



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Evaluación de la supervivencia de los aislados *Azotobacter vinelandii* S4Ta y *Azotobacter chroococcum* SM3.2 en presencia de hidrocarburos, producción de alginato y su capacidad promotora del crecimiento vegetal en el modelo de *Raphanus sativus* L.

Tesis que para obtener el título de

LICENCIADO EN BIÓLOGIA

PRESENTA:

Jesús Manuel Tadeo Antonio

DIRECTORA: Dra. Dalia Molina Romero
CO-DIRECTORA: Dra. Liliana López Pliego



Diciembre , 2025

DEDICATORIA

A Dios, por permitirme haber entrado a esta carrera y ser mi compañero más fiel hasta el último día, que a pesar de mis temores y miedos me sostuvo aun cuando dudé de mis propias fuerzas.

A mi madre hermosa, cuyo amor incondicional no conoce límites. Gracias por tu paciencia cuando el cansancio me vencía, por tus palabras de aliento cuando yo ya no podía más, por mostrarme, con tu ejemplo, que la perseverancia también es una forma de fe. A mi padre, que aun en momentos complicados nunca dejó de ser un apoyo firme, por enseñarme que avanzar requiere de coraje.

A mi hermana, mi compañía y risas en los días complicados. Gracias por siempre motivarme a seguir soñando, por recordarme que el ingenio puede abrir más caminos cuando el mundo parece estrecho, y por insistir a emprender sin miedo, dentro y fuera de la carrera.

Gracias a mi familia, que me esperó con paciencia mientras construía mi camino. Gracias por comprender mis ausencias, por celebrar mis pequeños pasos y por sostenerme cuando el peso de la responsabilidad parecía demasiado.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora, la Dra. Dalia Molina, por todo el apoyo y comprensión a lo largo de la carrera y sobre todo en mi estancia en el laboratorio, por sus conocimientos y por ser un pilar fundamental en mi vida académica, porque sin usted este trabajo no habría sido posible.

A mi co-asesora, la Dra. Liliana López Pliego, por la confianza y ayuda que me brindó durante la realización de esta tesis.

A mis compañeros y amigos, Reyna y Jorge por ayudarme y motivarme durante el tiempo que compartí con ellos en el laboratorio. A Reyna porque fue la mejor maestra que pude haber tenido, y a Jorge porque fue el mejor compañero a lo largo de toda la tesis, lleno de chisme y momentos divertidos.

A Ángel, Armando, Marisel, Fernando, Lili, Aramis, Jess y todas las demás personas que estuvieron dentro del mejor laboratorio el “Lab 330”, porque fueron más que mis compañeros de laboratorio, se convirtieron en mis amigos, ustedes hicieron especial mi tiempo en el laboratorio, todos los días me sacaron una sonrisa, me ayudaron cada vez que lo necesitaba y me animaron siempre.

A la familia pastoral y a todos mis amigos y compañeros de la iglesia Puerta del Cielo, Puebla y Tehuacán, por su constante apoyo y motivación para seguir adelante. Gracias por tenerme siempre presente en sus oraciones.

A todos, muchas gracias por ser un refugio y fuerza.

INDICE

Resumen	6
Introducción.....	7
Marco Teórico.....	12
Mecanismos de las PGPR contra los Hidrocarburos	12
Eficiencia en la Producción de Exopolisacáridos en Biorremediación	14
<i>Azotobacter</i> y los Metales Pesados	15
Antecedentes.....	16
Especies del género <i>Azotobacter</i>	16
Metabolismo de Alginato.....	18
Modelo Vegetal	20
Justificación	23
Hipótesis	23
Pregunta de Investigación.....	23
Objetivo General.....	24
Objetivos Específicos.....	24
Materiales y Métodos	24
Material biológico	24
Supervivencia y Crecimiento en Presencia de Hidrocarburos	25
Determinación de la Producción de Alginato	26
Determinación de Proteínas Totales.....	28
Desinfección y Germinación de Semillas.....	30
Condiciones de Invernadero y Riego	31
Preparación de los Inóculos.....	31
Inoculación de Bacterias.....	32

Cosecha y Toma de Datos Morfométricos	32
Evaluación de la Presencia de Bacterias en la raíz	33
Análisis Estadístico	34
Resultados	34
Supervivencia Bacteriana a Hidrocarburos	34
Evaluación de la Producción de Alginato	39
Promoción de crecimiento de la PGPR en <i>Raphanus sativus</i> L.	44
Evaluación de la Presencia de Bacterias en la Raíz de <i>R. sativus</i> L.	48
Discusión	49
Supervivencia Bacteriana a Hidrocarburos	49
Evaluación de la Producción de Alginato	51
Promoción de Crecimiento de la PGPR en <i>Raphanus sativus</i> L.....	55
Evaluación de la Presencia de Bacterias en la Raíz de <i>R. sativus</i> L.	57
Conclusiones	58
Perspectivas	58
Bibliografía.....	59

