Benemérita
Universidad Autónoma de Puebla

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
COLEGIO DE INGENIERÍA AMBIENTAL

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE SUELOS "DR. JESÚS CABALLERO MELLADO "CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS-ICUAP

"Rizorremediación en suelo contaminado con petróleo crudo utilizando nopal verdura (*Opuntia spp.*)-*Azospirillum spp.*"

TESIS

Para obtener el grado de:

Licenciatura en Ingeniería Ambiental

Presenta:

Brenda Severiano Hernández

Directora de Tesis: c.M.C. Teresita Jiménez Salgado

Co-asesor: M.C. Refugio Armando Tapia Hernández

Puebla, Pue. Febrero 2022

Contenido

INTRODUCCIÓN 1

Planteamiento del Problema 3

Justificación 4

Objetivos 6

Objetivo General 6

Objetivos Específicos 6

Hipótesis 7

CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES 8

1. El suelo 8

1.1. Características del suelo 8

1.2. Degradación de los suelos 10

2. Normativa 11

3. Petróleo Crudo 12

3.1. Daños causados por derrames 14

4. Remediación 14

5. Biorremediación 15

6. Fitorremediación 17

7. Rizorremediación 18

8. Bacterias 19

8.1. Azospirillum spp. 21

9. Nopal 22

CAPÍTULO 2: METODOLOGÍA 25

Esquema de trabajo 1. 25

Esquema de trabajo 2 26

1. Suelo 27
2. Nopales (Cladodios de *Opuntia spp.*) 28
3. Cepas Bacterianas 29
Identificación de Cepas Bacterianas 29
Caracterización de *Azospirillum* 30
4. Diseño Experimental de Adaptación de *Opuntia spp.* en presencia de petróleo crudo. 31
5. Diseño Experimental de Rizorremediación 34
6. Evaluación de respuesta de Rizorremediación 34
7. Análisis Estadístico 36
CAPÍTULO 3: RESULTADOS y DISCUSIÓN 37
1. Identificación y caracterización de Cepas 37
Identificación Morfológicas 37
Actividad Reductora de Acetileno 40
Detección de la Actividad Biosurfactante 41
Bacterias Solubilizadoras de Fosfatos 42
2. Ensayo de Adaptación de *Opuntia spp.* 43
3. Ensayo de Rizorremediación 46
3.1 Análisis Fisicoquímicos en Suelo 46
Caracterización físico-química del suelo de los tratamientos de rizorremediación de 30 días 47
Caracterización físico-química del suelo de los tratamientos de rizorremediación de 60 días 49
Caracterización físico-química del suelo de los tratamientos de rizorremediación de 150 días 50
3.2 Evaluación de degradación de Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP) 53

3.3 Determinación de índice morfológico de calidad de plantas 56
Brotes 57
Tallo y raíz frescos 58
Peso seco de raíz 59
Tallos 60
Conclusiones 61
BIBLIOGRAFÍA 62
ANEXOS 76

Índice de Tablas:

Tabla 1: Límites máximos permisibles para fracciones de hidrocarburos en suelo NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012.

Tabla 2: Origen de las cepas de *Azospirillum* empleadas en los diseños experimentales.

Tabla 3: Diseño experimental aleatorio, Adaptación y Rizorremediación de HTP´s en suelo.

Tabla 4: Identificación y Morfología de las cepas colección de *Azospirillum spp.*

Tabla 5: Caracterización de las cepas colección de *Azospirillum spp*.

Tabla 6: Evaluación de adaptación de *Opuntia spp.* en presencia de petróleo crudo (12,146ppm) a los 90 días.

Tabla 7: Características fisicoquímicas Iniciales de suelo limpio y contaminado con crudo.

Tabla 8: Propiedades fisicoquímicas de suelo limpio y contaminado a 30 días del Proceso de Rizorremediación.

Tabla 9: Propiedades fisicoquímicas de suelo limpio y contaminado a 60 días del Proceso de Rizorremediación.

Tabla 10: Propiedades fisicoquímicas del suelo limpio y contaminado a 150 días del proceso de Rizorremediación.

Tabla 11: Evaluación de la Rizorremediación en la Degradación de Hidrocarburos Totales del petróleo (5,000ppm) a 30, 60 y 150 días.

Tabla 12: Desarrollo de brotes en los diferentes tiempos del proceso de rizorremediación.

Índice de Figuras

Figura 1 Clasificación de Hidrocarburos.

Figura 2 Principales estrategias implicadas en el proceso de fitorremediación de suelos.

Figura 3 Mapa del sitio donde se obtuvo el suelo limpio.

Figura 4 Bolsas con suelo contaminado.

Figura 5 Sanitización de Nopales con Caldo Bordelés

Figura 6 Cultivos ajustados para inoculación de plantas y turba

Figura 7 Inoculación de Nopales con caldo NFb.

Figura 8 Bioaumentación.

Figura 9 Diseño Experimental de Rizorremediación.

Figura 10 Crecimiento de cepas en medio RC.

Figura 11 Crecimiento de cepas en medio PDA.

Figura 12 Cromatografía de la Actividad Reductora de Acetileno de cepa BSH-7.

Figura 13 Actividad Hemolítica en medio Agar Sangre.

Figura 14 Emulsificación en medio Banat.

Figura 15 Bacterias solubilizadoras de fosfatos.

Figura 16 Adaptación de *Opuntia spp*. en suelo contaminado a 90 días.

Figura 17 Tratamientos sin crecimiento de raíz.

Figura 18 Espectro de cepa BSH-7 con concentraciones Iniciales, a 30, 60 y 150 días.

Figura 19 Observación de raíz y tallo de cada tratamiento.

.

Abreviaturas

ARA: Actividad Reductora de Acetileno.

AIA: Ácido Indol Acético.

API: American Petroleum Institute.

BPCV: Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal.

BTEX: Benceno, Tolueno, Etilbenceno y Xileno.

C: Carbono

CE: Conductividad Eléctrica.

CO_2: Dióxido de Carbono.

C_2Cl_4: Tetracloruro de Etileno.

HTP: Hidrocarburos Totales del Petróleo.

LMP: Límites Máximos Permisibles.

MAC: Metabolismo del Ácido Crasuláceo

MO: Materia Orgánica

mL: mililitros.

N_2: Nitrógeno

Na_2SO_4: Sulfato de Sodio.

P: Fósforo

PDA: Agar Papa Dextrosa.

ppm: Partes por millón.

PEMEX: Petróleos Mexicanos.

RC: Rojo Congo.

SEMARNAT: Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales.

SAGARPA: Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

TBP: True Boiling Point.

UFC: Unidades Formadoras de Colonias.

INTRODUCCIÓN

La degradación de los sistemas naturales causadas por las actividades humanas son uno de los principales problemas del cambio climático. Este problema se ha reflejado en las últimas décadas en todo el mundo provocando cambio en temperaturas extremas, elevación del nivel del mar, cambio en las precipitaciones, escases de agua, la deforestación de áreas naturales, entre otros. El ritmo que se sobreexplota estos recursos naturales está generando un enorme déficit, ya que cada año se consume más de lo que el planeta puede regenerar (Useros Fernández, 2013).

Las crecientes operaciones del crimen organizado en México, han llevado a la extracción y distribución de hidrocarburos como una de sus principales actividades en esta última década. Petróleos Mexicanos (PEMEX) reportó 7 estados con más de 1000 tomas clandestinas, siendo Puebla e Hidalgo los estados con más tomas. PEMEX cuenta con una cobertura de red de ductos con una longitud superior a los 17,000 kilómetros para su distribución en todo el territorio nacional, transportando principalmente crudos, gasolinas, y otros tipos de hidrocarburos pasando por regiones de suelos agrícolas en el estado, afectado principalmente el suelo y agua por los derrames de petróleo (PEMEX, 2018). Además del impacto económico que generan estas actividades ilegales, producen otros efectos adversos sociales y ambientales. (Llaven Anzures, 2016)

Los petróleos crudos tienen características físicas y químicas muy variables de un campo de producción a otro e incluso dentro de un mismo yacimiento, estos están constituidos por mezclas de cientos de compuestos principalmente por moléculas hidrocarbonadas, clasificándolos en pesados y ligeros (Wauquier, 2004).

Los principales componentes del petróleo son los hidrocarburos, estos están constituidos básicamente por combinaciones de Carbón e Hidrógeno en un 90% y pueden considerarse estructuralmente, como los esqueletos fundamentales de las moléculas orgánicas, mezclados en distintas proporciones junto con otros elementos químicos presentes en cantidades menores ya sea en su forma elemental o bien como constituyentes heterocíclicos y grupos funcionales (Primo Yúfera, 1994).

Un suelo contaminado es aquel que ha sufrido alteraciones negativas en sus características siendo un riesgo para la salud humana y el medio ambiente (Pinedo Alonso, 2014). Una de las principales consecuencias de la presencia de hidrocarburos en el suelo es que imposibilita el intercambio gaseoso con la atmósfera, iniciando una serie de procesos físico-químico simultáneos como evaporación y penetración que, dependiendo el tipo de hidrocarburo, temperatura, humedad, textura del suelo y cantidad vertida, puede ser más o menos lentos, lo que provoca una mayor toxicidad dificultando su recuperación (Benavides López de Mesa, *et al*, 2006).

En un suelo contaminado con hidrocarburos la relación Carbono/Nitrógeno/Fósforo (C:N:P) se ve afectada, por lo que la proporción de carbono incrementa respecto al nitrógeno y fósforo ocasionando un desequilibrio. Estos 3 elementos son primordiales para la elaboración de moléculas en el suelo, cuando existe una disminución en las concentraciones de nitrógeno y fósforo la fertilidad del suelo se ve perjudicada. En el caso del nitrógeno es un elemento fundamental en el metabolismo de los microorganismos con el fin de producir aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos (Acuña, *et al*, 2008). La asimilación de nitrógeno ocurre a través de la incorporación del ion amonio, teniendo la fijación biológica del nitrógeno como un proceso eficiente llevado a cabo por ciertas bacterias, haciendo la mayor parte del nitrógeno disponible para las células vivas (Werner, *et al*, 2005).

Existen diferentes técnicas de remediación, pero se ha considerado la biorremediación como una tecnología de las más prometedoras y menos costosas para la restauración de muchos sitios contaminados, usando plantas y microorganismos (Adams Schroeder, *et al*, 1999). Aunque las plantas tienen su propio mecanismo de defensa contra los hidrocarburos, se vuelven más tolerantes cuando se asocian con diferentes microorganismos que son capaces de biodegradar el contaminante.

Por otro lado, en las últimas décadas el interés por el cultivo de nopal se ha incrementado debido a sus múltiples usos como forraje, en la dieta humana y la producción de cochinilla, lo que ha generado reportes de sus propiedades nutrimentales y sus efectos positivos en ámbitos científicos (Inglese,*et al*, 2018).

Planteamiento del Problema

La Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) clasifica los sitios contaminados en dos tipos: pasivos ambientales y los sitios contaminados por emergencias ambientales. Los hidrocarburos fueron los principales responsables involucrados de los sitios contaminados por emergencias ambientales en el 2018, siendo los mayores generadores las actividades de explotación y transporte de hidrocarburo con un 72.7% del total registrado, el restante en tomas clandestinas y robo de combustible (SEMARNAT, 2018).

En los últimos cuatro años, el robo de combustible se ha agudizado en diferentes partes del país, sobresaliendo en 2018, los estados de Puebla (1815), Hidalgo (1726), Guanajuato (1547), Veracruz (1338) y Jalisco (1263) (PEMEX, 2018).

En el estado de Puebla, las tomas clandestinas aumentaron un 496% respecto al 2014, ocasionando daños ambientales, ecológico, económico, social y de salud para el suelo y seres vivos principalmente en zonas agrícolas. El mayor número de tomas clandestinas, se han reportado en el llamado triángulo rojo que se compone por los municipios San Martín Texmelucan, junto con Quecholac, Acatzingo y Acajete (Padilla, 2020).

Debido a la alteración de los ecosistemas por la presencia de compuestos xenóbioticos, investigadores de diferentes partes del mundo, incluyendo México, han buscado alternativas viables, limpias y de menor costo.

Justificación

El desarrollo de las comunidades implica el consumo de recursos naturales no renovables, siendo el suelo uno de los más afectados. En los últimos años ha aumentado el interés en evaluar la calidad y salud del recurso suelo, debido a que es un componente fundamental de la biósfera, del que se obtienen alimentos, insumos para la industria y recursos energéticos.

Es de conocimiento que el consumo de hidrocarburos es una necesidad para la población, además en la mayoría de actividades económicas se requieren derivados de los mismos. La producción de hidrocarburos y sus subproductos requiere la ocupación de grandes extensiones de suelo, así como también la instalación de redes para el transporte de los hidrocarburos (crudos o procesados).

La industria petrolera en México es una de las principales fuentes de contaminación del suelo, agua y aire, ésta inicia desde su proceso de extracción, producción y transporte de combustibles. Para el caso de México, los derrames de hidrocarburos, de manera voluntaria o involuntaria, tienden a contaminar las subcapas del suelo, afectando tanto el suelo como los mantos acuíferos, así como la alteración de la calidad del ambiente, salud y paisaje. El robo de combustible a PEMEX, también conocido como “huachicoleo”, contabilizó 12,581 tomas clandestinas durante 2018, un repunte de 43% anual, ocasionando pérdidas económicas de 147,000 millones de pesos en los últimos tres años a la petrolera (Solis, 2019).

Como alternativa de limpieza de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo, se ha acudido a la utilización de organismos biológicos que contribuyen a la oxidación, degradación, transformación y completa mineralización de estos contaminantes. El uso de procedimientos biológicos con plantas y microorganismos para limpiar suelo y agua contaminada (biorremediación) ha recibido especial atención, por ser de bajo costo y ambientalmente amigable. La alternativa de limpieza de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo se fundamenta en la utilización de plantas, lo que se conoce como fitorremediación. La rizorremediación ha sido considerada una técnica efectiva para la remoción y/o degradación de contaminantes orgánicos, especialmente aplicada en cultivos tolerantes mediante buenas técnicas de agricultura y el uso de microorganismos

promotores del crecimiento vegetal que a la vez son capaces de asimilar y/o cometabolizar los contaminatantes.

El género *Azospirillum* se caracteriza por realizar el proceso de fijación biológica de nitrógeno, aportando nitrógeno disponible. La disposición de nitrógeno no sólo se refleja en el incremento y rendimiento de cultivos, sino que ayuda a activar la microbiota del ambiente, equilibrar la relación C/N disminuyendo el contaminante. Existen reportes donde mencionan la capacidad de degradar algunos compuestos xenóbioticos como BTEX, crudo y diésel.

El nopal (Opuntia *spp.*) es considerado como un cultivo alternativo, ayuda a la prevención de la erosión en suelos y la desertificación, dada su tolerancia al estrés hidrico, térmico, y uso potencial a los cambios climáticos como el incremento de CO_2.

Por lo antes expuesto se consideró importante investigar la recuperación de suelos contaminados con petróleo crudo, mediante el proceso de rizorremediación empleando cladodios de nopal (*Opuntia spp.*) y la bacteria *Azospirillum spp.*

Objetivos

Objetivo General

Evaluar la rizorremediación empleando cladodios de nopal verdura (*Oputia spp.)* con bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Azospirillum spp.* en un suelo contaminado con petróleo crudo.

Objetivos Específicos

- Valorar la adaptación de *Opuntia spp.* en presencia del petróleo crudo por 90 días antes del ensayo de rizorremediación.
- Evaluar la respuesta de degradación del petróleo crudo 30, 60 y 150 días posterior al proceso de rizorremediación.
- Identificar y caracterizar las bacterias hidrocarbonoclastas y fijadoras de nitrógeno del género *Azospirillum spp*.
- Determinar las propiedades fisicoquímicas del suelo limpio y contaminado, tiempo 0, 30, 60 y 150 días posterior al proceso de rizorremediación.
- Evaluar la respuesta de rizorremediación en plantas de nopal a 30, 60 y 150 días posterior a la inoculación.

Hipótesis

- Mediante el proceso de Rizorremediación los cladodios del nopal verdura inoculados con *Azospirillum spp*, lograrán adaptarse a la presencia de petróleo crudo en suelo.

- La rizorremediación será efectiva en la descontaminación de suelo, empleando cladodios de nopal - *Azospirillum spp*, observando desarrollo y crecimiento de la planta, así como degradación del petróleo crudo.

CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES

1. El suelo

El suelo es un importante elemento en la tierra, una de sus definiciones dice “es un cuerpo natural polifacético, polidisperso y polidinámico que adquiere propiedades de acuerdo con las fuerzas físicas, químicas y biológicas que actúan sobre él”, por lo que se le considera como un recurso natural no renovable. Constituye una interface que permite intercambios entre la litosfera, la biosfera y la atmósfera (Porta Casanellas, *et al.*, 2014). Está constituido principalmente por material mineral, agua, aire, materia orgánica y por una variedad de microorganismos de diferentes tamaños y especies, pero con gran importancia para la realización de funciones específicas de ciclos biogeoquímicos como la oxidación del amoniaco a nitratos, mientras que en otros intervienen en procesos de descomposición de materiales orgánicos para mejor disposición de los nutrientes, haciendo un suelo fértil para la vegetación (Julca, *et al.*, 2006).

Este recurso natural desempeña una serie de funciones clave, tanto medioambientales como sociales y económicos que resultan fundamentales para la vida. Las actividades antropogénicas como la industria, la municipal y la agrícola, son las principales causantes de la degradación del suelo y perdida o reducción de sus funciones. El manejo inadecuado de este recurso trae como consecuencia la imposibilidad de hacer un uso óptimo del suelo (Silva Arroyave, *et al.*, 2009; Vargas Rojas, 2009).

1.1. Características del suelo

El estudio del suelo debe permitir interpretar cuál es el comportamiento esperable de cada suelo, cuál es su respuesta frente acciones externas principalmente las de origen antrópico, así como establecer cuáles han sido los procesos formadores que han actuado a lo largo de su desarrollo (Porta Casanellas, *et al.*, 2003). Las propiedades fisicoquímicas del suelo nos ayudan también a definir cuál estrategia de biorremediación es la mejor dependiendo de las características del suelo.

Las determinaciones que se establecen para la clasificación de los suelos se ven señaladas en la Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y su clasificación. Algunas de las principales determinaciones son:

- **pH**: Esta propiedad química nos indica el grado de acidez o alcalinidad de un suelo, este es un indicador de la disponibilidad de nutrientes, esto se debe a la presencia de los iones de H^+ y OH^- que son determinantes de la solubilidad de los nutrientes en el suelo o son indicadores de la escasez de las formas disponibles de algunos de ellos (Osorio, 2012).
- **Conductividad Eléctrica (CE)**: Mide la capacidad del suelo para conducir corriente eléctrica a través de las sales presentes, por lo tanto, la CE mide la concentración de sales solubles presentes en la solución del suelo. Esta propiedad está influenciada por una combinación de propiedades fisicoquímicas, como pueden ser la textura, el contenido de materia orgánica, humedad, entre otras. Este es un potencial estimador de la variabilidad espacial del contenido de arcilla y humedad del suelo (Simón, *et al*, 2013).
- **Textura**: Se define como la proporción relativa por tamaños de partículas de arena, limo y arcilla, que al combinarse generan las clases texturales. La importancia de la textura de los suelos, es que te permite conocer las diferentes estructuras que lo originan teniendo diferentes porosidades y su agregación, esto nos da lugar a posibles problemas de endurecimiento, aireación, capacidad de retención hídrica permeabilidad, etc. (Lacasta, *et al*, 2006).
- **Materia Orgánica**: algunos autores denominan como materia organica o humus a la parte orgánica del suelo de color pardo y negruzco, que resulta de la descomposición de materias orgánicas de origen vetegal. Esta tiene efecto sobre las propiedades físicas del suelo, formando agregados y dando estabilidad estructural, uniéndose a las arcillas favoreciendo la penetración del agua y su retención, disminuyendo la erosión y favoreciendo el intercambio gaseoso. La cantidad de materia orgánica en el suelo depende de muchos factores, tales como la incorporación de nuevos restos orgánicos al suelo y su velocidad de oxidación química y biológica; también facilita los mecanismos de absorción de sustancias peligrosas (Julca, *et al*, 2006).
- **Nitrógeno:** El nitrógeno del suelo proviene principalmente de dos distintos procesos de fijación, abiótica y biológica. Este proceso se define como la oxidación o reducción de nitrógeno para dar amonio (NH_4^+) u óxidos (NO_2^- y NO_3^-) y consiste

en la conversión del nitrógeno a compuestos absorbibles y metabolizables para ser incorporadas por los microorganismos (Calvo García, 2011). El suministro de nitrógeno en la atmósfera terrestre es de casi un 79% en forma de gas N_2, la mayor parte del nitrógeno presente en los suelos minerales se encuentra formando parte de la materia orgánica que en el suelo se deposita a la muerte de los microorganismos y de plantas.Todos los suelos contienen en pequeñas cantidad de nitrógeno enforma de compuestos simples como aminoácidos, sales amónicas y nitratos. Sin embargo, la mayoría de los organismos no pueden usar el N_2 por que hay un triple enlace entre los dos átomos de nitrógeno, lo que hace la que molécula sea casi inerte. Para que esta pueda ser aprovechada debe fijarse en forma de iones de amonio o nitrato (Deacon, 2021). El nitrógeno varia más en cantidad en el suelo que los otros elementos esenciales, para el desarrollo vegetal según las condiciones de drenaje, topografía y textura del suelo (Navarro, *et al*, 2003).

