

Marín-San Pedro, A.F. (2010). Optimización de los tratamientos de desorción térmica de suelos contaminados por hidrocarburos derivados del Petróleo. [Tesis de grado, Universidad politécnica de Madrid]. Repositorio institucional. <http://oa.upm.es/3703/>

Marques-Benavides, L., Modesto-Sánchez, D., Saucedo-Martínez, B. C., Rico-Cerda, J. L., Bribiesca-Rodríguez, L., y Sánchez-Yáñez, J. M. (2020). *Phaseolus vulgaris* en el tratamiento de suelo un agrícola contaminado por hidrocarburos. *J. Selva Andina Res. Soc.*, 11(2), 94-102.

Marquina, M.E., Ramírez, Y., y Castro, Y. (2018). Efecto de bacterias rizosféricas en la germinación y crecimiento del pimentón *Capsicum annuum* L. var. Cacique Gigante. *Bioagro.*, 30(1), 3-16.

Martel-Valles, J.F., Cuevas-González, E., Benavides-Mendoza, A., Valdez-Aguilar, L.A., y Foroughbakhch-Pournavab, R. (2017). Distribución mineral de plantas de tomate irrigadas con agua contaminada con benceno, diésel y gasolina. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 4(10), 21-30,

Martínez, S. (2017). Biomarcadores de genotoxicidad y estudios de homogeneidad genética en *Heleobia cf. australis* para el análisis ambiental de la costa uruguaya. [Tesis de obtención de grado, Universidad de la Republica de Uruguay]. Repositorio institucional. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/10206/1/uy24-18587.pdf>

Martínez, V. E. (2001). Efecto de hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de suelo arcilloso. *Terra latinoamericana*, 19(1), 9-17.

Martínez-Barrios, E. (2020). Estudio de la migración de hidrocarburos en suelos gruesos para la remediación electroquímica. [Tesis de grado, Instituto tecnológico de ciudad Madero]. Repositorio Institucional. <http://200.188.131.162:8080/jspui/handle/123456789/386>

Martínez-Hernández, O. (2019). Respuesta funcional de *Heliconia Psittacorum*, *Helianthus Anuus* y *Framboyán* como plantas para la fitorremediación con acondicionadores orgánicos en suelos contaminados por hidrocarburos en Ecosur Villahermosa, Tabasco. [Tesis de grado, Universidad de ciencias y artes de Chiapas]. Repositorio institucional. <https://www.ecosur.mx/ecoconsulta/indicadores/detalles.php?id=32300&bdi=30&name=RESPUESTA%20FUNCIONAL%20DE%20HELICONIA%20PSITTACORUM,%20HELIANTHUS%20ANUUS%20Y%20FRAMBOY%C3%81N%20COMO%20PLANTAS%20PARA%20LA%20FITORREMEDIACI%C3%93N%20CON%20ACONDICIONADORES%20ORG%C3%81NICOS%20EN%20SUELOS%20CONTAMINADOS%20POR%20HI DROCARBUROS%20EN%20ECOSUR%20VILLAHERMOSA,%20TABASCO>

Martínez-Jara, D. C. (2017). Elaboración y evaluación de la actividad fotocatalítica de un biocompuesto para su potencial aplicación en la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos presentes en agua [Tesis de grado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. Repositorio institucional. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/7013>

