



# UNIVERSIDAD POPULAR AUTÓNOMA DEL ESTADO DE PUEBLA

DECANATO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y FACULTAD  
DE BIOTECNOLOGÍA

## TESIS

Evaluación de los filos *firmicutes*, *bacteroidetes* y *gammaproteobacteria*  
en la fitorremediación con *Tagetes erecta*  
de suelos contaminados con diésel

Para obtener el título de:  
**MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA:**  
**Lic. Alejandro Elorduy Vergara**

Directora:  
Dra. Beatriz Pérez Armendariz

Co-Director:  
Dr. Ellie Girgis El Kassis

Asesor:  
Dr. Luis Daniel Ortega Martinez

Puebla, Puebla, 11 de Marzo del 2019



**UPAEP – Secretaría General**

Dirección General de Apoyos Académicos

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

Biblioteca Central - **Karol Wojtyła**

**Tesis Digitales Restricciones de uso:**

**DERECHOS RESERVADOS ©**

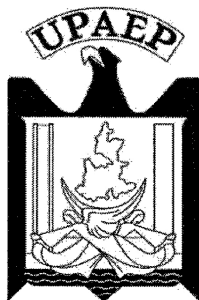
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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



Centro Interdisciplinario de Posgrados

e investigación

Decanato de Ciencias Biológicas

**Maestría en Biotecnología**

Se aprueba la tesis titulada:

EVALUACIÓN DE LOS FILOS FIRMICUTES, BACTEROIDETES Y  
GAMMAPROTEOBACTERIA EN LA FITORREMEDIACIÓN CON  
TAGETES ERECTA DE SUELOS CONTAMINADOS CON DIÉSEL

Autor:

**LIC. ALEJANDRO ELORDUY VERGARA**

Comité de Revisión:

A blue ink signature of Dra. Beatriz Pérez Armendariz, consisting of a stylized 'B' followed by 'Pérez Armendariz'.

Dra. Beatriz Pérez Armendariz

Director

A blue ink signature of Dr. Elie Girgis El Kassis, featuring a stylized 'E' and 'K'.

Dr. Elie Girgis El Kassis

Co-Director

A blue ink signature of Dr. Luis Daniel Ortega Martínez, appearing as a stylized 'LDO'.

Dr. Luis Daniel Ortega Martínez

Asesor

Puebla, México.

Marzo, 2019

## **Agradecimientos**

A la doctora Bety por haberme dado la confianza y la oportunidad de haber formado parte de la maestría en Biotecnología de la UPAEP, y por haberme ayudado durante todo el proceso de la maestría y la tesis.

Al Dr. Elie y al Dr. Luis Daniel por toda su ayuda, enseñanza y el tiempo que me dedicaron desde el comienzo de proyecto y hasta el final del mismo, sin ustedes no habría sido posible terminarlo.

A mis papás por su apoyo incondicional y modelo a seguir.

A mi esposa por haberme apoyado siempre, haberme acompañado en todo momento y haberme tenido la paciencia por todas las horas de trabajo invertidas.

## Contenido

Resumen.....	VI
Capítulo I.....	1
1.1.Introducción.....	2
1.2 Antecedentes.....	2
1.3. Planteamiento del problema.....	3
1.4. Justificación.....	3
1.5. Hipótesis.....	4
1.6. Objetivos.....	4
Capítulo II. Marco teórico.....	5
2.1. Hidrocarburos.....	6
2.1.1 Características generales de los hidrocarburos.....	6
2.1.2 Diésel.....	9
2.1.3 Hidrocarburos Totales del Petróleo (TPH) .....	11
2.1.4 Contaminación por hidrocarburos.....	11
2.2. Suelo .....	12
2.2.1 Contaminación de suelos por hidrocarburos.....	13
2.3 Microbiota.....	14
2.3.1 Microbiota de suelo.....	14
2.4 Biorremediación de hidrocarburos.....	17
2.4.1 Técnicas de biorremediación.....	18
2.4.2 Fitorremediación.....	19
2.4.3 <i>Tagetes erecta</i> . .....	20
Capítulo III. Materiales y métodos.....	22
3.1. Muestreo de suelo.....	23
3.2. Contaminación artificial.....	23
3.3. Plantación y cultivos.....	23
3.4. Recolección de muestras de tratamientos.....	24
3.5. Procesamiento de muestras.....	24
3.5.1. Extracción de ADN.....	24
3.5.2. Determinación de concentración de ácidos nucleicos.....	25
3.5.3. Análisis por rtPCR.....	25
3.5.4. Clonación y transformación de ADN plasmídico.....	26
3.5.5. Curvas estándar de cuantificación.....	28

3.6. Detección y cuantificación de TPH.....	29
Capítulo IV. Resultados y Discusión.....	30
Resultados.....	31
4.1. Plantación y extracción de muestras.....	31
4.2. Extracción de ADN bacteriano de muestra de suelo.....	33
4.3. PCR en tiempo real.....	34
4.3.1 Curvas estándar para cuantificación.....	34
4.3.2. Resultados de rtPCR.....	37
4.4. Detección y cuantificación de TPH.....	44
Discusión.....	46
Conclusiones.....	48
Referencias bibliográficas.....	49

## **Resumen.**

La contaminación de suelos por hidrocarburos es un tema complejo que afecta a gran parte del mundo y conlleva graves y complejas consecuencias en la agricultura, ecosistemas, salud y economía. La fitorremediación es de las técnicas de biorremediación más estudiadas para la remoción de contaminantes, en la que se utilizan plantas para remover, transferir, estabilizar, concentrar y/o destruir los contaminantes. La microbiota del suelo juega un papel muy importante en el crecimiento y salud de los suelos y plantas, algunos microorganismos cuentan con capacidades degradativas de hidrocarburos, lo que en simbiosis con ciertas plantas puede potenciar la eliminación de contaminantes en un medio. En el presente estudio se analizó la capacidad de la planta de Cempasúchil de fitorremediación de un suelo contaminado artificialmente con diésel y los cambios generados en poblaciones de los filos *gammaproteobacteria*, *firmicutes* y *bacteroidetes*. En el suelo impactado con diésel se mostró una remoción del diésel de un 42% en un lapso de 4 meses. Los 3 filos de bacterias mostraron un crecimiento con la presencia del hidrocarburo, *bacteroidetes* teniendo una población mucho menor que los otros dos filos pero con el mayor crecimiento en proporción con los demás. La planta de Cempasúchil mostró un menor crecimiento al control positivo, sin embargo sobrevivió a una concentración de 50,000ppm y mostró capacidades fitorremediadoras.

## **Abstract.**

Soil contamination by hydrocarbons is a complex issue that has effects all around the world and entails serious and complex consequences in agriculture, ecosystems, health and economy. Phytoremediation is one of the most studied bioremediation techniques for the removal of contaminants, in which plants are used to remove, transfer, stabilize, concentrate and / or destroy contaminants. Soil microbiota plays a very important role in the growth and health of soil and plants, some microorganisms have degrading hydrocarbon capacities, which in symbiosis with certain plants can enhance the elimination of contaminants in a medium. In the present study, the capability of the *Tagetes erecta* for phytoremediation of a soil artificially contaminated with diesel and the changes generated in populations of the *gammaproteobacteria*, *firmicutes* and *bacteroidetes* phyla were analyzed. In soil impacted with diesel, there was a 42% diesel removal after a period of 4 months. The 3 phyla of bacteria showed a growth with the presence of hydrocarbon, *bacteroidetes* having a population much smaller than the other two edges but with the highest growth in proportion with the others. *Tagetes erecta* showed a lower in comparison

to the positive control, however it survived a concentration of 50,000ppm and showed phytoremediation capabilities.

# Capítulo I

## 1.1 Introducción

El petróleo, a pesar de haber sido de enorme ayuda a las actividades humanas en todas sus formas de uso, desde plásticos hasta combustibles, también ha traído un sin fin de aspectos negativos al mundo, siendo la contaminación de ecosistemas por hidrocarburos una de las más importantes. La contaminación de hidrocarburos conlleva efectos negativos en la sociedad, economía y ecosistemas, en específico la contaminación de zonas agrícolas destruye el suelo y lo vuelve infértil, dejando sin trabajo a la sociedad, contamina productos agrícolas que llegan a mesas de los hogares para ser consumidos afectando la salud de las personas, destruye la flora y fauna en delimitaciones de la zona afectada, se dispersa y contamina mantos freáticos y zonas alejadas al centro de contaminación. Existen muchas técnicas de remediación de suelos contaminados por hidrocarburos, sin embargo siempre se pueden mejorar o explorar nuevos campos con el fin de optimizar la remediación, por ello que en la presente investigación se buscó remediar suelos contaminados con diésel con ayuda del cempasúchitl, flor característica y típica de México. Esta investigación versa en el comportamiento de la microbiota del suelo y los cambios que ésta sufre a causa de la contaminación, como también a causa de una remediación. El objetivo fue analizar los cambios de 3 filos importantes involucrados en el crecimiento de plantas y en la degradación de hidrocarburos en suelos, *gamma proteobacteria*, *firmitutes*, bacteroidetes y esto mediante técnicas moleculares y biotecnológicas.

## 1.2. Antecedentes

Diferentes plantas tienen capacidades de fitorremediación de hidrocarburos, como la alfalfa, hierbas altas de pradera, trigo, maíz, (Aprill & Sims, 1990; Ferro et al., 1994; Ayotumo et al., 2006). así mismo de benzoopireno, metales pesados, colorantes, con especies de *tagetes* (cempasúchitl) (Sun et al., 2011; Goswami & Das, 2017; Patil & Jadhav, 2013).

Pocos estudios preceden sobre la fitorremediación con *Tagetes erecta*, conocida como Cempasuchitl, no obstante, arrojan resultados atractivos para seguir investigando a la planta su posible aplicación en campo para la biorremediación. Con el cempasuchil se ha comprobado la absorción de metales pesados como el plomo, cobre y cadmio, así como la degradación de benzoopireno y colorante azul 160 (Sun, et al., 2011; Patil & Jadhav 2013; Uruguchi, et al., 2006; Bosiacki, 2008; Malarkodi, et al., 2008). El cempasuchil ha demostrado sus capacidades de fitorremediación de metales pesados y únicamente se ha

probado una sola vez para 1 tipo de hidrocarburo, por ello se pretende estudiar su capacidad para degradar diésel y analizar sus cambios en la microbiota.

### **1.3. Planteamiento del problema**

La situación actual del país por contaminación de hidrocarburos en suelos agrícolas es un gran reto que debe abordarse por la sociedad, la academia y el gobierno. Puebla es el cuarto estado con mayor número de derrames de petróleo a nivel nacional, con un total de 6.91 de billones de barriles de petróleo derramados (Comisión Nacional de Hidrocarburos, 2013). En el año 2017 se transportaron un total de 926,599 miles de barriles de derivados del petróleo, los ductos son el medio de transporte más utilizados, transportando aproximadamente el 76% del total de hidrocarburos., este sistema de transporte es el más vulnerable, y 12,581 sufren alguna fuga por accidentes o acciones de robo de combustible (PEMEX, 2017). Las afectaciones de estos derrames incluyen la salud humana (Cuadras *et al.* 2012; Morales, 2008; Tirado, 2004), las afectaciones al medio ambiente (Miranda y Restrepo, 2005) y afectaciones socioeconómicas (Infante, 1998).

### **1.4. Justificación**

La microbiota es el conjunto de microorganismos localizados en un hábitat específico. En el suelo, estos microorganismos realizan diferentes funciones importantes para la dinámica funcional, tal como la degradación de sustancias xenobióticas, control biológico de patógenos, solubilización de minerales y la descomposición de la materia orgánica que proporciona nutrientes a las plantas (Schloter *et al.*, 2003). Existen antecedentes sobre las afectaciones de la microbiota por la contaminación del suelo (Miranda y Restrepo, 2005), no obstante la microbiota también forma parte importante de la restauración de suelos (Silva *et al.*, 2009). Sin embargo hay pocos estudios de la evaluación de la microbiota empleando bioaumentación en suelos agrícolas. En este trabajo se muestra la dinámica de poblaciones de 5 filos representativos de los taxones microbianos en el suelo (*Bacteroidetes*, *Gammaproteobacteria*, *Firmicutes* y bacterias totales). Este estudio permitirá explorar estrategias para la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos. El conocimiento del cambio de poblaciones microbianas en los suelos afectados de la región de Puebla será una aportación de esta investigación. La estrategia de fitorremediación con *Tagetes erecta* podría ser una alternativa de ingresos económicos sin generar posibles riesgos a la salud, siendo esta una planta ornamental.

## 1.5. Hipótesis

La fitorremediación de un suelo agrícola impactado con diésel empleando *Tagetes erecta* tiene un efecto de remoción y un cambio en la microbiota

## 1.6. Objetivos

**General:** Analizar la microbiota presente en suelos agrícolas contaminados con diésel de la región de Tecamachalco, Puebla, en el proceso de fitorremediación con *Tagetes erecta* mediante técnicas moleculares y analíticas de IR, para generar estrategias de biorremediación.

### **Específicos:**

- Contaminar artificialmente el suelo agrícola con diésel.
- Cuantificar mediante gravimetría la cantidad de diésel presente en muestras
- Determinar mediante IR la presencia de diésel
- Realizar PCR en tiempo real con primers específicos de filos *bacteroidetes*, *firmicutes*, *gammaproteobacteria* y bacterias totales para cuantificar el microbioma en las muestras de suelo antes y después de la fitorremediación.
- Realizar los análisis estadísticos de los resultados.

## **Capítulo II. Marco teórico**

## 2.1 Hidrocarburos

### 2.1.1 Características generales de los hidrocarburos

Los hidrocarburos son compuestos orgánicos, extraídos de combustibles fósiles, formados por átomos de carbono e hidrógeno (Flores-Puente et al., 2004). La molécula básica de hidrocarburo es el metano ( $\text{-CH}_4$ ), formándose las demás variedades de hidrocarburos de petróleo a partir de esta molécula. Los hidrocarburos que tienen hasta 4 átomos de carbono suelen ser gases; si tienen entre 5 y 19 líquidos, y con 20 o más son sólidos. Los hidrocarburos del petróleo consisten en compuestos saturados de cadena lineal (alcanos), compuestos acíclicos (cicloalcanos) y compuestos aromáticos conteniendo cuando menos un anillo bencénico en su estructura molecular. (Botello, 2005). El petróleo además, contiene compuestos de azufre, nitrógeno, oxígeno, y trazas de metales y otros elementos (Witter y Nguyen, 2016).

Los alcanos pueden ser saturados de cadena lineal o isoalcanos de cadena ramificada con la fórmula general ( $\text{C}_n\text{H}_{2n+2}$ ) y con átomos de carbono desde C1 hasta C40 y en ocasiones se han reportado cadenas con más de 60 átomos de carbono. Los alcanos cíclicos consisten de compuestos en los cuales todos o algunos de los átomos de carbono están arreglados molecularmente formando anillos. Los hidrocarburos aromáticos son usualmente menos abundantes que los saturados y contienen uno o más anillos bencénicos íntimamente ligados o conectados en su estructura molecular; el grupo de los hidrocarburos aromáticos policíclicos lo conforman aquellos compuestos cuya estructura molecular se origina por la unión de 3 o más anillos bencénicos (Posthuma, 1977).

En la tabla 1 se muestran los principales alcanos y sus propiedades físicoquímicas, en la tabla 2 se muestran los principales hidrocarburos aromáticos con sus propiedades físicoquímicas (Botello, 2005).