- **Fósforo:** Este elemento se obtiene de la descomposición de la roca madre durante el proceso de la meteorización y representa alrededor del 0.1% de la corteza terrestre, la cantidad de fósforo total del suelo en raras ocasiones sobrepasa el valor del 0.5% (1500ppm) y este puede clasificarse como inorgánico y orgánico. El fósforo inorgánico es casi siempre predominante, excepto en los suelos donde la materia orgánica se halla en una gran proporción (Navarro, *et al*, 2003). El fósforo es considerado como un elemento esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas, este se encuentra deficiente en formas asimilables. Un factor a tener en cuenta en la disponibilidad del fósforo para las plantas es que las raíces son capaces de modificar la concentración de iones en su entorno más próximo (Fernández, 2007).

1.2. Degradación de los suelos

La degradación de los sistemas naturales es originada por diversos factores directos e indirectos. Las actividades antropogénicas han sido las principales causas de la pérdida de nuestros recursos naturales finitos, esto hace que no sean recuperables en el lapso de una vida humana. En la última década la contaminación ambiental con petróleo crudo

es un fenómeno común en los países productores de petróleo que ha ido en aumento. Pueden ocurrir riesgos graves para la salud pública y el medio ambiente cuando el suelo está contaminado por hidrocarburos.

Los derrames de petróleo constituyen uno de los principales contaminantes en suelo, este tipo de contingencia ambiental originan efectos directos sobre la funcionalidad del ecosistema. Las propiedades químicas del suelo más afectadas por hidrocarburos son: Aumento de carbono orgánico, alteración del pH, aumento del manganeso y hierro intercambiable, alteración en fósforo y nitrógeno, entre otros (Ortínez, *et al*, 2003).

Simultáneamente a los efectos en las propiedades físicas y químicas del suelo, suceden cambios en las condiciones de fertilidad, donde se observaron incrementos en el contenido de materia orgánica debido al aumento de Carbón orgánico por parte del hidrocarburo (Martínez, *et al*, 2001). Este tipo de contingencia ambiental origina efectos directos sobre la biota, ya que el petróleo contiene compuestos tóxicos que producen daños directos sobre plantas, animales y humanos pero principalmente sobre las poblaciones de microorganismos que son utilizados como indicador biológico gracias a su sensiblididad a los cambios ante un contaminante (Zamora, *et al*, 2012).

2. Normativa

La Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente establece en su artículo 134 que los suelos contaminados por la presencia de materiales o residuos peligrosos, deberán llevarse a cabo las acciones necesarias para recuperar o establecer sus condiciones, de tal manera que puedan ser utilizados en cualquier tipo de actividad prevista para el programa de desarrollo urbano o de ordenamiento ecológico que resulte aplicable. Es a través de la SEMARNAT que se encarga de la protección y conservación del suelo en México, a través de su Programa Nacional de Remediación de Sitios Contaminados, donde se han publicado normas que regulan la gestión integral de suelos contaminados. La Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelo y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación., tiene como objetivo contar con una gestión integral para que se establezcan los instrumentos necesarios para la prevención, gestión, remediación y reutilización de sitios contaminados.

Esta norma menciona la fracción de hidrocarburos que se deben de analizar dependiendo del producto contaminante, estas van desde Fracción pesada a los denominados BTEX y Poliaromáticos (Tabla 1). De misma forma menciona los límites máximos permisibles que deben cumplir los diferentes tipos de uso de suelo y métodos analíticos a realizar.

Tabla 1 Límites máximos permisibles para fracciones de hidrocarburos en suelo NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012

FRACCIÓN DE HIDROCARBUROS	USO DE SUELO PREDOMINANTE (mg/kg BASE SECA)			MÉTODO ANALÍTICO
	Agrícola, forestal, pecuario y de conservación	Residencial y recreativo	Industrial y comercial	
Ligera	200	200	500	NMX-AA-105-SCFI-2008
Media	1 200	1 200	5 000	NMX-AA-145-SCFI-2008
Pesada	3 000	3 000	6 000	NMX-AA-134-SCFI-2006

3. Petróleo Crudo

El petróleo crudo tiene como características físicas un color negro, viscoso y con un olor característico. Es una mezcla compleja con varios componentes orgánicos, donde la mayoría son los hidrocarburos formados por cadenas de carbón e hidrógeno, y en cantidades menores contiene a otros elementos en forma de grupos funcionales y otros constituyentes como metales (hierro, níquel, cromo y vanadio, etc.) en concentraciones diferentes, estos pueden variar dependiendo del tipo de petróleo crudo y de la región de donde se formó. Así, 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 (V. Botello, *et al*, 2005).

Su importancia está relacionada con la movilidad debido a su alto peso molecular, haciendolos inmóviles y, por ende, de baja volatilidad y solubilidad (Ortínez, *et al*, 2003).

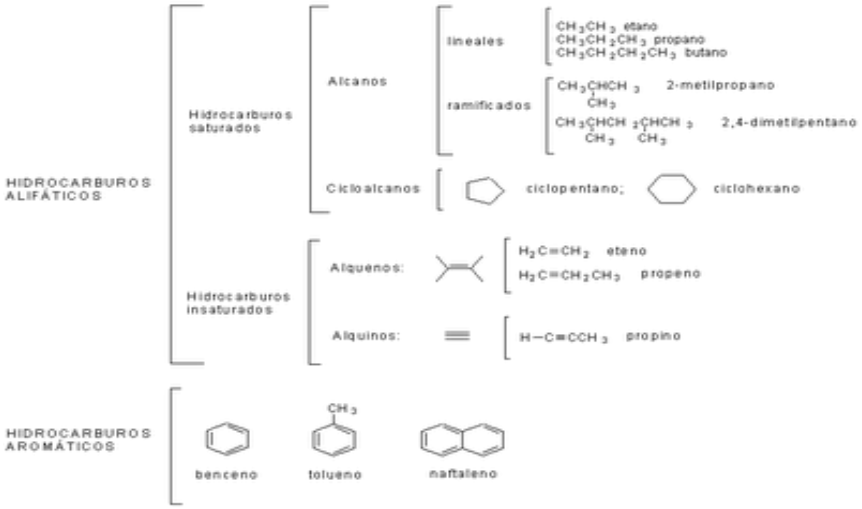


Figura 1 *Clasificación de Hidrocarburos*

Como consecuencia de su origen, condiciones de evolución y antigüedad, los crudos tienen diferentes composición en cuanto al tipo y cantidad de familias químicas hidrocarbonadas. La caracterización básica del crudo permite su diferenciación en términos de ligero o pesado según a sus propiedades, estas van desde la determinación de la densidad en grados API (American Petroleum Institute por sus siglas en inglés), rendimientos en destilación mediante su curva TBP (True Boiling Point por sus siglas en inglés) y el contenido de azufre, que nos permite su valoración de sus dificultades de procesamiento (LLuch Urpí, 2011).

El crudo debe transportarse desde el lugar de su producción hasta una refineria para su procesamiento, esto implica que su manipulación sea a través de bombeo por oleoductos u otros medios de transporte. PEMEX cuenta con más de 17,000 kilómetros de red de ductos en todo el territorio nacional, sus principales productos que trasporta por su sistema son:

- Gasolinas
- Diésel
- Gas Licuado de Petróleo
- Petróquímicos y
- Crudos, (PEMEX, 2018)

3.1. Daños causados por derrames

La amplia red de ductos que atraviesa México ha provocado que existan grandes áreas de suelos contaminados por hidrocarburos, debido principalmente a la falta de mantenimiento y el robo de combustible. El último reporte que se tiene por parte de PEMEX es en el 2018 donde menciona los principales estados con tomas clandestinas, siendo Hidalgo y Puebla con los números más altos.

Las emergencias ambientales provocados por el petróleo crudo y sus productos refinados pueden ocasionar consecuencias, en la mayor parte de los casos, se traducen en pérdidas humanas, grandes afectaciones al medio ambiente y/o cuantiosas pérdidas materiales, esto cuando no se toman las medidas necesarias de prevención y no se está preparado para responder rápida y efectivamente a esta clase de eventos. Cada vez que existe un derrame de hidrocarburos se provoca afectaciones al suelo, a los cultivos y al agua. Algunos terrenos han pasado por un proceso de biorremediación por empresas contratadas por PEMEX, sin embargo, otras áreas quedan inhabilitadas, abandonadas o fungiendo como basureros (Cavazos Arroyo, *et al*, 2014).

4. Remediación

Para estos suelos que están contaminados, existen diferentes tipos de remediación que les permite reducir el impacto que se ha causado en ellos, haciéndolos disponibles para su uso nuevamente. Los principales factores que inciden en la eficiencia de un proceso de remediación de contaminantes son: el tipo de contaminante, las características del suelo y la interacción que existe entre el contaminante y el medio (FCH, 2019).

Las tecnologías de remediación pueden clasificarse de diferentes maneras, con base en los siguientes principios:

1. Estrategia de remediación:

   Son 3 estrategias básicas que pueden usarse separadas o en conjunto.

   - Destrucción o modificación de los contaminantes: este tipo busca alterar la estructura del contaminante.
   - Extracción o separación de los contaminantes: este es extraído a aprovechando sus propiedades físicas o químicas (volatilización, solubilidad, carga eléctrica).

- Aislamiento o inmovilización del contaminante: estos son estabilizados, solidificados o contenidos con el uso de métodos físicos o químicos.

2. Lugar en que se realiza el proceso de remediación:
   - *In situ*: Son las aplicaciones en las que el suelo contaminado es tratado sin necesidad de excavar el sitio. Este tipo de técnica fomenta el uso de microorganismos autóctonos de la zona con el fin de que estos degraden los contaminantes. Este proceso requiere de mecanismos que estimulen la actividad de los microorganismos.
   - *Ex situ*: La aplicación de esta tecnología requiere de excavación, dragado o cualquier otro proceso de remover el suelo contaminado antes de su tratamiento en un sistema controlado.
3. Tipo de tratamiento:
   - Tratamientos fisicoquímicos: Utiliza las propiedades físicas y/o químicas de los contaminantes o del medio contaminado para destruir, separar o contener la contaminación.
   - Tratamientos térmicos: Utilizan calor para incrementar la volatilización, quemar, descomponer o fundir los contaminantes del suelo.
   - Tratamientos biológicos: Utilizan las actividades metabólicas de ciertos organismos (plantas, hongos, bacterias o algunas enzimas) para degradar, transformar o remover los contaminantes a productos metabólicos inocuos.

Es importante mencionar que cada una de estas clasificaciones pueden variar ampliamente, estas van a depender de diversos factores específicos del sitio y de las propiedades fisicoquímicas del contaminante, también de su disponibilidad, de la fiabilidad demostrada en pruebas y de sus costos (Volke Sepúlveda, *et al*, 2002).

5. Biorremediación

Walter (2008), define la biorremediación como una tecnología emergente que utiliza organismos como plantas, microorganismos o productos de los mismos como enzimas para la eliminación, atenuación o transformación de sustancias contaminantes a través de procesos biológicos. Las técnicas clásicas de biorremediación surgieron de forma

empírica, pero en estas últimas dos décadas fue que se reconoció que los microorganismos son capaces de degradar compuestos xenobióticos tóxicos.

La biorremediación puede ser divida en estrategias *in situ* y *ex situ*. Las técnicas *in situ* presentan mayor ventaja por el menor costo y la disminución de la generación de residuos en la superficie y utiliza microorganismos autóctonos aislados de sitios contaminados, estos pueden ayudar a la degradación ya que tienen la capacidad de tolerar la toxicidad de los contaminantes (Benavides López de Mesa*, et al*, 2006). Las tecnologías *In situ* buscan estimular y crear un ambiente favorable para el desarrollo de los microorganismos, así como para darle los nutrientes y las condiciones adecuadas para su desarrollo, como es el caso de las técnicas de atenuación natural, bioventeo, biolabranza, bioestimulación y bioaumentación.

En el caso de la bioestimulación esta implica la adición de nutrientes principalmente nitrógeno y fósforo, agua y/u oxígeno en el suelo contaminado para la estimulación de los microorganismos nativos capaces de biodegradar compuestos contaminantes. La bioaumentación describe la adición de organismos o enzimas en un material externos al suelo, con el propósito de degradar o eliminar sustancias indeseables (Volke Sepúlveda, *et al.,* 2002).

La capacidad de los microorganismos de degradar los compuestos orgánicos dependen de diversos factores. Las plantas o la microflora asociada a la planta, pueden convertir hidrocarburos (HC) en formas no tóxicas y son útiles para la biorremediación de suelos contaminados (Cunningham, *et al*, 1996). La biorremediación depende de las actividades catabólicas de los organismos, y por consiguiente de su capacidad para utilizar los contaminantes como fuente de alimento y energía. Este proceso incluye reacciones de óxido-reducción, procesos de sorción e intercambio iónico, e incluso reacciones de acomplejamiento y quelación (Volke Sepúlveda, *et al*, 2002).

La biorremediación no requiere sofisticadas técnicas de operación y sus subproductos son principalemente agua, CO_2 y biomasa que son inofensivos y resultan útiles para el crecimiento de las plantas (Chibuike, *et al*, 2013).

6. Fitorremediación

El interés de remediar la contaminación ambiental con técnicas amigables se ha incrementado rápidamente en estos años. Regvar (2010) señala que la fitorremediación se sustenta en el uso de vegetación para el tratamiento de suelos, sedimentos y agua contaminados. Esta técnica puede aplicarse tanto *In Situ* como *Ex Situ*, y está basado en la conservación de la estructura del suelo y es visualmente atractivo. Esta tecnología verde involucra “plantas tolerantes” equipadas con notables capacidades metabólicas y de absorción, así como sistemas de trasporte de elementos que pueden absorber nutrientes en una matriz contaminada para la eliminación, retención y/o degradación de los contaminantes (Paz-Alberto, *et al,* 2013). Esta técnica es el último paso para la limpieza de suelos contaminados, no perturba en gran medida el suelo o el paisaje, es de bajo costo y es de fácil aplicación, aunque presenta algunas desventajas como que es un proceso lento, está limitado a suelos pocos profundos, concentraciones altas de contaminantes pueden ser nocivas para las plantas y require una buena gestión de biomasa para impedir que los contaminantes entren en la cadena trófica (Ortiz Bernad, *et al*, 2007)

La eficacia de la fitorremediación es el identificar especies de plantas adecuadas a las condiciones locales que sean tolerantes a los contamiantes y su capacidad para promover la descontaminación. Las plantas utilizadas para la biorremediación debe tener ciertos rasgos característicos:

a) Rápido crecimiento.
b) Tolerancia a contaminantes orgánicos e inorgánicos.
c) Resistente a enfermedades, plagas, etc.
d) Sistema de raíces y brotes densos.
e) Poco atractiva para los animales, de modo que la trasferencia de contaminantes a los niveles tróficos superiores de la cadena alimentaria terrestre sea mínima.
f) Fácil de cultivar y cosechar (Kumar Rai, 2018).

Chaudhry, *et al* (2005) mencionan los principales mecanismos que constituyen la fitorremediación, dónde se cree que ocurre a través de uno o más para la degradación

de los contaminantes: Fitoestabilización, Fitoextracción, Fitoacumulación, Fitotransformación, Fitotranspiración y Rizoremediación.

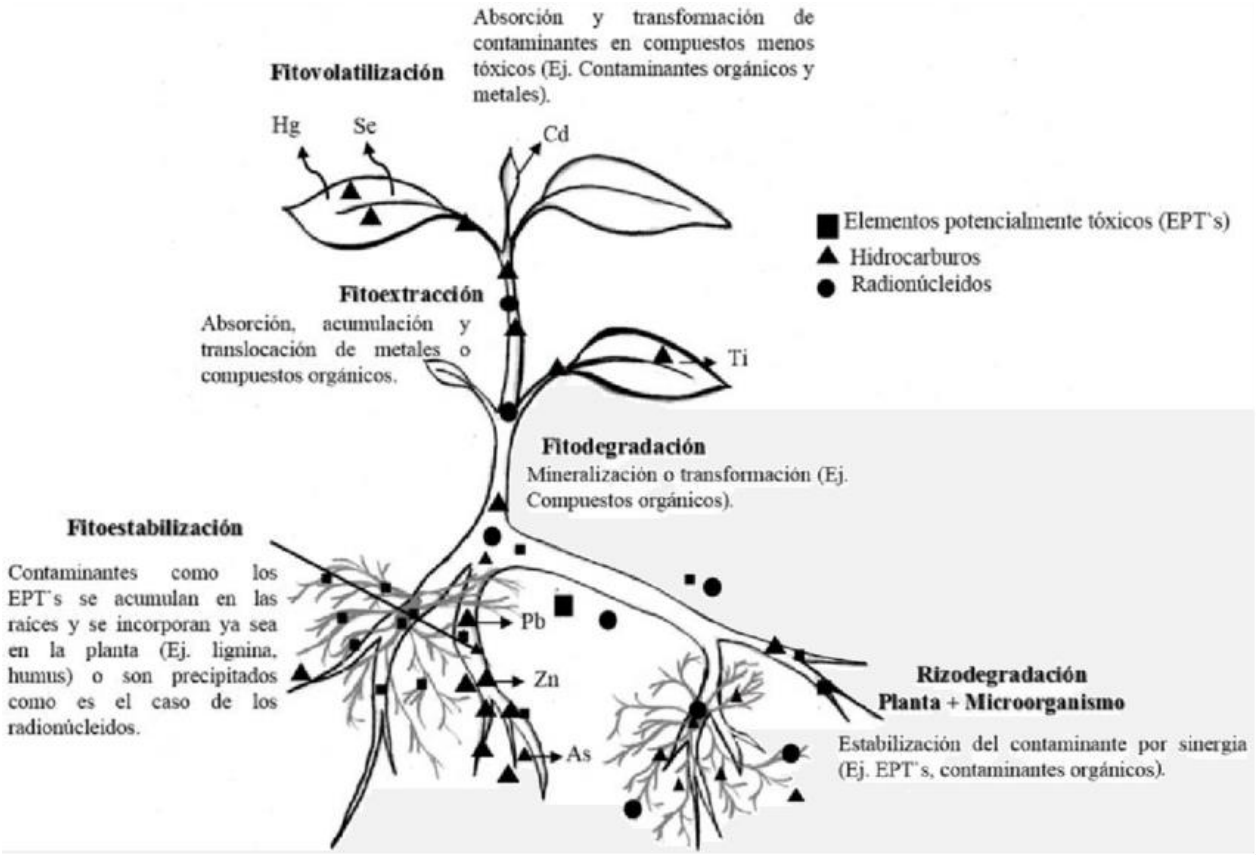


Figura 2 *Principales estrategias implicadas en el proceso de fitorremediación de suelos.*

Fuente: (Peralta Pérez, et al, 2012)

La importancia del uso de las plantas para la fitorremediación no solo va en función de eliminación de los contaminantes, si no que se buscan cultivos que se puedan adaptar a condiciones extremas tanto temperatura, humedad, entre otros factores, así también que contribuyan a la problemática ambiental que se está viviendo en esta época.

7. Rizorremediación

La rizorremediación se define como la utilización de la relación simbiótica entre plantas y microorganismos del suelo asociados en la zona de las raíces. La eficiencia general se puede mejorar con la combinación adecuada de plantas y microbios para contaminantes específicos y apoyando el proceso con la aplicación de enmiendas de suelo apropiadas (Hoang, *et al.*, 2020). Se enfoca principalmente en estimular a la población de microrganismos degradantes a través de los efectos rizosféricos de la planta. Ciertos

tipos de exudados de la plantas como los carbohidratos, los ácidos carboxílicos y los aminoácidos, ayudan a la estimulación de poblaciones microbianas, mejorando el proceso de biodegradación de algunos contaminantes orgánicos. Sin embargo, algunos contaminantes orgánicos son persistentes y estos requieren sustratos específicos inducidos por enzimas para su eliminación (Dzantor, 2007). Para eso se requieren la presencia de microorganismos o consorcios competentes que produzcan enzimas como lacasas y peroxidasas y/o sustratos para la biodegradación de la mayoría de estos compuestos (Chi-Yuan, *et al.,* 2012).