- Martínez-Prado, M. A., y Soto-Álvarez, C. E. (2017). Remoción de hidrocarburos de petróleo de un suelo de baja permeabilidad: biorremediación y electrorremediación. *Rev Mex Ing Quim.*, 16(3), 955-970.
- Martins, C.D.C., Liduino, V.S., Oliveira, F.J.S. y Sérvulo, E.F.C. (2014). Phytoremediation of Soil Multi-Contaminated with Hydrocarbons and Heavy Metals Using Sunflowers. *Int. J. Eng. Technol.*, 14(5), 1-6.
- Mazzeo, D.E.C., Roberto, M.M., Sommaggio, L.R.D., Marin-Morales, M.A. (2018). Bioassays Used to Assess the Efficacy of Biodegradation. Toxicity and Biodegradation Testing. Methods in Pharmacology and Toxicology. (In: Bidoia, E., Montagnolli, R. Eds). Humana Press, New York, pp. 215–239 https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7425-2_11
- McIntosh, P., Schulthess, C. P., Kuzovkina, Y. A., & Guillard, K. (2017). Bioremediation and phytoremediation of total petroleum hydrocarbons (TPH) under various conditions. *International Journal of Phytoremediation*, 19(8), 755–764. <http://dx.doi.org/10.1080/15226514.2017.1284753>
- Medina, R. (2017). Remediación de un suelo crónicamente contaminado con hidrocarburos policíclicos aromáticos [Tesis de obtención de grado, Universidad Nacional de La Plata]. Repositorio institucional. <https://digital.cic.gba.gob.ar/handle/11746/7181>
- Meléndez-Gélvez, I., Quijano-Vargas, M. J., y Quijano-Parra, A. (2017). Genotoxicidad de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos extraídos mediante el sistema Diclorometano-Etanol-Tolueno en muestras del aire de Cúcuta-Norte de Santander-Colombia. *Acta Toxicol. Argent.*, 25(1),1-11.
- Méndez-Sánchez, J.A., López-Hernández, E.S. y López-Martínez S. (2019). Deficiencia productiva del sistema Cacao, a causa de PEMEX: Percepción o realidad. *Journal of Basic Sciences*, 5(15), 124-133. <https://doi.org/10.19136/jobs.a5n15.3573>

- Ministerio de Salud y Protección Social. (2018). Evaluación de los efectos en salud de la comunidad Hitnü en los municipios de Arauca y Puerto Rondón (Arauca), por exposición a situaciones relacionadas con actividades de explotación de Hidrocarburos. https://minciencias.gov.co/sites/default/files/upload/convocatoria/anexo_2-protocolo_de_estudio_de_la_propuesta_0.pdf
- Mireles-Morales, E., Camacho-Frías, E. y Barrera-Cortés, J. (2013). Degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos de alto peso molecular con bacterias nativas de un suelo contaminado. *Revista de ciencia y tecnología de la UACJ*. 11(2), 25-31.
- Mireles-Morales, E., Camacho-Frías, E. y Barrera-Cortés, J. (2013). Degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos de alto peso molecular con bacterias nativas de un suelo contaminado. *Revista de ciencia y tecnología de la UACJ*. 11(2), 25-31.
- Molina-Solís, G. N. (2020). Determinación de las condiciones para producción de mucopolisacáridos por aislados de *Azotobacter* provenientes de suelos arcillosos contaminados con hidrocarburos de la región amazónica [Tesis de obtención de grado, Pontificia Universidad Católica Del Ecuador]. Repositorio institucional. <http://201.159.222.35/handle/22000/18037>
- Morales-Bautista, C.M., Lobato-García, C.E., Flores-Jiménez, J. y Mendez-Olán, C. (2019). Cambios en las propiedades físicas y químicas de un suelo debido a un proceso de restauración aplicado a un derrame de hidrocarburos. *Acta Universitaria*, (29), 1-14. <http://doi.org/10.15174.au.2019.2154>
- Moubasher, HA, Hegazy, AK, Mohamed, NH, Moustafa, YM, Kabiell, HF y Hamad, AA (2015). Phytoremediation of soils polluted with crude petroleum oil using *Bassia scoparia* and its associated rhizosphere microorganisms. *Int. Biodeterior. Biodegradation*, 98, 113–120. Doi: 10.1016 / j.ibiod.2014.11.019