**Tabla 1.** Propiedades fisicoquímicas de los principales n-alcanos y cicloalcanos.

Nombre	Fórmula	Punto de Fusión °C	Punto de Ebullición °C	Densidad g/ml
<b>Alcanos</b>				
Metano	CH <sub>4</sub>	-183	-162	-
Etano	CH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	-172	-88.5	-
Propano	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-187	-42	-
n-Butano	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-138	0	-
n-Pentano	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	-130	36	0.626
n-Hexano	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub>	-95	69	0.659
n-Heptano	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	-90.5	98	0.684
n-Octano	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CH <sub>3</sub>	-57	16	0.703
n-Nonano	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH <sub>3</sub>	-54	151	0.718
n-Decano	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> CH <sub>3</sub>	-30	174	0.730
n-Undecano	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> CH <sub>3</sub>	-26	196	0.740
n-Dodecano	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> CH <sub>3</sub>	-10	216	0.749
n-Tridecano	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> CH <sub>3</sub>	-6	234	0.757
n-Tetradecano	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> CH <sub>3</sub>	5.5	252	0.764
n-Pentadecano	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>13</sub> CH <sub>3</sub>	10	266	0.769
n-Hexadecano	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> CH <sub>3</sub>	18	280	0.775

n-Heptadecano	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{C}$ $\text{H}_3$	22	292	-
n-Octadecano	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{C}$ $\text{H}_3$	28	308	-
n-Nonadecano	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{C}$ $\text{H}_3$	32	320	-
n-Eicosano	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{C}$ $\text{H}_3$	36	-	-
<b>Cicloalcanos</b>				
Isobutano	$(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_3$	-159	-12	-
Isopentano	$(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2$ $\text{CH}_3$	-160	28	0.620
Neopentano	$(\text{CH}_3)_4\text{C}$	-17	9.5	-
Isohexano	$(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$	-154	60	0.654
3-metilpentano	$(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$	-118	63	0.676
2,2 Dimetilbutano	$(\text{CH}_3)_3\text{CCH}_2\text{C}$ $\text{H}_3$	-98	50	0.649
2,3 Dimetilbutano	$(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}(\text{CH}_3)_2$	-129	58	0.668

**Tabla 2.** Principales propiedades físicas de algunos compuestos aromáticos.

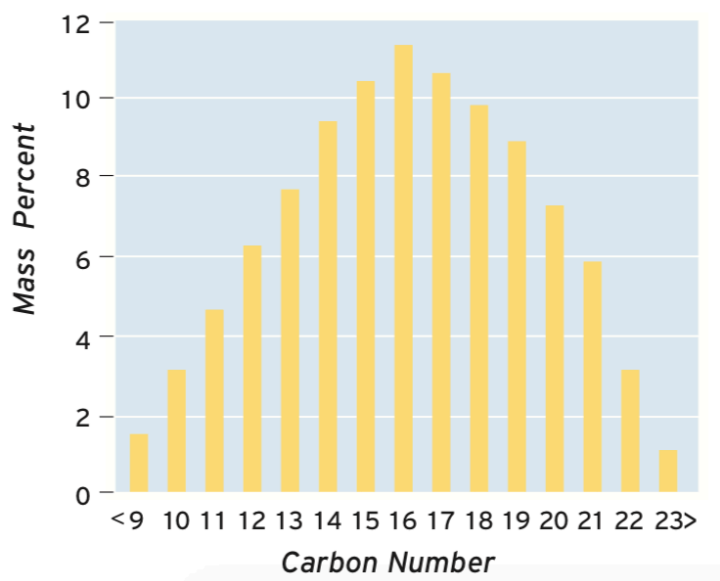
Nombre	Fórmula	Punto de Fusión °C	Punto de Ebullición °C	Densidad a 20°C (g/ml)
Benceno	$\text{C}_6\text{H}_6$	5.5	80	0.874
Tolueno	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$	-95	111	0.862
Etilbenceno	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CH}_3$	-95	136	0.863
Propilbenceno	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	-100	1259	0.858

Isopropilbenceno	$(\text{CH}_3)_2\text{CHC}_6\text{H}_5$	-96	152	0.858
O-Xileno	$\text{O}-(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_4$	-25	144	0.876
m-Xileno	$\text{m}-(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_4$	-48	139	0.860
p-Xileno	$\text{p}-(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_4$	13	138	0.857
1,2,3 Trimetilbenceno	1,2,3- $(\text{CH}_3)_3\text{C}_6\text{H}_3$	-25	176	0.890
1,2,5 Trimetilbenceno	1,2,5- $(\text{CH}_3)_3\text{C}_6\text{H}_3$	-44	169	0.872
Estireno	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH-CH}_2$	-31	145	0.901
Bifenilo	$\text{C}_6\text{H}_5\text{-C}_6\text{H}_5$	-69	255	-
Naftaleno	$\text{C}_{10}\text{H}_8$	80	218	0.975

### 2.1.2 Diésel.

La figura 4.2 muestra una distribución típica del número de carbonos en diésel. El diésel es una mezcla compleja de miles de compuestos, la mayoría conteniendo carbonos de entre 10 y 22 átomos. La mayoría de los compuestos pertenecen a los grupos de alcanos (parafinas), cicloalcanos (naftenos) e hidrocarburos aromáticos, y dependiendo de las proporciones de estos compuestos varían un diésel de otro (Chevron, 2007). La tabla 2.1 muestra algunos de los principales hidrocarburos presentes en el diésel.

**Figura 2.1** Distribución típica del número de carbonos en el diésel



**Tabla 2.1** Principales hidrocarburos, punto de ebullición y congelación presentes en el combustible diésel

Compound	Chemical Formula	Hydrocarbon Class	Boiling Point, °C/°F	Freezing Point, °C/°F
Naphthalene	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub>	Aromatic	218/424	80/176
Tetralin	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub>	Aromatic	208/406	-35/-31
cis-Decalin	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub>	Naphthene	196/385	-43/-45
1,3-Diethylbenzene	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>	Aromatic	181/358	-84/-119
n-Butylcyclohexane	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub>	Naphthene	181/358	-75/-103
n-Pentylcyclopentane	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub>	Naphthene	181/358	-83/-117
Decane	C <sub>10</sub> H <sub>22</sub>	n-Paraffin	174/345	-30/-22
Anthracene	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	Aromatic	341/646	215/419
1-Pentyl-naphthalene	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub>	Aromatic	306/583	-24/-11
n-Nonylcyclohexane	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub>	Naphthene	282/540	-10/14
n-Decylcyclopentane	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub>	Naphthene	279/534	-22/-8
n-Pentadecane	C <sub>15</sub> H <sub>32</sub>	n-Paraffin	271/520	10/50
2-Methyltetradecane	C <sub>15</sub> H <sub>32</sub>	Isoparaffin	265/509	-8/18
1-Decylnaphthalene	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub>	Aromatic	379/714	15/59
n-Tetradecylbenzene	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub>	Aromatic	354/669	16/61
n-Tetradecylcyclohexane	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub>	Naphthene	354/669	25/77
n-Pentadecylcyclopentane	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub>	Naphthene	353/667	17/63
Eicosane	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub>	n-Paraffin	344/651	36/97
2-Methylnonadecane	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub>	Isoparaffin	339/642	18/64

Tabla tomada de Chevron, 2007

La producción de diésel es menos compleja que la producción de gasolina y se trata también de una mezcla de hidrocarburos de composición química no definida en su totalidad. La composición química del diésel depende en mayor medida del tipo de crudo procesado, debido a que son pocos los procesos químicos destinados a transformar el petróleo crudo en diésel. El diésel se obtiene mayormente de procesos de fraccionamiento o destilación. Un volumen importante proviene del proceso de destilación primaria del cual se separa la fracción de hidrocarburos que destilan aproximadamente entre los 175 y los 370 °C (PEMEX, 2017).

### **2.1.3. Hidrocarburos Totales del Petróleo (TPH)**

El término hidrocarburos totales de petróleo (TPH por sus siglas en inglés) describe a un extenso grupo de sustancias químicas derivadas del petróleo crudo, siendo mezcla de líquidos incoloros o de color claro que se evaporan fácilmente, líquidos espesos de color oscuro o semisólidos que no se evaporan. Muchos de estos productos tienen un olor característico a gasolina, keroseno o aceite. Conocer la cantidad de TPH en una muestra ayuda como indicador general mostrando el tipo de contaminación existente en un sitio o muestra. Debido a que hay muchos productos químicos diferentes en el petróleo crudo y en otros derivados del petróleo, no es práctico medir cada uno en forma separada, sin embargo es útil medir la cantidad total de TPH.

### **2.1.4 Contaminación por hidrocarburos**

Los contaminantes se distribuyen de acuerdo a sus características físicas, químicas y condiciones ambientales como clima, tipo de suelo, entre otros. Una vez depositados en superficie, pueden volatilizarse, infiltrarse, biodegradarse o ser trasladados a otras zonas por organismos vivos o por escorrentía. Las sustancias que se infiltran pueden atravesar sin reacción con los constituyentes del suelo, o interaccionar con ellos, otros elementos pueden ser neutralizados, degradados, adsorbidos o precipitados. Como resultado final se produce la retención de las sustancias o su movilización, en el interior del suelo, por otra parte, el suelo no es selectivo y puede actuar sobre compuestos orgánicos e inorgánicos, aniones y cationes, ácidos y bases, oxidantes y reductores, metales, sales, partículas coloidales, y microorganismos (López Lafuente, 2007).

En el caso de los hidrocarburos como las gasolinas, gasóleos, aceites y petróleo crudo una vez depositados en el suelo donde existe algún manto freático, tienen a formar una capa en forma de nata en el nivel freático. Los compuestos densos migran hacia la base del acuífero en toda su profundidad mientras que los volátiles pueden evaporarse a la atmósfera, si la contaminación se produce en la superficie, si la pérdida es bajo el nivel del suelo los más móviles pueden migrar a través del suelo hacia el manto freático. Los componentes de peso molecular más alto son en su mayor parte insolubles e inmiscibles y pueden desplazarse lentamente a través del suelo. Sin embargo la migración vertical está en función del tipo de hidrocarburo y del tipo de partículas del suelo, partículas pequeñas que lo constituyen impiden el paso de contaminante, mientras que partículas grandes al tener espacios entre ellas, es decir, mayor porosidad, permitiendo una infiltración mayor. Los efectos de los hidrocarburos en el ambiente dependerán de la cantidad, composición, la frecuencia y tiempo de exposición, así como de las características del sitio donde sucedió el derrame (descarga, liberación, rebose, achique o vaciamiento de hidrocarburos que se presente en suelo) sin olvidar las variables ambientales como temperatura, humedad, oxígeno y sensibilidad de la biota específica del ecosistema (Ganem, 2010).

## **2.2 Suelo**

En el suelo existen 3 fases, en la fase líquida se encuentran en suspensión elementos químicos y moléculas solubles; la fracción gaseosa está formada por la modificación del aire atmosférico resultante de procesos bioquímicos como la respiración celular y la fracción sólida se compone de sustancias inorgánicas y materiales orgánicos. Por ello, el suelo es un ambiente heterogéneo altamente complejo, que se caracteriza por anclar una variedad de procesos químicos, físicos y biológicos, y es uno de los mayores reservorios de diversidad biológica en el planeta (Swift *et al*, 1998). En presencia de plantas, las bacterias colonizan la superficie de raíces, llamada rizósfera (Raaijmakers *et al.*, 2008;), y se encuentran en poblaciones alrededor de 10 a 1000 veces mayores que aquellas encontradas en suelos no rizosféricos (Berendsen *et al.*, 2012). Sin embargo, los metabolitos excretados por las raíces vegetales promueve un efecto selectivo sobre grupos microbianos que presentan compatibilidad metabólica a los exudados (Berendsen *et al.*, 2012). En el caso de los suelos agrícolas, se deben de contener suficientes nutrientes, recursos energéticos y microorganismos para brindar un ambiente idóneo a las plantas para tener una amplia producción.

Dependiendo de las características del suelo se pueden albergar diferentes especies de bacterias (Torsvik y Øvreas, 2002). Las estimaciones muestran la población de procariontes en suelos entre  $10^8$  y  $10^{10}$  bacterias por gramo de suelo y entre 5000 y más de un millón de especies diferentes en un mismo suelo (Taylor et al., 2002). Los microorganismos realizan diferentes funciones importantes para la dinámica funcional del suelo, como la degradación de sustancias xenobióticas, control biológico de patógenos, solubilización de minerales y la descomposición de la materia orgánica que proporciona nutrientes a las plantas (Schloter et al., 2003).

### **2.2.1 Contaminación de suelos por hidrocarburos**

Una de las fuentes de contaminación de suelos se debe a derrames hidrocarburos, afectando los microambientes, flora y microbiota (Madigan *et al.*, 1999) y de acuerdo con la Comisión Nacional de Hidrocarburos, de 2006 hasta 2012 la tendencia de fugas y derrames en ductos de Petróleos Mexicanos al cierre de 2014, presenta un incremento de 4%, en comparación con 2013. De las fugas y derrames en 2014, 60% se presentaron en los ductos de recolección y 38% en ductos de transporte.

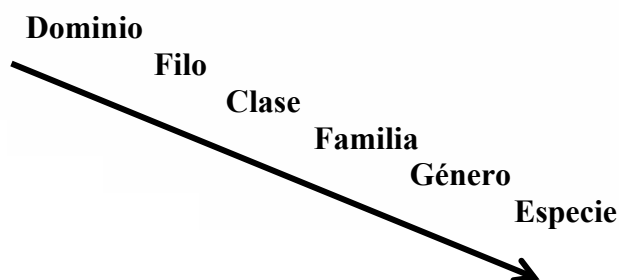
Entre los factores que inciden en los eventos de fugas y derrames se encuentran las tomas clandestinas y los fenómenos de corrosión. De acuerdo con la Comisión Nacional de Hidrocarburos de 2006 hasta 2012, Puebla fue el cuarto estado con mayor número de derrames de petróleo a nivel nacional, con un total de 6.91 billones de barriles de petróleo derramados (Comisión Nacional de Hidrocarburos, 2013). En el estado existen gasoductos que atraviesan más de 25 localidades en zonas rurales, lo que las hace vulnerables a derrames o a algún tipo de explosión (Cuanalo y Melgarejo, 2002). Tal es el caso del derrame de Acatzingo en el año 2002, que dejó una persona muerta y 50 hectáreas de terrenos de cultivos dañadas, se perdieron cosechas y se afectó la fertilidad de los suelos. Otro ejemplo es la explosión de un ducto en 2010, en el municipio de San Martín Texmelucan, con un saldo de 30 muertos, además de 83 casas con daños parciales y 32 con pérdida total, la explosión abarcó una distancia aproximada de un kilómetro y medio y se expandió por 50 hectáreas de suelos de cultivo y por la ribera del río Atoyac, desencadenando un impacto severo sobre la microfauna, microflora, biota y poblaciones humanas cercanas al río (Rivera et al., 2013; Cavazos-Arroyo et al., 2014).

Durante 2014, se identificaron y clausuraron 4,125 tomas clandestinas (TC), cifra 43.7% mayor a las 2,871 detectadas en el 2013. Tamaulipas fue la entidad más afectada por este delito, identificarse 641 TC en los ductos de Pemex Refinación (16% del total

nacional). Le siguen Guanajuato con 524 TC (13%), Sinaloa con 519 TC (13%) y Jalisco con 359 TC (9%) (Pemex, 2015).

### 2.3 Microbiota

El término microbiota hace referencia a los microorganismos que se encuentran en un ambiente específico, y puede ser desde virus, bacterias u hongos. Todo organismo está clasificado de forma taxonómica, logrando así tener grupos de organismos con propiedades similares, separándolos de lo que son diferentes. La clasificación taxonómica de organismos en rango descendiente se muestra en la figura 2.2.



**Figura 2.2** Clasificación taxonómica de organismos

En el dominio de las bacterias encontramos 30 filos acorde al LSPN (List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature) (Euzéby, 1997).

#### 2.3.1 Microbiota de suelo

El suelo es un ambiente complejo capaz de albergar diferentes especies de bacterias, estas se encuentran en proporciones que van de  $10^8$  a  $10^{10}$  por gramo de suelo, entre 5000 y más de un millón de especies diferentes (Burns *et al.*, 2013). La dinámica funcional tiene varias funciones importantes que son realizadas por los microorganismos: la degradación de sustancias xenobióticas, control biológico de patógenos, solubilización de minerales y la descomposición de la materia orgánica que proporciona nutrientes a las plantas, (Schloter *et al.*, 2003; Kujur *et al.*, 2012). En presencia de plantas, las bacterias colonizan la superficie de raíces, denominada rizosfera (Davison, 1988; Zhang *et al.*, 2006), estas se encuentran en poblaciones alrededor de 10 a 1000 veces mayores que aquellas encontradas

en suelos no rizosféricos (Berendsen et al., 2012). Sin embargo, los metabolitos excretados por las raíces vegetales promueve un efecto selectivo sobre grupos microbianos que presentan compatibilidad metabólica a los exudados (Rovira, 1959, Berendsen et al., 2012). En el caso de los suelos agrícolas, se deben de contener suficientes nutrientes, recursos energéticos y microorganismos para brindar un ambiente idóneo a las plantas para tener una amplia producción.

La principal característica de estos microorganismos es la de favorecer el desarrollo vegetal por mecanismos directos, como la fijación biológica de nitrógeno (FBN), la producción de fitormones y la solubilización de fosfatos; o por mecanismos indirectos, como el control biológico de fitopatógenos e insectos, aumento de la resistencia a estrés bióticos y abióticos, además de otros mecanismos (Bulgarelliet al., 2013).

Los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal, presentados por estos microorganismos y que pueden ser explotados en beneficio de una agricultura más sostenible y de menor impacto ambiental, comprenden: la fijación biológica de nitrógeno (James y Baldani, 2012); el aumento de la actividad de la nitrato reductasa vegetal cuando en asociaciones endofíticas (CASSÁN et al., 2008); la producción de fitormonios como auxinas, citocinas (Tien et al., 1979), giberelinas (Bottini et al., 1989) y la regulación de la biosíntesis del etileno (Strzelczyk et al., 1994), además de una variedad de otras moléculas bioactivas (Perrig et al., 2007); la solubilización de fosfatos (Rodriguez et al., 2004); el control biológico de patógenos (Cassán et al., 2008); y el aumento de la resistencia vegetal a diferentes estrías abióticas (Yang et al., 2009).

Como se mencionó anteriormente, en la fase sólida del suelo, la cual representa en promedio el 50% del volumen total del suelo, siendo cerca del 45% representados por minerales y entre 1 - 5% representados por materia orgánica, donde residen los organismos vivos: raíces y macro y microorganismos. En la mayoría de los casos, los microorganismos, junto con sus enzimas extracelulares y con la meso y macrofauna, conduce a todas las reacciones metabólicas conocidas en este ambiente (Bakshi y Varma, 2011; Kujur et al., 2012). Estas actividades ocurren de manera desuniforme y presentan grandes diferencias espacio-temporales a lo largo del perfil del suelo, donde la acumulación de materia orgánica, desechos animales y deposiciones rizosféricas llevan a la existencia de microhabitats con elevada actividad biológica y biodiversidad (Gonzales et al. 2012).