Resumen

Azotobacter sp., es una γ -Proteobacteria, que pertenece a la familia Pseudomonadaceae, esta bacteria es un bacilo Gram negativo, aerobia estricta y fijadora de nitrógeno. Este microorganismo es considerado una bacteria promotora del crecimiento vegetal, capaz de producir Ácido Indolacético, solubilizar fosfatos y producir sideróforos. El presente estudio evaluó la supervivencia de dos aislados de *Azotobacter sp.* (*Azotobacter vinelandii* S4Ta y *Azotobacter chroococcum* SM3.2) ante la presencia de hidrocarburos (gasolina y diésel), su capacidad para producir alginato utilizando diferentes fuentes de carbono (sacarosa y fructosa) e hidrocarburos, además se probó si promueven el crecimiento vegetal en el modelo de rábano (*Raphanus sativus* L). Para evaluar la supervivencia de los aislados, se realizaron ensayos de crecimiento bacteriano en medios con diferentes concentraciones de hidrocarburos (2 al 4%); y en combinación con sacarosa e hidrocarburo, en un periodo de tiempo de 168 horas. Se determinó la población bacteriana mediante el método de goteo por sellado masivo en placa. Los datos fueron analizados estadísticamente por medio de una ANOVA de una vía y una prueba Tukey. Adicionalmente, se cuantificó la producción de alginato mediante el método de carbazol, mientras que los datos fueron analizados estadísticamente por medio de una ANOVA de dos vías y una prueba Tukey. Finalmente, se analizó la actividad como bacteria promotora de crecimiento vegetal a través de la medición de los datos morfométricos, esta evaluación se analizó estadísticamente aplicando una ANOVA de una vía. Los resultados demostraron que los aislados de *Azotobacter sp.* son capaces de sobrevivir hasta concentraciones del 4% en presencia de diésel a diferencia de gasolina y la combinación de sacarosa 1% con hidrocarburo al 2%. Adicionalmente, la producción de alginato de los aislados fue similar a la cepa control en presencia de una fuente de carbono combinada de sacarosa y diésel, es importante destacar que el aislado *Azotobacter vinelandii* S4Ta produjo mayor cantidad de alginato en las fuentes de carbono sacarosa y fructosa en comparación a la cepa control y el aislado *Azotobacter chroococcum* SM3.2.

Respecto a la capacidad de promover el crecimiento vegetal, las plantas inoculadas con los aislados presentaron mejoras en la morfología de la planta, como en el peso seco foliar y radicular, así como en la longitud de la planta con los tratamientos mono-inoculados, es importante destacar que el principal incremento del crecimiento vegetal se observó en las plantas con co-inoculación. En conclusión, los aislados *Azotobacter vinelandii* S4Ta y *Azotobacter chroococcum* SM3.2 demostraron tolerancia a la presencia de hidrocarburos (diésel y gasolina), presentaron producción de alginato con variación en función de la fuente de carbono y mejoraron el desarrollo vegetal de *Raphanus sativus* L., cuando es inoculado con *Azotobacter* sp.

Introducción

La explotación demográfica, la industrialización, la urbanización y el turismo son los factores más significativos del deterioro ambiental que se ha ido produciendo. Estos factores aumentan el uso de petróleo y sus derivados, lo cual produce residuos que conllevan a la acumulación de desechos tóxicos, sobre todo en el suelo (Vásquez *et al.*, 2010).

Cada año, se generan 4.514 millones de toneladas de petróleo alrededor del mundo (Fernández, 2024). México ocupa el décimo lugar entre los países que más petróleo crudo producen en todo el mundo (PEMEX, 2016). La infraestructura del sector de hidrocarburos incluye las instalaciones y los equipos requeridos para la venta, el transporte, el procesamiento, la extracción y la exploración del petróleo y gas natural. No obstante, estas actividades generan vector de contaminación, como humos, gases y aguas residuales, que se producen debido a filtraciones en tuberías, ductos o tanques. Estos daños son muy serios para el agua, el aire y el suelo (Brito *et al.*, 2003; Vogler, 2024).

Una de las sustancias contaminantes que más daño hace al medio ambiente es el petróleo; los derrames de hidrocarburos en el suelo dificultan la transferencia de gases hacia la atmósfera, lo que altera procesos fisicoquímicos como la evaporación y la capilaridad. Dependiendo de factores como el tipo de hidrocarburo, la

temperatura, la humedad y la textura del suelo, provocan que estos procesos se pueden volver lentos, provocando la toxicidad en el suelo y aguas contaminadas (Vásquez *et al.*, 2010)

En México, la Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012 establece los límites máximos permitidos de hidrocarburos en el suelo. Dicha norma establece los valores máximos para diferentes fracciones de hidrocarburos, considerando el tipo de hidrocarburo existente y el uso del terreno (agrícola, residencial, industrial, ambiental, fuente de emisión y nivel de riesgo). La clasificación de estos compuestos se basa en su rango de carbonos:

- **Fracción 1 (C6-C10):** Hidrocarburos ligeros.
 - **Uso Agrícola/Residencial:** < 50 mg/kg.
 - **Uso Industrial:** < 100 mg/kg.
- **Fracción 2 (C10-C28):** Hidrocarburos medios.
 - **Uso Agrícola/Residencial:** < 1,000 mg/kg.
 - **Uso Industrial:** < 3,000 mg/kg.
- **Fracción 3 (C28-C40):** Hidrocarburos pesados.
 - **Uso Agrícola/Residencial:** < 2,000 mg/kg.
 - **Uso Industrial:** < 4,000 mg/kg.

Ante la necesidad de contrarrestar las consecuencias que los hidrocarburos tienen en el terreno, se han desarrollado diversas tecnologías para la remediación de suelos contaminados. De acuerdo a Volkle y Velasco (2002), las tecnologías de remediación se pueden agrupar en tres tipos: a) fisicoquímicos, que incluyen la electrorremediación, el lavado y la solidificación/estabilización, donde se aprovechan las propiedades químicas y físicas de los contaminantes para eliminar, separar o contener la contaminación; b) térmicas, que abarcan la incineración, la vitrificación y la desorción térmica, empleando el calor durante el proceso con el fin de favorecer la volatilización, quemar, descomponer o inmovilizar los contaminantes; c) biológicos, como la bioestimulación, fitorremediación, biorremediación o biolabranza, apaleando al uso de acciones metabólicas de ciertos

organismos para llevar a cabo la degradación, transformación o eliminación de contaminantes en productos metabólicos no dañinos.