- Muñoz-Cuaical, S.D. (2016). Evaluación de la eficacia de *Trichoderma* sp y *Pseudomona* sp para biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. [Tesis de grado, Universidad Politécnica Salesiana Sede-Quito]. Repositorio institucional. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/13228/1/UPS-QT10474.pdf>
- Muskus Morales, A.M., Santoyo Muñoz, C., y Plata Quintero, L.S. (2013). Evaluación de las técnicas de atenuación natural, bioventing, bioaumentación y bioaumentación-bioventing, para la degradación de diésel en un suelo arenoso, en experimentos en columna. *Gest. Ambient.*, 16(2). 83-94.
- Nápoles, J., Rodríguez, S., Santiago, L., & Ábalos, A. (2015). Disminución del extracto orgánico total en suelos contaminados con hidrocarburos. *Tecnología Química*, 35(3), 322-333.
- Nápoles, J., Rodríguez, S., Santiago, L., y Ábalos, A. (2015). Disminución del extracto orgánico total en suelos contaminados con hidrocarburos. *Tecnol. quím.*, 35(3), 322-333.
- Nava-López, L.F., Camacho-Millán, R., Aguilar-Medina, E.M., Romero-Navarro, J.G., Sosa-Pérez, R., Ruiz-Abitia, A.I., Cárdenas-Cota, H.M. y Ramos-Payán, R. (2017). Formulación de biofertilizantes a partir de aislados regionales de *Azotobacter* y *Azospirillum* y su efecto en cultivo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) en casa sombra. *Mex. J. Biotechnol.*, 2(2), 183-195.
- Núñez-Terrones, E., Sánchez-Torres, Y. y Terrones-Cordero, A. (2020). Efectos de la reforma energética en el territorio y condiciones socioeconómicas en Papantla, Veracruz, México. *LiminaR Estudios Sociales y Humanísticos*, 18(1), 194-208. Doi: 10.29043/LIMINAR.V18I1.720
- Nzila, A. (2018). Estado actual de la degradación de hidrocarburos de petróleo alifáticos y aromáticos por microbios termofílicos y perspectivas futuras. *Revista Internacional de Investigación Ambiental y Salud Pública*, 15 (12), 2782. Doi: 10.3390 / ijerph15122782

- Onofre-Dolores, G., Mireles-Morales, E., Morales-Romero, J.L., Camacho-Frías, E. y Barrera-Cortés, J. (2013). Remoción de hidrocarburos policíclicos aromáticos de alto peso molecular mediante bacterias asociadas a sustancias húmicas. *Ciencia y tecnología de la UACJ*. 11 (2).
- Onwurah, I.N.E, y Nwuke, C. (2004). Enhanced bioremediation of crude oil-contaminated soil by a *Pseudomonas* species and mutually associated adapted *Azotobacter vinelandii*. *J. Chem. Technol. Biotechnol*, 79 (5), 491–498. Doi: 10.1002 / jctb.1009
- Orozco Corral, A.L., Valverde Flores, M.I., Martínez Téllez, R., Chávez Bustillos, C. y Benavides Hernández, R. (2016). Propiedades físicas, químicas y biológicas de un suelo con biofertilización cultivado con manzano. *Terra Latinoamericana*, 34(4), 441-456.
- Ortiz-Galeana, M.A., Hernández-Salmerón, J.E., Valenzuela-Aragón, B., De los Santos-Villalobos, S., Rocha-Granados, M.C. y Santoyo, G. (2018). diversidad de bacterias endófitas cultivables asociadas a plantas de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) cv. *Biloxi* con actividades promotoras del crecimiento vegetal. *Chil. j. agric. anim. sci.*, 34(2), 140-151. <https://dx.doi.org/10.4067/S0719-38902018005000403>
- Ortiz-Salinas, R., Cram, S. y Sommer, I. (2012). Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en suelos de la llanura aluvial baja del estado de Tabasco, México. *Universidad y ciencia*, 28(2), 131-144.
- Pandey, P., Kapley, A., & Brar, S. K. (2021). Biodegradation of High Molecular Weight Polyaromatic Hydrocarbons in Different Environments. *Frontiers in Microbiology*. 2079. <https://doi.org/10.14719/pst.2019.6.sp1.666>
- Peña-Murillo, S.E., Zambrano-Nevárez, E., Baquerizo-Figueroa, J., Antón-Loor, A. y Solórzano-Aldaz, K. (2019). Nuevos sistemas de tratamientos de suelo contaminado por hidrocarburos. *Revista Ibérica de Sistemas e Tecnologías de Informação*. (E21). 226–236.