El aumento de los microorganismos en la rizosfera trae muchos beneficios, ya que estos son considerados los principales contribuyentes al proceso de degradación de los contamiantes. La aplicación de la rizorremediación tiene algunos limitantes ambientales, como la competencia de especies de malezas que están mejor adaptadas al sitio, el crecimiento limitado de las plantas en sitios muy contaminados, la presencia de patógenos vegetales y otros factores de estrés bióticos y abióticos (Chandra, *et al*, 2018).

Germida, *et al* en 2002, señalan que las plantas juegan un papel importante para la rizodegradación de los hidrocarburos, que estas son las escargadas de suministrar los exudados de la raíz y los nutrientes que aumentan la actividad y tamaño de las comunidades microbianas en la rizosfera. La interacción entre la planta y los microorganismos es de suma importancia ya que estos generan una simbiosis que proporcionan nutrientes, estimulan el crecimiento, ejercen efectos antiestrés, mejora la fertilidad del suelo y restauran la biodiversidad y las funciones del ecosistema (Safronova, *et al*, 2011). Se ha determinado que la rizorremediación por pastos, árboles y otras especies anuales ayuda en la disminución de Hidrocarburos (Hussain, *et al*, 2017).

8. Bacterias

Las bacterias son organismos procariontes que representan el grupo de microorganismos con mayor diversidad y con mejor adaptabilidad a ambientes vivos. Entre los géneros bacterianos más estudiado por su eficiencia en la degradación de hidrocarburos y por ser bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) son: *Pseudomonas, Acinetobacter, Agrobacterium, Flavobacterium, Arthorobacter, Aeromonas, Corynebacterium, Bacillus y Azospirillum*. Los géneros *Pseudomonas, Agrobacterium, Bacilus y Azospirillum spp.* se

caracterizan por tener la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (Hernández A., *et al.*, 2003 y Galazka, *et al.,*2012). Estas bacterias tienen la función de tomar el nitrógeno atmosférico para originar compuestos solubles por las plantas, como el nitrato o amonio (Calvo García, 2011). *Azospirillum*, es considerada como una BPCV que tiene otros beneficios a las plantas inoculadas observando desde aumento de peso seco total, altura de plantas, tamaño de la hojas, índice de área foliar, tasa de germinación y efectos sobre el sistema radical de las plantas (Parra, *et al.*, 2002; Bashan ,*et al*., 2004; Bashan, *et al.,* 2015).

Las BPCV son capaces de ejercer un efecto benefico sobre el desarrollo vegetal sano y para una producción agrícola sustentable. Estas bacterias al colonizar las raíces de las plantas emplean las sustancias de desecho que se liberan durante el crecimiento del sistema radical, para transformarlos en sustancias promotoras del crecimiento (Sánchez Yáñez, 2006). De misma forma estas bacterias son las encargadas de fijar el N_2 y solubilizar el P jugando un papel importante en la biofertilización de cultivos (Cakmakci, *et al*, 2006).

Las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre además de aportar éste elemento al ecosistema contribuyen en otros procesos como la movilización de nutrientes, producción de fitohormonas dentro de la que se destaca el ácido indol-3- acético (AIA), producción de sideroforos y en la prevención o disminución del efecto de uno o más organismos fitopatógenos por su producción de algunos antibióticos y quitinasas (Ibarra Sánchez, 2010).

Las bacterias solubilizadoras de fosfatos juegan un papel importante en la rizósfera, ya que estas bacterias tienen la capacidad de convertir el fósforo insoluble en una forma disponible para las plantas (Wang, *et al*, 2017). Estos microorganismos están involucrados en una variedad de procesos que afectan la transormación del fósforo del suelo, siendo un componente integral del ciclo de fósforo al suelo. Varios mecanismos como la reducción del pH del suelo por la producción de ácido, la quelación de iones y las reacciones de intercambio en el entorno de crecimiento, desempeñan un papel en la solubilización de fosfato (Ranjan, *et al*, 2013).

Por otra parte las bacterias productoras de biosurfactantes, ayudan a los procesos de emulsificación de potenciales nutrientes hidrofóbicos, lubricación para movilidad sobre superficies semisólidas, modificación de las condiciones ambientales, entre otros. Generalmente se componen de una parte hidrofílica, que consta de aniones o cationes de aminoácidos o péptidos y otra parte hidrófoba constituida por ácidos grasos saturados (Franzetti, *et al.*, 2010). Las ventajas de los biosurfactantes bacterianos es que son fáciles de producir, menos tóxicos y estables en el rango de temperatura y pH de los ambientes naturales (Barrionuevo, 2017). La mayoría de los métodos para el análisis general de las cepas productoras de biosurfactantes se basan en los efectos físicos de los tensoactivos. Existen métodos preliminares cualitativos y cuantitativos entre los cuales encontramos la prueba de hemólisis, el método de colapso de gota, evaluación de la capacidad emulsificante y medición de la tensión superficial (Durán Jaramillo, 2019).

La identificación de cepas bacterianas tales como fijadoras de nitrógeno, solubilizadoras de fosfatos, productoras de biosurfactantes y degradadoras de hidrocarburos, tienen aplicaciones potenciales para diversos fines biotecnológicos tales como producción sostenible de cultivos, biorremediación de suelos y aguas contaminadas, Desde su descrubrimiento se ha empleado en la agricultura, por el beneficio en el desarrollo e incremento en la producción de diferentes cultivos de importancia agronómica y ecológica, considerandose un modelo de estudio por sus diferentes aplicaciones tecnológicas (Jiménez Salgado, *et al.*, 2018) o para mejorar la reforestación (Curiel Ruiz, *et al.*, 2018;). Por ello, se estudian el alcance de las bacterias y plantas, para que en conjunto puedan potencializar sus aplicaciones, obteniendo mejores resultados y disminuyendo los tiempos en la biorremediación.

8.1. Azospirillum spp.

El genero *Azospirillum* pertenece a la subclase alfa de las proteobacterias, son gramnegativas heterotróficas e incluye una especie anteriormente denominada *Spirillum lipoferum.* Esta bacteria es uno de los géneros más estudiados, actualmente incluyen 20 especies fijadoras de N_2 y una no fijadora de N_2. Las dos primeras especies aisladas fueron *A. lipoferum* (antiguo grupo II) y *A. brasilense* (antiguo grupo I) (Massena Reis, *et al*, 2015). El aislamiento de este género se ha realizado en medio semisólido excento de

nitrógeno NFb, esta condición semisólida es importante para producir el entorno microaerófilo que permite al organismo sintetizar el complejo nitrogenasa e iniciar la fijación de N_2 con la actividad reductora de acetileno (Caballero Mellado, 2001). Para diferenciar estas colonias de otros géneros de bacterias se pueden emplear medios selectivos como el PDA donde se característica por su crecimieto con un aspecto seco, arrugado y con tonalidades rosas (Döbereiner, *et al.*, 1987) y el medio Rojo Congo donde su crecimiento es de color escarlata y forma irregular.

Azospirillum es una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal de vida libre, capaz de mejorar el crecimiento y rendimiento de numerosas especies de plantas, muchas de estas de importancia agronómica y ecológica (Bashan, *et al.*, 2004), se ha visto que es una bacteria eficiente para resolver problemas ambientales. Los beneficios de la inoculación con *Azospirillum spp*., ha mostrado efectos favorables sobre el crecimiento de plantas y rendimiento de muchos cultivos además de cambios notables en la morfología y fisiología en las raíces incrementando el número y densidad de pelos radiculares en un tiempo menor (López Rosales, 2011).

Adicionalmente, existen reportes sobre el aislamiento de cepas de *Azospirillium* en suelos contaminados con hidrocarburos, así como su capacidad de degradar petróleo crudo (Cruz-Hernández et al 2019). Desde su descrubrimiento se ha empleado en la agricultura, por el beneficio en el desarrollo e incremento en la producción de diferentes cultivos de importancia agronómica y ecológica, considerandose un modelo de estudio por sus diferentes aplicaciones biotecnológicas (Jiménez Salgado, *et al*, 2018).

9. Nopal

La familia *Cactaceae* incluye aproximadamente 130 géneros y 2,000 especies. *Opuntia* y *Nopalea* son los géneros más importantes debido a sus múltiples aplicaciones. La tuna (*Opuntia ficus indica*) es originaria de México y las regiones semiáridas de América del Sur y Central. Este cactus ramificado es un cultivo domesticado desde hace mucho tiempo de gran importancia en la economía agrícola de las zonas áridas y semiáridas del mundo. Se distribuye ampliamente en Europa, suroeste de Estados Unidos, norte de México, gran parte de América Latina, Sudáfrica y el Mediterráneo (Utkarsha U.,*et al.*, 2010).

Los cactus son las plantas más notables y características de regiones cálidas y áridas, son importantes por su diversidad de formas de crecimiento y su capacidad no solo para crecer, sino para prosperar en entornos reconocidos como estresantes para la mayoría de las especies de plantas. México es el principal productor de Nopal verdura (74%) en todo el mundo, este vegetal es capaz de adaptarse a ambientes extremos por su alta homeóstasis que no es común en otras plantas desérticas (Ruiz Espinoza, *et al.*, 2008). La mayoría de las cactáseas son utilizadas como alimentos principalmente, pero el nopal también es usado para fijar el suelo y prevenir la erosión por lluvias intensas (Prieto García, *et al.*, 2006) y actuar como una cerca viva efectiva para la recuperación de suelos. Se pueden cultivar fácilmente con el mínimo de insumos agrícolas, tienen un gran potencial para el cultivo y la agricultura en suelos degradados y remediación de suelos (Utkarsha U.,*et al.*, 2010).

El uso agroindustrial de *Opuntia* ha ido en aumento en muchos países tanto en la producción de frutas, nopalitos, producción de cochinilla y forrajes. El uso de biomateriales como el nopal, se ha incrementado en los últimos años para la remediación de sitios contaminados como aguas residuales, metales pesados y/o pesticidas, demostrando eficiencia en la eliminación de estos contaminantes (Nharingo, *et al.*, 2019). Uno de los beneficios agronómicos y ecológicos de esta cactacea es la amplia captura de carbón, teniendo grandes valores de asimilación de CO_2 tanto en condiciones de humedad como largos periodos de sequía, beneficiando ampliamente el aspecto del calentamiento global (Pérez Doroteo, 2019; Vázquez Alvarado, *et al.*, 2011).

Los nopales tienen un potencial de aprovechamiento gracias a sus características morfológicas y fisiológicas, que les permiten almacenar y conservar el agua en sus tejidos que les ayuda a sobrevivir a la escasez y a las marcadas variaciones de temperatura (Cervantes Ramírez, 2005), por lo que son una alternativa de cultivo para regiones donde difícilmente crecen otras especies.

Las características de los nopales que las hacen adaptables al medio árido tienen relación con la confomación de varios de sus órganos. Sus raíces superficiales y extendidas captan el agua de las escasas lluvias. Estas inducen la formación de raíces secundarias que aumentan la superficie de contacto en el suelo lo cual facilita la absorción de agua y

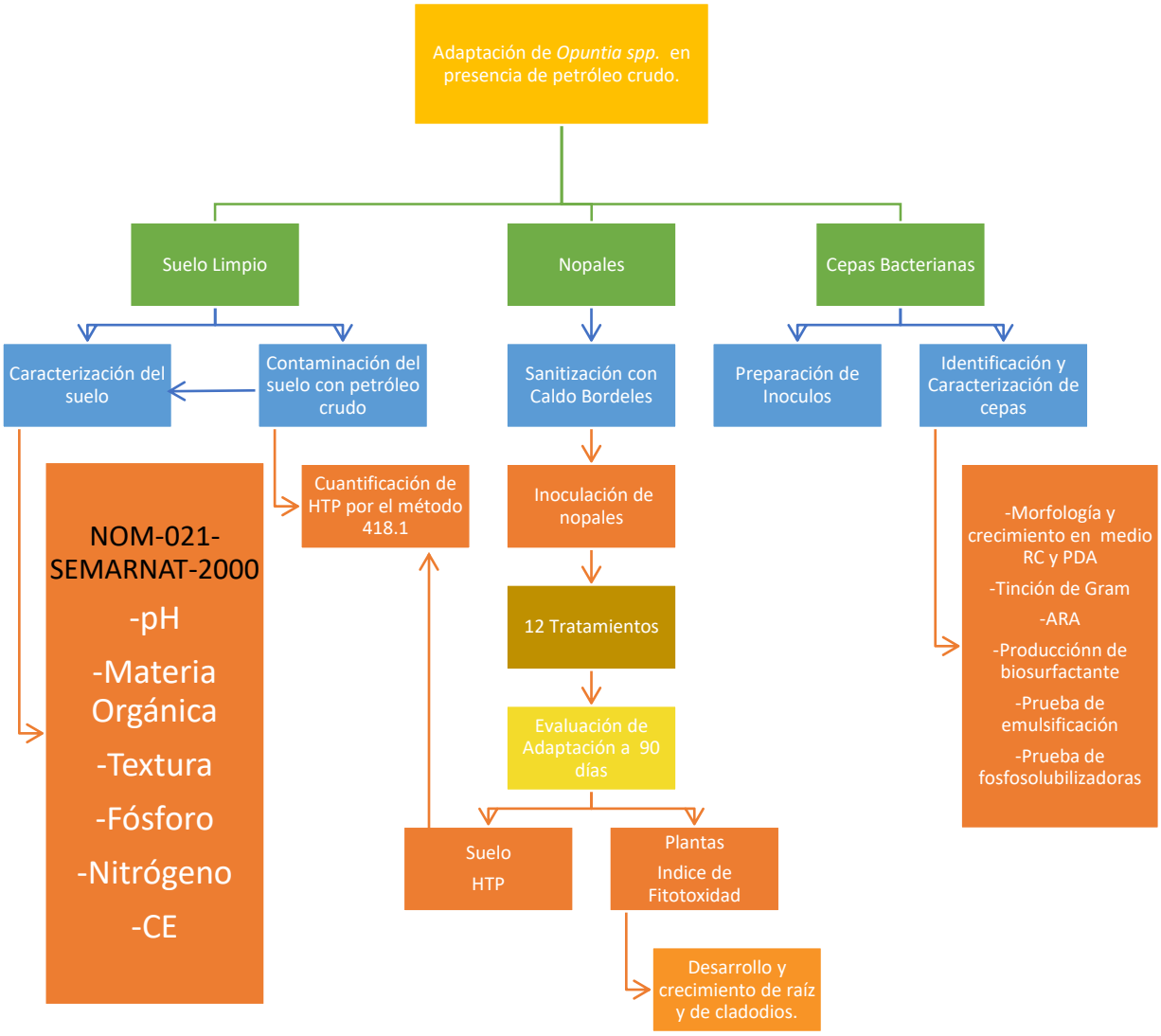
nutrientes. Cuando se inicia la sequía, las raíces comienzan a contraerse de manera radial contribuyendo a disminuir la pérdida de agua. Por otra parte, los tallos son suculentos y artículados llamados cladodios, en ellos se realiza la fotosíntesis, ya que los tallos modificados reemplazan a las hojas en esta función, estos se encuentran protegidos por una cutícula gruesa, que en ocasiones está cubierta de cera o pelos y poseen abundante perénquima que disminuyen la pérdida de agua lo que permite soportar largos periodos de sequía. Los cladodios poseen además espinas y presentan pocos estomas por unidad de superficie con la particularidad de permanecer cerrados dutante el día y abiertos en la noche (Sáenz, 2006).

El nopal es una planta con metabolismo tipo MAC (Metabolismo del Ácido Crasuláceo), esto es atribuido principalmente a su peculiar patrón diario de fijación de carbono y pérdida de agua, las cuales ocurren principalmente en la noche. Esto es a través de sus estomas que se abren en la noche para fijar el CO_2, acumular y almacenar malato en las vacuolas. La transpiración de las plantas MAC es de tres a cinco veces menos que las de una planta C_3 y una C_4, haciendo eficiente a esta planta en el uso del agua y en la habilidad de sobrevivir en ambientes semiáridos caracterizados por los largos periodos de sequia y altas temperaturas (Inglese, *et al.*, 2018).

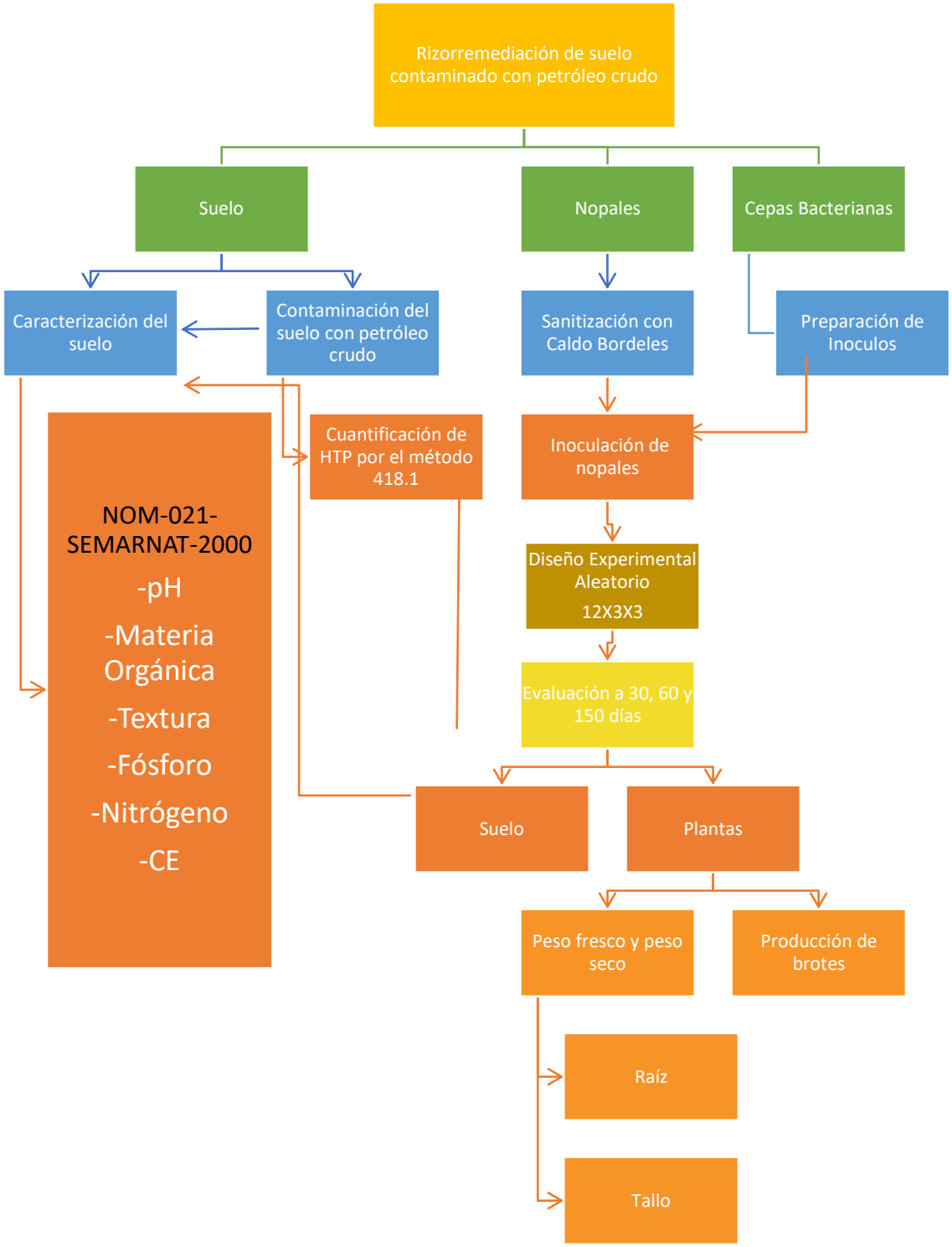
A pesar de ser una planta que no requiere muchas condiciones para su cultivo, se requiere de gran atención en el control de enfermedades y parásitos. Entre los principales agentes causantes de las enfermedades del nopal verdura es por la presencia de hongos, virus, levaduras, nematodos, micoplasmas e incluso algunos organismos hasta ahora no identificados. Su forma de diseminación y transmisión puede ser muy variada, ya que esta puede ser causada por aves, insectos, mamíferos y el mismo hombre en el manejo de herramientas, causándoles heridas al nopal o bien mediante la acción del viento, lluvia e incluso el riego (Robles Contreras, *et al.*, 2008). Aunque son muchas las enfermedades que afectan al nopal, una recomendación general para nuevas plantaciones es el tratamiento con agentes químicos como el caldo bordelés, el cuál actua como un protector de contacto preventivo, es decir, como barrera que impide que hongos penetren los tejidos de la planta evitando el desarrollo de patógenos (Pérez Doroteo, 2019).

CAPÍTULO 2: METODOLOGÍA

Esquema de trabajo 1.



Esquema de trabajo 2



1. Suelo

El muestreo del suelo se realizó en el municipio de Atlixco con coordenadas 18º55’55.5” N, 98º22’54.2” W. (Figura 3), se trasladaron aproximadamente 165 kilos de suelo al Laboratorio de Microbiología de Suelo del ICUAP.