Sin duda existen varias opciones eficaces para la descontaminación; sin embargo, para elegir correctamente la tecnología de remediación es necesario tener en cuenta los siguientes aspectos: a) las características del lugar contaminado; b) el tipo de contaminante, su concentración y sus propiedades fisicoquímicas; c) las propiedades fisicoquímicas y el tipo de suelo que se va a tratar; y d) el coste (Volke & Velasco, 2002)

Ante esta situación, la biotecnología ambiental se vuelve esencial para contrarrestar las múltiples consecuencias del origen humano, al emplear diversas tácticas (Singh *et al.*, 2017). La acción de las comunidades microbianas, elementos esenciales de los ecosistemas que cumplen funciones significativas en la degradación de una amplia variedad de contaminantes (Brennerova *et al.*, 2009). De acuerdo con Kumar y colaboradores (2023), ciertos microorganismos mejoran el crecimiento, desarrollo y rendimiento de las plantas; estas interacciones, además, llegan a provocar que la planta desarrolle tolerancia sistemática inducida (IST), un fenómeno fisiológico de aclimatación mediante el cual las plantas, después de haber estado expuestas a un estrés abiótico moderado, ponen en funcionamiento una red de señalización que otorga protección y resiliencia a toda la planta ante episodios futuros con estrés más intensos (Fukami *et al.*, 2018).

Por otra parte, al utilizar microorganismos que ayuden a la biodegradación de contaminantes y al mismo tiempo fomenten el crecimiento vegetal podría mejorar la calidad del suelo agrícola contaminado, lo cual permitiría reducir el uso de agroquímicos costosos y perjudiciales para el medio ambiente (Vejan *et al.*, 2018; Prasad *et al.*, 2017). En este sentido, las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) mejoran la calidad del suelo, elevan la capacidad de tolerancia de los vegetales a situaciones de estrés abiótico, como la salinidad y la sequía, y optimizan el rendimiento agrícola (Santos *et al.*, 2019).

Entre los mecanismos que las PGPR emplean para fomentar el crecimiento de plantas, se incluyen: la generación de biopelículas; la producción de compuestos

antimicrobianos como los antibióticos o los compuestos orgánicos volátiles (por ejemplo, el cianuro de hidrógeno); las enzimas líticas que limitan el desarrollo de microorganismos fitopatógenos (Santoyo *et al.*, 2021); la producción del compuesto enzimático ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico desaminasa (ACC); la inhibición del *Quorum Sensing* (QS); el aumento sistemático inducido (ISR); y los sideróforos (Balogh *et al.*, 2010; Framptom *et al.*, 2012).

En esencia, los métodos para promover el crecimiento de las plantas se clasifican en dos categorías: directos e indirectos. Los mecanismos directos son los que tienen un impacto en el balance de los reguladores del crecimiento vegetal o que aportan nutrientes al instante. Los PGPR metabolizan y emiten nutrientes que benefician el desarrollo de la planta, o porque las bacterias producen y liberan fitohormonas para la planta (Glick, 2014; Govindasamay *et al.*, 2011). En cuanto a los mecanismos indirectos, por su parte, requieren la participación de los procesos metabólicos de defensa de la planta, que reaccionan ante las señales emitidas por las bacterias que la influyen (Ramos-Solano *et al.*, 2008; Jha *et al.*, 2012; Glick, 2014).

Mecanismos Directos

- Fijación de Nitrógeno

La enzima dinitrogenasa es la que realiza este proceso en las bacterias fijadoras de nitrógeno. Esta enzima transforma el di-nitrógeno inerte (N_2) que está en la atmósfera en amonio y, por consiguiente, en nitrógeno biodisponible (Zhang *et al.*, 2023). Solo una pequeña fracción de bacterias y arqueas posee la capacidad de fijar el nitrógeno (Boyd & Peters, 2013).

- Solubilización de Fosfatos

El fósforo es fundamental en el crecimiento de las raíces (Elhaisoufi *et al.*, 2020). La falta de este elemento en el suelo, o su escasa presencia debido a la aplicación de fertilizantes (Shenoy & Kalagudi, 2005), es lo que limita el crecimiento vegetal. Las bacterias solubilizadoras de fosfato convierten el fósforo inorgánico en ortofosfatos solubles, gracias a la producción de ácidos orgánicos o a la acción de enzimas fitasas (Sanchez-Gonzales *et al.*, 2022).

- Producción de Fitohormonas

Las fitohormonas son elementos de señalización en las plantas que forman una red de comunicación interconectada para modificar el crecimiento y el desarrollo como respuesta a un ambiente en constante cambio (Bittner *et al.*, 2022). Estas cumplen distintas funciones dependiendo de su estructura química.

- Auxinas

Las auxinas son hormonas vegetales con múltiples funciones que controlan el desarrollo y el crecimiento de la raíz. Esto sucede por la modulación de la expresión génica a través de factores de transcripción, lo que provoca reacciones concretas dependiendo del nivel de concentración (Gomes *et al.*, 2021; Leyser, 2018).

- Giberelinas

La altura de las plantas aumenta considerablemente debido a las giberelinas (Takehara, 2018). Mejoran la tolerancia al estrés y la absorción de iones (Iqbal & Ashraf, 2013); además, regulan procesos como la floración, el alargamiento del tallo y la germinación (Van De Velde *et al.*, 2017).

- Citoquininas

En la comunicación entre órganos, las citoquininas funcionan como moléculas de señalización (Sakakibara, 2021). De acuerdo con Yong y colaboradores (2009), regulan la senescencia de las hojas, así como el inicio y la elongación de las raíces. Su síntesis se produce sobre todo en las puntas de las raíces, desde donde se envían a los órganos aéreos mediante el xilema (Bottini *et al.*, 2004).