- Peña-Salamanca, E.J., Madera-Parra, C.A., Sánchez J.M. y Medina-Vásquez, J. (2013). Bioprospección de plantas nativas para su uso en procesos de biorremediación: caso *Heliconia Psittacorum* (Heliconiaceae). *Rev. acad. colomb. cienc.*, 37(145), 469-481.
- Peralta-Pérez, M. D. R. y Volke-Sepúlveda, T. L. (2012). La defensa antioxidante en las plantas: una herramienta clave para la fitorremediación. *Revista mexicana de ingeniería química*, 11(1), 75-88.
- Peralta-Sánchez, M., Trejo-Téllez, L. I., Gómez-Merino, F. C., Rodríguez-Mendoza, M., Serrato-Cruz, M. Á., y García-Albarado, J. C. (2014). Metabolitos secundarios y clorofilas en cempasúchil en respuesta a estrés salino. *Rev. Mex. Cienc. Agríc*, 5(SPE9), 1589-1599. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i9.1050>
- Pérez-García, C.C. (2015). Revisión del tema materiales usados como matrices de inmovilización para microorganismo de interés ambiental [Tesis de obtención de grado, Bogotá-DC]. Repositorio institucional. <https://repositorio.uniandes.edu.co/bitstream/handle/1992/17305/u703892.pdf?sequence=1>
- Pérez-Muñoz, Y., López-Martínez, S., Rodríguez-Luna, A.R. y Ramos-Arcos, S.A. (2019). Ba. *Journal of Basic Sciences*, 5 (15). 134-152. <https://doi.org/10.19136/jobs.a5n15.3574>
- Pérez-Ortega, G., Angeles-López, G. E., Argueta-Villamar, A., & González-Trujano, M. E. (2017). Preclinical evidence of the anxiolytic and sedative-like activities of *Tagetes erecta* L. reinforces its ethnobotanical approach. *Biomed. Pharmacother.*, 93, 383–390. Doi:10.1016/j.biopha.2017.06.064
- Pérez-Vargas, J., Vigueras-Carmona, S.E., Gómez-Guzmán, O. y Calva-Calva, G. (2015). Degradación microbiana con BFNA de hidrocarburos aromáticos por bioaumentación en Biopilas. *CENIC Ciencias Biológicas*. 46 (Especial), 416-423.

- Periche-Fiestas, D. I. (2015). Efecto de las concentraciones del surfactante Polioxietileno (20) Monooleato de sorbitán “Tween 80” en la biodegradación de petróleo Diesel II en suelo, por *Pseudomonas aeruginosa*. [Tesis de grado, Universidad Nacional de Trujillo]. Repositorio institucional.
<http://www.dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/4582/Periche%20Fiestas%20Diana%20Isabel.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Petróleos Mexicanos, PEMEX. (2018/12/20). Reporte de tomas clandestinas en 2018
https://www.pemex.com/acerca/informes_publicaciones/Paginas/tomas-clandestinas.aspx
- Pino, N. J., Muñera, L. M., & Peñuela, G. A. (2016). Bioaugmentation with Immobilized Microorganisms to Enhance Phytoremediation of PCB-Contaminated Soil. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 25(4), 419–430.
Doi:10.1080/15320383.2016.1148010
- Prakash, A. A., Prabhu, N. S., Rajasekar, A., Parthipan, P., AlSalhi, M. S., Devanesan, S., & Govarthanan, M. (2020). Bio-electrokinetic remediation of crude oil contaminated soil enhanced by bacterial biosurfactant. *J. Hazard. Mater.*, 124061.
Doi:10.1016/j.jhazmat.2020.124061
- Prematuri, R., Mardatin, N. F., Irdiastuti, R., Turjaman, M., Wagatsuma, T., & Tawaraya, K. (2019). Petroleum hydrocarbons degradation in contaminated soil using the plants of the Aster family. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 27, 4460–4467 [doi:10.1007/s11356-019-07097-4](https://doi.org/10.1007/s11356-019-07097-4)
- Quintero, V. E. V., Cobo, J. J. S., Barahona, S. C. G., & Arenas, J. B. (2016). Evaluación del efecto de la bioestimulación sobre la biorremediación de hidrocarburos en suelos contaminados con alquitrán en Soacha, Cundinamarca-Colombia. *Acta Agron.*, 65(4), 354-361.
<http://dx.doi.org/10.15446/acag.v65n4.51013>