Debido a su heterogeneidad física, química y biológica, el suelo es uno de los mayores reservorios de biodiversidad microbiana, constituyendo un importante recurso

para la exploración biotecnológica. La diversidad bacteriana en estos ambientes es muy superior a la observada para organismos eucariontes, pudiendo existir miles de diferentes especies de bacterias en apenas 1 cm<sup>3</sup> de suelo (Torsvik y Øvreas, 2002; Maron et al., 2011). Los microorganismos que habitan el suelo constituyen la base de procesos ecológicos, como los ciclos biogeoquímicos y la cadena trófica, manteniendo relaciones vitales entre sí y con los organismos superiores. Diversas funciones de importancia para la dinámica funcional del suelo son realizadas por los microorganismos, como la descomposición de la materia orgánica que proporciona nutrientes a las plantas y la degradación de sustancias xenobióticas. Además, la microbiota del suelo actúa en el control biológico de patógenos, influye en la solubilización de minerales y contribuye a la estructuración y agregación del suelo (Schloter et al., 2003; Kujur et al., 2012). Se han descrito varios géneros bacterianos con potencial de promoción del crecimiento de plantas, pero la mayor composición filogenética de comunidades bacterianas en suelo y asociadas a vegetales es de *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Proteobacteria* (Bulgarelli et al., 2013; Djemiel et al., 2017). Sin embargo la composición y dinámica microbiana en suelos puede variar dependiendo de locación, la composición del suelo, especies de plantas y la arquitectura de biomasa (Schneider et al., 2012; Voříšková and Baldrian, 2013; Cardenas et al., 2015; Ventorino et al., 2015).

Las estimaciones recientes muestran la población de procariotas en suelos entre 10<sup>8</sup>-10<sup>10</sup> bacterias por gramo de suelo, entre 5000 y más de un millón de especies diferentes (BURNS et al., 2013). Estos microorganismos pueden ser clasificados en grupos funcionales de acuerdo con sus actuaciones en los procesos biológicos. Ejemplos de estos grupos son los microorganismos involucrados en el ciclo del carbono y el nitrógeno (Torsvik y Øvreas, 2002).

A pesar de ser capaces de apreciar la importancia de la biodiversidad microbiana del suelo, todavía tenemos poca información sobre el papel de esta biodiversidad para el funcionamiento de este ambiente (Stark et al., 2008) y su influencia en la productividad vegetal (Marcel et al., 2008; Bakshi y Varma, 2011) establecen que la fertilidad y calidad de suelos no están relacionadas solamente con su composición química, sino principalmente con la cantidad y diversidad de los microorganismos que los habitan. Se estima que menos del 10% de los microorganismos existentes en estos ambientes han sido caracterizados y descritos (Dubey et al., 2006) y por lo tanto el desarrollo de métodos dirigidos a la exploración de grupos microbianos específicos son todavía una gran necesidad.

La existencia de microbiota en plantas es fundamental y por medio de mecanismos bioquímicos se logra el mutualismo demostrado por estudios en la promoción de crecimiento de plantas y la promoción de salud de plantas por medio de bacterias. (Bulgarelli et al., 2013).

## **2.4 Biorremediación de hidrocarburos**

Numerosos microorganismos, como hongos y bacterias, son capaces de degradar diferentes hidrocarburos, alifáticos y aromáticos, bajo distintas condiciones ambientales (por ejemplo, condiciones aerobias o anaerobias). Diversas enzimas ofrecen estas capacidades a los microorganismos, permitiendo que la degradación del hidrocarburo se lleve a cabo poco a poco a través del metabolismo secuencial de sus compuestos (Van Hamme *et al.*, 2003). Dentro de la biorremediación de suelos se consideran todos los posibles organismos que pueden vivir en el suelo como algas, actinomicetos, nematodos, oligoquetos, insectos, pequeños mamíferos y plantas. Sin embargo, se pone a las bacterias, hongos y plantas como los mejores organismos capaces de degradar, estabilizar y tolerar las situaciones de estrés causadas por la contaminación con hidrocarburos del petróleo (Boszczyk *et al.*, 2004; Martín *et al.*, 2004).

El fundamento bioquímico de la biorremediación se basa en una serie de reacciones de óxido-reducción en la cadena respiratoria de las células, cuyo la finalidad de obtener de energía. La cadena se inicia con un sustrato orgánico (compuestos hidrocarbonados) externo a la célula y que actúa como dador de electrones, de modo que la actividad metabólica de la célula acaba degradando y consumiendo dicha sustancia.

Los aceptores más comúnmente utilizados por los microorganismos son el oxígeno, los nitratos, el hierro (III), los sulfatos y el dióxido de carbono. Cuando el oxígeno es utilizado como aceptor de electrones la respiración microbiana se produce en condiciones aerobias, y los procesos de biodegradación serán de tipo aerobio; sin embargo, si utiliza los sulfatos o el dióxido de carbono se produce en condiciones reductoras o anaerobias, y los procesos de biodegradación serán de tipo anaerobio (Maroto y Rogel, *sf.*). El catabolismo aerobio de hidrocarburos puede ser más rápido y completo debido a la ventaja metabólica de tener la disponibilidad de O<sub>2</sub> como aceptor de electrones (Cao *et al.*, 2009; Maki *et al.*, 2001). El producto final de la oxidación de hidrocarburos alifáticos saturados es acetil-CoA, que se cataboliza en el ciclo del ácido cítrico, junto con la producción de electrones en la cadena de transporte de electrones (Madigan *et al.*, 2010).

El ataque inicial intracelular es un proceso oxidativo, y la activación, así como la incorporación de oxígeno, es una reacción enzimática clave catalizada por oxigenasas y peroxidasas. Las vías de degradación periféricas convierten a los hidrocarburos en intermediarios del metabolismo central, por ejemplo, el ciclo del ácido cítrico. La biosíntesis de la biomasa celular se produce a partir de los metabolitos precursores centrales, como acetil-CoA, succinato, piruvato (Nilanjana y Chandran, 2011.)

Otro grupo involucrado en la biodegradación son las lacasas, constituyen una familia de oxidasas multicobre que catalizan la oxidación de una amplia gama de sustratos fenólicos y aromáticos con reducción de oxígeno molecular a agua. Muchos microorganismos producen lacasas, intra y extracelularmente, capaces de catalizar la oxidación. Las lacasas representan un grupo de enzimas oxidorreductasas con gran potencial para aplicaciones biotecnológicas y de biorremediación (Gianfreda *et al.*, 1999).

Las peroxidasas (oxidorreductasas de peróxido de hidrógeno) son enzimas que catalizan la oxidación de la lignina y otros compuestos fenólicos a expensas de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en presencia de un mediador (Hiner *et al.*, 2002) Se han estudiado lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y peroxidasa versátil (VP) debido a su alto potencial para degradar sustancias tóxicas del ambiente.

Las posibilidades de biodegradación de las fracciones ligeras de hidrocarburos son buenas, alrededor de 90%, aunque se da naturalmente pérdida por volatilización, mientras que las fracciones medias como es el caso del diésel tiene hasta un 100%, sin embargo, la fracción pesada como el asfalto prácticamente nulas posibilidades (Saval Bohórquez, 2013).

#### **2.4.1 Técnicas de biorremediación.**

El término biorremediación se utiliza para describir una variedad de sistemas que utilizan organismos vivos (plantas, hongos, bacterias, etc.) para degradar, transformar o remover compuestos orgánicos tóxicos a productos metabólicos inocuos o menos tóxicos. Esta estrategia biológica depende de las actividades catabólicas de los organismos, y por consiguiente de su capacidad para utilizar los contaminantes como fuente de alimento y energía (Van Deuren *et al.*, 1997). Las rutas de biodegradación de los contaminantes orgánicos, varían en función de la estructura química del compuesto y de las especies microbianas degradadoras. El proceso de biorremediación incluye reacciones de óxido-reducción, procesos de adsorción e intercambio iónico, e incluso reacciones de

acomplejamiento y quelación que resultan en la inmovilización de metales (Eweis *et al.*, 1998).

Los tratamientos *in situ*, que actúan sobre los contaminantes en el lugar en el que se localizan, y tratamientos *ex situ*, que requieren la excavación previa del suelo para su posterior tratamiento, ya sea en el mismo lugar (tratamiento *on-site*) o en instalaciones externas que requieren el transporte del suelo contaminado (tratamiento *off-site*). Los tratamientos *in situ* requieren menos manejo pero por lo general son más lentos y más difíciles de llevar a la práctica dada la dificultad de poner en contacto íntimo a los agentes de descontaminación con toda la masa de suelo contaminada. Los tratamientos *ex situ* suelen ser más costosos pero también más rápidos, consiguiendo normalmente una recuperación más completa de la zona afectada. En función de los objetivos que se quieren alcanzar a la hora de recuperar un suelo contaminado (Kaifer *et al.*, 2004).

#### 2.4.2 Fitorremediación

La fitorremediación es una técnica que utiliza plantas para remover, transferir, estabilizar, concentrar y/o destruir contaminantes (orgánicos e inorgánicos) en suelo y agua (Martín *et al.*, 2004), gracias a la capacidad de algunas plantas de tomar y acumular los contaminantes en sus tallos, en niveles que resultan tóxicos para otras especies. Además, las plantas desarrollan interacciones y asociaciones en las raíces con organismos que pueden causar la degradación o transformación acelerada de ciertos contaminantes a productos que no representan amenazas ambientales (Torres, 2003; López *et al.*, 2006; Ferrera-Cerrato *et al.*, 2006).

Las fitotecnologías se basan en los mecanismos fisiológicos básicos (Tabla 2.2) que tienen lugar en las plantas y en los microorganismos asociados a ellas, tales como: transpiración, fotosíntesis, metabolismo y nutrición (Delgadillo-López *et al.*, 2011), siendo los más destacados la fitoextracción, la fitoestabilización, la fitovolatilización, la fitodegradación y la fitoestimulación.

**Tabla 2.2.** Mecanismos de fitorremediación

Proceso	Mecanismo	Contaminantes
Fitoestabilización	Complejación	Orgánicos e inorgánicos

Fitoextracción	Hiperacumulación	Inorgánicos
Fitovolatilización	Volatilización a través de las hojas	Orgánicos e inorgánicos
Fitoinmovilización	Acumulación en la rizósfera	Orgánicos e inorgánicos
Fitodegradación	Uso de plantas y microorganismos asociados para degradar contaminantes	Orgánicos
Rizofiltración	Uso de raíces para absorber	Orgánicos e inorgánicos

Tomada de Delgadillo-López *et al.*, 2011 (Ghosh y Singh, 2005).

- Fitoextracción: La planta absorbe los contaminantes acumulándolos en hojas, tallos o raíces facilitando la extracción de éstos; en la contaminación por metales las plantas pueden ser procesadas mediante incineración y reciclaje de los metales.
- Fitoestabilización: El sistema radical impide la movilización de los contaminantes por impedimento físico, absorción, adsorción, o precipitación del contaminante en la zona radical.
- Fitovolatilización: La planta es capaz de movilizar el contaminante a las hojas y liberarlo mediante la transpiración; el contaminante puede estar en su forma original o en una forma modificada.
- Fitodegradación: La planta tiene la capacidad de metabolizar los contaminantes y transformarlos, la mayoría de las veces en formas menos tóxicas, y en ocasiones en formas utilizables para la planta (CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O).
- Fitoestimulación: Las raíces de las plantas liberan exudados que estimulan el desarrollo de otros microorganismos con capacidad de biotransformar los contaminantes en compuestos menos tóxicos (Villegas, 2011)

### 2.4.3 Cempasúchil (*Tagetes erecta*)

**Descripción de Cempasúchitl** (Rodríguez *et al.*, 2006):

Familia: Asteraceae

Género: Tagetes

Especie: erecta

340 Naturally occurring bioactive compounds

Nombres comunes: Cempasuchil, Cempoalxóchitl, Flor de muerto, Flor de tapayola, Flor de veinte peéталos, Inditas, K-Pu-Huk (Maya), Rosa de muerto, Sempual, Tiscoque, Yita cuaá (mixteco), Zampual. Zempoalxóchitl.

Descripción general: Tagetes erecta es una planta herbácea anual de hasta 60 cm de altura, tallo pubescente estriado, hojas divididas aromáticas que miden hasta 20 cm de largo; flores grandes de color naranja, amarillo o rojizo con un olor acre; florece en octubre y noviembre. Tiene pedúnculos de hasta 15 cm de largo, con brácteas pinnadas, lóbulos con cerdas en los dientes terminados, campanulado involucro de 13–20 mm de altura; 9–25 mm de ancho, bráctea 5–11, glabra con ápice triangular, flores liguladas de 5–8 a numerosas.

Habitat: El género Tagetes es nativo americano; se distribuyen aproximadamente 20 especies desde México hasta Argentina, su origen ha sido sujeto a especulaciones y confusiones. La planta crece en un bosque mésico de montaña con suelo bronceado; cerca de ríos y bosque tropical caducifolio; en áreas abiertas de selva baja caducifolios; jungla caducifolera de altura media y jungla alta perennifolious; suelo pedregoso negro. Se encuentra entre 800 y 2590 m sobre el nivel del mar.

Distribución: En México se encuentra principalmente en los estados de Chiapas, Estado de México, Puebla, Tlaxcala, Veracruz, Tabasco, Oaxaca, Durango, Jalisco, Michoacán, Guerrero y Yucatán.

Análisis fitoquímico: posee sustancias químicas que contienen azufre en su estructura con propiedades nematicidas, taninos, oleorseína y xantofila. Además emiten etileno que inhibe el crecimiento de otras plantas en sus proximidades.

Propiedades y acciones documentadas: Se usa comúnmente como una infusión de flores y hojas para curar trastornos estomacales (cólicos) (Martín, 1993f) y contra parásitos del intestino. Las hojas se han utilizado para curar heridas, granos, fiebre y enfermedades hepáticas. Se utiliza para forraje de aves de corral y rituales religiosos, principalmente para las celebraciones del 2 de noviembre. Se obtiene un pigmento amarillo de las flores, que se usa para lana, cuero, telas y fibras. Tiene un uso veterinario contra trastornos del sistema digestivo y 342 infecciones de compuestos bioactivos que ocurren naturalmente. La planta

también tiene propiedades antifúngicas, antivirales, antibacterianas y nematocidas; adjuntas a sus propiedades medicinales.

## **Capítulo III. Materiales y métodos**

### **3.1. Muestreo de suelo**

Las muestras de suelo se recolectaron en una parcela agrícola en la zona de Tecamachalco (18°49'04.3"N 97°44'30.1"W). El suelo fue recolectado conforme a la norma NOM-021-SEMARNAT-2000. Se retiraron aproximadamente 20 kilos, al momento de la recolección en el predio se cultivaba maíz; la muestra no presentó signos de contaminación de hidrocarburo.

### **3.2. Contaminación artificial**

El suelo recolectado se colocó en charolas de plástico, donde se desmenuzó para deshacer las partículas más grandes y se sometió a homogeneización mediante el mezclado con pala de aluminio dentro de tinas de plástico, con capacidad para 30 kilogramos, evitando la contaminación con otros materiales,

Durante el periodo de secado, el suelo se movió y monitoreó cada 24 horas. Una vez seco, se pesaron 100 kg para proceder con su contaminación artificial con diésel. El total del suelo se separó en dos partes, una para el control sin contaminar y la otra para añadirle diésel a 50000ppm (5%) (Arroyo, 2017). Se contaminaron 50 kg de suelo con 2.5 kg de diésel, lo que acorde con su densidad de  $0.832 \text{ g/cm}^3$ , corresponde a  $3004.8 \text{ cm}^3$ . Por tanto 50 kg de suelo seco se contaminaron con 3.005 litros de diésel.

La contaminación del suelo se realizó mediante la aspersión de diésel comercial con constante movimiento mediante una espátula, y las charolas se taparon con plástico oscuro para evitar la fotólisis siguiendo el método empleado por Chuluun, Shah, y Rhee (2014). El suelo contaminado y cubierto con el plástico se dejó un mes en temperización para que la fracción ligera de los hidrocarburos se volatilizara.

### **3.3. Plantación y cultivos**

La investigación se desarrolló en el Centro de Innovación Tecnológica en Agricultura Protegida (CITAP) de la UPAEP en Atlixco, Puebla., las semillas fueron germinadas en charolas de unicel utilizando turba como sustrato, posteriormente la plántula se trasladó a

bolsas de 1 litro rellenas con el suelo agrícola recolectado. Las plantas se dejaron crecer por 4 meses. Se realizaron 2 repeticiones del tratamiento de fitorremediación de diésel con cempasúchil, 1 repetición del suelo intacto y 1 del suelo contaminado con diésel como controles. Todos los tratamientos fueron regados con agua. Los tratamientos se denominaron de la siguiente manera: Suelo agrícola intacto, suelo contaminado con diésel, y suelo contaminado + planta.

### 3.4. Recolección de muestras de tratamientos

Previamente y posterior a la fitorremediación, se tomaron 3 muestras de suelo en 3 zonas diferentes de la bolsa de los diferentes tratamientos, cercano a la raíz evitando el suelo de la superficie y el tallo de la raíz. Las 3 muestras recolectadas de cada tratamiento se mezclaron para lograr tener mezcla uniforme. Para distinguir las muestras en los futuros análisis posteriores a la fitorremediación los tratamientos se clasificaron de la siguiente manera (Tabla 3.1):

**Tabla 3.1** Nombre de tratamientos, descripción y tiempo al la toma de muestra

<b>Tratamiento</b>	<b>Descripción</b>	<b>Tiempo de toma de muestra</b>
T1	Suelo agrícola intacto	0 meses
T2	Suelo agrícola intacto	4 meses
T3	Suelo contaminado con diésel	0 meses
T4	Suelo contaminado con diésel	4 meses
T5	Suelo contaminado con diésel + <i>Tagetes erecta</i> 2	2 semanas
T6	Suelo contaminado con diésel + <i>Tagetes erecta</i> 2	4 meses

### 3.5. Procesamiento de muestras

#### 3.5.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó por duplicado, siguiendo el protocolo del kit para extracción de ADN de suelo “Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep” de la marca ZymoResearch. Se tomaron 0.25 gramos de la muestra previamente mezclada, al final el ADN de los duplicados se juntó para hacer una sola muestra. Al final se obtuvieron 8 muestras de ADN de bacteria de suelo correspondientes a los tratamientos mencionados con anterioridad (T1 a T6).