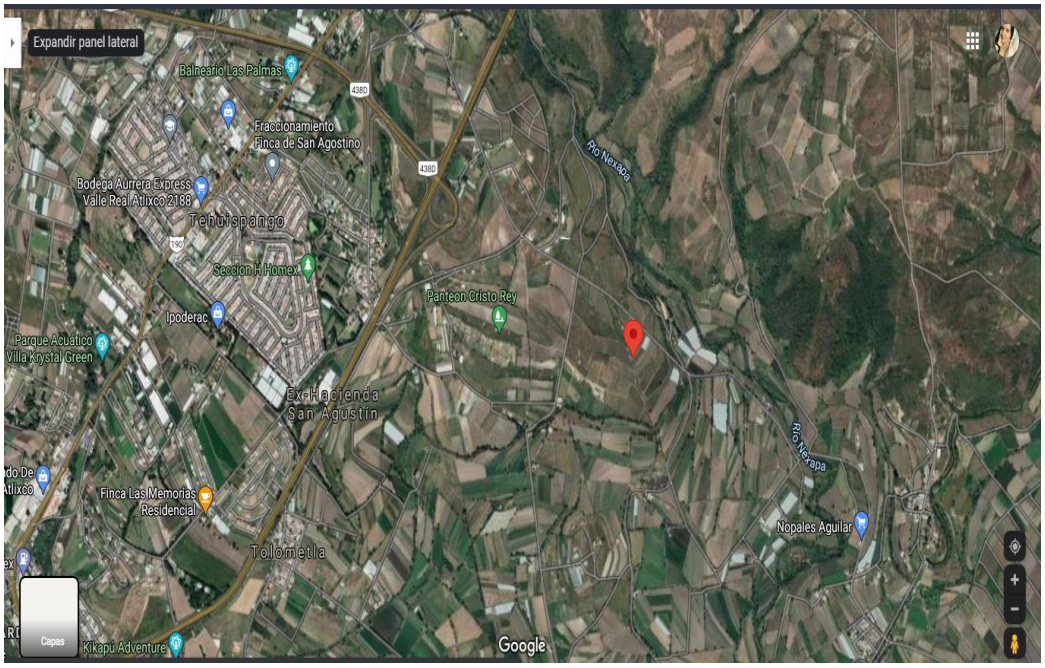


Figura 3 *Mapa del sitio donde se obtuvo el suelo limpio.*

Fuente: Google Maps

El suelo se caracterizó, analizando los principales parámetros fisicoquímicos para determinar su estado inicial antes de su contaminación.

Para realizar el ensayo de adaptación de *Opuntia spp.*, el suelo fue contaminado con petróleo crudo (proporcionado por personal de PEMEX de un derrame en el municipio de Amozoc) para esto, el crudo fue disuelto en etanol en cantidad necesaria para alcanzar una concentración de alrededor de 12000 ppm de HTP, se homogenizó y se guardó en bolsas de plástico a temperatura ambiente por cinco días (Figura 4). Éste primer ensayo se realizó por 90 días, después de este tiempo se separaron los suelos por tratamientos para evitar contaminación entre cepas.

Para el ensayo de rizorremediación, se emplearon los suelos donde se realizó el ensayo de adaptación, los cuales fueron llevados a la concentración inicial de 5000 ppm de HTP.

Figura 4 *Bolsas con suelo contaminado*

Fuente: Propia.

2. Nopales (Cladodios de *Opuntia spp.*)

Los cladodios se obtuvieron de la misma localidad que el suelo, escogiendo un tamaño promedio entre todos los cladodios de alrededor de 30 cm de alto, fueron sanitizados con Caldo Bordelés (Pérez Doroteo, 2019), con el fin de controlar plagas como la grana cochinilla, hongos y bacterias parásitas que presenta el cultivo de nopal.

Para la preparación del caldo se mezclaron 100 gramos de sulfato de cobre ($CuSO_4$) en 1 litro de agua hasta tener disueltos todos los cristales. En otro recipiente se disolvieron 100 gramos de cal en 9 litros de agua y se le agregó con cuidado la solución de sulfato de cobre mezclando la solución con un palo de madera, los cladodios fueron sumergidos por 15 minutos (Figura 5), después se dejaron secar a temperatura ambiente, este proceso se repitió 2 veces cada 15 días, antes de sembrarlos en las macetas con los suelos.

Este procedimiento fue realizado para los cladodios empleados en los dos ensayos de adaptación y rizorremediación.

Figura 5 *Sanitización de Nopales con Caldo Bordelés*

Fuente: Propia

3. Cepas Bacterianas

Las cepas empleadas de *Azospirillum spp.* pertenecen a la colección del Laboratorio de Microbiología de Suelos “Dr. Jesús Caballero Mellado” del CICM-BUAP. (Tabla 2), algunas aisladas de suelo contaminado con hidrocarburos. Estas cepas se seleccionaron con base en estudios anteriores donde demostraban su capacidad de fijar nitrógeno, promover el crecimiento de algunos cultivos y tener la capacidad de degradación de algunos contaminantes. Las cepas se sacaron de crio-conservación a -70ºC, se sembraron en placas de agar Rojo Congo (RC) por el método de estría cruzada, incubadas a 32ºC por 48 horas.

Identificación de Cepas Bacterianas

Identificación morfológica de *Azospirillum spp.*

Se emplearon los medios de Agar Papa Dextrosa (PDA) y Rojo Congo (RC) para ver su morfología macroscópica característica de las cepas de *Azospirillum*. Se realizó Tinción de Gram, esta prueba fue utilizada para identificar las dos principales clases de bacterias y observar sus características microscópicas.

Caracterización de *Azospirillum*

- Actividad Reductora de Acetileno (ARA): Es un método indirecto para la determinación de la actividad de la nitrogenasa para bacterias fijadoras de nitrógeno. La reducción de acetileno a etileno, fue detectada por un cromatógrafo de gases con detector de flama ionizante de hidrógeno Thermo modelo focus.

- Producción de biosurfactantes: Se sembraron los cultivos en Agar sangre, para observar la actividad hemolítica, este método es una prueba primaria donde la zona clara alrededor de la colonia indica la presencia de biosurfactantes que provocan la disminución de la tensión superficial y el rompimiento de la membrana de los hematíes del medio.

- Capacidad de emulsión: Tubos con 10 mL de medio Banat, adicionados con 5000 ppm de petróleo crudo, se inocularon con 1 mL de las cepas a una población de $1X10^8$ UFC/mL con 5,000ppm de petróleo crudo en cada tubo. Se incubaron en agitación por 24 horas a 32ºC y se observó la capacidad emulsificante de las bacterias. Esta actividad se correlaciona con la concentración de surfactante, pero no siempre con su actividad superficial.

- Prueba de fosfosolubilzación: se utilizó el medio de Goldstein, para observar la presencia de halos amarillos, prueba positiva de solubilización de fosfatos. A pesar de esto la producción de un halo en agar sólido no debería ser considerada la única prueba para la solubilización de fósforo y cuando las colonias crecen sin un halo después de varios requipes en el medio, debería llevarse a cabo una prueba adicional en medio líquido para medir la disolución de P (Restrepo Franco, *et al.*, 2015).

Tabla 2. Origen de las cepas de Azospirillum empleadas en los diseños experimentales.

Cepa	Origen	Cepa	Origen
Cd	Cepa tipo ATCC 29710 *Azospirillum brasilense*	**BSH-1**	Aislada de suelo contaminado con petróleo crudo en cultivo de nopal tunero Acatzingo-Puebla). *Azospirillum spp.*
C3	Colección del LMS Aislada de cultivo de café. *Azospirillum brasilense.*	**BSH-4**	Aislada de suelo contaminado con petróleo crudo en cultivo de nopal tunero Acatzingo-Puebla. *Azospirillum spp.*
A4	Colección del LMS aislada de suelo contaminado con diésel (Acatzingo,Puebla) *Azospirillum brasilense*	**BSH-6**	Aislada de suelo contaminado con petróleo crudo en cultivo de nopal tunero Acatzingo-Puebla. *Azospirillum spp.*
A5	Colección del LMS aislada de suelo contaminado de diésel *Azospirillum brasilense*	**BSH-7**	Aislada de suelo contaminado con petróleo crudo en cultivo de nopal tunero Acatzingo-Puebla. *Azospirillum spp.*
		BSH-10	Aislada de suelo contaminado con petróleo crudo en cultivo de nopal tunero Acatzingo-Puebla. *Azospirillum spp.*

4. Diseño Experimental de Adaptación de *Opuntia spp.* en presencia de petróleo crudo.

En este primer ensayo se utilizaron 18 macetas con suelo limpio y 90 macetas con suelo contaminado con petróleo crudo a 12,146 ppm. Cada maceta contenía 1.5 kilogramos de suelo mezclado homogéneamente. La investigación se realizó mediante un diseño experimental aleatorio de 12 tratamientos que consistían en dos Blancos, dos con una

cepa control y ocho cepas de la colección del Laboratorio de Microbiología de Suelos “Dr. Jesús Mellado”-CICM-BUAP. El ensayo de Adaptación de *Opuntia spp.,* se realizó en invernadero con luz natural a temperatura ambiente entre los meses de marzo a junio del 2020, con tres repeticiones por cada tratamiento (Tabla 3).

Se prepararon los precultivos de cada una de las cepas en tubos con caldo NFb incubados en agitación por 48 horas a 32ºC, posteriormente se transfirió una alícuota del inoculo a matraces con caldo NFb de 500 mL, incubándose por otras 48 horas a 32ºC, cada una de las cepas se ajustó a una población de $1x10^8$ UFC/mL (Figura 6). Para la preparación del biofertilizante de los nopales, se empleó turba tindalizada y neutralizada.

Figura 6 *Cultivos ajustados para inoculación de plantas y turba Fuente Propia.*

Figura 7 *Inoculación de Nopales con caldo NFb.*

Figura 8 *Bioaumentación.*

Fuente: Propia

La tindalización de la turba se realizó a diez libras de presión, por una hora repitiéndose cada tercer día, posteriormente se inoculó la turba con cada una de las cepas. Se inocularon los cladodios con los cultivos de cada una de las cepas durante una hora (Figura 7), en seguida se aplicó el biofertilizante preparado para que se adhiriera a la base del cladodio. Los cladodios fueron sembrados en macetas con suelo contaminado y bioaumentado a capacidad de campo, para el suelo limpio se empleó agua (Figura 8).

El diseño experimental realizado (Tabla 3) muestra los tratamientos que se emplearon para suelo limpio y suelo contaminado con petróleo crudo con 3 repeticiones con un total de 9 macetas por tratamiento.

Tabla 3 Diseño experimental aleatorio, Adaptación y Rizorremediación de HTP´s en suelo.

Tratamientos	
Nombre	**Componentes**
Bco SL	Suelo limpio + Planta sin inocular
Bco SC	Suelo Contaminado + Planta sin inocular
Cd SL	Suelo limpio + Planta inoculada con cepa Cd
Cd SC	Suelo Contaminado + Planta inoculada con cepa Cd
A4	Suelo Contaminado + Planta inoculada con cepa A4
A5	Suelo Contaminado + Planta inoculada con cepa A5
C3	Suelo Contaminado + Planta inoculada con cepa C3
BSH-1	Suelo Contaminado + Planta inoculada con cepa BSH-1
BSH-4	Suelo Contaminado + Planta inoculada con cepa BSH-4
BSH-6	Suelo Contaminado + Planta inoculada con cepa BSH-6
BSH-7	Suelo Contaminado + Planta inoculada con cepa BSH-7
BSH-10	Suelo Contaminado + Planta inoculada con cepa BSH-10

El riego de plantas se realizó periódicamente considerando una humedad óptima a 60% de la capacidad de campo, así como la observación de las pencas para evitar la aparición de la grana cochinilla, cuando se observó presencia de grana cochinilla, esta se retiraba de forma manual, para evitar su propagación. Transcurridos los 90 días se evaluó la

adaptación de los cladodios, se analizaron los suelos para cuantificar la degradación Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP) y evaluación del desarrollo de los cladodios, observando principalmente el crecimiento y grosor de las plantas, así como el crecimiento de raíces en cada uno de los tratamientos.

5. Diseño Experimental de Rizorremediación

El proceso de rizorremediación se llevó de igual forma con 18 macetas con suelo limpio y 90 macetas con el suelo contaminado con petróleo crudo utilizado en el ensayo de Adaptación de *Opuntia spp.* Este suelo se ajustó a 5,000 ppm aproximadamente por cada tratamiento de suelos contaminados, mezclándolos por separado para evitar contaminación cruzada entre cepas. Cada maceta contenía 1.5 kg de suelo con el mismo diseño experimental de 12 tratamientos (Tabla 3). El ensayo de rizorremediación fue realizado a nivel invernadero con luz natural a temperatura ambiente entre los meses de junio a noviembre del 2020, siguiendo el diseño experimental con bloques aleatorios, con repeticiones de 3 macetas por cada tratamiento por 3 fechas de evaluación de la rizorremediación obteniendo un arreglo factorial de 12x3x3. (Figura 9).

Figura 9 Diseño Experimental de Rizorremediación

6. Evaluación de respuesta de Rizorremediación

Se realizaron diferentes determinaciones para evaluar el efecto de la rizorremediación de las plantas a los 30, 60 y 150 días posteriores a su siembra.

1. Caracterización del suelo:

Esta se realizó bajo la NOM-021-RECNAT-2000, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. De igual forma se analizó al suelo limpio y al suelo contaminado inicial para ver sus características antes y durante el proceso de rizorremediación. Se determinaron solo los siguientes parámetros:

- AS-02 pH por método Electrométrico: medido en relación suelo-agua (1:2).
- AS-07 Contenido de materia orgánica: Método de Walkley y Black.
- AS-08 Nitrógeno inorgánico: Método Kjeldahl.
- AS-09 Determinación de textura del suelo: Método Bouyoucos
- AS-10 Fósforo extraíble en suelos de neutros a alcalinos. Método Olsen.
- AS-18 Medición de conductividad eléctrica: Método Electrométrico.

2. Determinación de Hidrocarburos totales por espectrofotometría de infrarrojo (IR). Método EPA 418.1

El suelo fue analizado para determinar la concentración de hidrocarburos totales del petróleo presentes en las muestras: Se colocaron 2 gramos del suelo en viales con sulfato de sodio (Na_2SO_4) y 5 mL de Tetracloruro de etileno (C_2Cl_4), sonicados por 10 minutos 3 veces. Posteriormente fueron filtrados empleando embudos con papel filtro y sílica gel, se enjuagaron cada uno de los viales con C_2Cl_4 hasta llegar a un aforo de 5 mL. Se realizó una curva de calibración empleando un estándar de petróleo crudo a 5,000 ppm, las extracciones fueron analizados por medio de un espectrofotómetro de infrarrojo marca Bruker modelo Tensor 27 a una longitud de onda de 2930 nm.

3. Determinación de índice morfológico de calidad de plantas (biomasa en raíz y tallo).

Se evaluó el desarrollo de los cladodios de las macetas por triplicado, en relación al peso fresco y seco de raíces y tallos y en el número de brotes formados por mes.

Para evaluar el peso fresco los cladodios se lavaron con agua destilada y secados con papel absorbente, se realizó un corte al cladodio a 5 cm desde la base, los pesos fueron registrados en conjunto raíz + tallo y por separado, posteriormente se llevaron a la estufa de secado a 60ºC por 72h. El peso seco fue registrado por cada tratamiento.

7. Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando una prueba de ANOVA en los diferentes tratamientos. Se aplicó la prueba de Tukey (p=0.05) para comparar las medias entre tratamientos en la determinación de las propiedades fisicoquímicas del suelo, la evaluación de la biomasa en tallo y raíz y en la degradación de los hidrocarburos totales de petróleo a los 30, 60 y 150 días respectivamente. Se utilizó el software estadístico Origin y Minitab 17.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS y DISCUSIÓN

1. Identificación y caracterización de Cepas

Identificación Morfológicas

Las cepas seleccionadas fueron sembradas en medio RC, donde se observó el crecimiento de colonias escarlatas, brillantes, pequeñas, redondas, algunas con centro convexo y otras planas con características principales de *Azospirillum spp.* como lo reportado por Hossain, *et al.*, (2015) donde mencionan que el agar RC es crucial para el aislamiento de *Azospirillum* ya que este ayuda a diferenciar de otras colonias de bacterias asociadas a la rizosfera que no pueden absorber el colorante. (Figura 10).

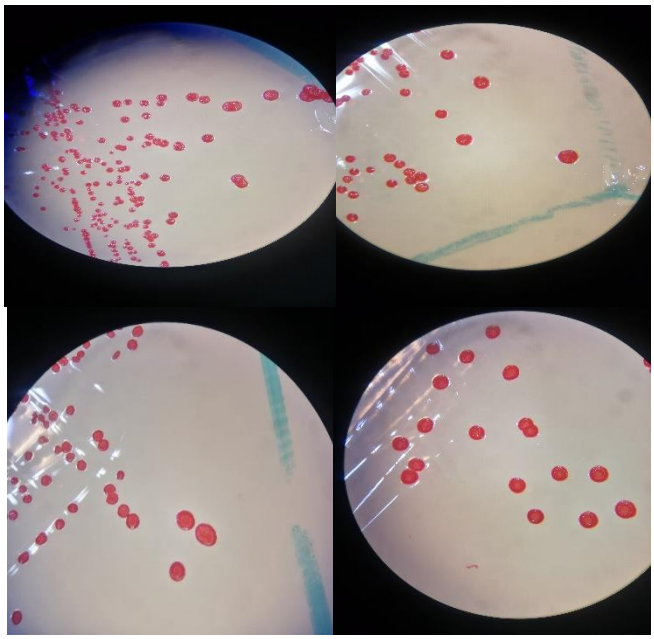


Figura 10 *Crecimiento de cepas en medio RC.*

El crecimiento de las cepas en medio PDA, al inicio las colonias fueron lisas y grisáceas, y después de una semana de incubación se tornaron rosadas, redondas y con bordes irregulares, esto concuerda con lo reportado por Döbereiner, *et al.,* (1987) y Massena Reis, *et al.*, (2015) donde emplearon el medio PDA adicionado con malato de potasio y sacarosa (Figura 11).

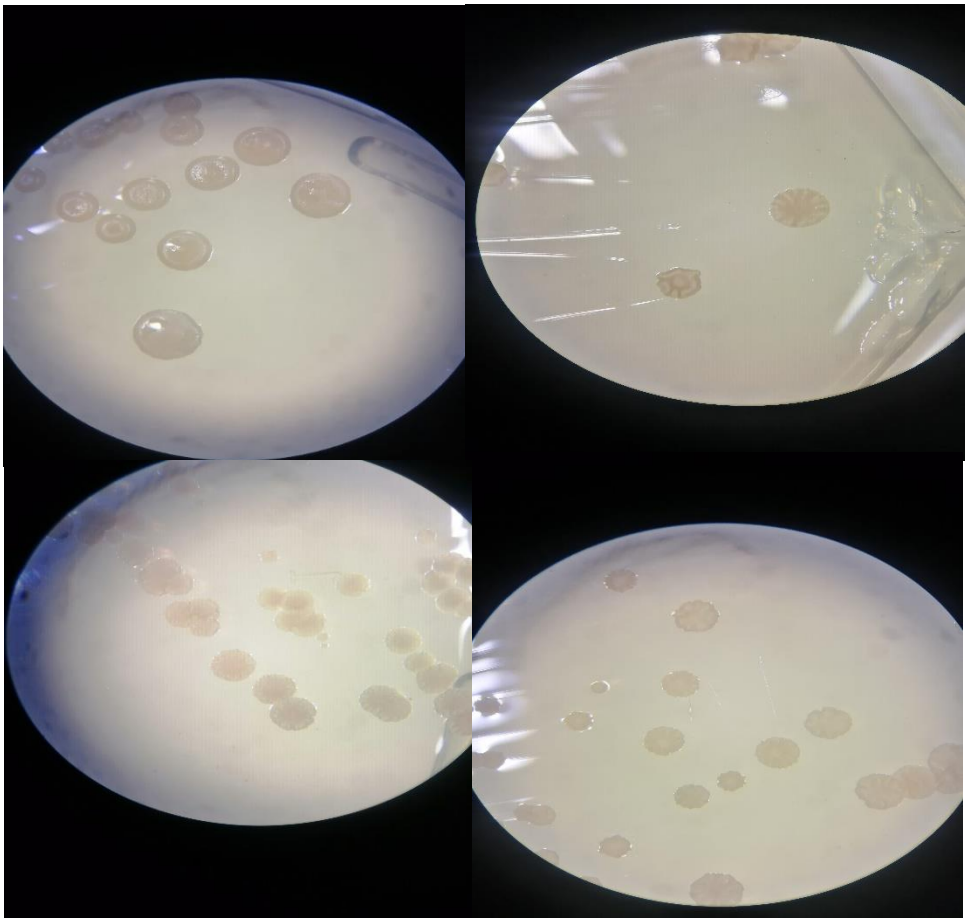


Figura 11 *Crecimiento de cepas en medio PDA.*

Los resultados sobre la Tinción de Gram señalaron que el total de cepas fueron Gram negativas. Estas células tuvieron formas ovoides con paredes rojas lo mismo reportado por Okon, *et al.*, (1976) quienes señalan que el género de *Azospirillum* pertenece al grupo de Bacterias Gram negativas, con forma celular de bacilos ligeramente curveados. En la Tabla 4 se muestran las morfologías macroscópicas y microscópicas de las cepas de *Azospirillum spp.* en los diferentes medio de cultivo.