Quispe-Huanca, J.M.M. (2019). Identificación y determinación de la biomasa de bacterias nativas de suelo contaminado por Hidrocarburos producto de la biodegradación a diferentes concentraciones de Diésel B [Tesis de grado, Universidad Nacional De San Agustín De Arequipa]. Repositorio institucional. <http://bibliotecas.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/9912/BIquujmm1.pdf?sequence=3&isAllowed=y>

Rajkumari, J., Choudhury, Y., Bhattacharjee, K., & Pandey, P. (2021). Rhizodegradation of Pyrene by a Non-pathogenic *Klebsiella pneumoniae* Isolate Applied With *Tagetes erecta* L. and Changes in the Rhizobacterial Community. *Front. Microbiol.*, 12, 145. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.593023>

Restrepo-Franco, G.M., Marulanda-Moreno, S., de la Fe-Pérez, Y., Díaz-de la Osa, A., Lucia-Baldani, V., y Hernández-Rodríguez, A. (2015). Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Revista CENIC*, 46 (1), 63-76.

Reyes Robalino, A. A. (2019). Determinación de la eficiencia del extracto alcohólico y la maceración de la flor de muerto (*Tagetes erecta* L.) en el manejo de la marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum* Smith.) en eucalipto tropical (*Eucalyptus urograndis*). [Proyecto de investigación de obtención de grado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. Repositorio institucional. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/14340>

Reyes-Reyes, M.A., Puentes-Cala, E.A., Casanova-Montes, E.L., López-Deluque, F., Panqueva-Álvarez, JH, y Castillo-Villamizar, G.A. (2018). Inmovilización de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo crudo en matrices orgánicas naturales y sintéticas. *Rev. Int. de Contam. Ambient.*, 34(4), 597-609. <https://doi.org/10.20937/rica.2018.34.04.04>

Rivas-Trasancos, L., Navarro-Sosa, Y., Romero-Silva, R., Díaz-Díaz, M.A., Fernández-Rangel, D., Cañete-Pérez, C.C., Salazar-Alemán, D. y Hernández-Hernández D. (2020). Evaluación en

campo de material absorbente para recogida de hidrocarburos del petróleo en agua. *CENIC Ciencias Químicas*, 51(1), 18-34.

Rivera-Ortiz, P., Rivera-Lárraga J.E., Andrade-Limas, E.C., Heyer-Rodríguez, L., De la Garza-Requena, F.R. y Castro-Meza, B.I. (2018). Bioestimulación y biorremediación de recortes de perforación contaminados con hidrocarburos. *Rev. Int. de Contam. Ambient.*, 34(2), 249-262. <https://doi.org/10.20937/rica.2018.34.02.06>.

Riveroll-Larios, J. (2014). Actividad microbiana en suelos tropicales con diferente historia de contaminación por hidrocarburos. [Tesis de grado, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco]. Repositorio institucional. <http://universidadpersonal.net/doc-elec/156731.pdf>

Robichaud, K., Stewart, K., Labrecque, M., Hijri, M., Cherewyk, J. y Amyot, M. (2019). An ecological microsystem to treat waste oil contaminated soil: Using phytoremediation assisted by fungi and local compost, on a mixed-contaminant site, in a cold climate. *Sci. Total Environ.*, 672, 732–742. doi: 10.1016 / j. scitotenv.2019.03.447

Rodríguez, N. J. P., Acevedo, S. C., Gallo, A., y Mesa, G. P. (2012). Comparación entre bioestimulación y bioaumentación para la recuperación de suelos contaminados con diésel. *Producción + Limpia*, 7(1), 101-108

Rodriguez-Campos, J., Perales-Garcia, A., Hernandez-Carballo, J., Martinez-Rabelo, F., Hernández-Castellanos, B., Barois, I., & Contreras-Ramos, S. M. (2019). Bioremediation of soil contaminated by hydrocarbons with the combination of three technologies: bioaugmentation, phytoremediation, and vermiremediation. *Journal of soils and sediments*, 19(4), 1981-1994.