### 3.5.2. Determinación de concentración de ácidos nucleicos

La cuantificación se realizó con un espectrofotómetro (Genova NanoDrop Jenway), siguiendo protocolo y manual del equipo. Posteriormente, todas las muestras se llevaron a una dilución conteniendo 5ng/ul de ADN para su uso en rtPCR.

### 3.5.3. Análisis por qPCR

Para la amplificación de los genes se seleccionaron los primers diseñados por varios autores para la amplificación de filos en muestras de suelos específicamente: *gamma proteobacteria*, *firmicutes*, *bacteroidetes* y bacterias totales. Las secuencias se muestran en la tabla 3.2.

**Tabla 3.2** Primers para la detección de filos y bacterias totales.

	<b>Nombre del primer</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Fuente</b>
Bacterias totales	Bacfw F	ACTCCTACGGGAGGCAG	Yu <i>et al.</i> , 2011
	Bacrev R	GACTACCAGGGTATCTAATCC	Yu <i>et al.</i> , 2011
<i>Gammaproteobacteria</i>	$\gamma$ 1080F	TCGTCAGCTCGTGTGTGA	Gregoris <i>et al.</i> , 2011
	$\gamma$ 1202R	CGTAAGGGCCATGATG	Gregoris <i>et al.</i> , 2011
<i>Bacteroidetes</i>	Bac960F	GTTTAATTCGATGATACGCGAG	Yang <i>et al.</i> , 2017
	Bac1100R	TTAASCCGACACCTCACGG	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>Firmicutes</i>	Firm934F	GGAGYATGTGGTTTAATTCGAAGCA	Guo X, 2008
	Firm1060R	AGCTGACGACAACCATGCAC	Guo X, 2008

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo usando el kit SybrGreen PCR kit de la marca Qiagen, el equipo utilizado fue Rotor-Gene Q 2PLX de la misma marca Qiagen. Las reacciones se hicieron por triplicado. La detección de fluorescencia se hizo en el canal verde con longitud de emisión de 470 y longitud de detección de 510nm. Los componentes de las reacciones se muestran en la tabla 3.3, y las condiciones usadas en la tabla 3.4

**Tabla 3.3** Componentes de reacción qPCR

Componente	Volumen
SYBR Green Master Mix 2X	7.5 µl
Primer (10 µM)	1.5 µl
Agua libre de RNAsas	5.4 µl
DNA (5ng/ µl)	0.6 µl
<b>Total</b>	<b>15 µl</b>

**Tabla 3.4** Condiciones para la amplificación por PCR.

Blanco	Fase	Condición
Filos y Bacterias Totales	Desnaturalización inicial	95°C - 5 minutos
Filos	45 ciclos	45 ciclos
	Desnaturalización	95°C - 10 segundos
	Hibridación/elongación	60°C - 10 segundos
Bacterias Totales	45 ciclos	45 ciclos
	Desnaturalización	95°C - 15 segundos
	Hibridación/elongación	61°C - 15 segundos
Filos y Bacterias Totales	Melting curve	Incremento de temperatura cada 1°C, de 50°C a 99°C, tiempo de espera de 5 segundos por etapa

### 3.5.4. Clonación y transformación de ADN plásmidico

La curva para *gammaproteobacteria* se realizó mediante la clonación del gen 16S rRNA de *E. Coli K12* en el vector pUC19. La bacteria competente para realizar la clonación fue *Escherichia coli KRX* (Promega). Se realizó la amplificación del gen 16S rRNA con los primers diseñados de manera que los bordes 5´ fueran idénticos a los del vector pUC19 digerido por las enzimas XbaI y HindIII según las instrucciones del kit In-fusion HD Ecodry Cloning Kit (Clontech). La secuencia de los primers para la amplificación del gen 16S rRNA fueron obtenidas de Bergmann, I. 2012. (Tabla 3.5). La reacción fue realizada

con el termociclador LUX (ACTGene). Las condiciones de PCR punto final se muestran en la tabla 3.6.

**Tabla3.5** Primers para amplificación del gen 16S rRNA de bacterias.

Orden	Especie	Primer	Secuencia	Producto PCR
Bacterias	<i>Escherichia coli K12</i>	Bacecofw	CCGGGGATCCTCTAGAAGAGTTTGA TCATG GCTCAG	1428 bp
		Bacecorev	TGATTACGCCAAGCTTCTTTTGC AACCCACTCC	

**Tabla3.6** Condiciones PCR punto final para amplificación gen 16S rRNA de *Escherichia coli*

Condiciones	
Componentes de la reacción	Prime Star Max DNA Polymerase 25 µl
	Primer (10 µM) 1.5 µl
	Agua libre de RNAasas 15.5 µl
	DNA 8 µl
	<b>Volumen Total 50 µl</b>
Programa PCR con 30 ciclos	Desnaturalización inicial 98°C por 5 minutos
	Desnaturalización 98°C por 10 segundos
	Hibridación 60°C por 15 segundos
	Elongación 72°C por 05 segundos
	Elongación 72°C por 5 minutos

Tras la amplificación del gen, se realizó la purificación de los productos de PCR siguiendo el protocolo de Gel/ PCR DNA Fragments Extraction Kit de IBIScientific.

Para la clonación del amplicón en el vector pUC19, este se digirió con las enzimas XbaI y HindIII (Promega), incubándolos por 72 horas a 37°C. (Tabla 3.7)

**Tabla 3.7** Componentes para la digestión del vector pUC19.

Componentes de la digestión	Volúmenes
XbaI	0.8 µl
HindIII	0.8 µl
Buffer E	2 µl
pUC19	19 µl
Agua	7.5 µl
Volumen Total	20 µl

Una vez digerido el vector, se usó el kit In-Fusion® HD EcoDry™ Cloning Kit para la clonación. Posteriormente se transformaron las bacterias competentes de la cepa *Escherichia coli* KRX según las instrucciones del proveedor. Las bacterias transformadas se colocaron en cajas petri con medio LB-Agar-Ampicilina a diferentes volúmenes de sembrado (25, 50, 100 y 250) dejando incubar a 37°C por una noche. Al siguiente día, 5 colonias fueron inoculadas en medio LB líquido con ampicilina para su crecimiento y su verificación, extrayendo su ADN plasmídico con Zippy Plasmid Miniprep Kit (Zymo research) y comprobando la clonación linearizando el plásmido extraído con la enzima XbaI. Se eligió la colonia que haya tenido éxito en la clonación completa y se cultivó de nueva vez en medio LB con ampicilina (100ul/ml) para guardarlas en stock a -80°C con 1mL de gliceron (15%).

Teniendo el plásmido clonado, este se volvió a extraer, a purificar y linearizar, y purificar del gen de agarosa, esta vez a mayor cantidad para poder realizar la curva de calibración para la qPCR. Se midió la concentración del plásmido con NanoDrop.

### 3.5.5. Curvas estándar para cuantificación de número de copias de genes

Las curvas de calibración para los filos *firmicutes*, *bacteroidetes* y bacterias totales se tomaron de trabajos anteriores de estudiantes de maestría que utilizaron las mismas condiciones de PCR y los mismo primers.

El plásmido linearizado y purificado se cuantificó con NanoDrop y se calculó el número de copias que éste representa en la qPCR a partir de su tamaño de bases de pares y concentración. Para ello se usó el programa “Calculator for determining the number of copies of a template “ (Staroscik, 2004). Una vez calculado el número de copias, y al igual que en las demás curvas de calibración, se realizaron diluciones de 10, 100, 1000, 10000, 100000 de la concentración del plásmido con el gen 16S rRNA de *Escherichia coli* K12 para la cuantificación de *Gammaproteobacteria*. Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo con las mismas condiciones y componentes mostrados en las tablas 3.3 y 3.4.

### 3.6 Detección y cuantificación de TPH.

La extracción de los hidrocarburos del suelo se realizó por baño ultrasónico, con una metodología adaptada de los procedimientos utilizados por Buddhadasa, *et al.* 2001, Bolotnik *et al.* 2018 y Ahmed, Fakhruddin, y Kabir, 2018.

Se pesó y mezcló 10 g de suelo homogeneizado con 10 g de sulfato de sodio anhidro a esto se le adicionó 20 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 ultrasonificación y 5 min de reposo.

Transcurrido este tiempo, las muestras se transfirieron a tubos falcón para centrifugarse por 5 min a 2000 rpm. El sobrenadante se recuperó para realizar la determinación gravimétrica y detección por IR-FID.

La determinación de hidrocarburos totales por el método gravimétrico se realizó siguiendo el método descrito por Fernández *et al.* 2006: Se puso a peso constante tubos de ensayo de 100 ml y se registró su peso. Cada extracto de suelo se pasó a un tubo de ensayo y se procedió a evaporar el solvente (diclorometano:acetona) en campana de flujo laminar a temperatura ambiente hasta sequedad y se pesó nuevamente el tubo con el extracto libre de solvente y se anotó el peso. El contenido total de HTPs es la diferencia en peso. Para hacer el cálculo de concentración de hidrocarburos totales del petróleo provenientes de la muestra se utilizó la Ecuación 1.

**Ecuación 1.**  $HTPs (mgkg^{-1} de s. s.) = (R_B - R_A) * (FC) / (P * FH)$

Donde:

$$HTPs (mgkg^{-1} de s. s.) = \text{hidrocarburos totales del petróleo en } \frac{mg}{kg} \text{ de suelo seco}$$

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

RB=peso (mg) del recipiente con el extracto orgánico concentrado.

P=cantidad de suelo extraído (g)

FH=factor de corrección de humedad (1-(%humedad/100))

FC=factor de corrección para transformar a kg de s.s.=1000

A pesar de saber que las muestras efectivamente contenían diésel por haberlas contaminado artificialmente en el laboratorio, la detección mediante infra rojo (IR) se realizó para poder comprobar la presencia del hidrocarburo. Además, se utilizó como referencia para corroborar la degradación del hidrocarburo en las muestras. Las muestras se mandaron al CESAT de la UPAEP para la realización de la detección.

## **Capítulo IV. Resultados y Discusión**

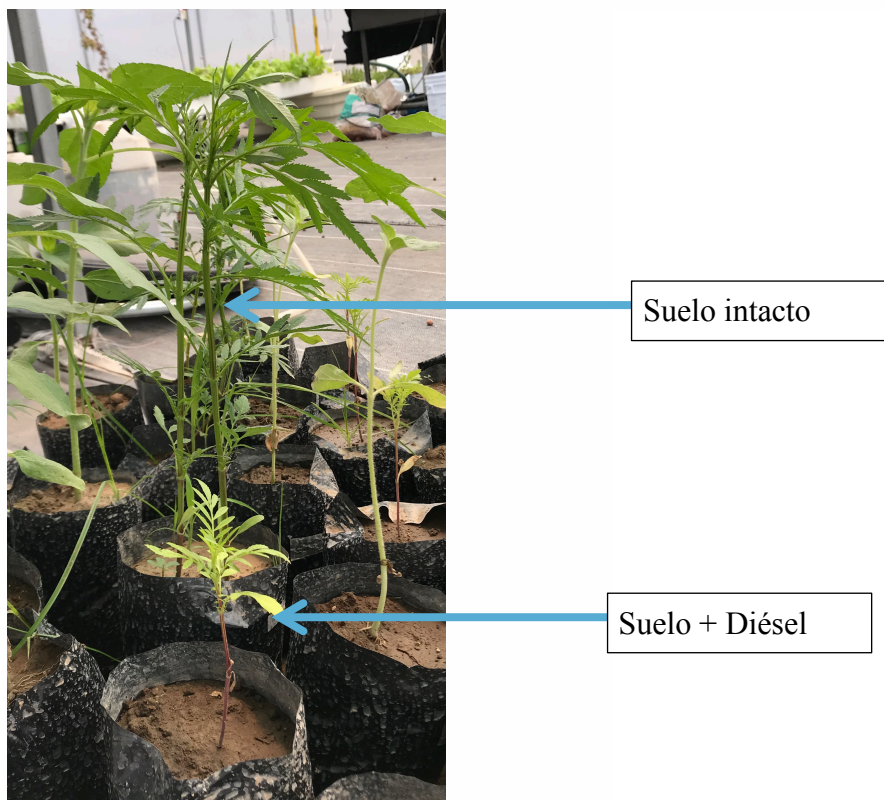
## Resultados

### 4.1. Plantación y extracción de muestras.

Se intentaron germinar las semillas directo en el suelo extraído de la zona de Tecamachalco, sin embargo no hubo éxito en la germinación de las mismas, por lo que se tuvo que recurrir a charolas de unicel y una mezcla de peat moss y agolita en proporción 80:20 respectivamente. Una vez crecidas las plántulas, estas se sembraron en las bolsas con los diferentes tratamientos. Las muestras de suelo después de la remediación no se pudieron obtener únicamente de la rizósfera al haber habido pocas raíces. Tampoco se pudo tomar del suelo pegado a la raíz primaria, ya que contenía todavía restos de peat moss y agrolita adherido, lo que hubiera alterado los resultados.

La imagen 4.1 muestra la diferencia de crecimiento de las plantas a 2 semanas de ser trasplantadas en las bolsas con suelo intacto y suelo contaminado artificialmente. La diferencia en crecimiento de la planta en suelo intacto y contaminado después de 4 meses se muestra en la imagen 4.2. La imagen 4.3 muestra la diferencia de crecimiento y tamaño de flor y raíces extraídas del suelo.

**Imagen 4.1** Comparación de crecimiento de cempasúchil en suelo intacto y contaminado.



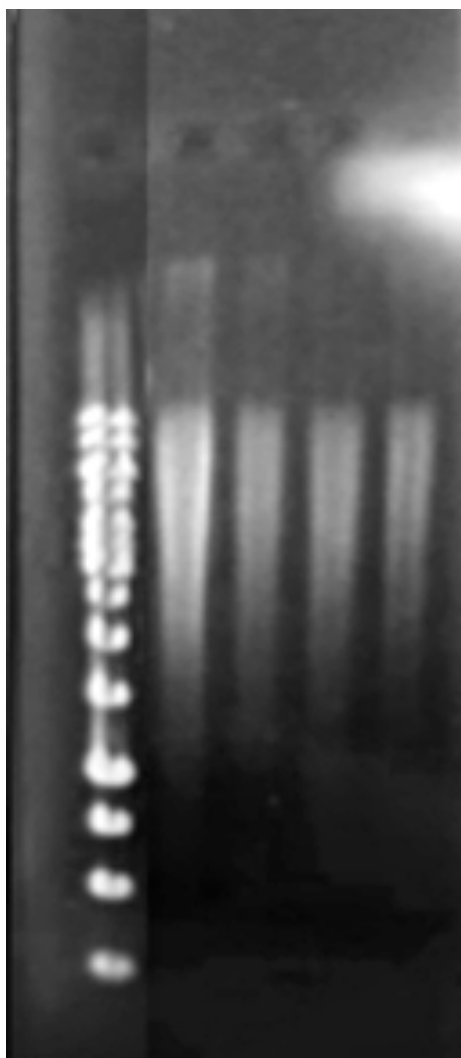
**Imagen 4.2** A) Crecimiento de planta en suelo contaminado con diésel. B) Crecimiento de planta en suelo sin contaminación.



#### **4.2. Extracción de ADN bacteriano de muestra de suelo.**

El gel de agarosa con el ADN bacteriano extraído aparentemente muestra una menor cantidad de material genético en las muestras de suelo contaminado artificialmente (Imagen 4.4).

**Imagen 4.4.** Gel de electroforesis con muestras de ADN.

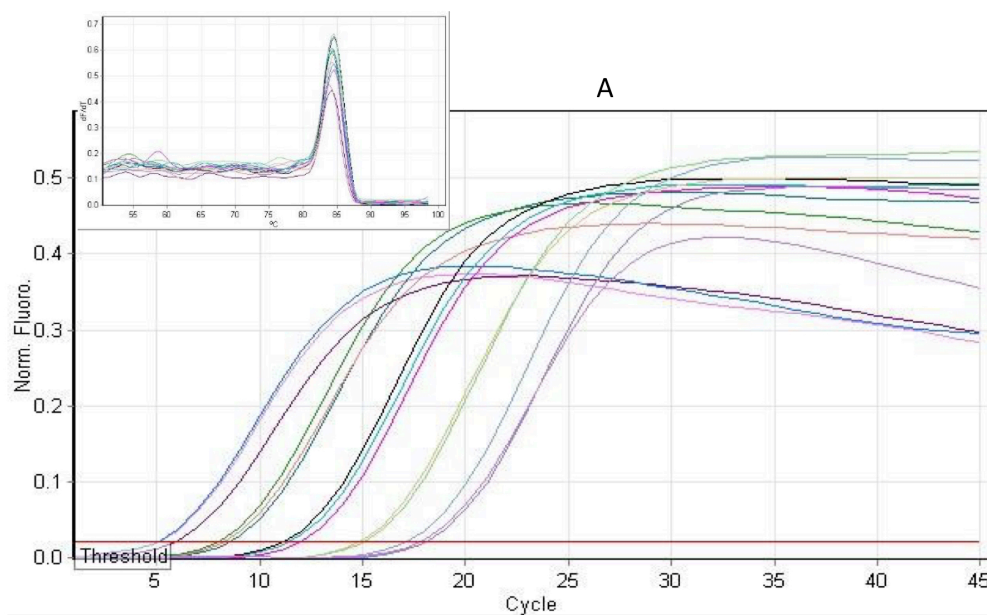


### 4.3 PCR en tiempo real

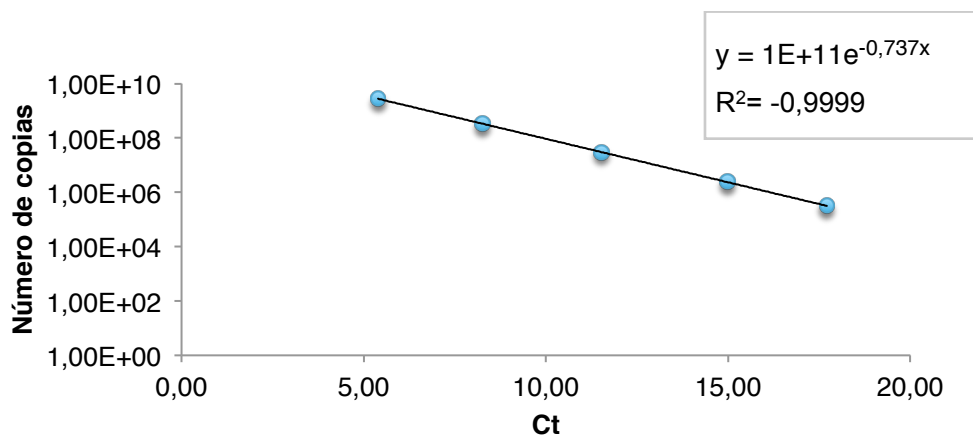
#### 4.3.1. Curvas estándar para cuantificación.