Tabla 4 Identificación y Morfología de las cepas de colección de Azospirillum spp.

Cepas	Morfología Macroscópica		Morfología Microscópica
	RC	PDA	
CD	Escarlata, pequeña, redonda, convexas, brillosas.	Rosadas, circulares con bordes irregulares.	Bacilos ovoides, Gram (-)
C3	Escarlata, pequeña, redonda, convexas, opaca.	Rosadas, circulares con bordes regulares.	Bacilos ovoides, Gram (-)
A4	Escarlata, pequeña, redonda, convexas, brillosas.	Rosadas, circulares con bordes irregulares.	Bacilos ovoides, Gram (-)
A5	Escarlata, pequeña, redonda, convexas, brillosas.	Rosadas, circulares con bordes irregulares.	Bacilos ovoides, Gram (-)
BSH-1	Escarlata, pequeña, redonda, convexas, brillosas.	Rosadas, circulares con bordes irregulares.	Bacilos ovoides, Gram (-)
BSH-4	Escarlata, pequeña, redonda, plana, brillosas.	Rosadas, circulares con bordes irregulares.	Bacilos ovoides, Gram (-)
BSH-6	Escarlata, pequeña, redonda, convexas, brillosas.	Rosadas, irregulares, con bordes irregulares.	Bacilos ovoides, Gram (-)
BSH-7	Escarlata, pequeña, redonda, planas, brillosas.	Rosadas, circulares con bordes irregulares	Bacilos ovoides, Gram (-)
BSH-10	Escarlata, pequeña, redonda, convexas, brillosas.	Rosadas, circulares, ondulada.	Bacilos ovoides, Gram (-)

Actividad Reductora de Acetileno

Las cepas se caracterizaron en relación con la Actividad Reductora de Acetileno (ARA), prueba indirecta donde la bacteria manifiesta la presencia de la enzima nitrogenasa. Los resultados obtenidos mostraron que el 100% de las cepas fueron ARA (+) como se observa en el cromatograma con la reducción del acetileno a etileno (Figura 12).

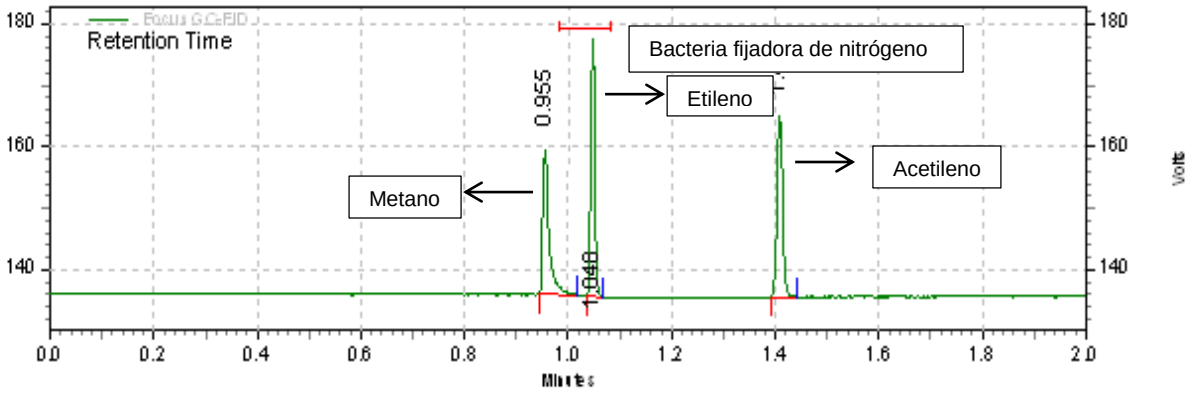


Figura 12 *Cromatografía de la Actividad Reductora de Acetileno de cepa BSH-7*

Pérez Pazos, *et al.,* (2017) señalan que los resultados obtenidos en el ensayo de reducción de acetileno indican que las cepas de *Azospirillum* presentaron una disminución significativa del acetileno sugiriendo que estas bacterias presentan la capacidad de fijación de nitrógeno.

Detección de la Actividad Biosurfactante

En la actividad hemolítica evaluada en Agar Sangre (Figura 13), se observó la presencia de halos de hemólisis alrededor de las colonias, a excepción de la cepa A5, la hemolisis permite observar la disminución de la tensión superficial y el rompimiento de la membrana de los hematíes del medio a causa de los biosurfactantes secretados. (Becerra Gutiérrez, *et al.,* 2016).

Para poner de manifiesto la actividad emulsificante se empleo el medio Banat (Figura 14). Se observó que las cepas BSH-4, BSH-6 y BSH-7, reduciendo la tensión superficial entre el medio y el petróleo crudo, este método se correlaciona con la concentración de surfactantes pero no siempre con su actividad superficial, por lo cual este método es útil para indicar la presencia de surfactantes. Los biosurfactantes al ser capaces de emulsificar aumentan la solubilidad de estos compuestos y la biodisponibilidad para otros microorganismos que pueden aprovecharlos como fuente de carbono. (Aguilar Domínguez, *et al.*, 2018).

Figura 13 *Actividad Hemolítica en medio Agar Sangre*

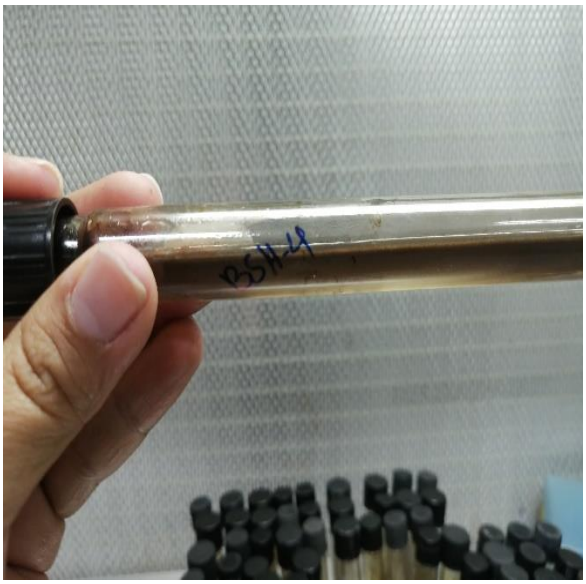


Figura 14 *Emulsificación en medio Banat*

Bacterias Solubilizadoras de Fosfatos

Para la identificación de bacterias solubilizadoras de fosfatos, se utilizó el medio Goldstein, que en su composición contenía fosfato tricálcico como fuente de fósforo como lo mencionan Bashan, *et al.,* (2013). Se pudo ver el crecimiento de la colonia con una producción de halo (Figura 15). La cepa A5, no tuvo la formación de halo en este medio. Restrepo, *et al.,* (2015) mencionan que para el aislamiento y la selección de bacterias que solubilizan fosfatos, se deben de realizar más pruebas rigurosas con distintas fuentes de fósforo, ya que no todas las bacterias asimilan solo un grupo de metal-P. Pérez Pazos, *et al*., (2017) reportaron la capacidad de cepas de *Azospirillum* para solubilizar fósforo ya que estas demostraron la presencia de grupos de ortofosfato disponibles.

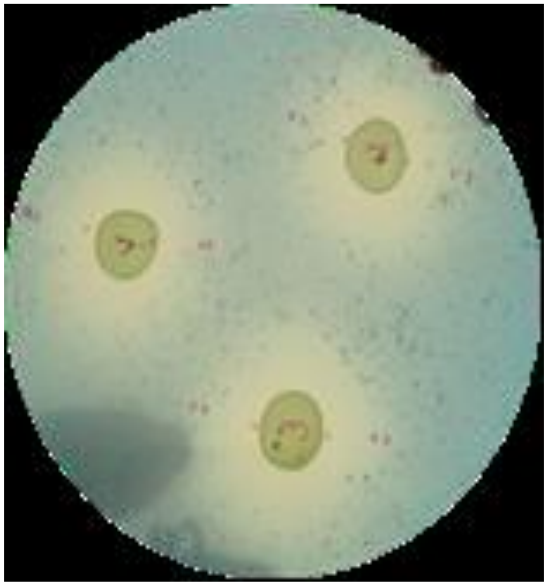


Figura 15 *Bacterias solubilizadoras de fosfatos.*

En el caso de las cepas BSH-4, BSH-6 y BSH-7 fueron las únicas cepas que lograron tener resultados positivos en las cuatro pruebas de ARA, Actividad Hemolítica, Emulsificación y solubilización de fosfatos. En la tabla 5 se muestran los resultados de las pruebas de ARA, Actividad hemolítica, emulsificación y solubilización de fosfatos con todas las cepas de trabajo elegidas.

Tabla 5 Caracterización de las cepas colección de Azospirillum spp.

Cepa	ARA	Actividad Hemolítica	Emulsificación	Fosfosolubilizadora
Cd	+	+	-	+
C3	+	+	-	+
A4	+	+	-	+
A5	+	-	-	-
BSH-1	+	+	-	+
BSH-4	++	+	+	+
BSH-6	+	+	+	+
BSH-7	++	+	+	+
BSH-10	++	+	-	+

2. Ensayo de Adaptación de *Opuntia spp.*

Transcurridos los 90 días de siembra de los cladodios en suelo con petróleo crudo, se observó que en la mayoría de los tratamientos pudieron adaptarse a la concentración de 12,146 ppm., del petróleo crudo, a pesar de que se obtuvo una adaptación del 98% de las plantas al contaminante, estas sufrieron cambios físicos en la coloración de los cladodios de un color verde característico del nopal a verde grisáceo o un verde pálido con tonalidades amarillas, crecimiento curveado, emergencia de grana cochinilla y poco desarrollo de raíces y pencas (Figura 16). En dos tratamientos (Cd (1) y BSH-10 (2)) no hubo crecimiento de raíz, por lo que las plantas murieron (Figura 17), esto pudiera deberse a lo que mencionan Godheja, *et al,* (2017) sobre que la concentración y tipo de hidrocarburo, afecta las propiedades fisicoquímicas y biológicas del suelo, saturando los poros e impidiendo el transporte de oxígeno y soluciones, disminuyendo poblaciones microbianas, así como la fenología de los cultivos. En relación a los resultados obtenidos de adaptación y fitotoxicidad concuerdan con lo que mencionan Rivera Cruz, *et al.*, (2004) donde señalan que el uso de plantas pueden ser bioindicadores de la calidad del suelo midiendo la sensibilidad de las plantas mediante su germinación, crecimiento, biomasa aérea, de raíz y el número de nódulos producidos, así como también existen estudios de

evaluación de toxicidad donde se emplean semillas labiles como lechuga y rábano evaluando parámetros similares a los mencionados (Callupe Vargas, 2018).

Figura. 16 *Adaptación de Opuntia spp. en suelo contaminado a 90 días.*

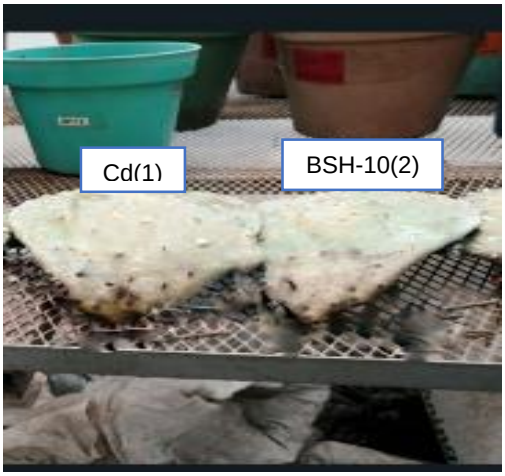


Figura 17 *Tratamientos sin crecimiento de raíz.*

La presencia de grana cochinilla, se puede atribuir a principalmente a la temporada que se realizó el ensayo de adaptación (marzo a junio). En el manual de SAGARPA, Díaz Franco, *et al.*, 2014 mencionan que ésta se presenta durante la temporada de calor y en invierno disminuye su incidencia. Se localiza principalmente en las pencas maduras y a veces en los nopalitos, la cochinilla succiona la savia de las pencas lo que induce un amarillamiento en las plantas. Se caracteriza por la presencia de pequeños puntos algodonosos de color blanco, que se sitúan en la base de las espinas, pero cuando se les quita la capa algodonosa su cuerpo es de color rojo y cuando se aplastan producen un líquido viscoso rojo carmín intenso.

A pesar de la infestación y afectación física de los cladodios, en los resultados de HTP (Tabla 6); se detectó una disminución estadísticamente significativa con respecto al BCO SC, los tratamientos BSH-4, C3 y BSH-7 presentaron mayor porcentaje de degradación con un 77.06%, 75.36% y 74.04% respectivamente de HTP, de una concentración inicial de 12,146 ppm, encontrando valores cercanos a los establecidos en la NOM-138-SEMARNAT-SSA1-2012 para suelos agrícolas (Tabla 1).

Tabla 6. Evaluación de adaptación de Opuntia spp. en presencia de petróleo crudo (12,146ppm) a los 90 días.

Cepa	Concentración ppm	Cepa	Concentración ppm
Bco SL	267^{d}	**A5**	4003^{ab}
Bco SC	4702^{a}	**BSH-1**	3392^{bc}
CD SL	191^{d}	**BSH-4**	2786^{c}
CD SC	4069^{ab}	**BSH-6**	3214^{bc}
C3	2992^{c}	**BSH-7**	3156^{bc}
A4	3912^{ab}	**BSH-10**	4098^{ab}

. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. (Tukey,$p<0.05$).

Los resultados obtenidos en el ensayo de adaptación aportaron indicios de selección de cepas con capacidad degradadora de hidrocarburos y promotora de crecimiento observando la respuesta principalmente en el desarrollo de raíces. También se pudo observar que el suelo blanco contaminado en presencia de *Opuntia* logró disminuir la concentración de hidrocarburos, esto pudiera deberse a lo mencionado por Escobar Alvarado, *et al.,* en 2018, que la presencia de plantas sin inocular en suelos contaminados con hidrocarburos acelera el proceso de degradación natural, ya que ayudan a las actividades microbianas presentes. Así como la exposición a la luz solar y el riego constante pudo ayudar a una degradación más rápida, estos factores contribuyen de igual forma a la volatilización del contaminante y a la promoción del crecimiento microbiano en el suelo.

3. Ensayo de Rizorremediación

3.1 Análisis Fisicoquímicos en Suelo

Para realizar y evaluar el proceso de biorremediación es necesario conocer las características de la matriz (Cabanillas Caroajulca, *et al.,* 2015). En el presente estudio se determinaron algunas propiedades fisicoquímicas del suelo limpio y contaminado. En la Tabla 7 se presentan los valores obtenidos de seis parámetros analizados conforme a la NOM-021-RECNAT-2000 en suelo limpio y contaminado.

Tabla 7 Características fisicoquímicas Iniciales de suelo limpio y contaminado con crudo.

	Suelo Limpio Inicial		Suelo Contaminado Inicial	
Parámetro	Resultado	Interpretación	Resultado	Interpretación
pH	8.03	Medianamente alcalino	8.24	Medianamente alcalino
Conductividad Eléctrica dS/m	0.259	Efectos despreciables de la salinidad	0.738	Efectos despreciables de la salinidad
Materia Orgánica %	5.08	Alto	9.59	Muy Alto
Fósforo ppm	3.97	Bajo	3.47	Bajo
Nitrógeno %	0.148	Medianamente Rico	0.099	Mediano
Textura	%Arena 63	Franco arenoso	%Arena 57	Franco arcilloso arenoso
	%Limo 18		%Limo 20	
	%Arcilla 19		%Arcilla 23	

Medias obtenidas de 3 repeticiones.

Los resultados muestran una ligera modificación del pH de 8.24 y conductividad de 0.738 dS/m en el suelo contaminado respecto al suelo limpio quedándose con la misma clasificación que menciona la norma NOM-021- RECNAT-2000 (Anexo 1 y 2). Wang *et al.*, (2013) reportan que el aumentol del pH en suelos contaminados, podría deberse a la naturaleza hidrofóbica del petróleo crudo y por la acumulación de bases intercambiales que contiene el contaminante.

En relación al contenido de materia orgánica (M.O.), este presentó un incremento importante en suelo contaminado y paso de alto a muy alto. Los nutrientes como el fósforo y el nitrógeno tuvieron un desequilibrio ya que disminuyeron respecto al suelo limpio, esto se debe a la relación de C:N:P, que se vio afectada por la incorporación del hidrocarburo al suelo. Kayode, *et al.*, (2009) y Godheja, *et al.,* (2017), mencionan que las principales propiedades fisicoquímicas que sufren cambios cuando se contamina con hidrocarburos es la materia orgánica, pH, el contenido de carbono orgánico, nitrógeno y fósforo.

En el caso del parámetro de textura se tuvo una pequeña modificación en el porcentaje de arcilla, limo y arena, pero con esto la clase textural cambio de franco arenoso a franco arcilloso arenoso, esta clase textural dominante permite que estos suelos sean susceptibles de someterse a procesos de biorremediación. La absorción de contaminantes en la arena permite la aglomeración de estas partículas haciendo que disminuya su porcentaje, esto se ve reflejado en el aumento del porcentaje de arcillas (Morales Bautista, *et al.,* 2019). Curiel Iñiguez, (2018) menciona que la influencia del petróleo crudo en las arcillas es que este inhibe el intercambio catiónico, reduciendo así la capacidad de las partículas de atraer los cationes de las sales presentes en el suelo, teniendo cambios en pH.

Caracterización físico-química del suelo de los tratamientos de rizorremediación de 30 días

En el caso de pH se mantuvo medianamente alcalino, ya que no tuvo diferencia a comparación del suelo inicial en el transcurso de 30 días con un valor aproximado de 8.10. (Tabla 8). La conductividad incremento en algunos tratamientos respecto al suelo inicial contaminado. Zamora, *et al.,* (2012) mencionan que el incremento de la conductividad se atribuye principalmente a la actividad biológica durante la descomposición de materia orgánica y procesos redox.

Tabla 8 Propiedades fisicoquímicas de suelo limpio y contaminado a 30 días del Proceso de Rizorremediación.

Tratamiento	pH	Cond. dS/m	M.O.%	Nitrógeno %	Fósforo ppm	Textura
Bco SL	8.02 cdef	0.258 d	4.98 bc	0.148	3.97	Franco arenoso
Bco SC	8.08 defg	0.631 c	9.06 a	0.127	3.47	Franco arcilloso arenoso
Cd SL	8.03 ab	0.247 d	5.01 c	0.150	3.98	Franco arenoso
Cd SC	8.02 g	0.623 c	7.69 ab	0.103	3.52	Franco arcilloso arenoso
A4	8.16 abc	0.720 b	9.15 a	0.123	3.47	Franco arcilloso arenoso
A5	8.21 a	0.626 c	7.82 ab	0.099	3.49	Franco arcilloso arenoso
C3	8.08 defg	0.783 a	8.42 ab	0.103	4.60	Franco arcilloso arenoso
BSH-1	8.06 fg	0.731 b	8.45 ab	0.099	4.01	Franco arcilloso arenoso
BSH-4	8.14 abcd	0.731 b	9.29 a	0.127	3.92	Franco arcilloso arenoso
BSH-6	8.10 cdef	0.796 a	8.45 ab	0.127	3.47	Franco arcilloso arenoso
BSH-7	8.13 bcde	0.637 c	9.30 a	0.131	3.48	Franco arcilloso arenoso
BSH-10	8.07 efg	0.797 a	8.47 ab	0.115	3.50	Franco arcilloso arenoso

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. (Tukey,p<0.05).

En el caso de MO se observó pequeños cambios en su porcentaje, empezando a disminuir sus valores de 9.2% a un 8.4%. En cuanto a nitrógeno y fósforo se mantuvieron sus valores sin diferencia estadísticamente significativa en sus resultados respecto al suelo inicial. En el caso de la textura, esta siguió con la misma clase textural sin mucha variación en los porcentajes de arcilla con un promedio del 20% al 23% teniendo la clase textural en todos los tratamientos con suelos contaminados de franco arcilloso arenoso con excepción de los suelos limpios que desde un principio se conservaron como franco arenoso.