Rojas-Contreras, A., Rodríguez-Dorantes, A.M., Montes Villafán S, Pérez Jiménez S, Rodríguez Tovar A, Guerrero Zúñiga LA. (2010). Evaluación de la promoción del crecimiento

de *Cynodon dactylon* L. por rizobacterias productoras de fitohormonas aisladas de un suelo contaminado con hidrocarburos derivados del petróleo. *Polibotánica*, (29), 131-147.

Rojas-Tapias, D., Ortiz-Vera, M., Rivera, D., Kloepper, J. y Bonilla, R.. (2013). Evaluación de tres métodos para la conservación de *Azotobacter chroococcum* y *Azotobacter vinelandii*. *Uni. Sci.*, 18 (2), 129-139.

Rosales, A.G., Rodríguez, C.D., y Ballen-Segura, M. (2018). Remoción de contaminantes y crecimiento del alga *Scenedesmus* sp. en aguas residuales de curtiembres, comparación entre células libres e inmovilizadas. *Ingeniería y Ciencia*, 14(28), 11-34. <https://doi.org/10.17230/ingciencia.14.28.1>

Rucks, L., García, F., Kaplán, A., Ponce de León, J., & Hill, M. (2004). Propiedades físicas del suelo. Universidad de la República: Facultad de agronomía. Montevideo, Uruguay.

Salim, F., Setiadi, Y., Sopandie, D., & Yani, M. (2020). Adaptation selection of plants for utilization in phytoremediation of soil contaminated by crude oil. *HAYATI Journal of biosciences*, 27(1), 45-45. <https://doi.org/10.4308/hjb.27.1.45>

Salinas-Vera, J.D. (2019). Evaluación del potencial celulolítico por bacterias y hongos a diferentes concentraciones de diésel de suelo no perturbado y disturbado del Piedemonte Llanero obtenido del Instituto Agrícola Guacavía en el municipio de Cumaral (Meta). [Tesis de grado, Universidad Santo Tomás]. Repositorio institucional. <http://repository.usta.edu.co/bitstream/handle/11634/16793/2019josesalinas.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Santamaría, W. C., Mora-Romero, C. C., Escobar-Buitrago, P. S., Casallas, P. E. C., y Santamaría, Y. V. (2012). Inducción de micronúcleos y otras anomalías nucleares en *Astyanax* gr. *bimaculatus* (Pisces: Characidae) expuestas a fenantreno. *Orinoquia*, 16(2), 237-247. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5441106>

- Sapuppo R. (2017). Biorremediación de suelos contaminados con Hidrocarburos, mediante la Bioestimulación con lodos residuales. [Tesis de grado, Universidad de Guadalajara]. Repositorio institucional.
<http://repositorio.cucba.udg.mx:8080/xmlui/handle/123456789/6075>
- Schwitzguébel, J.P. (2015). Phytoremediation of soils contaminated by organic compounds: hype, hope and facts. *J. Soils Sediments*, 17(5), 1492–1502. doi:10.1007/s11368-015-1253-9
- Secretaria de energía SENER. (2013). Prospectiva de Petróleo Crudo y Petrolíferos 2013-2027. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/62951/Prospectiva_de_Petr_leo_y_Petrol_feros_2013-2027.pdf
- Silva-Castro, G. A., Uad, I., Rodríguez-Calvo, A., González-López, J., & Calvo, C. (2015). Response of autochthonous microbiota of diesel polluted soils to land-farming treatments. *Environmental Research*, 137, 49–58. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2014.11.009>
- Silvana-Álvaro, C.E., Arocena-Agustín, L., Martínez-Ángel, M. y Nudelman, S.E. (2017). Biodegradación aerobia de fracciones de Hidrocarburos provenientes de la actividad petrolera en un suelo de la Región Patagonia Norte, Argentina. *Rev. Int. de Contam. Ambient.*, 33(2), 247-257. <https://doi.org/10.20937/rica.2017.33.02.06>
- Sivasankar, S., Ilakkiya, P., Rajkumar, M., Sureshkumar, R., & Sendhilnathan, R. (2020). effect of *Vam* and *Azotobacter* on growth and yield characters of african marigold (*Tagetes erecta* linn.) cv. *poornima yellow*. *Plant Archives*, 20(1), 1133-1136.
- Stephenson, F. H. (2010). Cell growth. *Calculations for Molecular Biology and Biotechnology*, 45–81. Doi:10.1016/b978-0-12-375690-9.00003-6