Mecanismos Indirectos

- Sideróforos

El hierro es fundamental para los organismos vivos; interviene en procesos metabólicos importantes, como la síntesis de ácidos nucleicos, el transporte fotosintético, la fijación de nitrógeno y la reducción de nitratos (Liu *et al.*, 2007; Narrillos-Rodríguez, 2014). A pesar de que en la corteza terrestre el hierro es

abundante, su biodisponibilidad no es elevada (Boyd & Ellwood, 2010; Emerson *et al.*, 2012). Para obtenerlo, las bacterias secretan sideróforos, que son moléculas quelantes que atrapan el hierro y lo convierten en su forma soluble (Fe^{2+}) (Aguado-Santacruz *et al.*, 2012; Kramer *et al.*, 2020).

- **Antibióticos**

Los antibióticos son sustancias que generan hongos y bacterias, las cuales pueden detener el crecimiento de estas (efecto bacteriostático) o eliminarlas por completo (efecto bactericida). De acuerdo con Calvo y Martínez-Martínez (2009), su función se basa en la inhibición de la síntesis proteica, el daño a las membranas citoplasmáticas, la interferencia con el metabolismo del ADN o el bloqueo de las síntesis de la pared celular.

Marco Teórico

Mecanismos de las PGPR contra los Hidrocarburos

Las PGPR son bacterias que se encuentran en la rizosfera, que es la zona del suelo donde las raíces de las plantas tienen un impacto. Estas bacterias promueven la producción de fitohormonas, la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfatos y la generación de sideróforos para asistir el crecimiento vegetal; por ende, crean vínculos simbióticos con las plantas (Bashan *et al.*, 2014). Por lo tanto, algunas PGPR, además, de fomentar el crecimiento de las plantas, ayudan a la biorremediación de hidrocarburos mediante diferentes mecanismos:

1. Degradación enzimática: Algunas PGPR producen enzimas como oxigenasas y peroxidasas, las cuales catalizan la degradación de hidrocarburos en compuestos menos tóxicos (Glick, 2010).
2. Bioestimulación: Las PGPR producen sustancias que estimulan el crecimiento de las plantas, como ácidos indolacéticos (AIA) y giberelinas. Esto, mejora la capacidad de las plantas para establecerse en suelos contaminados (Spaepen *et al.*, 2007).

3. Mejora de la estructura del suelo: Las PGPR sintetizan exopolisacáridos que promueven la agregación del suelo. Así, incrementan su porosidad y favorecen la penetración radicular y el intercambio gaseoso, aspectos esenciales para la degradación aeróbica de hidrocarburos. (Alami *et al.*, 2000).
4. Competencia con microorganismos patógenos: Al colonizar la rizosfera, las PGPR compiten con otros microorganismos por recursos. Esto reduce la presencia de patógenos que podrían afectar negativamente a las plantas en suelos contaminados (Lugtenberg & Kamilova, 2009).

Las PGPR son útiles para potenciar el desarrollo de las plantas en condiciones difíciles, lo que aumenta la eficiencia de la fitorremediación (Balseiro-Romero *et al.*, 2017; Oleńska *et al.*, 2020; Tara *et al.*, 2014). Las PGPR, como *Bacillus* y *Pseudomonas*, logran que la degradación de contaminantes sea más efectiva al generar biosurfactantes que incrementan la biodisponibilidad de los hidrocarburos (Spaepen *et al.*, 2007). Al mismo tiempo, fomentan el crecimiento de las plantas mediante la producción de fitohormonas (ácido indolacético) y la reducción del estrés por etileno a través de ACC-desaminasa (Glick & Stearns, 2011). A su vez, las plantas aportan al proceso a través de la emisión de exudados radiculares que mejoran la microbiota degradadora y la activación de sistemas enzimáticos (lacasas, peroxidasas) que convierten los contaminantes (Pilon-Smits, 2005).

Las plantas tienen una variedad de procesos metabólicos que les posibilitan soportar y adaptarse a situaciones de estrés, como la existencia de hidrocarburos en el suelo (Pilon-Smits, 2005). No obstante, el desarrollo de las plantas y la generación de biomasa se ven frecuentemente restringidos en estas condiciones tan extremas. Por lo tanto, la fitorremediación se vuelve menos eficaz y la muerte de las plantas aumenta (Glick & Stearns, 2011).

Los hidrocarburos, en especial los derivados de petróleo y los policíclicos aromáticos (HAPs), constituyen un peligro significativo para los sistemas biológicos. Investigaciones actuales indican que, en las plantas, incluso con niveles bajos de HAPs (≥ 50 mg/kg), la elongación de las raíces se ve reducida entre un 60 y un 80%

debido a cambios en la expresión de genes vinculados con la división celular (Liu *et al.*, 2023). Asimismo, producen estrés oxidativo a través de la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que disminuye la eficiencia fotosintética entre un 30 y un 50% en especies como *Helianthus annuus* y *Zea mays* (Zhang *et al.*, 2022). La exposición prolongada a HAPs en animales, incluidos los seres humanos, está vinculada con carcinogénesis, alteraciones endocrinas y neurotoxicidad, ya que estos tienen la capacidad de bioacumularse y de generar alteraciones químicas en el ADN (Boström *et al.*, 2002). Desde el punto de vista humano, investigaciones epidemiológicas relacionan la exposición prenatal a HAPs con trastornos del neurodesarrollo y con un peso bajo al nacer (Perera *et al.*, 2022).

Eficiencia en la Producción de Exopolisacáridos en Biorremediación

Los hidrocarburos, que provienen mayormente del petróleo, son contaminantes orgánicos recalcitrantes que suponen riesgos para la salud humana y ambiental. Se ofrecen varias soluciones a este problema, entre las que se incluye la producción de exopolisacáridos (EPS). Estos son biopolímeros con un peso molecular elevado que los microorganismos secretan en el medio extracelular. Están compuestos principalmente por monosacáridos y otros sustituyentes (Flemming & Wingender, 2010). Estos polímeros desempeñan roles fundamentales en la creación de biopelículas, en la adaptación al medio ambiente y en la defensa contra el estrés (Costa *et al.*, 2018). Diferentes grupos de microorganismos generan EPS, destacando las bacterias como *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Azotobacter*, en particular *A. chroococcum* y *A. vinelandii*, que sintetizan el alginato, un EPS de importancia industrial (Nwodo *et al.*, 2018).