Las figuras 4.6 a 4.8 muestran curvas estándar junto con las ecuaciones para determinar número de copias, tomadas de los trabajos anteriores de estudiantes.

A)

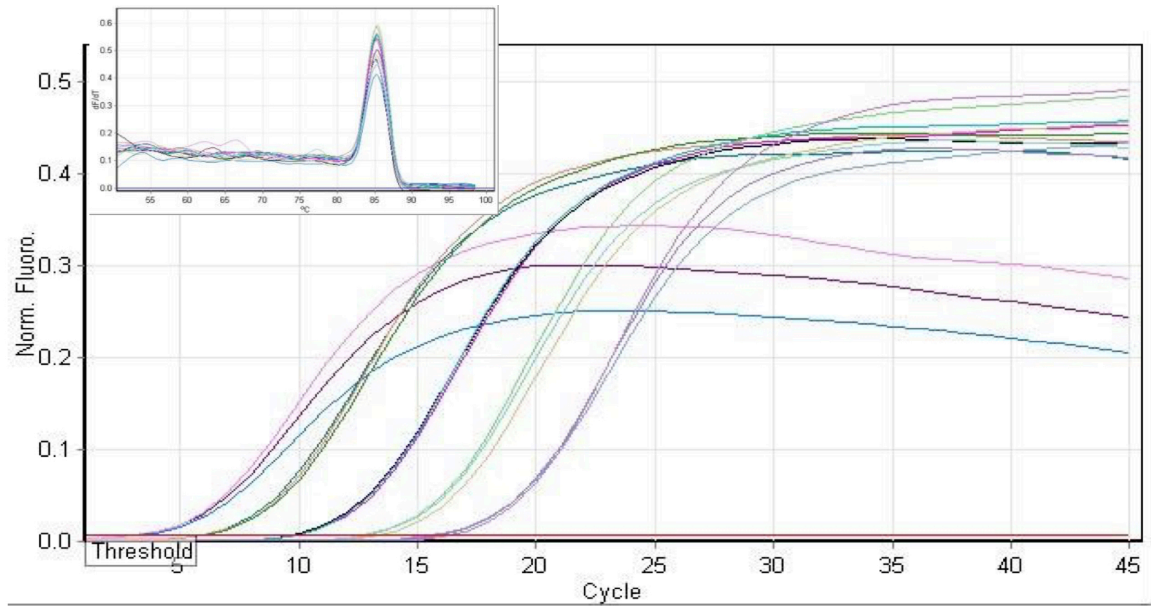


B)

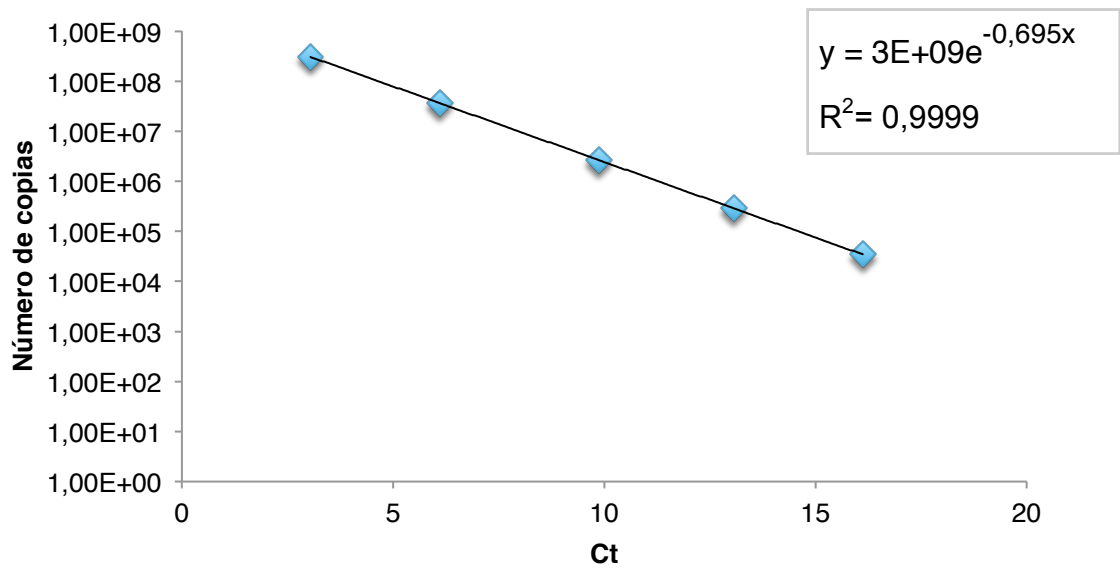


**Figura 4.1** Diluciones seriadas a partir del DNA plasmídico pMiniT/gen 16S RNA de *Firmicutes*. A) Curva de amplificación con curva de disociación B) Curva de calibración.

A)

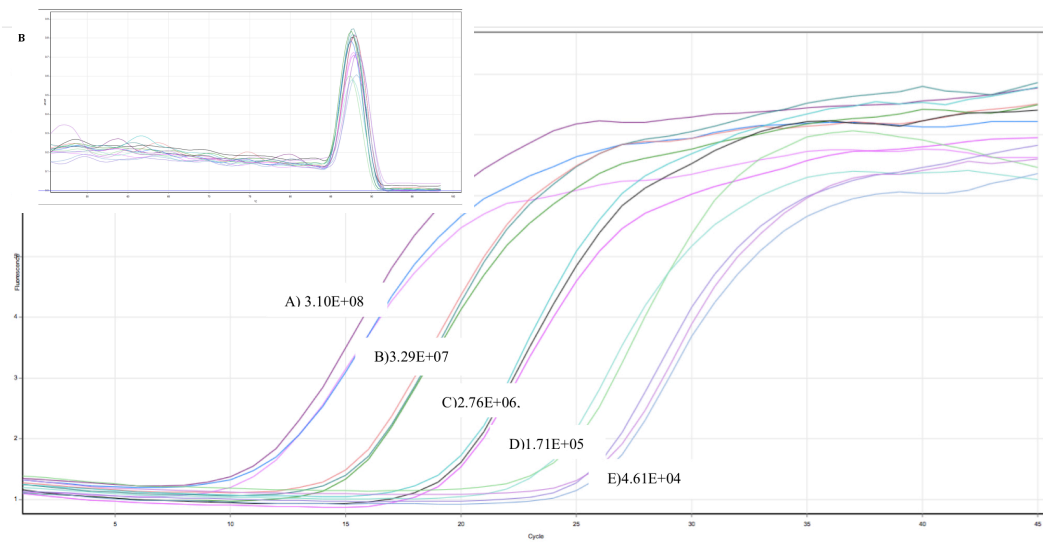


B)

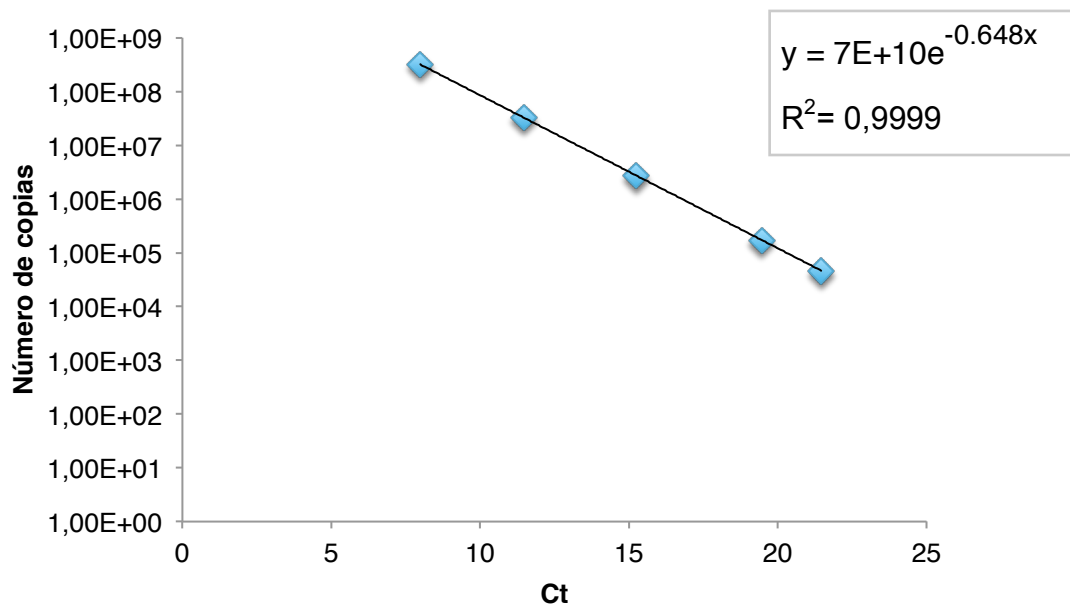


**Figura 4.2** Diluciones seriadas a partir del DNA plasmídico pMiniT/gen 16S RNA de *Bacteroidetes*. A) Curva de amplificación y disociación con curva de calibración.

A)

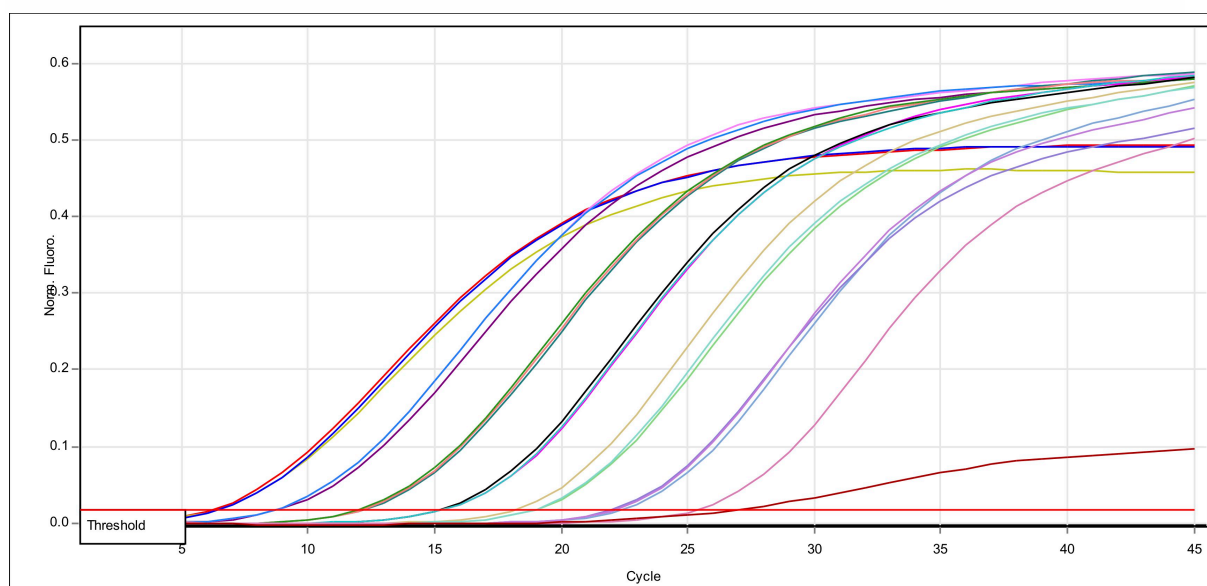


B)

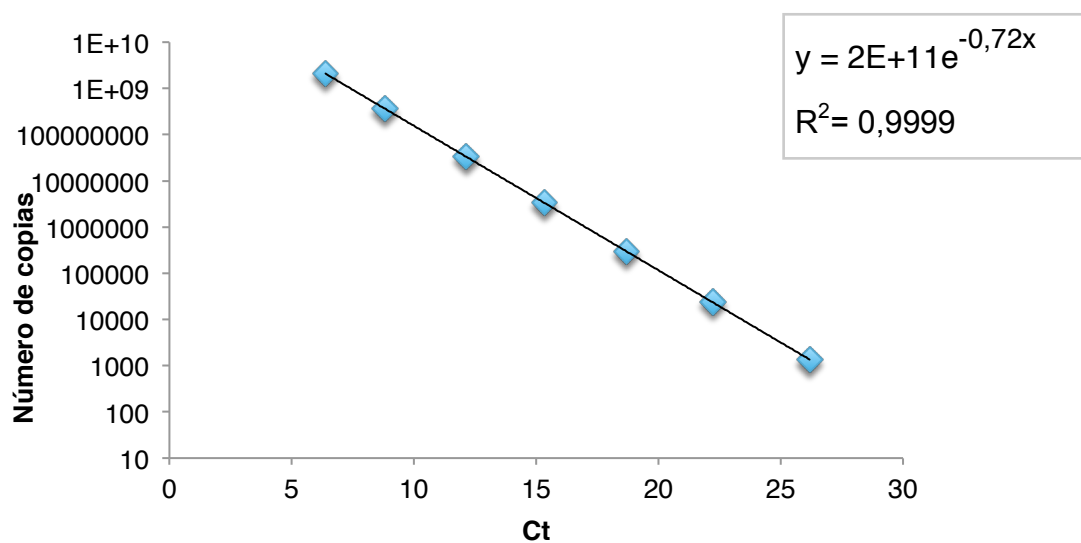


**Figura 4.3** Diluciones seriadas a partir del DNA plasmídico pUC19/gen 16S RNA de Bacterias totales. A) Curva de amplificación y disociación B) curva de calibración.

A)



B)

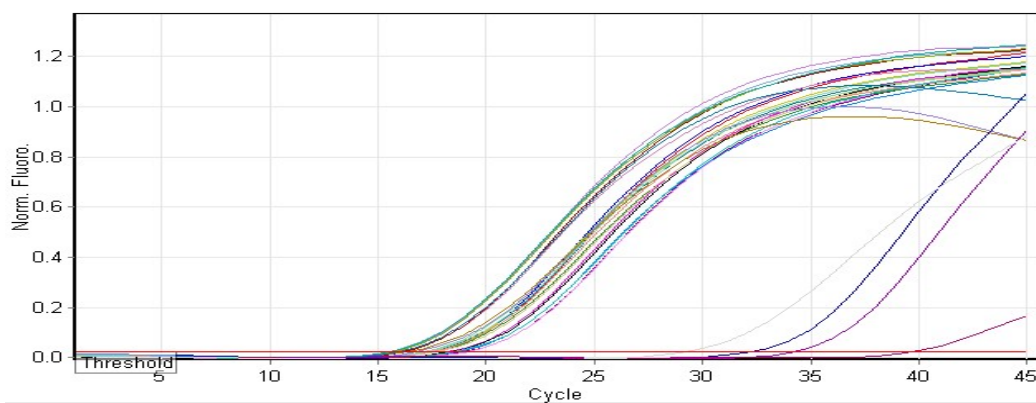


**Figura 4.4** Diluciones seriadas a partir del DNA plasmídico pUC19/gen 16S RNA de *Gammaproteobacteria*. A) Curva de amplificación y disociación B) curva de calibración.

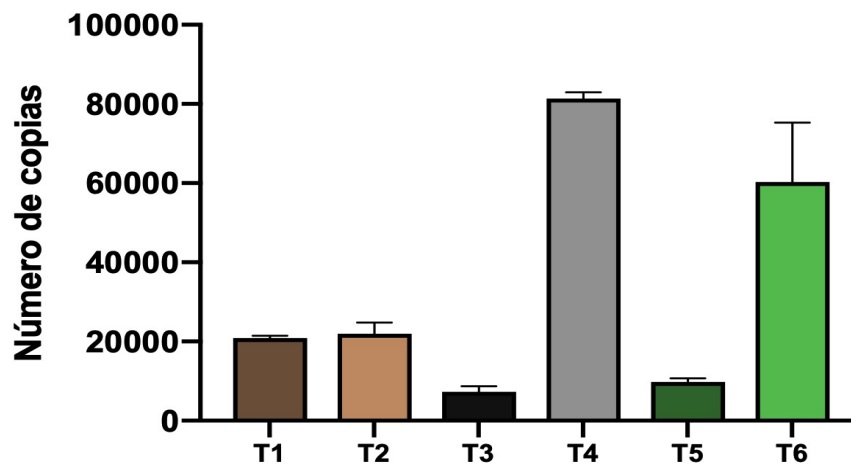
#### 4.3.2. Resultados de rtPCR.

Las figuras 4.1 a 4.4 muestran los resultados de las rtPCRs transformados en número de copias de todas las muestras, junto con las curvas de amplificación.