- Sun, Y. y Zhou, Q. (2016). Uptake and translocation of benzo[a]pyrene (B[a]P) in two ornamental plants and dissipation in soil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 124, 74–81. Doi: 10.1016 / j.ecoenv.2015.09.037
- Suryatmana, P., Setiawati, M. R., Nursyabani, D. D., & Kamaluddin, N. N. (2019). Potential of *Boehmia nivea* as phytoremediator for petroleum-contaminated soil following nitrogen-fixing bacteria inoculation. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, 393(1) 393 012095.
- Suryatmana, P., Zannatan, Muda Zannatan, A., Rosalina Sylvia, A., Rochimi-Setiawati, M., Syafrizal, Zulkifliani, Peny-Wulandari, A., Riztama A. (2018). Bioremediation of petroleum contaminated soil using Oyster Mushroom Log Waste (OMLW), *Azotobacter vinelandii*, and a petrophilic consortium. *Asian Jr. of Microbiol. Biotech. Env. Sc.*, 20, 158-168.
- Tandel, S. P., Kumari, K., Vadodaria, J. R., & Patel, D. A. (2021). Interactive effect of different levels of fertilizers and plant growth regulators on yield and economics of African marigold (*Tagetes erecta* L.). *J. Pharmacogn. Phytochem.*, 10(2), 1551-1554.
- Tec-Campos, D., Zuniga, C., Passi, A., Del Toro, J., Tibocha-Bonilla, J.D., Zepeda, A., Betenbaugh, M.J. & Zengler, K. (2020). Modeling of nitrogen fixation and polymer production in the heterotrophic diazotroph *Azotobacter vinelandii* DJ. *Metab. Ing. Comun.*, 11, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.mec.2020.e00132>
- Torres, H. J. G., Rossi, A. M., y Sosa, M. Q. (2015). Efecto genotóxico de las mezclas complejas de hidrocarburos en trabajadores de estaciones de servicio de gasolina. *Salud Uninorte*, 31(1), 91-100.
- Torri, S.I., Cabrera, M.N., & Alberti, C. (2018). Respiración potencial durante la bioestimulación de un suelo contaminado con hidrocarburos aromáticos policíclicos. *Rev. Int. Contam. Ambient.*, 34(1), 127-136. <https://doi.org/10.20937/rica.2018.34.01.11>

- Trejos-Delgado, M.C. (2017). Evaluación de un proceso de biorremediación aplicado a un suelo contaminado con petróleo crudo. [Tesis de obtención de grado, Universidad Nacional de Colombia]. Repositorio institucional. <http://bdigital.unal.edu.co/59356/1/1124314851.2017.pdf>
- Triviño-Tonato, N. G. (2018). Evaluación de remoción de plomo por acción de perlas de alginato con *Chlorella sp.* Inmovilizada [Tesis de licenciatura, Universidad Politécnica Salesiana]. Repositorio institucional. <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/16552>
- Trujillo-Narcía, A., Rivera-Cruz, M.C., Lagunes-Espinoza, L.C., Palma-López, D.J., Soto-Sánchez, S. y Ramírez-Valverde, G. (2012). Efecto de la restauración de un fluvisol contaminado con petróleo crudo. *Rev. Int. de Contam. Ambient.*, 28(4), 360-374.
- Trujillo-Toro, M. A., y Ramírez-Quirama, J. F. (2012). Biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos en Colombia. *Revista De Investigación Agraria Y Ambiental*, 3(2), 37-48. <https://doi.org/10.22490/21456453.952>
- Vargas Gutiérrez, D. L. (2010). Efecto del tiempo, temperatura de almacenamiento y tamizado del suelo sobre algunas poblaciones microbianas. [Tesis de obtención de grado, Pontificia Universidad Javeriana]. Repositorio institucional. <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/8648>
- Varjani, SJ (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresour. Technol.*, 223, 277–286. doi: 10.1016 / j.biortech.2016.10.037
- Vázquez-Luna, M., Montiel-Flores, A., Vázquez-Luna, D., & Herrera-Tenorio, M. F. (2011). Impacto del petróleo crudo en suelo sobre la microbiota de vida libre fijadora de nitrógeno. *Trop. Subtrop. Agroecosystems.*, 13(3), 511-523.