Azotobacter spp. genera alginato, un EPS constituido por los ácidos L-gulurónico y D-manurónico, que le confieren características gelificantes (Hay *et al.*, 2013). Este alginato crea biopelículas que resguardan las raíces de la deshidratación y el estrés osmótico, a la vez que aumenta la agregación del suelo, lo cual optimiza su porosidad (>30%) y su capacidad para retener agua (Alami *et al.*, 2000).

Estos biopolímeros funcionan como emulsificantes y, por lo tanto, disminuyen la tensión superficial en la interfase entre contaminante y agua, lo que incrementa la biodisponibilidad de los hidrocarburos (Flemming & Wingender, 2010). Investigaciones recientes indican que los EPS crean matrices extracelulares que atrapan hidrocarburos, lo cual favorece su degradación enzimática por consorcios de microorganismos (Omarova *et al.*, 2018). Además, al propiciar la agregación de partículas, mejoran la estructura del suelo; esto favorece la difusión de oxígeno y la porosidad, lo cual es fundamental para que ocurra la degradación aeróbica (Morcillo & Manzanera, 2021). Los EPS bacterianos, en las plantas, crean una barrera de protección en las raíces que disminuye la absorción de toxinas y favorece la producción de enzimas para desintoxicarse (Ali *et al.*, 2023), lo cual les permite mitigar el estrés por hidrocarburos.

***Azotobacter* y los Metales Pesados**

La contaminación por metales pesados, como cadmio (Cd), plomo (Pb) y mercurio (Hg), representa un desafío articular debido a su toxicidad persistente y su capacidad de bioacumularse. *Azotobacter spp.* tiene la capacidad de tolerar y eliminar metales pesados gracias a ciertos mecanismos específicos, como por ejemplo la biosorción, la producción de compuestos quelantes del tipo sideróforos y la precipitación de metales (Gadd, 2010).

Investigaciones actuales indican que los EPS generados por bacterias rizosféricas, como *Pseudomonas* y *Azotobacter spp.* poseen grupos funcionales (hidroxilo, fosfato y carboxilo) que quelan de manera eficaz metales como Cd^{2+} y Pb^{2+} (Pereira *et al.*, 2021). Estas técnicas, como la espectroscopía infrarroja (FTIR), han demostrado que estos biopolímeros atrapan metales a través de enlaces covalentes coordinados y iónicos (Oliveira *et al.*, 2020).

La biosorción y la producción de EPS son dos de los mecanismos tolerantes de *Azotobacter spp.* En el primer caso, las células bacterianas captan metales en sus paredes celulares por causa de grupos funcionales como fosfatos y carboxilos. Este

cambio hacia compuestos menos tóxicos ocurre a través de un proceso enzimático, que transforma los metales en formas menos reactivas o bioaccesibles (Diaconu *et al.*, 2020).

Antecedentes

Especies del género *Azotobacter*

El género *Azotobacter* se ubica en las γ -Proteobacteria que pertenece a la familia Pseudomonadaceae. Se caracteriza por ser un bacilo Gram negativo, poliploide, aerobio estricto y es un fijador de nitrógeno. Bajo ciertas condiciones desfavorables como la limitación de nitrógeno, la falta de nutrientes esenciales, una baja tensión de oxígeno o la presencia de ciertas fuentes de carbono, el microorganismo entra en etapa de enquistamiento; así produce células metabólicamente latentes (Sadoff, 1975; Socolofsky *et al.*, 1962). Para que el quiste se forme, es necesario producir alginato (Remminghorst & Rehm, 2006). La capa extracelular es muy resistente y está formada por altas concentraciones de alginato (Hay *et al.*, 2014). La capa más externa de alginato llamada exina tiene un alto contenido de residuos de ácido glucurónico unidos consecutivamente, lo cual resulta en una estructura de alginato con mayor rigidez (Hay *et al.*, 2014).

El género comprende al menos siete especies bien definidas: *A. chroococcum*, *A. armeniacus*, *A. beijerinckii*, *A. nigricans*, *A. paspali*, *A. salinestris* y *A. vinelandii* (Jensen, 1954). Dentro de las siete especies descritas de *Azotobacter spp.*, *A. vinelandii* presenta una morfología colonial característica: colonias opacas, convexas, mucoides en la mayoría de las cepas, brillantes y lisas. Su morfología microscópica presenta un estado pleomórfico que varía desde formas bacilar hasta formas cocoides. Las células tienen un diámetro que va de 1.6-2.5 x 3-5 μm . Es posible observarlas como bacilos individuales, en pares o formando agregados irregulares (Kennedy *et al.*, 2015).

Otra especie es *A. chroococcum*, es considerada como saprófito y es la especie más estudiada en aspectos relacionados con la nutrición de plantas, además

contribuye a la fertilidad de los suelos, por lo que se ha investigado como inoculante microbiano (Arora *et. al.*, 2018). *A. chroococcum* es una bacteria Gram negativa, varía en distintas formas morfológicas que van desde células pleomorfas ovoides hasta células cocoides de 1.5 a 2.0 μm de diámetro (Wani *et. al.*, 2016).