A)



B)

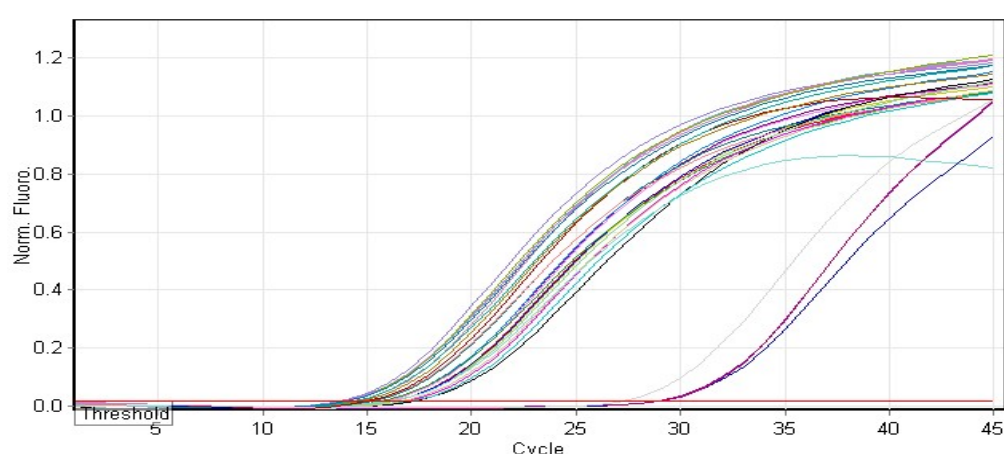


C)

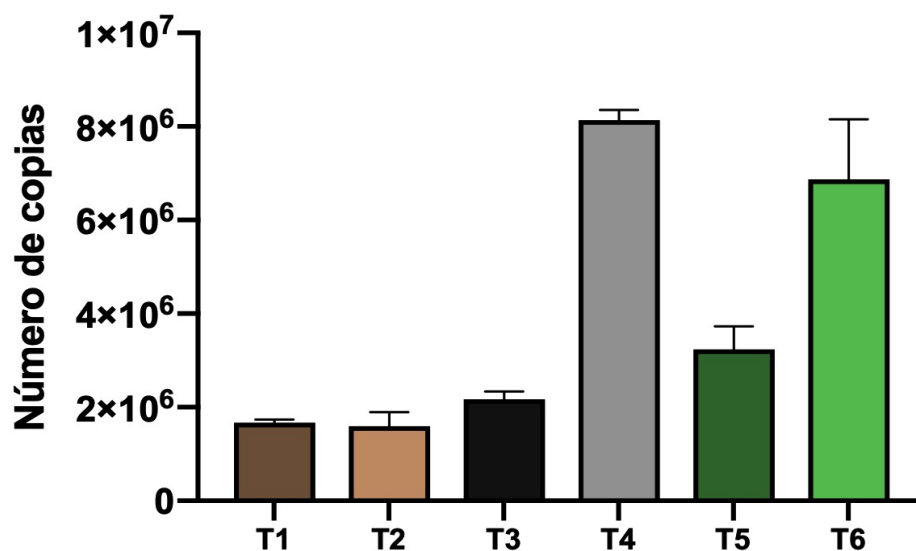
Tratamiento	N	Media	Agrupación
Suelo + Diesel 4 meses	2	81359	A
Suelo + Diésel + Planta 4 meses	5	58288	B
Suelo intacto 4 meses	3	21954	C
Suelo intacto tiempo 0	3	20888	C
Suelo + Diésel + Plántula 2 semanas	6	9772	C
Suelo + Diesel tiempo 0	3	7254	C

**Figura 4.5** Análisis de filo *Bacteroidetes* **A)** Curva amplificación **B)** Número de copias por tratamiento, T1= suelo intacto tiempo 0, T2= suelo intacto 4 meses, T3= suelo + diésel tiempo 0, T4= suelo + diésel 4 meses, T5= suelo + diésel + plántula 2 semanas, T6= suelo + diésel 4 meses. **C)** Análisis de varianza por tratamiento, grupos Tukey (letras iguales sin diferencia significativa, Valor de P = 0.000).

A)



B)

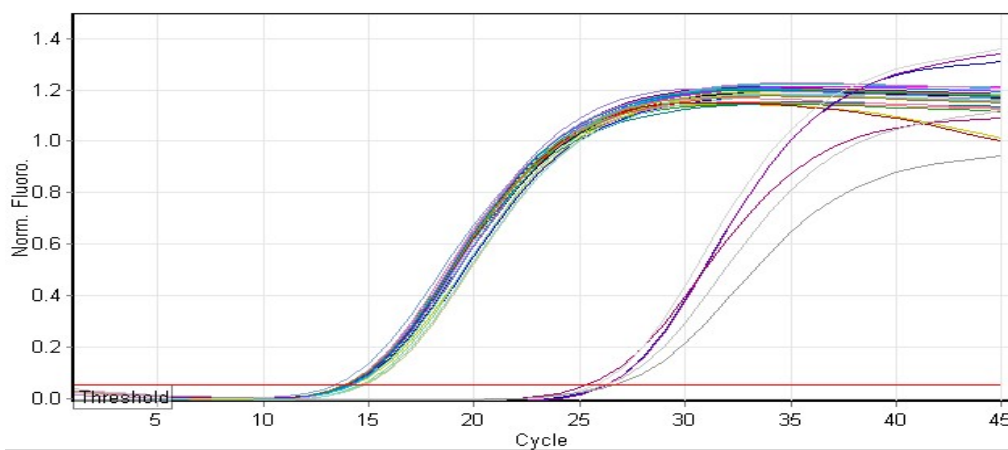


C)

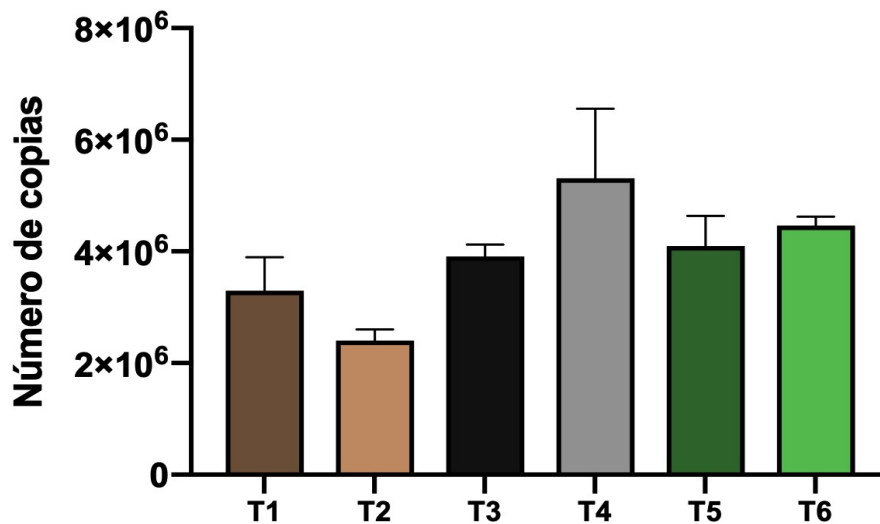
Tratamiento	N	Media	Agrupación
Suelo + Diesel 4 meses	3	8139004	A
Suelo + Diésel + Planta 4 meses	5	6869783	A
Suelo + Diésel + Plántula 2 semanas	6	3239291	B
Suelo + Diesel tiempo 0	3	2174280	B C
Suelo intacto tiempo 0	3	1671648	C
Suelo intacto 4 meses	3	1597128	C

**Figura 4.6** Análisis de filo *Gammaproteobacteria* **A)** Curva amplificación **B)** Número de copias por tratamiento, T1= suelo intacto tiempo 0, T2= suelo intacto 4 meses, T3= suelo + diésel tiempo 0, T4= suelo + diésel 4 meses, T5= suelo + diésel + plántula 2 semanas, T6= suelo + diésel 4 meses. **C)** Análisis de varianza por tratamiento, grupos Tukey (Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes, Valor de P = 0.000).

A)



B)

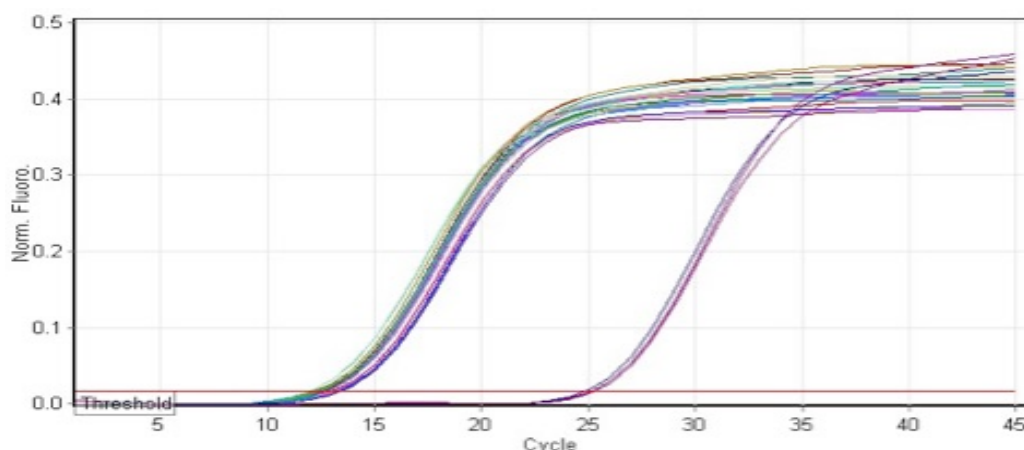


C)

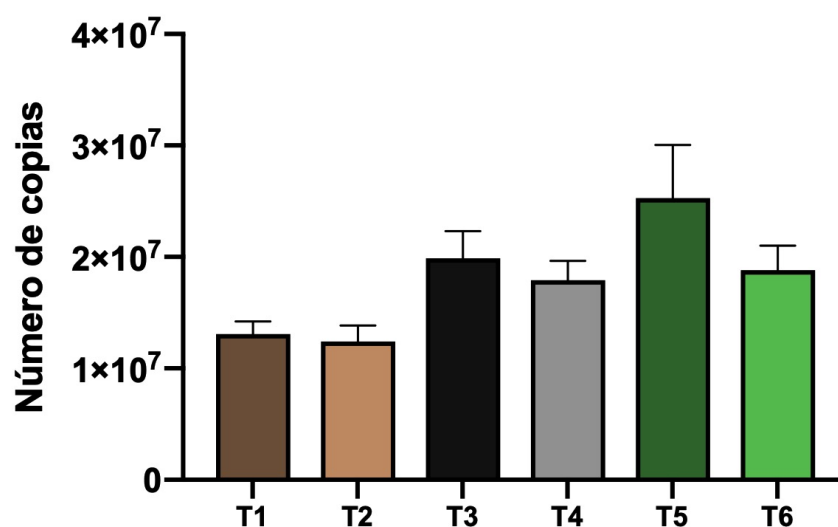
Tratamiento	N	Media	Agrupación
Suelo + Diesel 4 meses	3	5307774	A
Suelo + Diésel + Planta 4 meses	6	4522079	A B
Suelo + Diésel + Plántula 2 semanas	6	4095117	A B
Suelo + Diesel tiempo 0	3	3907889	A B
Suelo intacto tiempo 0	3	3293700	B C
Suelo intacto 4 meses	3	2405511	C

**Figura 4.7** Análisis de filo *Firmicutes* **A)** Curva amplificación **B)** Número de copias por tratamiento, T1= suelo intacto tiempo 0, T2= suelo intacto 4 meses, T3= suelo + diésel tiempo 0, T4= suelo + diésel 4 meses, T5= suelo + diésel + plántula 2 semanas, T6= suelo + diésel 4 meses. **C)** Análisis de varianza por tratamiento, grupos Tukey (Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes, Valor de P = 0.000).

A)



B)

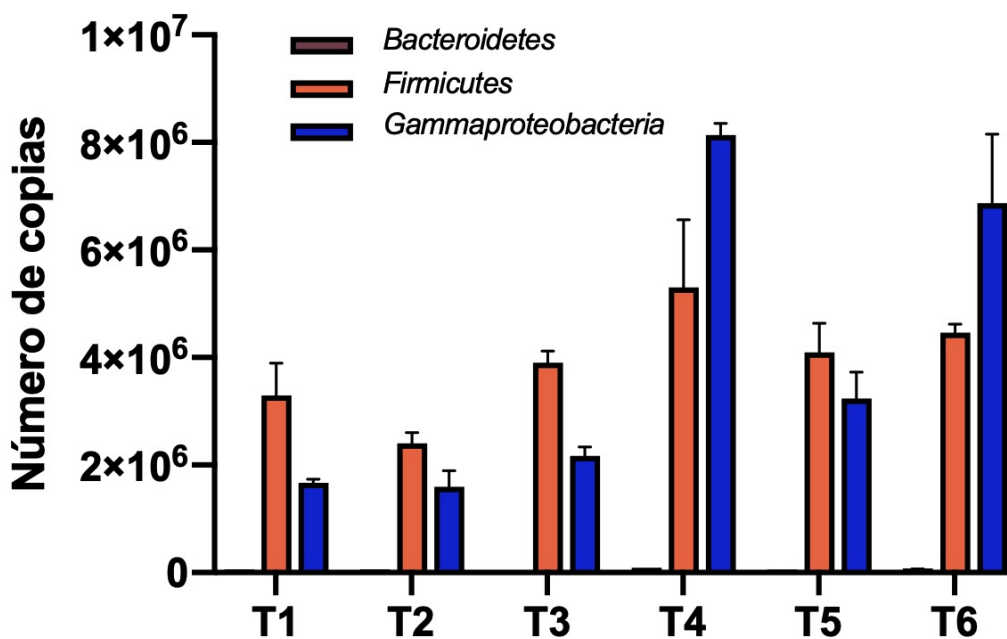


C)

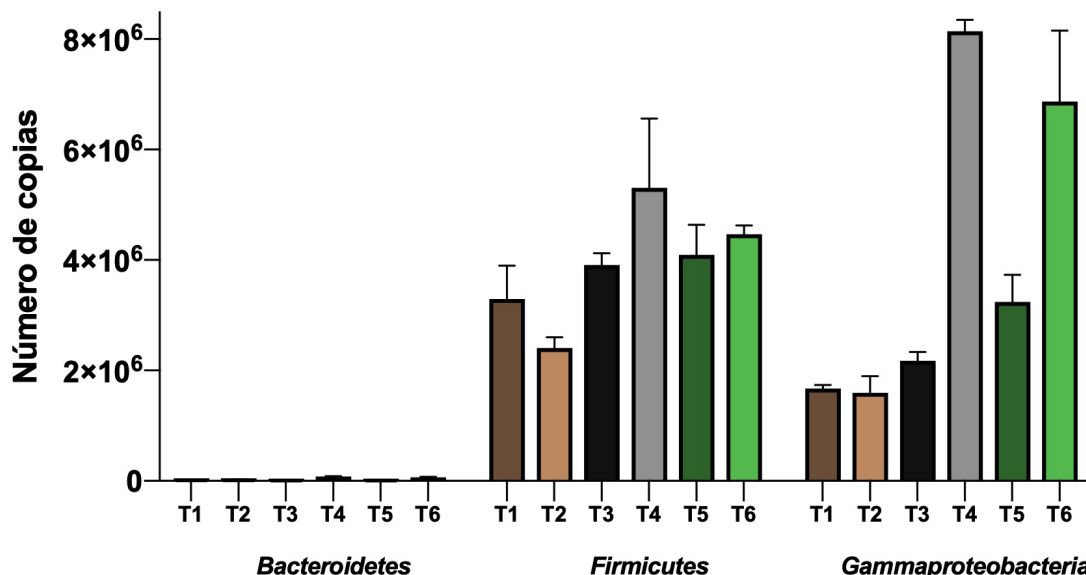
Tratamiento	N	Media	Agrupación
Suelo + Diésel + Plántula 2 semanas	6	25295754	A
Suelo + Diesel tiempo 0	3	19880285	A B
Suelo + Diésel + Planta 4 meses	6	18825851	B
Suelo + Diesel 4 meses	3	17929899	B
Suelo intacto tiempo 0	3	13073812	B
Suelo intacto 4 meses	3	12408638	B

**Figura 4.8** Análisis de Bacterias totales **A)** Curva amplificación **B)** Número de copias por tratamiento, T1= suelo intacto tiempo 0, T2= suelo intacto 4 meses, T3= suelo + diésel tiempo 0, T4= suelo + diésel 4 meses, T5= suelo + diésel + plántula 2 semanas, T6= suelo + diésel 4 meses. **C)** Análisis de varianza por tratamiento, grupos Tukey (Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes, Valor de P = 0.000).

Las siguientes figuras muestran la comparación de los 3 filos estudiados, mostrando los resultados en grupos por tratamientos y filos.



**Figura 4.9** Comparación de número de copias de los filos agrupados por tratamientos. T1= suelo intacto tiempo 0, T2= suelo intacto 4 meses, T3= suelo + diésel tiempo 0, T4= suelo + diésel 4 meses, T5= suelo + diésel + plántula 2 semanas, T6= suelo + diésel 4 meses.



**Figura 4.10** Comparación de número de copias entre filos estudiados. T1= suelo intacto tiempo 0, T2= suelo intacto 4 meses, T3= suelo + diésel tiempo 0, T4= suelo + diésel 4 meses, T5= suelo + diésel + plántula 2 semanas, T6= suelo + diésel 4 meses.

En el filo *firmicutes* se observa un aumento significativo en el número de copias del suelo contaminado con diésel a los 4 meses de tratamiento, y una disminución significativa a los 4 meses en la muestra del suelo intacto. Las demás muestras no muestran grandes cambios, aunque existe una tendencia a un aumento en la presencia de diésel y una disminución sin la presencia.