- Velásquez-Arias, J. A. V. (2017). Contaminación de suelos y aguas por hidrocarburos en Colombia. Análisis de la fitorremediación como estrategia biotecnológica de recuperación. *Revista de investigación Agraria y Ambiental*, 8(1), 151-167. <https://doi.org/10.22490/21456453.1846>
- Ventura-Martínez, R., Ángeles-López, G. E., Rodríguez, R., González-Trujano, M. E., & Déciga-Campos, M. (2018). Spasmolytic effect of aqueous extract of *Tagetes erecta* L. flowers is mediated through calcium channel blockade on the guinea-pig ileum. *Biomed. Pharmacother.*, 103, 1552–1556. Doi:10.1016/j.biopha.2018.04.166.
- Villalón-Mendoza, H. (2016). Indicadores de calidad de la planta de *Quercus canby* Trel. (encino) en vivero forestal. *Latinoamericana De Recursos Naturales*, 12(1), 46-52. <http://revista.itson.edu.mx/index.php/rln/article/view/250>
- Villanueva-Abanto, G.L. (2012). Efecto de la concentración de petróleo diésel 2 en la producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa*. [Tesis de obtención de grado, Universidad Nacional de Trujillo]. Repositorio institucional: <http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/2643/Villanueva%20Abanto%20Graciela%20Lisset.pdf.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Wang, B., Xu, X., Yao, X., Tang, H., & Ji, F. (2019). Degradation of phenanthrene and fluoranthene in a slurry bioreactor using free and Ca-alginate-immobilized *Sphingomonas pseudosanguinis* and *Pseudomonas stutzeri* bacteria. *J. Environ. Manage*, 249, 109388. Doi:10.1016/j.jenvman.2019.109388
- Xiao, N., Liu, R., Jin, C. y Dai, Y. (2015). Efficiency of five ornamental plant species in the phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. *Ecol. Eng.*, 75, 384–391. doi: 10.1016 / j.ecoleng.2014.12.008

- Xu, X., Zhou, H., Chen, X., Wang, B., Jin, Z., & Ji, F. (2019). Biodegradation potential of polycyclic aromatic hydrocarbons by immobilized *Klebsiella sp.* in soil washing effluent. *Chemosphere*, 223, 140–147. Doi:10.1016/j.chemosphere.2019.01.196
- Yagual-Barzola, K.R. (2020). Técnicas de recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos aplicables en el Cantón Salinas. [Tesis de obtención de grado, Universidad Estatal Península de Santa Elena]. Repositorio Institucional. <https://repositorio.upse.edu.ec/handle/46000/5345>
- Yóplac, K.E., Tuesta, O., Pariente, E. y Guzmán, W. (2020). Prospección de especies arbóreas para la fitorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos, Amazonas, Perú. *Forestal del Perú*, 35(1), 31 – 41.
- Zamora, A., Ramos, J., & Arias, M. (2012). Efecto de la contaminación por hidrocarburos sobre algunas propiedades químicas y microbiológicas de un suelo de sabana. *Bioagro*, 24(1), 5-12
- Zhang, B., Zhang, L. y Zhang, X. (2019). Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil by petroleum-degrading bacteria immobilized on biochar. *RSC Adv.*, 9(60), 35304–35311. Doi: 10.1039 / c9ra06726d
- Żur, J., Wojcieszńska, D. y Guzik, U. (2016). Metabolic Responses of Bacterial Cells to Immobilization, *Molecules*, 21 (7), 958. Doi: 10,3390 / moléculas21070958