El alginato es un polisacárido que puede ser producido por una variedad de organismos, incluyendo algas marinas, plantas y ciertos tipos de bacterias. En el caso de los procariontes, los géneros *Pseudomonas spp.* y *Azotobacter spp.* han demostrado la capacidad de producir este biopolímero (Miranda *et. al.*, 2008), y dentro del género de *Azotobacter sp.* encontramos a dos especies capaces de producir este polímero *A. vinelandii* y *A. chroococcum*. Se trata de un polisacárido extracelular lineal constituido por proporciones variables de ácido β -D-manurónico (M) y su epímero, el ácido α -L-gulurónico (G), unidos por enlaces β -1,4 (Hay *et. al.*, 2014) (Figura 1).

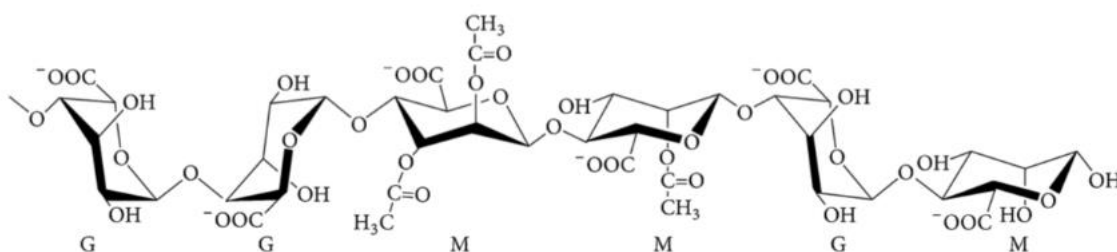


Figura 1. Estructura química del alginato (Urtuvia *et. al.*, 2017)

Así mismo, *A. vinelandii* posee otra característica fisiológica notable, bajo condiciones de limitación de hierro, sintetiza y secreta pioverdinas, una subclase de sideróforos de la familia de los hidroxamato-péptidos, los cuales son producidos por diversas bacterias de la familia *Pseudomonadaceae* y otros géneros para quelar y adquirir hierro férrico (Fe^{3+}) del medio ambiente (Schalk, *et. al.*, 2012).

Las cepas de *Azotobacter spp.* empleadas en este trabajo, se aislaron a partir de los muestreos de la Reserva de Biósfera de Tehuacán-Cuicatlán y del Estado de México. La cepa de *Azotobacter vinelandii* S4Ta se aisló de un tetecho y *Azotobacter chroococcum* SM3.2 aislada de una mezquitera. Se realizó la recolección de las muestras de suelo en diferentes zonas ambientales y su posterior procesamiento mediante tamizados. Para aislar cepas de *A. vinelandii*, a partir de

muestras de suelo se utilizaron dos técnicas de aislamiento. La primera técnica empleada fue el uso de medios de cultivo líquido como Burk-sacarosa (BS). La segunda técnica de aislamiento se fundamentó en colocar granos de suelo en medio sólido Ashby-Manitol (García, 2019). Posteriormente, estos aislados se caracterizaron bioquímicamente, se evidenciaron características metabólicas tipo PGPR. Ambos aislados son capaces de producir ácido indolacético (AIA), sideróforos y solubilizan fosfatos (Aguilar, 2023; Sánchez Rosas, 2025).

Metabolismo de Alginato

El alginato es un polisacárido lineal compuesto por ácido β -D-manurónico y su epímero, el ácido α -L-gulurónico, ampliamente utilizado en industrias como la alimentaria, farmacéutica, textil y biomédica debido a sus propiedades gelificantes, espesantes y biocompatibles (Lee & Mooney, 2012).

La síntesis de alginato se inicia por la isomerización de la fructosa-6-fosfato a manosa-6-fosfato mediante la actividad de la enzima fosfomanosa isomerasa (PMI-GMP-*algA*). Posteriormente, la enzima fosfomanomutasa (PMM-*algC*) convierte la manosa-6-fosfato a manosa-1-fosfato. El siguiente paso es la conversión de la manosa-1-fosfato a GDP-manosa por la enzima fosfomanosa isomerasa (PMI-GMP-*algA*). Subsecuentemente, se forma el ácido GDP-manurónico por la oxidación de la enzima GDP-manosa deshidrogenasa (GMD-*algD*), la cual es el sustrato directo y el punto crucial de control cinético para la biosíntesis de alginato. La enzima glicosil-transferasa y c-di-GMP participan en la polimerización y el transporte del ácido GDP-manurónico que es el sustrato que se polimeriza a nivel de membrana interna para formar ácido polimanurónico (Galindo *et. al.*, 2007).

Finalmente, el ácido polimanurónico sufre una serie de modificaciones post-polimerización por un complejo de acetilasas constituido por AlgI, AlgV, AlgF. Los residuos de manuronato no acetilados se epimerizan a guluronato por una epimerasa de manuronato AlgG o ME. La exportación a través de la membrana externa por una proteína con actividad de canal iónico AlgE. El polímero exportado

es convertido a alginato por una familia de siete epimerasas homólogas AlgE1-7 (Gawin *et. al.*, 2020).