En el filo *bacteroidetes* es el filo con cambios más notorios de los 3 fillos estudiados. En las muestras de suelo intacto casi no hay ninguna variación. Al tiempo 0 del tratamiento, se observa una disminución en las muestras con diésel, reduciéndose a más del 50% el número de copias en relación al suelo intacto. No obstante, se observa un incremento de más del 100% después de los 4 meses de tratamiento. El aumento de la muestra de suelo contaminado sin fitorremediación es ligeramente mayor a la que contiene la planta, sin embargo ambos muestran un incremento significativo.

En cuanto a *gammaproteobacteria*, la presencia de diésel en el ambiente siempre favoreció a su crecimiento, los menores número de copias se observan en el suelo intacto que a su vez no tienen variación antes y después del tiempo de cultivo. Se observa una ligera diferencia entre el crecimiento de bacterias el suelo con diésel en el tiempo 0 y el suelo contaminado con la plántula a las 2 semanas, lo que propone que poco tiempo de cultivo y crecimiento del cempasúchil favorece el crecimiento de este filo. Al final del tratamiento el suelo con diésel muestra un ligero mayor número de copias que el suelo con fitorremediación, pero por la desviación estándar podría suponerse que llegan al mismo número de copias, siendo éste más de 3 veces mayor al número de copias del suelo intacto.

Por último, en bacterias totales se observa siempre un aumento en el número de copias con la presencia de diésel. Al igual que con *gammaproteobacteria*, las 2 semanas de diferencia entre las muestras de suelo con diésel sin y con planta, fue suficiente para notar un mayor aumento en el número de copias con la presencia de la plántula. Al término de los 4 meses de espera, la cantidad de bacterias disminuyó en ambos tratamientos quedándose casi igual, sin embargo por arriba de la cantidad del suelo intacto.

El resultado más notorio en la investigación es la poca cantidad de *bacteroidetes* presentes en el suelo agrícola, siendo ésta hasta 100 veces menor a el máximo encontrado en *gammaproteobacteria*. Sin embargo, *bacteroidetes* fue el filo con el mayor crecimiento

de bacterias en proporción a los demás, habiendo aumentado más de 12 veces su cantidad, mientras que los demás grupos de 0,5 a 4 veces únicamente.

Comparando los filos en cada tratamiento, en todos los tratamientos en donde no hubo fitorremediación *firmicutes* tiene una mayor cantidad que *gammaproteobacteria*, después de la fitorremediación sucede lo contrario y *gammaproteobacteria* supera la cantidad de *firmicutes*.

Al intentar analizar los números de copias de los filos en relación al número de bacterias totales, no fue posible hacerlo ya que el número de copias sumado de los filos era cercano al total de bacterias totales, faltando los 29 filos que no se analizaron.

#### 4.4 Detección y cuantificación de TPH:

La remoción de TPH en las muestras de suelo tras la fitorremediación se muestran en la figura 4.5. Tomando en cuenta la cantidad de diésel presente en la muestra de suelo con diésel sin fitorremediación como un 100% de contaminante, la fitorremediación mostró una remoción del 42%

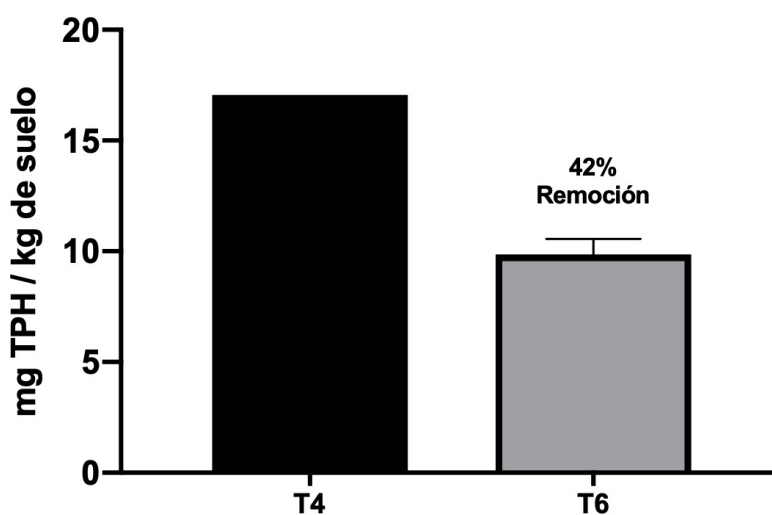
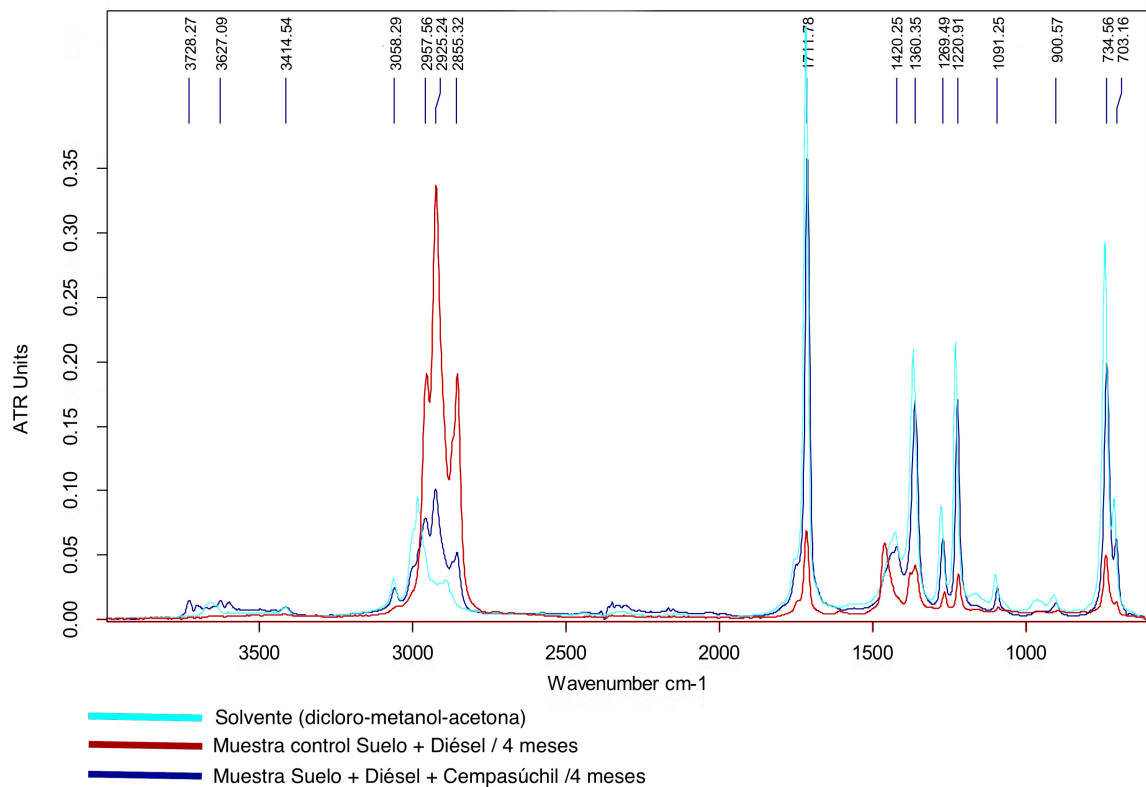


Figura 4.11 Concentración de TPH en mg/kg de suelo y porcentaje de remoción de TPH.

La figura 4.8 muestra el espectro IR de las muestras de suelo con fitorremediación, la muestra de suelo con diésel y el solvente utilizado. Los picos entre 2800 y 2900cm<sup>-1</sup> muestran el contenido de hidrocarburos. En evidente la disminución de la cantidad de hidrocarburo en la muestra después de la fitorremediación y en la muestra control de suelo + diésel sin planta. Además de observar la remoción del diésel en el suelo a través del método de sonicación, la reducción en TPH en la muestra de suelo se pudo observar en el espectro de IR. El área bajo la curva del suelo más la planta es notoriamente menor al del suelo contaminado sin diésel.



**Figura 4.12** Espectro IR de las muestras de tratamiento, control y solvente.

## Discusión.

Una degradación del 100% de hidrocarburos por bacterias ha podido ser demostrada en estudios realizados en agua, ya que las bacterias segregan agentes surfactantes que emulsifican los hidrocarburos y ayudan a incrementar la actividad respiratoria de los microorganismos (Rambeloarisoa *et al.*, 1984). La remoción de hidrocarburos en suelo sin embargo, es más complicada por la poca movilidad que tienen las bacterias en el medio en comparación con el agua, en donde además los surfactantes segregados pueden esparcirse y abarcar todo el volumen del medio, y no solo la superficie del suelo en donde estén adheridas las bacterias. La degradación del 100% de hidrocarburos en agua fue en cuestión de días (Rambeloarisoa *et al.*, 1984), mientras que el 42% de degradación de hidrocarburos en suelo en cuestión de meses. En el estudio de Rambeloarisoa y colaboradores, fueron detectados especies de los filos *firmicutes* y *gammaproteobacteria* en el consorcio de bacterias utilizado para la remoción de hidrocarburos, concordando con el crecimiento obtenido y mostrado en las figura 4.10 de los mismos filos. En otro estudio, se muestran de igual manera las capacidades de degradación de hidrocarburos de *firmicutes* y *gammaproteobacteria*, y se demuestra que la degradación de alcanos de 8 a 21 carbonos puede ser del 100%, la tasa de degradación baja conforme aumenta el número de carbonos en los hidrocarburos (Mukred *et al.*, 2008).

Por la poca cantidad de raíces presentes en la fitorremediación de nuestro estudio, se podría creer que la tasa de degradación de TPH y el crecimiento de bacterias no fue elevado, no obstante los resultados muestran lo contrario. Un experimento similar al presente realizado, mostró una degradación de diésel de un 35% en suelo sembrado con alfalfa después de 7 semanas (Kim *et al.*, 2006). En ese estudio se utilizó una concentración de diésel casi 10 veces menor, por lo que tuvieron mayor crecimiento de raíces y pudieron diferenciar crecimiento de bacterias y degradación de hidrocarburos en suelo no-rizosférico y rizósfera. No se puede hacer una comparación exacta con ese estudio porque en nuestro estudio, las muestras de suelo fueron únicamente de suelo no-rizosférico, ya que la cantidad de suelo adyacente a raíces no fue significativa. El suelo no-rizosférico de Kim y colaboradores no mostró crecimiento significativo de bacterias en suelo contaminado, mientras que el del presente estudio sí, la razón puede ser la cantidad de diésel utilizado, la cantidad utilizada por nosotros fue casi 10 veces mayor al otro estudio. Sin embargo los resultados son muy parecidos, y uno de los filos representativos que mostraron gran crecimiento en ambos estudios fue *gammaproteobacteria*. En un estudio donde se analizó la estructura del

microbioma en un suelo impactado a largo plazo con diésel mostró resultados similares a la abundancia encontrada en nuestro estudio, *firmicutes* y *gammaproteobacteria* tuvieron una abundancia alta en comparación con *bacteroidetes*. (Sutton et al., 2012). La abundancia relativa de aproximadamente 1% de *bacteroidetes* se muestra constante en diferentes tipos de suelos (Fierer et al., 2005), además de haber sido encontrado en las mismas proporciones en suelos contaminados y no contaminados (Sutton et al., 2012). En suelo arenoso de playa contaminado con hidrocarburos también se encontró que el filo dominante fue *gammaproteobacteria*, en menor cantidad *firmicutes*, y por último *bacteroidetes* en mínimas cantidades, pero presente en los filos degradadores de hidrocarburos (Kostka et al., 2011).

En nuestro estudio no se determinó si la planta de cempasúchil absorbió hidrocarburo por rizofiltración, sin embargo otros estudios han determinado que las plantas no son capaces de tomar el diésel dentro de su organismo, por lo que probablemente la fitorremediación de la planta fue a través de los exudados de las raíces, ayudando a la microbiota a crecer y poder metabolizar el hidrocarburo (Schwab y Banks, 1994; Reilley et al., 1996). Por otro lado, las características del suelo son un factor determinante para el éxito de una fitorremediación (pH, conductividad eléctrica, temperatura, porosidad, higroscopía, estructura, textura, entre otros), por lo que para tener éxito en la fitorremediación, el suelo debe de estar en óptimas condiciones (Mohammad, 2016). Sin embargo, teniendo en cuenta los volúmenes tan altos de suelos impactados en México y la diferente cantidad de suelos agrícolas, igualar y modificar los para estar en óptimas condiciones sería casi imposible, sin mencionar que modificando las características de suelo podría traer consecuencias en la eficacia de cultivos futuros; por esa razón se utilizó suelo real agrícola de la zona de Tecamachalco, haciendo así un experimento apegado lo más posible a la realidad.

A pesar del poco crecimiento de la planta en el suelo contaminado artificialmente, la remoción del 42% del hidrocarburo fue buena. Resultados de otros estudios realizados con ésta planta, muestran que la degradación del colorante azul 160 a través de las raíces del cempasúchil es del 90% (Patil y Jadhav, 2012). Por otro lado, se observó una biodegradación de benzo-a-pireno en suelo de un 79-92% y una acumulación de metales pesados en la planta (Sun *et al.*, 2010). No hay referencias al crecimiento de la planta o a los efectos negativos de los metabolitos sobre la planta por lo que no podemos comparar el crecimiento de nuestro estudio con los otros estudios realizados con Cempasúchil. Sin

embargo estudios de fitorremediación con linaza y sorgo también un menor crecimiento de las plantas en comparación con los controles sin contaminar (Shirdam et al., 2008).

Hasta el 2010 se sabía de 49 especies de *gammaproteobacteria* capaces de degradar hidrocarburos, 7 de *bacteroidetes*, y 14 de *firmicutes* (Prince et al., 2010). Para cada especie se documentó la capacidad de degradar un tipo específico de hidrocarburo, probablemente por ello *gammaproteobacteria* tuvo una mayor tasa de crecimiento en el presente estudio. Por otro lado, se tomó en cuenta el suelo sin tratamiento de fitorremediación como el control de remoción de hidrocarburos, sin embargo las figuras muestran un crecimiento de bacterias casi igual al los tratamiento de fitorremediación, por lo que seguramente el suelo por sí solo tiene capacidad de remoción de hidrocarburos, afirmando también que la fitorremediación con *Tagetes erecta* sí tuvo un efecto positivo en la degradación de diésel.

## Conclusiones

Las plantas sembradas con suelo con diésel mostraron poco crecimiento en comparación con las plantas control en un suelo sin contaminar, sin embargo el crecimiento de la planta a una concentración de 50,000ppm de diésel fue un resultado significativo, que comprueba la hipótesis de que el cempasúchil es capaz de crecer en suelo contaminados con hidrocarburos. Este estudio sirvió de manera exploratoria para detectar las capacidades de *Tagetes erecta* en la fitorremediación de suelos impactados con diésel, además de el efecto que esta genera sobre la microbiota del suelo agrícola, el cual mostró ser positivo para los filos analizados.

Los puntos a tomar en consideración para próximos estudios con ésta planta son: 1) sembrar más de una plántula por bolsa de suelo con diésel, de manera que las raíces abarquen una mayor área y se espere que haya una mayor fitorremediación; 2) analizar mediante secuenciación masiva los filos bacterianos con el fin de obtener un análisis completo y un mayor panorama sobre otros posibles filos degradadores de hidrocarburos potenciados por la planta; 3) adicionar la muestra de suelo del tratamiento de suelo con planta sin contaminar para el análisis de rtPCR; 4) medir la actividad enzimática; 5) utilizar cromatografía de gases para el análisis cuantitativo de TPH; y 6) determinar presencia de hidrocarburos en tallo y flor de la planta.

Existen pocos estudios acerca del cempasúchil y su capacidad de fitorremediación, y el presente estudio aporta más datos acerca de las capacidades de esta planta para

metabolizar hidrocarburos. El estudio de la remoción de hidrocarburos a través de la biorremediación lleva siendo estudiado por casi 4 décadas, y aún así no se ha podido crear un método universal y efectivo para descontaminar suelos impactados, es un tema sumamente complejo.

## Referencias bibliográficas.

Aprill, W., & Sims, R. C. (1990). Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil. *Chemosphere*, 20(1-2), 253-265. doi:10.1016/0045-6535(90)90100-8

Agarry, S., & Latinwo, G. K. (2015). Biodegradation of diesel oil in soil and its enhancement by application of bioventing and amendment with brewery waste effluents as biostimulation-bioaugmentation agents. *Journal of Ecological Engineering*, 16(2).

Ahmed, F., Fakhruddin, A. N. M., & Kabir, M. M. (2018). Degradation of diesel and phenol using bacteria isolated from petroleum hydrocarbon contaminated soil. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*, 53(1), 53-62.

Ayotamuno, J., Kogbara, R., & Egwuenum, P. (2006). A Comparison of Corn and Elephant Grass in the Phytoremediation of a Petroleum- Hydrocarbon Contaminated Agricultural Soil in Port Harcourt. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 4((3&4)), 218-222.

Bakshi M. Varma, A. (2011). Soil enzyme: the state-of-art. In: SHUKLA, G; VARMA, A. (eds). *Soil enzymology: soil biology*. 1<sup>a</sup>. edition Springer-Verlag: Berlin Heidelberg.

Berendsen, R. L., Pieterse, C. M., & Bakker, P. A. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, 17(8), 478-486. doi:10.1016/j.tplants.2012.04.001

Bosiacki, M. (2008) Accumulation of cadmium in selected species of ornamental plants. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus* 7, 21–31

Botello, A. V. (2005). *Golfo de Mexico, contaminacion e impacto ambiental: Diagnostico y tendencias*. Campeche: Universidad Autónoma de Campeche-EPOMEX.