Ortiz Díaz, *et al.,* (2019) mencionan que cada situación de contaminación es única, ya que cada afectación tiene su particularidad, como temperatura, pH, humedad, tipo de

suelo, por lo cual no existe un tratamiento específico que permita establecer una mitigación por rápida o por completo.

Caracterización físico-química del suelo de los tratamientos de rizorremediación de 60 días

Tabla 9 Propiedades fisicoquímicas de suelo limpio y contaminado a 60 días del Proceso de Rizorremediación.

Tratamiento	pH	Cond. dS/m	M.O.%	Nitrógeno %	Fósforo ppm	Textura
Bco SL	8.02 ^{ab}	0.240 ^{d}	5.05 ^{b}	0.148	3.99	Franco arenoso
Bco SC	8.03 ^{bcd}	0.448 ^{c}	8.03 ^{ab}	0.127	4.10	Franco arcilloso arenoso
Cd SL	8.01 ^{a}	0.236 ^{d}	4.98 ^{b}	0.156	3.99	Franco arenoso
Cd SC	7.92 ^{e}	0.553 ^{abc}	7.28 ^{ab}	0.115	5.18	Franco arenoso
A4	7.93 ^{e}	0.560 ^{abc}	7.03 ^{ab}	0.129	3.47	Franco arenoso
A5	7.94 ^{de}	0.566 ^{abc}	7.84 ^{ab}	0.111	3.49	Franco arcilloso arenoso
C3	8.00 ^{bcde}	0.475 ^{bc}	7.47 ^{ab}	0.119	7.07	Franco arcilloso arenoso
BSH-1	8.04 ^{bc}	0.582 ^{abc}	7.72 ^{ab}	0.152	4.46	Franco arcilloso arenoso
BSH-4	8.05 ^{abc}	0.466 ^{bc}	9.03 ^{a}	0.156	5.58	Franco arcilloso arenoso
BSH-6	8.03 ^{bcd}	0.693 a	7.47 ^{ab}	0.160	3.70	Franco arcilloso arenoso
BSH-7	7.92 ^{e}	0.652 ^{ab}	6.23 ^{ab}	0.152	3.70	Franco arcilloso arenoso
BSH-10	7.98 ^{cde}	0.488 ^{bc}	7.28 ^{ab}	0.156	3.57	Franco arcilloso arenoso

. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. (Tukey,$p<0.05$).

A los 60 días del proceso de rizorremediación se realizó la caracterización fisicoquímica de los 12 tratamientos (Tabla 9). En este transcurso de tiempo, se empezaron a observar cambios significativos en todos los parámetros a comparación del suelo contaminado inicial. Para el caso de pH sólo 2 tratamientos tuvieron valores mayores respecto al suelo limpio inicial de 8.03 y la conductividad empezó a disminuir respecto al primer mes. De igual forma la MO disminuyó en su porcentaje en la mayoría de los tratamientos, pero seguía clasificándose en muy alto como lo marca la norma NOM-021-RECNAT-2000 (Anexo 3). En el caso de los nutrientes de Nitrógeno y Fósforo se observó un pequeño incremento en sus valores respecto al primer mes. En la clase textural dos tratamientos

empezaron a tener algunos cambios en sus porcentajes de arena haciendo que este cambiara de Franco arcilloso arenoso a Franco arenoso.

Caracterización físico-química del suelo de los tratamientos de rizorremediación de 150 días.

En la tabla 10 se pueden observar los cambios significativos en las propiedades fisicoquímicas que se tuvieron en cada parámetro.

Tabla 10 Propiedades fisicoquímicas del suelo limpio y contaminado a 150 días del proceso de Rizorremediación.

Tratamiento	pH	Cond. dS/m	M.O.%	Nitrógeno %	Fósforo ppm	Textura
Bco SL	7.86 ^{b}	0.216 ^{d}	5.04 ^{c}	0.151	6.39	Franco arenoso
Bco SC	7.80 ^{bc}	0.385 ^{c}	7.97 ^{a}	0.177	5.14	Franco arenoso
Cd SL	7.96 ^{a}	0.250 ^{d}	4.92 ^{c}	0.156	5.99	Franco arenoso
Cd SC	7.79 ^{bc}	0.460 ^{abc}	6.97 ^{abc}	0.127	5.94	Franco arenoso
A4	7.80 ^{bc}	0.435 ^{bc}	5.23 ^{c}	0.140	8.15	Franco arenoso
A5	7.80 ^{bc}	0.381 ^{c}	6.54 ^{abc}	0.136	5.31	Franco arenoso
C3	7.80 ^{bc}	0.447 ^{abc}	6.85 ^{abc}	0.123	52.34	Franco arenoso
BSH-1	7.83 ^{bc}	0.440 ^{abc}	7.28 ^{ab}	0.168	28.69	Franco arenoso
BSH-4	7.81 ^{bc}	0.419 ^{c}	6.10 ^{abc}	0.218	6.39	Franco arenoso
BSH-6	7.84 ^{bc}	0.529 ^{a}	6.60 ^{abc}	0.164	5.76	Franco arenoso
BSH-7	7.76 ^{c}	0.528 ^{ab}	5.35 ^{bc}	0.168	6.71	Franco arenoso
BSH-10	7.79 ^{bc}	0.414 ^{c}	6.16 ^{abc}	0.152	6.57	Franco arenoso

. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. (Tukey,$p<0.05$).

En el caso del pH se vio una reducción final de aproximadamente 0.3 unidades teniendo un pH similar en casi todos los tratamientos de 7.76 a 7.96, teniendo un valor cercano al neutro o encontrarse entre 6 a 8 para el proceso de biorremediación. Njoku *et al.,* (2009) reportan que la disminución de pH se debe principalmente a la liberación de ácidos orgánicos que se producen durante la degradación del crudo en el suelo o bien la

producción de radiacales ácidos por la nitrificación, por algunas bacterias fijadoras de nitrógeno o fosfosolubilizadoras.

La conductividad eléctrica de los suelos contaminados después de 150 días del proceso de rizorremediación fue menor que la que presentaron en el primer mes llegando en promedio a 0.460 dS/m, pero no llegó a los valores iniciales respecto a la conductividad del suelo limpio. Devatha *et al,* (2019) y Zahermand *et al,* (2020) mencionan que el aumento en los niveles de la conductividad eléctrica se debe principalmente a la contaminación por el petróleo crudo ya que este posee una gran cantidad de iones que podría unirse con los iones existentes en el suelo.

El parámetro de materia orgánica redujo en su porcentaje de casi 3 unidades en la mayoria de los tratamientos siendo los tratamientos con las cepas A4 y BSH-7 los que tuvieron valores similares al tratamiento control de suelo limpio con planta con 5.23% y 5.35% respectivamente. El contenido de materia orgánica en los suelos contaminados es la sumatoria de la materia biogénica y la materia petrogénica (Martínez, *et al*, 2001) influyendo en la cuantificación de MO. La utilización de bacterias de *Azospirillum* ayudó a la reducción de la MO en comparación en los tratamientos que solo se utilizó la planta donde sus porcentajes fueron mínimos, por consiguiente esto se manifestó en la concentración de Hidrocarburos Totales. Los contaminantes orgánicos pueden proporcionar a los microorganismos una fuente de carbono y los electrónes necesarios para su mineralización, esto puede atribuirse a la degradación por la actividad enzimática de las cepas inoculadas (Martin, *et al.*, 2014).

Con respecto al contenido de nitrógeno y fósforo se observó que aumentaron a los 150 días, los valores fueron mayores que los encontrados en el suelo control inicial, tanto en suelo limpio como contaminado. En los tratamientos con plantas inoculadas tuvieron mejor resultado a comparación de los blancos, teniendo un incremento considerable.

El tratamiento de las plantas inoculadas con la cepa BSH-4 tuvo la mejor respuesta, ya que este aumentó el contenido de nitrógeno en más del doble respecto al suelo contaminado inicial. Hernández, *et al.,* (2003) reportaron que los suelos contaminados con queroseno son capaces de sostener abundantes poblaciones de bacterias fijadoras de N_2 atmosférico como el caso de *Azospirillum* que permite usar el petróleo como fuente

de carbono y energía. El empleo de bacterias fijadoras de nitrógeno puede beneficiar en el aporte del nitrógeno, lo que ayudaría a encontrar un equilibrio en la relación C/N, así como favorecería el crecimiento microbiano.Las bacterias fijadoras de nitrógeno como el género *Azospirillum* poseen la caracteristica de adaptase a condiciones adversas, tomando la materia o contaminantes orgánicos del medio como fuente de energía lo que tiene un efecto directo sobre las plantas, ya que además producen ácido indol acético, el cual es responsable del crecimiento de la planta (Ibarra Sánchez, 2010).

Para el caso del fósforo, los tratamientos que aumentaron mas del doble de su concentracion inicial fueron las cepas C3 y BSH-1 con 52.34 ppm y 28.69 ppm respectivamente, resultados similares a los obtenidos por Sánchez Cote (2016) donde su mejor tratamiento fue el obtenido por la cepa C3. En el sistema suelo-planta el 90% del fósforo está en el suelo pero sólo una pequeña parte de este es utilizable por los vegetales. Fernández en el 2007, mencionó que, el fósforo disponible en el suelo a comparación de otros nutrientes es insuficiente para los vegetales. Un factor a considerar es la disponibilidad del fósforo para las plantas, donde las raíces son capaces de modificar la concentración de iones en su entorno más próximo, debido a la segregación de exudados radiculares, actividad microbiana en la rizosfera y la difusión de iones. Restrepo Franco, *et al.,* (2014) mencionan que la efectividad de bacterias solubilizadoras de fósforo depende de su capacidad para colonizar la rizosfera, que es afectada por factores tales como el pH que favorece la formación de hidrofosfatos de mayor solubilidad, la salinidad y la temperatura.

En cuanto parámetro de textura al final del experimento, se determinó como Franco Arenoso para todos los tratamientos ya que sus porcentajes de arena se vieron aumentados a más del 60% y en el caso de las arcillas estas se redujeron a menos del 20%, similar a la textura del suelo limpio.

Hernández Acosta, *et al*, 2006 mencionan que un mayor porcentaje de arena favorece los procesos de biorremediación, ya que al tenerse poca arcilla el fenómeno de adsorber o fijar los hidrocarburos en las partículas es mínimo, haciendolo disponible para la degradación por parte de los microorganismos presentes en el suelo. Con la contaminación de los suelos, se puede originar estructuras diferentes en cuanto a

porosidad y agregación, que dan lugar a posibles problemas de endurecimiento, aireación, capacidad de retención hídrica, permeabilidad y la capacidad de carga de los suelos (Ortíz Diaz, *et al*, 2019).

3.2 Evaluación de degradación de Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP)

En la Tabla 11 se presentan los valores obtenidos HTP´s, a los tres tiempos de evaluación. A partir de los 30 días se observó una reducción estadísticamente significativa en la concentración de HTP´s con las cepas BSH-4, BSH-6 y CD SC del 66.25 %, 65.73% y 63.47% respectivamente.

Tabla 11. Evaluación de la Rizorremediación en la Degradación de Hidrocarburos Totales del petróleo (5,000ppm) a 30,60 y 150 días.

	Inicial	30 días	60 días	150 días
Bco SL	267 ^{d}	252 ^{c}	149 ^{bc}	126 ^{bc}
BCO SC	4609 ^{ab}	1810 ^{ab}	1723 ^{a}	1346 ^{a}
CD SL	191 ^{d}	92 ^{c}	89 ^{c}	85 ^{c}
CD SC	4744 ^{a}	1733 ^{b}	1688 ^{a}	1518 ^{a}
C3	4276 ^{abc}	2153 ^{ab}	1695 ^{a}	1496 ^{a}
A4	4296 ^{abc}	1894 ^{ab}	1856 ^{a}	1491 ^{a}
A5	4087 ^{c}	2233 ^{ab}	1444 ^{a}	887 ^{abc}
BSH-1	4754 ^{a}	2906 ^{a}	1508 ^{a}	1141 ^{a}
BSH-4	4736 ^{c}	1599 ^{b}	1326 ^{a}	1096 ^{a}
BSH-6	4445 ^{ab}	1523 ^{b}	1474 ^{a}	1171 ^{a}
BSH-7	4105 ^{bc}	1648 ^{b}	1210 ^{ab}	995 ^{ab}
BSH-10	4037 ^{c}	1670 ^{b}	1406 ^{a}	1398 ^{a}

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. (Tukey,$p<0.05$).

En el caso de los 60 días se observó una disminución en todos los tratamientos, siendo la cepa BSH-4, BSH-7 y BSH-1, las que obtuvieron mayor degradación respecto a la concentración inicial con un 72.01%, 70.52% y 68.28% respectivamente. Transcurridos los 150 días los tratamientos que mejor respuesta tuvieron en la degradación de HTP en el proceso de rizorremediación fueron las cepas A5, BSH-7 y BSH-4 reduciendo en un 78.30%, 77.54% y a 76.86% respectivamente. Sin embargo, la cepa que degradó menos fue la cepa C3 con un 65.02% de los tratamientos con suelos contaminados. A pesar de esto, todos los tratamientos presentaron resultados por debajo de los LMP conforme a los suelos agrícolas mencionados en la NOM-138-SEMARNAT-2012. (Tabla 1). A partir de los 30 días se obtuvo la disminución de la concentración de los HTP´s como se puede observar en los espectros de IR (Figura 7).

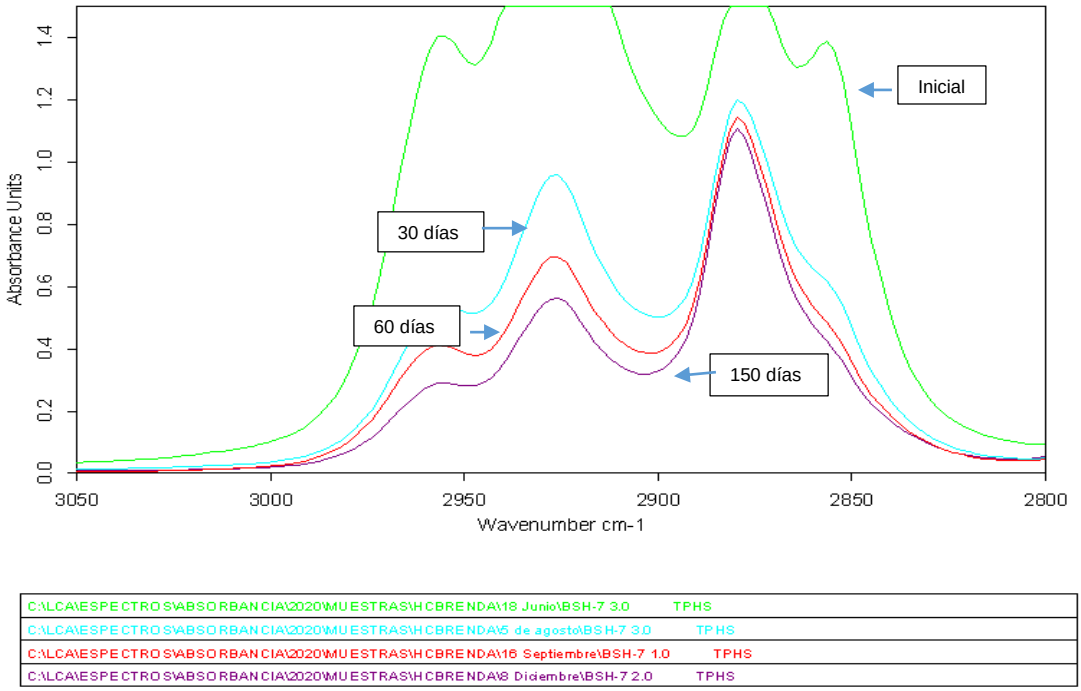


***Figura 18**. Espectro de IR: cepa BSH-7 concentración inicial, 30, 60 y 150 días.*

En los suelos limpios presentaban concentraciones bajas de HTP, probablemente a compuestos similares a hidrocarburos derivados de gran número de agroquímicos que se utilizan en las labores agrícolas, además de que el método empleado para la cuantificación también puede incluir compuestos distintos a hidrocarburos de petróleo como son las sustancias húmicas presentes en los suelos (Pawlak, *et al*, 2008). Los

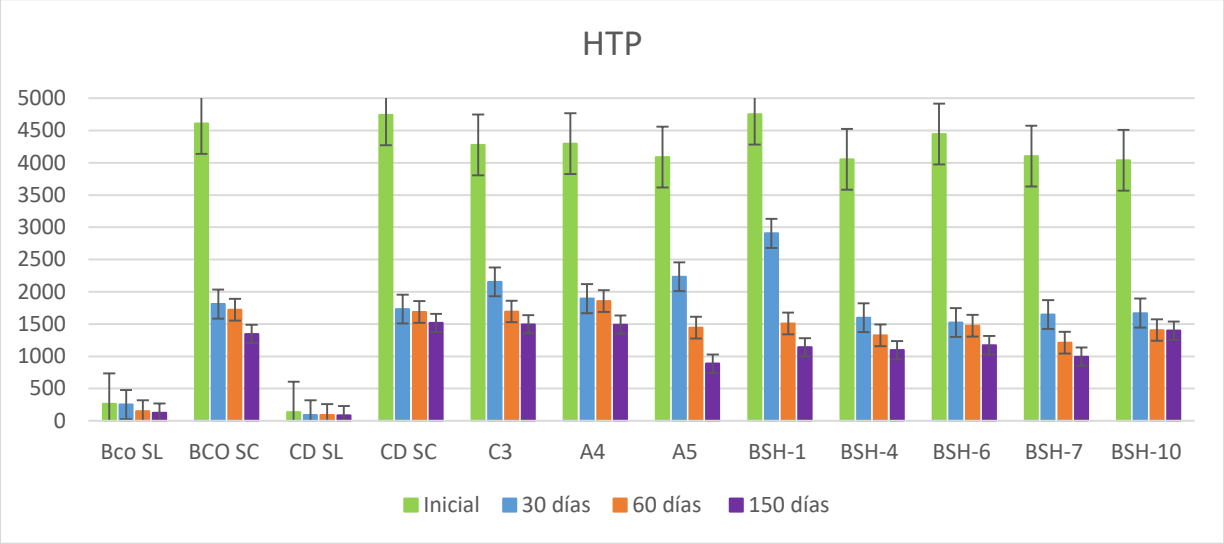
tratamientos con suelo limpio se observó una disminución en los valores de HTP, esto podría ser por la capacidad de los microrganismos y/o las plantas de degradar, extraer o transformar sustancias orgánicas recalcitrantes en el suelo (Chaudry *et al.* 2005).

En el caso de suelo contaminado en presencia de cladodios, se observa una buena respuesta ante el contaminante (BCO SC), desde el primer mes se obtuvo una degradación de HTP con un 60.73%, esto pudiera explicarse donde algunas plantas pueden incrementar la remoción de xenobióticos por los mecanismos principales donde poseen las características de la captación directa y transformación del contaminante o la liberación de enzimas específicas o cofactores enzimáticos que propician que un contaminante orgánico recalcitrante sea transformado o degradado (Ferrera Cerrato, *et al.,* 2006 y Pérez Montero, *et al.,* 2012). Por otra parte, los tratamientos inoculados con las cepas BSH-1, BSH-4 y BSH-7, tuvieron la mejor respuesta en la degradación del hidrocarburo, Pérez Montero *et al.*, (2012) mencionan que la inoculación de plantas con microorganismos degradadores de hidrocarburos es una buena opción para los procesos de biorremediación, pero su aplicación puede no ser exitosa por la competencia con los microorganismos del sitio.

La respuesta del uso de BPCV como el caso de *Azospirillum* demostró la capacidad que tiene para la degradación de los contaminantes, ya que las cepas se caracterizarón por la capacidad de aportar nitrógeno, solubilizar el fósforo y emulsificar el contaminante. De la Rosa Cruz, *et al.,* (2014), y Zhang, *et al.,*(2012) reportan que el uso de microorganismos para la biorremediación de suelos contaminados, donde producen biosurfactantes logran incrementar la biodisponibilidad mediante la solubilización de los compuestos orgánicos hidrofóbicos como el caso del petróleo crudo, ayudando a la disminución de la concentración del contaminante.

De misma forma, Escobar Alvarado, *et al.,* (2018) señalan que la presencia de raíces ayudan a la aireación del suelo y a la producción y retención de nutrientes que, a su vez ayudan a la actividad de degradación de contaminantes por las bacterias que se encuentran en la rizósfera. Además de degradar al contaminante las bacterias empleadas ayudaron a recuperar algunas caracteristicas del suelo en particular nitrógeno y fósforo y aumentar el desarrollo de la planta como se puede observar en la tabla 12.