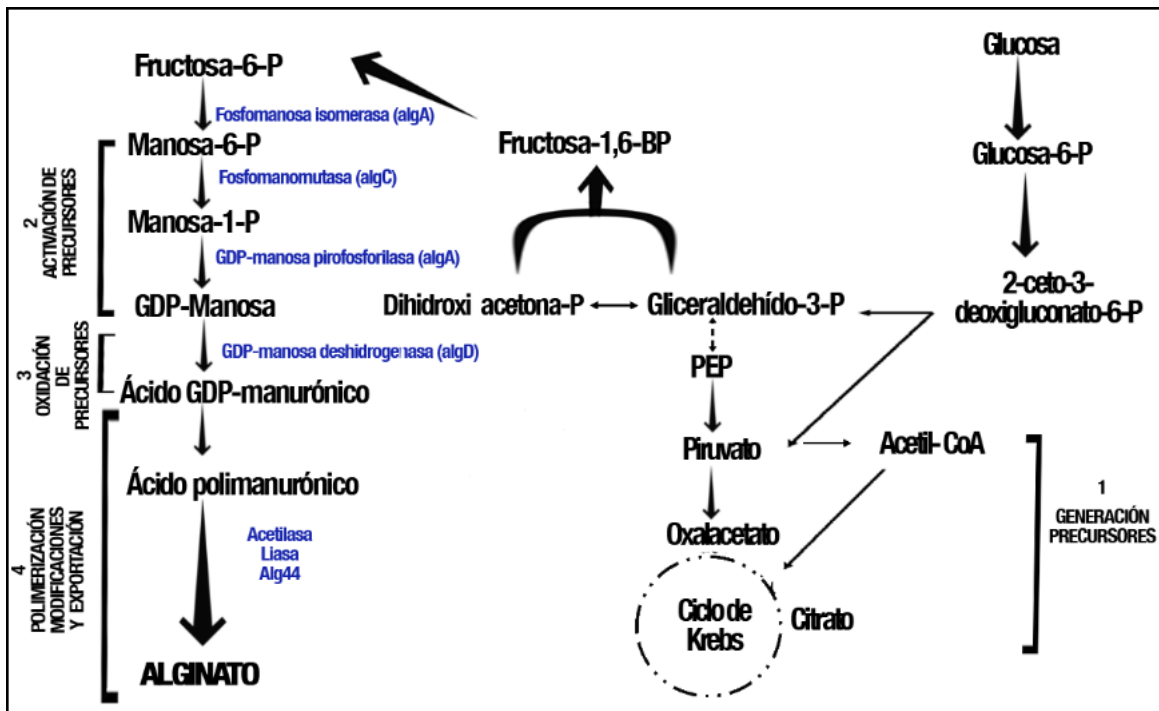


Figura 2. Diagrama de la biosíntesis del alginato *A. vinelandii* (modificado de Galindo *et. al.*, 2007)

A. vinelandii es uno de los microorganismos que más se han investigado en cuanto a su habilidad para producir alginato, ya que puede sintetizar este biopolímero como parte de su matriz extracelular. Esto le otorga protección y ayuda a que se formen quistes en situaciones de estrés (Remminghorst & Rehm, 2006). La producción de alginato en *A. vinelandii* varía entre 4.88 y 5.26 g/L (Aasfar *et al.*, 2021).

La producción de alginato por *Azotobacter spp.* se ve afectada por diversos factores, siendo algunos de los más relevantes la fuente de carbono, el pH, la temperatura, la composición del medio de cultivo y la presencia de nitrógeno (Noar & Bruno-Bárcena, 2018). De acuerdo con Gawin y colaboradores (2020), la cantidad y la distribución de los residuos del ácido α -L-gulurónico y del ácido (1,4)- β -D-manurónico determinan las propiedades fisicoquímicas del alginato.

Los alginatos destinados a la aplicación farmacéutica necesitan de un contenido de más del 50% de (1,4)- β -D-manurónico, esta composición química limita el uso de alginato como materia prima en esta industria. No obstante, la epimerización *in vitro*

podría aumentar el contenido de (1,4)- β -D-manurónico mediante las manuronano C-5 epimerasas que producen algunas especies de *Azotobacter* (Gawin *et. al.*, 2020).



Figura 3. Organización de los genes involucrados en la biosíntesis de alginato en *A. vinelandii* (modificado de Galindo *et. al.*, 2007)

El diésel, también conocido como gasóleo o gasoil, es otro de los productos derivados del petróleo que se emplea con más frecuencia en las actividades humanas. Este es un producto obtenido mediante la destilación del petróleo a una temperatura que varía entre 200 y 380°C (PEMEX, 2006). De acuerdo con Rodríguez (2017), es un hidrocarburo líquido que tiene entre 10 y 22 átomos de carbono, así como compuestos aromáticos, naftalénicos y parafínicos, con una densidad aproximada de 0.832 g/cm³. Conforme a Yoneyama (2015), *A. vinelandii* tiene la capacidad de crecer en presencia de hidrocarburos como el petróleo crudo y sus derivados, lo que indica que podría ser usado para fabricar biopolímeros y biorremediar al mismo tiempo. La capacidad de este microorganismo para metabolizar hidrocarburos se debe a la presencia de enzimas como la desoxigenasa como la monooxigenasa (alkB) está presente en *Pseudomonas* y probablemente este gen también está presente en *Azotobacter* (Alotaibi *et. al.*, 2022).

Modelo Vegetal

Raphanus sativus L., comúnmente conocido como rábano, es una especie perteneciente a la familia Brassicaceae (Seo *et. al.*, 2018). Se caracteriza por hipocótilos grandes y raíces pivotantes, y es cultivada y consumida principalmente por las raíces y las hojas, las cuales presentan un alto valor nutricional (Hara *et. al.*, 2011; Banihani, 2017).

Su origen se remonta a regiones de Asia, específicamente en China y el sudeste asiático, donde se ha documentado su cultivo desde hace más de 2,000 años (Curtis, 2003). En la medicina tradicional, *R. sativus* se ha empleado para tratar diversas afecciones.

Tradicionalmente se sabe que tiene beneficios antiinflamatorios, promueve la digestión, protege el estómago y tiene propiedades anticancerígenas (Oh *et. al.*, 2019). *R. sativus* se considera un alimento rico en nutrientes, porque contiene carbohidratos, azúcares, fibras dietéticas, proteínas e incluso algo de grasa y flúor. Además, posee diversas vitaminas hidrosolubles (B1, B2, B3, B5, B6, B9 y C), minerales (calcio, hierro, magnesio, manganeso, zinc, potasio y fósforo) y ácido fólico (Khattak, 2011).