Buddhadasa S. C., Barone, S., Bigger, S. W., & Orbell, J. D. (2001). Extraction of hydrocarbons from clay soils by sonication and soxhlet techniques. *Journal of the Japan Petroleum Institute*, 44(6), 378-383.

Bolotnik, T. A., Plyushchenko, I. V., Smolenkov, A. D., Pirogov, A. V., Popik, M. V., & Shpigun, O. A. (2018). Identification of Spillages of Semi-Volatile Hydrocarbon Fuels in Soils by Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry*, 73(6), 570-575.

BOTTINI, R.; FULCHIERI, M.; PEARCE, D.; PHARIS, R. (1989). *Identification of gibberelins A1, A3, and iso-A3 in cultures of Azospirillum lipoferum*. *Plant Physiology*, v. 90, p. 45-47.

Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., Themaat, E. V., & Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 64(1), 807-838. doi:10.1146/annurev-arplant-050312-120106

Burns, R. G., Deforest, J. L., Marxsen, J., Sinsabaugh, R. L., Stromberger, M. E., Wallenstein, M. D., Zoppini, A. (2013). Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions. *Soil Biology and Biochemistry*, 58, 216-234. doi:10.1016/j.soilbio.2012.11.009

Cardenas, E., Kranabetter, J. M., Hope, G., Maas, K. R., Hallam, S., and Mohn, W. W. (2015). Forest harvesting reduces the soil metagenomic potential for biomass decomposition. *ISME J.* 9, 1–12. doi: 10.1038/ismej.2015.57

CASSÁN, F.; SGROY, V.; PERRIG, D.; MASCIARELLI, O.; LUNA, V. Producción de fitohormonas por *Azospirillum* sp. aspectos fisiológicos y tecnológicos de la promoción del crecimiento vegetal. In: *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Cassán, F. D.; Garcia de Salomone, I. (eds). Asociación Argentina de Microbiología, Buenos Aires. p. 59-84, 2008.

Cavazos-Arroyo, J., Pérez-Armendáriz, B., & Mauricio-Gutiérrez, A. (2014). Afectaciones y consecuencias de los derrames de hidrocarburos en suelos agrícolas de Acatzingo, Puebla, México.

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.

Comisión Nacional de Hidrocarburos. (2013). Comisión Nacional de Hidrocarburos | Gobierno | gob.mx. Retrieved from <https://www.gob.mx/cnh>

Cuadra Anna Cuadras Andreu, Noelia Ramírez González, Enric Rovira Ricart, Rosa María Marcé Recasens, Francesc Borrull Ballarin. (2012). *Evaluación del riesgo asociado a la exposición de hidrocarburos aromáticos policíclicos en la salud de la población residente alrededor del complejo químico de Tarragona*. Revista de Saluods Ambiental.

Cuanalo, O. A., y Melgarejo G.P. (2002). Inestabilidad de laderas en la Sierra Norte y Nororiental del estado de Puebla. Elementos. Ciencia y Cultura. Vol. 9, No. 47, Septiembre- Noviembre 2002.

Chevron, 2007. *Diesel Fuels Technical Review* . Chevron.com. Obtenido de <https://www.chevron.com/-/media/chevron/operations/documents/diesel-fuel-tech-review.pdf>

Davison, J. (1988). Plant Beneficial Bacteria. *Nature Biotechnology*, 6(3), 282-286. doi:10.1038/nbt0388-282

*Djemiel C, Grec S and Hawkins S (2017) Characterization of Bacterial and Fungal Community Dynamics by High-Throughput Sequencing (HTS) Metabarcoding during Flax Dew-Retting. Front. Microbiol. 8:2052. doi: 10.3389/fmicb.2017.02052*

Dubey, S. K., Tripathi, A. K., & Upadhyay, S. N. (2006). Exploration of soil bacterial communities for their potential as bioresource. *Bioresource Technology*,97(17), 2217-2224. doi:10.1016/j.biortech.2005.06.008

Euzeby J. P. (1997). *List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a Folder Available on the Internet*. Laboratoire de Bactirilogie, Ecole Nationale Vitirinaire, F-31076 Toulouse cedex 3, France

Flores Puente, M. A., Torras Ortiz, S., & Teller Gutierrez, R. (2004). MEDIDAS DE MITIGACIÓN PARA USO DE SUELOS CONTAMINADOS POR DERRAMES DE HIDROCARBUROS EN INFRAESTRUCTURA DE TRANSPORTE TERRESTRE. *SECRETARÍA DE COMUNICACIONES Y TRANSPORTES INSTITUTO MEXICANO DEL TRANSPORTE*.

Ferro, A. M., Sims, R. C., & Bugbee, B. (1994). Hycrest Crested Wheatgrass Accelerates the Degradation of Pentachlorophenol in Soil. *Journal of Environment Quality*, 23(2), 272. doi:10.2134/jeq1994.00472425002300020008x

Ganem, A. Y. (Enero de 2010). Degradación de hidrocarburos en suelos contaminados mediante el proceso de electroquímica. Recuperado el 7 de Mayo de 2014, de <http://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/7243/51.pdf?sequence=1>

Gonzalez, A., King, A., Ii, M. S., Song, S., Shade, A., Metcalf, J. L., & Knight, R. (2012). Characterizing microbial communities through space and time. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(3), 431-436. doi:10.1016/j.copbio.2011.11.017

Gregoris, T. B., Aldred, N., Clare, A. S., & Burgess, J. G. (2011). Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. *Journal of Microbiological Methods*, 86(3), 351-356. doi:10.1016/j.mimet.2011.06.010

Guo, X., Xia, X., Tang, R., Zhou, J., Zhao, H., & Wang, K. (2008). Development of a real-time PCR method for Firmicutes and Bacteroidetes in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs. *Letters in Applied Microbiology*, 47(5), 367-373. doi:10.1111/j.1472-765x.2008.02408.x

Kim, J., Kang, S., Min, K., Cho, K., & Lee, I. (2006). Rhizosphere Microbial Activity During Phytoremediation of Diesel-Contaminated Soil. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 41(11), 2503-2516. doi:10.1080/10934520600927658

Glick, B. R. (2010). Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnology Advances*, 28(3), 367-374. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.02.001

Goswami, S., & Das, S. (2017). Screening of cadmium and copper phytoremediation ability of *Tagetes erecta*, using biochemical parameters and scanning electron microscopy-energy-dispersive X-ray microanalysis. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(9), 2533-2542. doi:10.1002/etc.3768

Infante, C. 1998. Biorremediación de derrames de hidrocarburos en ambientes naturales. Memorias del IV Congreso Interamericano sobre el Medio Ambiente. Caracas, Venezuela, Diciembre de 1997, colección simposio, volumen II. P 325-328. Compilador Roger Carrillo Castellanos. Editorial Equinoccio, Ediciones de la universidad Simón Bolívar, Caracas

JAMES, E. K.; BALDANI, J. I. The role of biological nitrogen fixation by non-legumes in the sustainable production of food and biofuels. *Plant and Soil*, v. 356, p. 1-3, 2012.

Kostka, J. E., Prakash, O., Overholt, W. A., Green, S. J., Freyer, G., Canion, A., . . . Huettel, M. (2011). Hydrocarbon-Degrading Bacteria and the Bacterial Community Response in Gulf of Mexico Beach Sands Impacted by the Deepwater Horizon Oil Spill. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(22), 7962-7974. doi:10.1128/aem.05402-11

Kujur, M., & Kumarpate, A. (2014). Kinetics of soil enzyme activities under different ecosystems: An index of soil quality. *Chilean journal of agricultural research*, 74(1), 96-104. doi:10.4067/s0718-58392014000100015

Lopez Lafuente, A. (2007). Biorremediación y fitorremediación en suelos contaminados.

Lukić, B., Panico, A., Huguenot, D., Fabbricino, M., Van Hullebusch, E. D., & Esposito, G. (2016). Evaluation of PAH removal efficiency in an artificial soil amended with different types of organic wastes. *Euro-Mediterranean Journal for Environmental Integration*, 1(1), 5.

Madigan, M. T., J. M. Martinko, y J. Parker. 1999. Brock: Biología de los Microorganismos. Prentice Hall. Octava Edición. 1064 p.

Malarkodi, M. et al. (2008) Phytoextraction of nickel contaminated soil using castor phytoextractor. *J. Plant Nutr.* 31, 219–229

Marcel G. A. Van Der Heijden, Bardgett, R. D., & Straalen, N. M. (2008). The unseen majority: Soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, 11(3), 296-310. doi:10.1111/j.1461-0248.2007.01139.x

Miranda, D., & Restrepo, R. (2005). Los Derrames De Petróleo En Ecosistemas Tropicales – Impactos, Consecuencias Y Prevención. La Experiencia De Colombia1. *International Oil Spill Conference Proceedings, 2005(1)*, 571-575. doi:10.7901/2169-3358-2005-1-571

Mohammad, A. H. (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

Morales J. G. 2008. *Determinar el análisis de riesgo toxicológico de los hidrocarburos aromáticos policíclicos a la salud humana de los trabajadores utilizando modelo Caltox*. Revista de Divulgación. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Vol 15, 27.

Mukred, A. M., Hamid, A. A., Hamzah, A., & Yusoff, W. M. (2008). Development of Three Bacteria Consortium for the Bioremediation of Crude Petroleum-oil in Contaminated Water. *OnLine Journal of Biological Sciences, 8(4)*, 73-79. doi:10.3844/ojbsci.2008.73.79

Patil, A. V., & Jadhav, J. P. (2013). Evaluation of phytoremediation potential of *Tagetes patula* L. for the degradation of textile dye Reactive Blue 160 and assessment of the toxicity of degraded metabolites by cytogenotoxicity. *Chemosphere, 92(2)*, 225-232. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.01.089

Posthuma, J. 1977. The composition of petroleum. *Rapp. P.V. Reun. Cons. It. Explor. Mer.*, 171: 7-16.

Saval Bohórquez, S. (2013). Recuperado el 2015, de <http://www.iingen.unam.mx/es-mx/BancoDeInformacion/MemoriasdeEventos/SolucionesContaminacionSuelo/SusanaSavalBohorquez>.

Sulaiman A Alrumman, Dominic B. Standing, Grease I. Paton, 2015. Effects of hydrocarbon contamination on soil microbial community and enzyme activity. *Journal of King Saud University – Science*

Schneider, T., Keiblinger, K. M., Schmid, E., Sterflinger-Gleixner, K., Ellersdorfer, G., Roschitzki, B., et al. (2012). Who is who in litter decomposition? Metaproteomics reveals

major microbial players and their biogeochemical functions. *ISME J.* 6, 1749–1762. doi: 10.1038/ismej.2012.11

PEMEX, (2017). *Anuario Estadístico 2017*.  
[http://www.pemex.com/ri/Publicaciones/Anuario%20Estadistico%20Archivos/anuario-estadistico\\_2017\\_es.pdf](http://www.pemex.com/ri/Publicaciones/Anuario%20Estadistico%20Archivos/anuario-estadistico_2017_es.pdf).

Perrig, D., Boiero, M. L., Masciarelli, O. A., Penna, C., Ruiz, O. A., Cassán, F. D., & Luna, M. V. (2007). Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(5), 1143-1150. doi:10.1007/s00253-007-0909-9

Prince, R. C., Gramain, A., & Mcgenity, T. J. (2010). Prokaryotic Hydrocarbon Degraders. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, 1669-1692. doi:10.1007/978-3-540-77587-4\_118

Raaijmakers, J. M., Paulitz, T. C., Steinberg, C., Alabouvette, C., & Moëgne-Loccoz, Y. (2008). The rhizosphere: A playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil*, 321(1-2), 341-361. doi:10.1007/s11104-008-9568-6

Rambeloarisoa, E., Rontani, J. F., Giusti, G., Duvnjak, Z., & Bertrand, J. C. (1984). Degradation of crude oil by a mixed population of bacteria isolated from sea-surface foams. *Marine Biology*, 83(1), 69-81. doi:10.1007/bf00393087

Reilley, K. A., Banks, M. K., & Schwab, A. P. (1996). Dissipation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Rhizosphere. *Journal of Environment Quality*, 25(2), 212. doi:10.2134/jeq1996.00472425002500020002x

Rodríguez, D. J., Angulo-Sánchez, J. L., & Hernández-Castillo, F. D. (2006). Chapter 14 An overview of the antimicrobial properties of Mexican medicinal plants. *Advances in Phytomedicine Naturally Occurring Bioactive Compounds*, 325-377. doi:10.1016/s1572-557x(06)03014-5

Rodriguez, H., Gonzalez, T., Goire, I., & Bashan, Y. (2004). Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. *Naturwissenschaften*, *91*(11), 552-555. doi:10.1007/s00114-004-0566-0

Shirdam, R., Zand, A. D., Bidhendi, G. N., & Mehrdadi, N. (2008). Phytoremediation of hydrocarbon-contaminated soils with emphasis on the effect of petroleum hydrocarbons on the growth of plant species. *Phytoprotection*, *89*(1), 21. doi:10.7202/000379ar

Schlöter, M., Dilly, O., & Munch, J. (2003). Indicators for evaluating soil quality. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *98*(1-3), 255-262. doi:10.1016/s0167-8809(03)00085-9

Schwab, A. P., & Banks, M. K. (1994). Biologically Mediated Dissipation of Polyaromatic Hydrocarbons in the Root Zone. *Bioremediation through Rhizosphere Technology ACS Symposium Series*, 132-141. doi:10.1021/bk-1994-0563.ch012

Silva, Í S., Santos, E. D., Menezes, C. R., Faria, A. F., Franciscon, E., Grossman, M., & Durrant, L. R. (2009). Bioremediation of a polyaromatic hydrocarbon contaminated soil by native soil microbiota and bioaugmentation with isolated microbial consortia. *Bioresource Technology*, *100*(20), 4669-4675. doi:10.1016/j.biortech.2009.03.079

Stark, C. H., Condon, L. M., O'Callaghan, M., Stewart, A., & Di, H. J. (2008). Differences in soil enzyme activities, microbial community structure and short-term nitrogen mineralisation resulting from farm management history and organic matter amendments. *Soil Biology and Biochemistry*, *40*(6), 1352-1363. doi:10.1016/j.soilbio.2007.09.025

Strzelczyk, E., Kampert, M., & Li, C. (1994). Cytokinin-like substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. *Microbiological Research*, *149*(1), 55-60. doi:10.1016/s0944-5013(11)80136-9

Sutton, N. B., Maphosa, F., Morillo, J. A., Al-Soud, W. A., Langenhoff, A. A., Grotenhuis, T., . . . Smidt, H. (2012). Impact of Long-Term Diesel Contamination on Soil Microbial Community Structure. *Applied and Environmental Microbiology*, *79*(2), 619-630. doi:10.1128/aem.02747-12

Sun, Y., Zhou, Q., Xu, Y., Wang, L., & Liang, X. (2011). Phytoremediation for co-contaminated soils of benzo[a]pyrene (B[a]P) and heavy metals using ornamental plant *Tagetes patula*. *Journal of Hazardous Materials*, 186(2-3), 2075-2082. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.12.116

Swift, M. J., Andren, O., Brussaard, L., Briones, M., Couteaux, M. -, Ekschmitt, K., . . . Smith, P. (1998). Global change, soil biodiversity, and nitrogen cycling in terrestrial ecosystems: Three case studies. *Global Change Biology*, 4(7), 729-743. doi:10.1046/j.1365-2486.1998.00207.x

Taylor, J., Wilson, B., Mills, M., & Burns, R. (2002). Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(3), 387-401. doi:10.1016/s0038-0717(01)00199-7

TIEN, T. M.; GASKENS, M. H.; HUBBELL, D. H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Applied and Environmental Microbiology*, v. 37, p.1016-1024, 1979.

Tirado A. L. G., González A. O. J., García G. R. S., Durán D. de B. C. (2004). *HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS: UNA AMENAZA POTENCIAL PARA LA SALUD*. UNAM, Facultad de Química.

Torsvik, V., & Øvreås, L. (2002). Microbial diversity and function in soil: From genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 5(3), 240-245. doi:10.1016/s1369-5274(02)00324-7

Uraguchi, S. et al. (2006) Characteristics of cadmium accumulation and tolerance in novel Cd-accumulating crops, *Avena strigosa* and *Crotalaria juncea*. *J. Exp. Bot.* 57, 2955–2965

Ventorino, V., Aliberti, A., Faraco, V., Robertiello, A., Giacobbe, S., Ercolini, D., et al. (2015). Exploring the microbiota dynamics related to vegetable biomasses degradation and study of lignocellulose-degrading bacteria for industrial biotechnological application. *Sci. Rep.* 5:8161. doi: 10.1038/srep08161

Voříšková, J., and Baldrian, P. (2013). Fungal community on decomposing leaf litter undergoes rapid successional changes. *ISME J.* 7, 477–486. doi: 10.1038/ismej.2012.116

Witter, A. E., & Nguyen, M. H. (2016). Determination of oxygen, nitrogen, and sulfur-containing polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in urban stream sediments. *Environmental Pollution*, 209, 186-196. doi:10.1016/j.envpol.2015.10.037

Yang, J., Kloepper, J. W., & Ryu, C. (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science*, 14(1), 1-4. doi:10.1016/j.tplants.2008.10.004

Yang, Y., Chen, M., Yang, B., Huang, X., Zhang, X., He, L., . . . Hua, Z. (2015). Use of 16S rRNA Gene-Targeted Group-Specific Primers for Real-Time PCR Analysis of Predominant Bacteria in Mouse Feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(19), 6749-6756. doi:10.1128/aem.01906-15

Yu, Y., Lee, C., Kim, J., & Hwang, S. (2005). Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnology and Bioengineering*, 89(6), 670-679. doi:10.1002/bit.20347