En la Gráfica 1 se presenta el comportamiento de la degradación de HTPs, en el proceso de rizorremediación, observandose que cuatro tratamientos a partir de los 30 días presentaron la mayor de degradación del hidrocarburo con un 60% de reducción de HTPs, (BSH-4, BSH-6, CD SC y BSH-7) .Resultados similares reportaron Rivera Cruz, *et al.*, (2004) y Sánchez Cote (2016) donde emplearón plantas de pasto y de colorín respectivamente, observando los mejores resultados de degradación del petróleo en los tratamientos que fueron inoculados con microorganismos rizosféricos y *Azospirillum spp.*



Gráfica 1 Porcentaje de degradación de HTP en el proceso de rizorremediación, 30, 60 y 150 días.

Escobar Alvarado, *et al.,* (2018) reportaron el uso de *Opuntia ficus* en la fitorremediación de suelos contaminados con aceite de motor usado, el porcentaje de reducción de HTP´s, fue de 46.6% en 140 días, demostrando que la planta por si sola tiene la capacidad de degradar los contaminantes orgánicos.

3.3 Determinación de índice morfológico de calidad de plantas

Durante el ensayo de rizorremediación se mostró que los cladodios de nopal se adaptaron a ambientes contaminados con petróleo crudo. Después de 150 días las plantas mostraron diferencias entre tratamientos, tanto en la formación de brotes, aumento en raíz y tamaño de pencas.

Brotes

En la tabla 12 se presentan el número de brotes formados durante el proceso de rizorremediación en relación al número total de cladodios de acuerdo al tiempo de evaluación. A los 30 días son nueve macetas contadas, por lo que se anotaron el total de brotes por las 9 macetas, así mismo a los 60 días con 6 macetas y a los 150 días con 3 macetas en total.

Tabla 12 Desarrollo de brotes en los diferentes tiempos del proceso de rizorremediación.

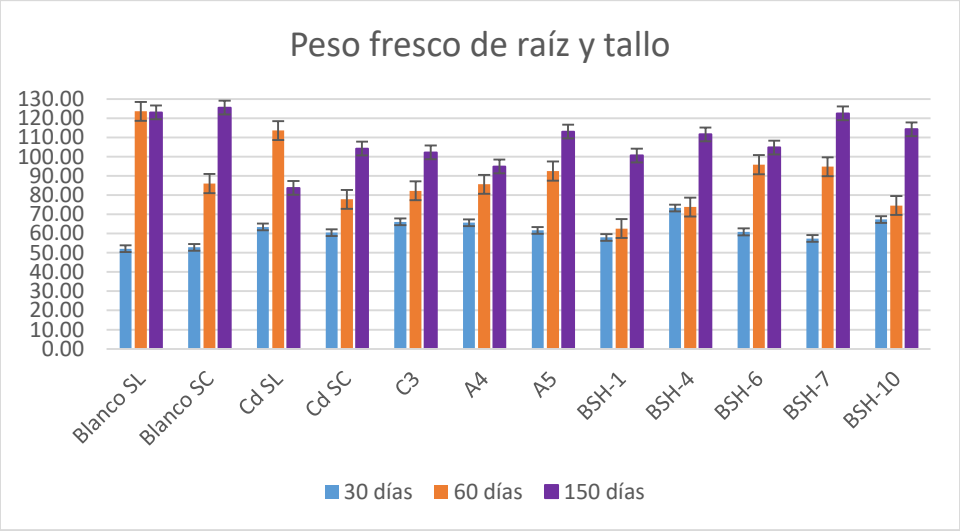
	30 días	60 días	150 días
Bco SL	2/9	4/6	4/3
BCO SC	1/9	2/6	2/3
CD SL	2/9	2/6	2/3
CD SC	4/9	5/6	4/3
C3	3/9	3/6	3/3
A4	3/9	4/6	4/3
A5	1/9	2/6	3/3
BSH-1	1/9	2/6	2/3
BSH-4	2/9	3/6	3/3
BSH-6	2/9	4/6	4/3
BSH-7	4/9	4/6	3/3
BSH-10	5/9	5/6	5/3

El tratamiento inoculado con la cepa BSH-10 es la que obtuvo mejor respuesta en el crecimiento de los brotes desde el principio del ensayo, este terminó con un promedio de 2 brotes por maceta, las condiciones del invernadero ayudaron a un buen desarrollo y crecimiento de los cladodios secundarios, la entrada de luz por el día y la temperatura del invernadero oscilaba entre los 30ºC en el día y los 9ºC por las noches. Inglese, *et al.*, (2018) mencionan que para un mejor crecimiento del nopal verdura se necesita buena luz y las temperaturas promedios para un desarrollo óptimo van de los 18-23ºC y como temperatura mimimas hasta los 3ºC.

Tallo y raíz frescos

En la figura 19 se muestran el aspecto de las raíces que presentaban los cladodios, se observa un crecimiento abundante de raíces secundarias y pelos radiculares.

Figura 19 *Observación raíz y tallo de cada tratamiento*



Gráfica 2 Peso fresco de raíz y tallo en los diferentes tiempos del proceso de rizorremediación.

La gráfica 2 muestra que a los 30 días el tratamiento BSH-4 y BSH-10 fueron los que presentaron mayor peso fresco. A los 60 días los mayores pesos fueron mostrados por los tratamientos de BC SL y CD SL sobrepasando los 100 gramos de tallo y raíz que presentaron diferencias significativas con los demás tratamientos. A los 150 días de igual forma los tratamientos BC SL y BC SC además del BSH-7 presentaron los mayores pesos alcanzando los 120 gramos. Rivera Cruz *et al.*, (2004) menciona que la exposición de las plantas al petróleo puede inhibir el crecimiento y la producción de la biomasa, esto

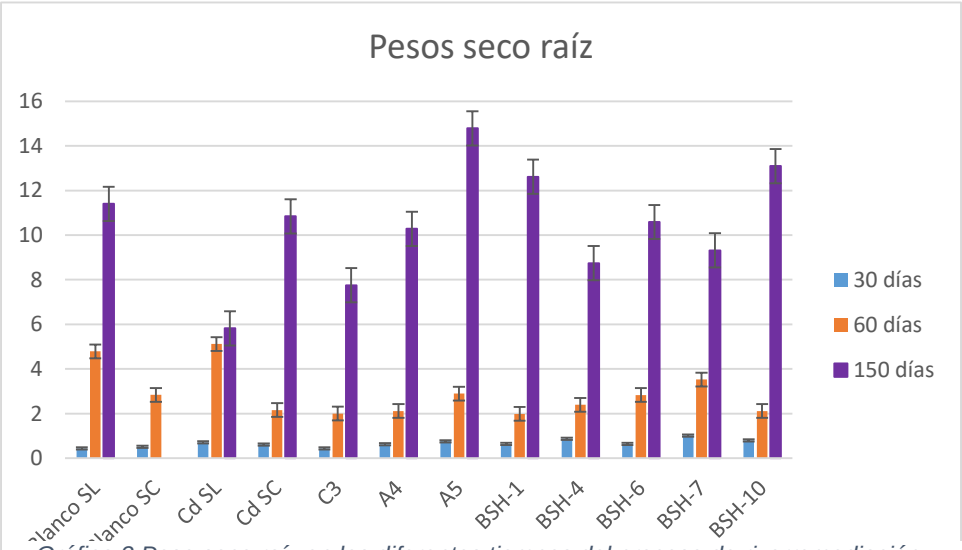
depende del tipo de petróleo, de los suelos, así como la especie vegetal que se utiliza y las condiciones de plantación.

A pesar de tener un buen desarrollo en las plantas, se vio la diferencia entre tratamientos con suelos limpios a suelos contaminados, como lo menciona García, *et al.*, (2013) donde presentaron una reducción significativa en área foliar, materia seca y volumen radical cuando se encontraban en suelos contaminados.

Peso seco de raíz

Después de determinar el peso fresco, las raíces fueron cuidadosamente separadas de los cladodios y secados para evaluar su peso. Los datos de pesos seco de las raíces se pueden observar en la Gráfica 3. En el primer mes no hay diferencia significativa entre los tratamientos, a los 60 días sólo los tratamientos con suelo limpio presentaron incrementos estadísticamente significativos respecto a los otros tratamientos, siendo el tratamiento CD SL el que tuvo mejor resultado con más de 5 gramos. Callupe (2018) menciona que los compuestos tóxicos de los contaminantes pueden retardar o inhibir los procesos de elongación de las raíces.

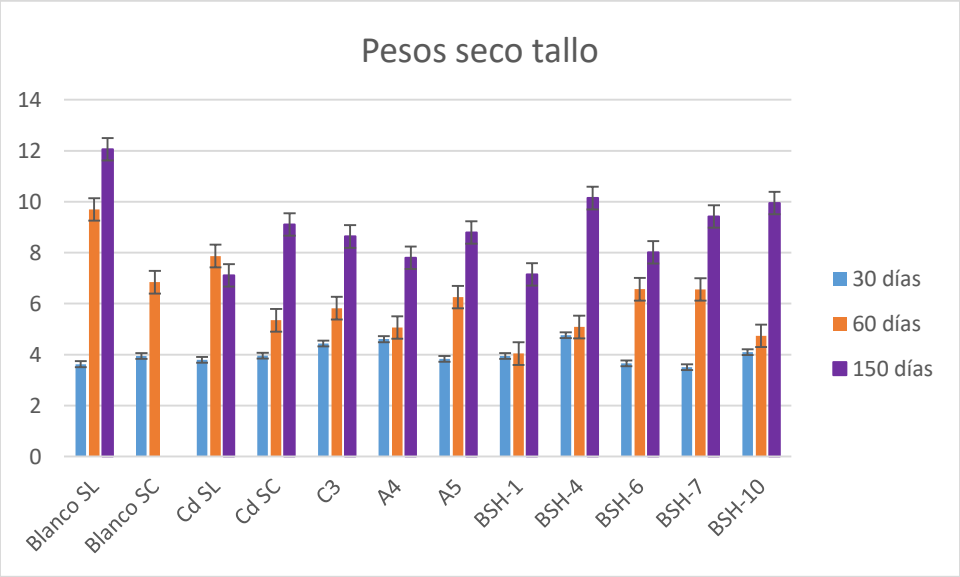
A los 150 días se observó el mayor incremento del peso seco de raíz, sobresaliendo los tratamientos inoculados con las cepas A5 y la BSH.10 con más producción de raíz 14.78g y 13.09g respectivamente.



Gráfica 3 Peso seco raíz en los diferentes tiempos del proceso de rizorremediación.

Tallos

Con respecto al peso seco de los tallos, a los 30 días no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos, teniendo un promedio de 4 gramos. A los 60 días se observó un incremento en los tratamientos, donde BCO SL fue el que tuvo mayor peso con 9.7 gramos, el tratamiento BSH-1 fue el que presentó menor peso 4.04 gramos encontrando diferencia estadísticamente significativa con respecto a los demás tratamientos. A los 150 días se puede ver que el tratamiento BCO SL presentó el mayor peso en tallo con 12.05 g, en el caso de los tratamientos, las cepas BSH-4, BSH-7, y BSH-10 mostraron el mayor peso de tallo 10.14, 9.43 y 9.95 respectivamente (Gráfica 4).



Gráfica 4 Peso seco en tallo en los diferentes tiempos en el proceso de rizorremediación.

En relación a la respuesta de rizorremediación del nopal se podría considerar lo que menciona Nedjimi (2021), respecto a que las plantas, se pueden clasificar como tolerantes y/o hiperacumuladoras cuando muestran un crecimiento rápido, alta producción de biomasa y son capaces de extraer y acumular altas cantidades de contaminantes sin signos de toxicidad. por lo que se pudiera concluir que las plantas de nopal asociadas con *Azospirillum* fueron capaces de adaptarse y degradar él contaminante y pudieran ser consideradas plantas tolerantes y degradadoras de hidrocarburos.

Conclusiones

- *Opuntia ficus* puede adaptarse y crecer en suelo contaminado con petróleo crudo a una concentración inicial de 12,146 ppm y degradar más del 70% del petróleo crudo.
- El tratamiento que presentó el mayor porcentaje de degradación de hidrocarburos en el ensayo de adaptación, fue el de *Opuntia ficus* inoculado con la cepa BSH-4 con el 77.06%.
- Durante el proceso de Rizorremediación se puede lograr la recuperación de algunas propiedades fisicoquímicas del suelo afectadas por la contaminación (materia orgánica, nitrógeno, fósforo y pH).
- Se obtuvieron tres cepas eficientes A5, BSH-7 y BSH-4. en la remoción del petróleo crudo en el ensayo de rizorremediación con un 78.30%, 77.54% y el 76.86% respectivamente.
- Los valores de HTP´s encontrados en suelo después de 30 días de tratamiento de rizorremediación fueron inferiores a los establecidos por la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, para suelos agrícolas.
- Se observó especificidad de respuesta en la rizorremediación con respecto a las cepas sobre el cultivo del nopal (*Opuntia*), que fueron aisladas de suelo y cultivo de tuna.
- La mayoría de las cepas de *Azospirillum* mostraron ser degradadoras de Hidrocarburos, productoras de biosurfactantes y fosfosolubilizadoras.
- Las cepas de *Azospirillum* mostraron actividad de reducción de acetileno por lo que pueden ser bacterias fijadoras de N_2, y favorecer el aporte de nitrógeno, beneficiando a la degradación del petróleo crudo y equilibrio de la relación C/N.
- La asociación *Opuntia ficus* - *Azospirillum spp,* fue estadísticamente significativa en la degradación de HTP´s y aumento en biomasa en comparación a los tratamientos sin inocular.

BIBLIOGRAFÍA

Acuña, A., Pucci, O., & Pucci, G. (2008). Caracterización de un proceso de biorremediación de hidrocarburos en deficiencia de nitrógeno en un suelo de Patagonia Argentina. *Ecosistemas*, 85-93.

Adams Schroeder, R., Domínguez Rodríguez, V., & García Hernández, L. (12 de Abril-Junio de 1999). Potencial de la biorremediación de suelo y agua impactados por petróleo en el trópico mexicano. *Terra Latinoamericana*, 159-174.

Aguilar Domínguez, A. L., Segovia Tagle, V., García Aguirre, K. K., & Herrera Mayorga, E. (2018). Evaluación de la producción de biosurgactante por dietzia sp. *Revista Latinoamericana el Ambiente y las Ciencias, 9*(21), 335-348.

Barrionuevo, M. R. (2017). Producción de biosurfactantes bacterianos para su uso en procesos de biotratameinto de efluentes industriales con contenido en metales. (U. d. Aires, Ed.) *Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.*

Bashan, Y., & de Bashan, L. E. (2015). Inoculant Preparation and Formulations for Azospirillum spp. En F. D. Cassán, Y. Okon, & C. M. Creus, *Handbook for Azospirillum* (págs. 469-486). Switzerland: Springer.

Bashan, Y., Holguin, G., & E. de Bashan, L. (2004). Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances. *Canadian Journal of Microbiology*, 521-577.

Bashan, Y., Kamnev, A. A., & de-Bashan, L. E. (2013). A proposal for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth. *Biol. Fertil Soils*, 49.

Becerra Gutiérrez, L. K., & Horna Acevedo, M. V. (2016). Aislamiento de microorganismos productores de biosurfactantes y lipasas a partir de efluentes residuales de camales y suelos contaminados con hidrocarburos. *Scientia Agropecuaria, 7*(1), 23-31.

Benavides López de Mesa, J., Quintero, G., Guevara Vizcaíno, A. L., Jaime Cáceres, D. C., Gutiérrez Riaño, S. M., & Miranda, G. J. (2006). Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *NOVA, 4*(5), 82-90.

Benjumeda Muñoz, D. (2017). Bacterias Promotoras Del Crecimiento Vegetal: Mecanismos y Aplicaciones. *Departamento de Microbiología y Parasitología*, 1-39.

Caballero Mellado, J. (2 de 03 de 2001). *Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno*. Obtenido de El género Azospirillum: http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap10/

Cabanillas Caroajulca, J. W., & Pissani Piedra, V. H. (2015). *Efecto de la Bioaumentación y Bioestimulación en la Eficiencia de Biorremediación de Suelos Contaminados con Hidrocarburos de Petróleo.* Lambayeque: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

Cakmakci, R., Dönmez, F., Aydin, A., & Sahin , F. (2006). Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. *Soil Biology & Biochemistry, 38*, 1482-1487.

Callupe Vargas, N. J. (2018). Determinación de la Toxicidad en suelos contaminados por hidrocarburos mediante bioensayos con semillas de Lechuga (Lactuca sativa L.), Cebolla (Allium cepa L.) y Rabanito (Raphanus sativus L.). *Universidad Nacional Agraria de la Selva*, 124.

Calvo García, S. (2011). Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. *Universidad de Salamanca*, 173-186.

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. *ASyD*, 539-550.

Cervantes Ramírez, M. C. (2005). Plantas de Importancia Económica en Zonas Áridas y Semiáridas de México. (U. d. Paulo, Ed.) *Anais do X Encontro de Geógrafos de América Latina*, 3388-3407.

Chandra, R., Dubey, N. K., & Kumar, V. (2018). Phytoremediation: A Green Sustainable Technology for Industrial Waste Management. En *Phytoremediation of Envioronmental Pollutants* (págs. 1-42). Uttar Pradesh: Taylor & Francis Group.

Chaudhry, Q., Blom-Zandstra, M., Gupta, S., & Joner, E. (2005). Utilising the Synergy between Plants and Rhizosphere Microorganisms to Enhance Breakdown of Organic Pollutants in the Environment. *Environ Sci & Pollut Res*, 34-48.

Chibuike G, U., & Obiora S, C. (2013). Bioremediation of hydrocarbon-polluted soils for impoved crop performance. *International Journal of Environmental Sciences, 4*(3), 223-230.

Chi-Yuan, F., & Krishnamurthy, S. (2012). Enzymes for Enhancing Bioremediation of Petroleum-Contaminated Soils: A Brief Review. *J. Air & Waste Manage*, 453-460.

Cruz Hernández, M. A., Jiménez Andrade, J. M., & Mendoza Herrera, A. (2019). Caracterización del potencial de degradación de compuestos xenobióticos por la rizobacteria Azospirillum brasilense. *Mexican Journal of Biotechnology, 4*(2), 10-22.

Cunningham, S. D., Anderson, T. A., Schwab, P. A., & Hsu, F. C. (1996). Advances in Agronomy. En *Phytoremediation of Soils Contaminated with Organic Pollutants* (págs. 56-114). Academic Press.

Curiel Iñiguez, N. P. (2018). Análisis del Efecto de la Contaminación con Gasolina en los asentamientos por consolidación secundaria en una arcilla expansiva. *Universidad Autónoma de Querétaro*, 138.

Curiel Ruiz, V. A., Delgadillo Martínez, J., & Moreno Medina, D. A. (2018). Bacterias hidrocarbonoclastas modificadas genéticamente para emplearlas como herramienta de visualización. *Revista Multidisciplinaria de Avances de Investigación, 3*(3), 33-42.

De la Rosa Cruz, N. L., Sánchez Salinas, E., & Ortíz Hernández, M. L. (2014). Biosurfactantes y su papel en la biorremediación de suelos contaminados con plaguicidas. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal, 5*(1), 47-67.

Deacon, J. (2021). *The Nitrogen cycle and Nitrogen fixation*. Obtenido de Institute of Cell and Molecular Biology, The University of Edinburgh: http://archive.bio.ed.ac.uk/jdeacon/microbes/nitrogen.htm

Díaz Franco, A., Maya Hernández, V., Álvarez Ojeda, M. G., & de la Garza Caballero, M. (2014). Tecnología para la Producción Intensiva de Nopal para Verdura en Tamaulipas. En *Folleto para productores* (Primera ed., págs. 4-29). México: Centro de Investigación Regional del Noreste.

Dobereiner, J., & Day , J. M. (1976). Associative symbiosis in tropical grasses: Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. *Procceding of the first international symposium on nitrogen fixation, 2*, 518-538.

Döbereiner, J., & Pedrosa, F. O. (1987). *Nitrogen-fixing Bacteria in Nonleguminous Crop Plants.* Madison: Science Tech/Springer Verlag.

Durán Jaramillo, A. (2019). Identificación y cuantificación relativa de genes involucrados en la biosíntesis de biosurfactantes en bacterias marinas. *Centro de investigación en Biotecnología*, 1-64.

Dzantor, K. E. (2007). Phytoremediation: the state of rhizosphere "engineering" for accelerated rhizodegradation of xenobiotic contaminants. *Chemical Technology and Biotechnology*, 228-232.

Escobar Alvarado, L. F., Vaca Mier, M., López Calleja, R., & Rojas Valencia, N. M. (2018). Efficiency of Opuntia ficus in the phytoremediation of a soil contaminated with used motor oil and lead, compared to that of Lolium perenne and Aloe barbadensis. *International Journal of Phytoremediation, 20*(2), 184-189.

FCH. (2019). *Manual de Tecnologías de Remediación de Sitios.* Chile: Gobierno de Chile. Obtenido de https://fch.cl/wp-content/uploads/2019/10/manual-de-tecnologias-de-remediacion-de-sitios-contaminados_baja-1.pdf

Fernández, M. T. (2007). Fósforo: amigo o enemigo. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, XLI*(2), 51-57.

Ferrera Cerrato, R., Rojas Avelizapa, N. G., Poggi Varaldo, H. M., Alarcón, A., & Cañizares Villanueva, R. O. (2006). Procesos de biorremediación del suelo y agua contaminada por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Revista Latinoamericana de Microbiología, 48*(2), 179-187.

Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., & Banat, I. M. (2010). (Bio)surfactant and Bioremediation, Successes and Failures. *Trends in Bioremediation and Phytoremediation*, 145-156.

Galazka, A., Krol, M., & Perzynski, A. (2012). The Efficiency or Rhizosphere Bioremediation with Azospirillum sp. and Pseudomonas stutzeri in Soils Freshly Contaminated with PAHs and Diesel Fuel. *Pol. J. Envieron.*, 345-353.

García , E., Ferrera , R., Almaráz, J. J., Rodríguez, R., & García, E. (Diciembre de 2013). Biodegradación de queroseno en la rizósfera de gramíneas en condiciones de invernadero. *Agronomía Costarricense, 37*(2), 125-134.

Germida, J., Frick, C., & Farrell, R. (2002). Phytoremediation of oil-contaminated soils. *Soil Science, 28B*, 169-186.

Godheja, J., Shekhar, S. K., & Modi, D. R. (2017). Bacterial Rhizoremediation or Petroleum Hydrocarbons. *Springer Nature Singapore*, 495-519.

Hernández A., E., Ferrera-Cerrato, R., & Rodríguez V, R. (2003). Bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno atmosférico en rizósfera de frijol contaminada con queroseno. *Terra Latinoamericana, 21*(1), 81-38.

Hernández Acosta, E., Gutiérrez Castorena, M. d., Rubiños Panta, J. E., & Alvarado López, J. (2006). Caracterización del suelo y plantas de un sitio contaminado con hidrocarburos. (A. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, Ed.) *Terra Latinoamericana, 24*(4), 463-470.

Hoang, S. A., Lamb, D., Seshadri, B., Sarkar, B., Choppala, G., Kirkham, M. B., & Bolan, N. S. (2020). Rhizoremediation as a green technology for the remediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials*, 1-80.

Hossain, M. M., Jahan, I., Akter, S., Rahman, N., & Rahman, B. (2015). Isolation and identification of Azospirillum isolates from different paddy fields of North Bengal. *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology, 3*(1), 74-80.

Hussain, I., Puschenreiter, M., Gerhard, S., Schöftner, P., Yousaf, S., Wang, A., . . . Reichenauer, T. (2017). Rhizoremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soils: Improvement opportunities and field applications. *El Sevier*, 202-219.

Ibarra Sánchez, C. L. (2010). Diversidad de Bacterias Fijadoras de Nitrógeno Aisladas de Suelo de Chinampa y su Efecto en plantas de Interes Agrícola. *Escuela Nacional de Ciencias Biológicas Sección de Estudios de Posgrado e Investigación*.

Inglese, P., Liguori, G., & De la Barrera, E. (2018). Ecofisiologia y biología reproductiva de los nopales cultivados. En O. d. Agricultura, *Ecologia del cultivo, manejo y usos del nopal* (págs. 32-44). Chile: ICARDA.

Inglese, P., Mondragon Jacobo, C., Nefzaoui, A., & Sáenz, C. (2018). *Ecología del Cultivo, Manejo y Usos del Nopal.* Roma: FAO.

Jiménez Salgado, T., Mauricio Gutiérrez, A., & Tapia Hernández, R. A. (2018). Distribución de Azospirillum spp. y desarrollo biotecnológico para mejora de los ecosistemas. En *Modelos microbianos para la investigación básica y la Biotecnología* (págs. 117-147). Puebla: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Julca Otiniano, A., Meneses Florián, L., Blas Sevillano, R., & Bello Amez, S. (2006). La Materia Orgánica, Importancia y Experiencias de su Uso en la Agricultura. *IDESIA, 24*(1), 46-51.

Kayode, J., & Oyedeji, A. (Mayo de 2009). Evaluation of the Effects of Pollution with Spent Lubricanting Oil on the Physical and Chemical Properties of Soil. *Pacific Journal of Science and Technology, 10*(1), 387-391.

Kondo, S. (s.f.). *Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal* . Obtenido de Caldo Bordelés Guia Técnica 5:

https://www.jica.go.jp/project/elsalvador/0603028/pdf/production/vegetable_05.pdf

Kumar Rai, P. (2018). Phytoremediation: Concept, Principles, Mechanims, and Applications. En *Phytoremediation of Emerging Contaminants in Wetlands* (págs. 31-45). Boca Raton: Taylor & Francis Group.

Lacasta, C., Benitez, M., Maire, N., & Meco, R. (2006). Efecto de la textura del suelo sobre diferentes parámetros bioquímicos. *VII Congreso SEAE: Agricultura y Alimentación Ecológica*.

Llaven Anzures, Y. (06 de 07 de 2016). Robo de hidrocarburo en Puebla ocupa primer lugar nacional. *La Jornada de Oriente*, pág. 1.

LLuch Urpí, J. (2011). El crudo del petróleo. En *Tecnología y Margen de Refino del Petróleo* (págs. 1-19). Madrid: Díaz de Santos.

López Rosales, M. C. (2011). Azospirrillum ssp. asociada a plantas de Agave salmiana variedades San Isidro y Chalqueño del municipio de Nanacamilpa, Tlaxcala. *Laboratorio de Microbiología de Suelos ICUAP*.

Marín Vázquez, C. L. (2020). Rizorremediación de suelos agrícolas contaminados con diésel de la zona de Acatzingo, Puebla. *Benemérita Universidad Autónoma de Puebla*, 1-71.

Martin, B. C., George, S. J., Price, C. A., Ryan, M. H., & Tibbett, M. (2014). The role of root exuded low molecular weight organic anions in facilitating petroleum hydrocarbon degradation: Current knowledge and future directions. *Science of the Total Environment*, 642-653.

Martínez, V., & López, F. (2001). Efecto de hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de suelo arcillosos. *Tierra Latinoamericana, 19*(1), 17.

Massena Reis, V., Divan Baldani, V. L., & Ivo Baldani, J. (2015). Isolation, Identification and Biochemical Characterization of Azospirillum spp. and Other Nitrogen-Fixing

Bacteria. En F. D. Cassán, Y. Okon, & C. M. Creus, *Handbook for Azospirillum Technical Issues and Protocols* (págs. 3-26). Argentina: Springer.

Mayz Figueroa, J. (2004). Fijación biológica de nitrógeno. *UDO Agrícola*, 1-20.

Mondragón Jacobo, C., & Pérez González , S. (2003). *El nopal (Opuntia spp.) como Forraje.* Roma: FAO.

Morales Bautista, C. M., Lobato García, C. E., Flores Jiménez, J., & Mendez Olán, C. (2019). Cambios en las propiedades físicas y químicas de un suelo debido a un proceso de restauración aplicando a un derrame de hidrocarburos. *Acta Universitaria, 29*, 1-14.

Navarro Blaya, S., & Navarro García, G. (2003). El Nitrógeno en el suelo. En *Química Agricola: El Suelo y los elementos químicos esenciales para la vida vegetal* (págs. 183-190). Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.

Nedjimi, B. (2021). Phytoremediation: a sustainable environmental technology for heavy metals decontamination. *SN Applied Sciences, 3*(286).

Nharingo, T., & Moyo, M. (2019). Application of Opuntia ficus-indica in bioremediation of wastewaters. *Journal of Environmental Management, 241*, 156-166.

NORMA Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación.

NORMA Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000, Especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis.

Njoku, K., Akinola, M., & Oboh, B. (2009). Phytoremediation of crude oil contaminated soil: The effect of growth of Glycine max on the physico-chemistry and crude oil contents of soil. *Nature and Science, 7*(10), 79-87.

Okon, Y., Albrecht, S. L., & Burris, R. H. (1976). Factor Affecting Growth and Nitrogen Fixation of Spirillum lipoferum. *Journal of Bacteriology, 127*(3), 1248-1254.

Ortínez Brito, O., Ize Lema, I., & Gavilán García, A. (2003). La restauración de suelos contaminados con hidrocarburos. *Gaceta Ecológica, 69*, 83-92.

Ortiz Bernad, I., Sanz García, J., Dorado Valiño, M., & Villar Fernández, S. (2007). La Recuperación de suelos contaminados. En *Técnicas de recuperación de suelos contaminados* (págs. 29-57). Madrid: Circulo de Innovación de tecnologías Medioambientales y Energías.

Ortíz Diaz, D., & Silva Leal, J. A. (2019). Efectos ambientales de los hidrocarburos. *Especialización de Control de la Contaminación Ambiental*.

Osorio, N. W. (2012). pH del Suelo y disponibilidad de nutrientes. *Manejo integral del Suelo y Nutrición Vegetal, 1*(4), 1-4.

Padilla, A. (02 de 03 de 2020). *Robo de Combustible en Puebla, del año 2000 a 2019.* Obtenido de Gobierno Fácil: http://gobiernofacil.com/proyectos/robo-de-combustible-en-puebla

Parra, Y., & Cuevas, F. (2002). Potencialidades de Azospirillum como inoculante para la Agricultura. *Cultivos Tropicales, 23*(3), 31-41.

Pawlak, Z., Rauckyte, T., & Oloyede, A. (2008). Oil, grease and used petroleum oil management and environmental economic issues. *Jornal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering, 26*(1), 11-17.

Paz-Alberto, A. M., & C. Sigua, G. (2013). Phytoremediation: A Green Technology to Remove Environmental Pollutants. *American Journal of Climate Change*, 71-86.

PEMEX. (20 de 12 de 2018). *PEMEX*. Recuperado el 15 de 04 de 2017, de http://www.pemex.com/acerca/informes_publicaciones/Paginas/tomas-clandestinas.aspx

Peralta Pérez, M., & Volke Sepúlveda, T. (2012). La defensa antioxidante en las plantas: una herramienta clave para la fitorremediación. *Revista mexicana de ingeniería química*, 75-88.

Pérez Doroteo, B. (2019). Evaluación de la respuesta de cladodios de nopal verduta (Opuntia ficus-indica) a la inoculación de Azospirillum sp., bajo condiciones de estrés hídrico y térmico. *Facultad de Ciencias Biológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla*, 1-78.

Pérez Montero, S., Ramírez Díaz, I. J., & Escalante Espinosa, E. (2012). Aplicación y beneficios de los inóculos bacterianos en la fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Kuxulkab, 18*(35), 39-44.

Pérez Pazos, J. V., & Sánchez López, D. B. (Diciembre de 2017). Caracterización y efecto de Azotobacter, Azospirillum y Pseudomonas asociadas a Ipomoea Batatas del Caribe Colombiano. *Colombiana de Biotecnología, 19*(2), 35-46.

Pinedo Alonso, J. (2014). Evaluación de riesgos en suelos afectados por hidrocarburos del petróleo. *Universidad de Cantabria*, 27.

Porta Casanellas, J., Lopez-Acevedo Reguerin, M., & Poch Claret, R. (2014). *Edafología: uso y protección de suelos* (Tercera ed.). Madrid, España: Mundi-Prensa.

Porta Casanellas, J., López-Acevedo Reguerín, M., & Roquero de Laburu, C. (2003). Edafología. En Porta Casanellas, *Edafología. Para la Agricultura y el medio ambiente.* (Tercera ed., págs. 61-64). Barcelona, Madrid, España: Mundi-Prensa.

Prieto García, F., Filardo Kerslup, S., Pérez Cruz, E., Beltrán Hernández, R., Román Gutiérrez, A., & Méndez Marzo, M. (2006). Caracterización física y química de semillasde opuntias (Opuntia spp.) cultivadas en el Estado de Hidalgo, México. *Bioagro, 18*(3), 163-169.

Primo Yúfera, E. (1994). *Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria.* Barcelona: Reverté.

Ramos Vásquez, E., & Zúñiga Dávila, D. (2008). Efecto de la Humedad, Temperatura y pH del suelo en la Actividad Microbiana a nivel de Laboratorio. *Ecología Aplicada*.

Ranjan, A., Rajan Mahalakshmi, M., & Sridevi, M. (2013). Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacterial species from different crop fields of Salem, Tamil Nadu, India. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, 3*(1), 29-33.

Regvar, M. (2008). Integrating Vegetation Ecology into Contemporary Phytoremediation Technologies: A Functional Approach to Phytoremediation. (H. Schroder, Ed.) *Grassland*.

Restrepo Franco, G. M., Marulancia Moreno, S., De la Fe Pérez , Y., Díaz de la Osa, A., Lucia Baldani, V., & Hernández Rodríguez , A. (2015). Bacterias solubilizadoras de fosfatos y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *CENIC, 46*(1), 63-73.

Rivera Cruz, M. d., & Trujillo Narcía, A. (2004). Estudio de toxicidad vegetal en suelos con petróleos nuevo e intemperizado. *Interciencia, 29*(7), 369-376.

Rivera Cruz, M. d., Ferrera Cerrato, R., Sánchez García, P., Volke Haller, V., Fernández Linares, L., & Rodríguez Vázquez, R. (2004). Descontaminación de suelos con petróleo crudo mediante microorganismos autóctonos y pasto Alemán (Echinochloa polystachya (H.B.K.) Hitchc.). *Agrociencia, 38*(1), 1-12.

Robles Contreras, F., Macías Duarte, R., & Grijalva Contreras, R. L. (2008). Tecnología de Producción de Nopal Verdura para el Noroeste de Sonora. *Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias*, 3-35.

Romero García, A. S. (2002). *Cromatografía.*

Ruiz Espinoza, F. H., Alvarado Mendoza, J. F., Murillo Amador, B., García Hernández, J. L., Pargas Lara, R., Duarte Osuna, J., . . . Fenech Larios, L. (2008). Rendimiento y Crecimiento de Nopalitos de Cultivares de Nopal (Opuntia ficus-indica) bajo Diferentes Densidades de Plantación. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 22-35.

Sáenz, C. (2006). Los nopales como recurso natural. En *Utilización agroindustrial del nopal* (págs. 1-5). Chile: FAO.

Safronova, V., Belimov, A., & Bullitta, S. (2011). Use of Legume-microbe symbioses for Phytoremediation of Heavy Metal Polluted Soils: Advantages and Potential Problems. *Handbook of Phytoremediation*, 443-469.

Sánchez Cote, V. (2016). Rizorremediación de un suelo contminado con petróleo crudo empleando Erythrina americana-Azospirillum sp. *Benemérita Universidad Autónoma de Puebla*, 1-71.

Sánchez Yáñez, J. M. (2006). Bacterias promotoras de crecimiento vegetal. *Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*.

Schlegel, F. (1996). El suelo. En F. &. Org. (Ed.), *Ecología y enseñanza rural: nociones ambientales básicas para profesores rurales y extensionistas* (pág. 187). FAO.

SEMARNAT. (17 de Mayo de 2018). *Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales*. Obtenido de Programa Nacional de Remediación de Sitios Contaminados : https://www.gob.mx/semarnat/documentos/programa-nacional-de-remediacion-de-sitios-contaminados,

Silva Arroyave, S. M., & Correa Restrepo, F. J. (Enero de 2009). Análisis de la Contaminación del suelo: Revisión de la Normativa y Posibilidades de Regulación Económica. *Semestre Económico, 12*(23), 13-34.

Simón, M., Peralta , N., & Costa, J. L. (2013). Relación entre la conductividad eléctrica aparente con propiedades del suelo y nutrientes. *Ciencia del Suelo, 31*(1), 45-55.

Skoog, D., Holler, J., & Nieman, T. (2000). *Principios de análisis instrumental* (Quinta ed.). Mc Graw Hill.

Solis, A. (23 de 01 de 2019). *Forbes México*. Obtenido de Los 5 estados con más huachicoleo durante 2018: https://www.forbes.com.mx/los-5-estados-con-mas-huachicoleo-durante-2018/

Turner, G., & Gibson, A. (1980). Measurement of Nitrogen Fixation by Indirect Means. En J. Wiley, *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation* (págs. 111-138). Bergersen.

Useros Fernández, J. L. (2013). El Cambio Climático: Sus causas y efectos medioambientales. *Anales de la Real Academia de Medicina y Cirugía de Valladolid*, 71-98.

Utkarsha U., Shedbalkar, Vinayak S., A., Jyoti P. , J., & Wishwas A., B. (2010). Opuntia and Other Cacti: Applications and Biotechnological Insights. *Tropical Plant Biol.*, 136-150.

V. Botello, A., Rendón von Osten, J., Gold-Bouchot, G., & Agraz Hernández, C. (2005). *Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencia.* Universidad Autónoma de Campeche, Universidad Nacional Autóoma de México, Insituto Nacional de Ecología.

V. Botello, A., Rendón von Osten, J., Gold-Bouchot, G., & Agraz-Hernández, C. (2005). *Características, Composición y Propiedades Fisicoquímicas del Petróleo* (Segunda ed.). Campeche.

Vargas Rojas, R. (2009). Guía para la descripción de suelos. En O. d. Alimentación, *Guía para la descripción de suelos.* Roma: FAO.

Vázquez Alvarado, R. E., Blanco Macías, F., Ojeda Zacarías, M., Martínez López, J. R., Valdez Cepeda, R. D., Santos Haliscak, A., & Háuad Marroquín, L. A. (2011). Reforestación a base de Nopal y Maguey para la conservación de suelo y agua. *Salud Pública y Nutrición*, 185-203.

Volke Sepúlveda , T., & Velasco Trejo, J. (2002). *Tecnologías de remediación para suelos contaminados.* México: INE-SEMARNAT.

Walter W., W. (2008). Rhizosphere processes and management in plant-assisted bioremediation (phytoremediation) of soils. *Springer Science*, 385-408.

Wang, Y., Feng, J., Lin, Q., Lyu, X., Wang, X., & Guoping, W. (2013). Effects of Crude Oil Contamination on Soil Physical and Chemical Properties in Momoge Wetland of China. *Chinese Geographical Science, 23*(6), 708-715.

Wang, Z., Xu, G., Ma, P., Lin, Y., Yang, X., & Cao, C. (2017). Isolation and Characterization of a Phosphorus-Solubilizing Bacterium from Rhizosphere Soils and its Colonization of Chinese Cabbage (Brassica campestris ssp. chinensis). *Frontiers in Microbiology, 8*(1270).

Wauquier, J.-P. (2004). *El refino del petróleo: petróleo crudo, productos petrolíferos, esquemas de fabricación.* Madrid: Ediciones Díaz de Santos.

Werner, D., & Newton, W. (2005). *Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Evironment.* Netherlands: Springer.

Yerushalmi, L., Rocheleau, S., Cimpola, R., Sarrazin, M., Sunahara, G., Peisajovich, A., . . . Guiot, S. R. (1998). Enhanced Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons in Contaminated Soil. *Journal of Soil Contamination*, 35-51.

Zahermand, S., Vafaeian, M., & Hosein Bazyar, M. (2020). Analysis of the physical and chemical properties of soil contaminated with oil (petroleum) hydrocarbons. *Earth Sciences Research Journal, 24*(2), 163-168.

Zamora, A., Ramos , J., & Arias, M. (2012). Efectos de la contaminación por hidrocarburos sobre algunas propiedades químicas y microbiológicas de un suelo de sabana. *Bioagro, 24*(1), 5-12.

Zhang, X., Xu, D., Zhu, C., Lundaa, T., & Scherr, K. E. (2012). Isolation and identification of biosurfactant producing and crude oil degrading Pseudomonas aeruginosa strains. *Chemical Engineering Journal, 209*, 138-146.

ANEXOS

Anexo 1. Clasificación de pH en la norma NOM-021-RECNAT-2000.

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

Anexo 2. Interpretación de conductividad Eléctrica en la norma NOM-021-RECNAT-2000.

Interpretación de conductividad eléctrica

CE dS m^{-1} a 25°C	Efectos
< 1.0	Efectos despreciables de la salinidad
1.1 - 2.0	Muy ligeramente salino
2.1 - 4.0	Moderadamente salino
4.1 - 8.0	Suelo salino
8.1 - 16.0	Fuertemente salino
> 16.0	Muy fuertemente salino

Anexo 3. Interpretación de Materia Orgánica en la NOM-021-RECNAT-2000.

Interpretación de Resultados de Materia Orgánica

Los valores de referencia para clasificar la concentración de la materia orgánica en los suelos minerales y volcánicos se presenta en el cuadro siguiente:

Clase	Materia orgánica (%)	
	Suelos volcánicos	Suelos no volcánicos
Muy bajo	< 4.0	< 0.5
Bajo	4.1 - 6.0	0.6 - 1.5
Medio	6.1 - 10.9	1.6 - 3.5
Alto	11.0 - 16.0	3.6 - 6.0
Muy Alto	> 16.1	> 6.0