Por ejemplo, en la medicina ayurvédica de la India, se ha utilizado para aliviar trastornos digestivos, como la indigestión y el estreñimiento, debido a su contenido de fibra y compuestos bioactivos (Kumar *et. al.*, 2015). Asimismo, se ha reportado su uso en la medicina tradicional china para tratar enfermedades respiratorias, como la tos y el asma, atribuyendo estas propiedades a la presencia de isotiocianatos y otros compuestos sulfurados (Wang *et. al.*, 2010).

El cultivo de *R. sativus* L. preferentemente se realiza en estaciones con clima frío, obteniendo una mejor calidad de raíces a una temperatura de 10 a 15.5 °C, sin embargo, también se puede cultivar a temperaturas altas (Ghimire *et. al.*, 2020). Esta condición varía su ciclo de cultivo, que puede oscilar desde los 20 a más de 70 días (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2020). Se adapta a cualquier tipo de suelo; no obstante, prefiere los suelos profundos y con un buen drenaje, pero con un alto contenido de materia orgánica y capaz de retener la humedad (Hernández-Villaseñor, 2024).

En México, el rábano se produce principalmente en los estados de Puebla, Guanajuato, Michoacán y el Estado de México, donde las condiciones climáticas y de suelo favorecen su cultivo (SIAP, 2023). Según datos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), en 2023 se cosecharon aproximadamente

1,364 hectáreas de rábano, con una producción total de 28,846 toneladas, lo que refleja su importancia en el sector hortícola nacional.

Recientemente el conocimiento sobre las interacciones planta-microbios en suelos contaminados ha aumentado el interés en su posible uso en procesos de biorremediación. Por ejemplo, en la biorremediación de sitios contaminados por metales pesados, la aplicación de microorganismos puede alterar su biodisponibilidad y su movilidad ayudando a la absorción de metales por las plantas (Jing *et. al.*, 2007). Adicionalmente se ha documentado la utilización de diversos microorganismos como *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Nocardia*, *Aspergillus niger*, *Pleurotus ostreatus* y *Azotobacter* en los procesos de biorremediación de los cuerpos de agua y los suelos contaminados por metales pesados, hidrocarburos, entre otros (Gurikar *et. al.*, 2016).

En el trabajo de Sumbul y colaboradores (2020) se destaca la importancia de la aplicación de *Azotobacter* sp. como un potencial elemento en el desarrollo de un sistema agrícola sostenible ya que promueve el crecimiento de las plantas a través de varios mecanismos como la fijación de nitrógeno, la producción de hormonas del crecimiento como ácido indolacético y la liberación de sideróforos.

Asimismo, estas características ayudan a mantener la fertilidad del suelo, facilitan el acceso del hierro a las plantas, muestran actividades anti fitopatógenas y en general mitigan diversas fuentes de estrés permitiendo el desarrollo de las plantas. Además, *Azotobacter* sp. es capaz de asimilar una gran variedad de sustratos por lo cual puede ser de utilidad en la biorremediación de sitios contaminados por petróleo (Verma & Kuila 2019), metales pesados (Manoj *et. al.*, 2020), compuestos aromáticos, fenoles entre otros (Gurikar *et. al.*, 2016).

Villacorta Chiclayo en 2013 demostró un efecto positivo en el crecimiento de las plántulas de *C. annuum* L. *var longum* "páprika" inoculados con *A. chroococcum* CALT-01, donde observó un incremento en peso seco radicular, peso seco aéreo, longitud de la raíz, longitud del tallo, número de raíces laterales y longitud de las hojas, mostrando una diferencia significativa respecto a las plántulas control.

Justificación

Los hidrocarburos derivados del petróleo constituyen contaminantes comunes que ponen en peligro a los ecosistemas terrestres y acuáticos. Su sedimentación y liberación en el ambiente afectan significativamente los suelos usados en la industria agrícola, perjudicando los cultivos al impedir el intercambio gaseoso e inhibir el crecimiento radicular. Paralelamente, el incremento en la tasa poblacional mundial causa una mayor demanda alimentaria y, por consecuencia, un uso más elevado de derivados del petróleo, lo que representa una problemática de escala global. Actualmente, se implementan diversas estrategias para contrarrestar esta problemática como la biorremediación. Entre estas, se destaca el uso de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR). Estas bacterias no solo ayudan a disminuir la concentración de hidrocarburos en el suelo, sino que ofrecen una ruta más amigable con el ambiente que evita la generación de contaminantes en el suelo; además, de aumentar la productividad de las plantas de importancia agronómica.

Hipótesis

Las cepas de *Azotobacter vinelandii* AEIV y S4Ta, y *Azotobacter chroococcum* SM3.2, tolerarán diferentes concentraciones de hidrocarburos como gasolina diesel. Por otra parte, la utilización de fuentes de carbono como fructosa y diésel combinado con sacarosa, influyen en la producción de alginato de las bacterias. Además, la inoculación de estas cepas promoverá el crecimiento de *Raphanus sativus* L.

Pregunta de Investigación

- ¿Cuál es la concentración máxima de hidrocarburos que los aislados de *Azotobacter* sp. puede tolerar sin afectar su crecimiento?
- ¿Influye el tipo de fuente de carbono (sacarosa, fructosa y diésel) en la producción de alginato por los aislados de *Azotobacter* sp.?
- ¿La mono-inoculación y co-inoculación de los aislados de *Azotobacter* sp. promoverán el crecimiento de *Raphanus sativus* L.?

Objetivo General

- Evaluar la capacidad de las cepas de *Azotobacter vinelandii* (AEIV y S4Ta) y *Azotobacter chroococcum* (SM3.2) para tolerar y metabolizar gasolina y diésel, así como su potencial para promover el crecimiento de *Raphanus sativus* L. en condiciones de inoculación.
- Evaluar la tolerancia de los aislado de *Azotobacter* sp. a diferentes concentraciones de hidrocarburo; así como, evaluar la producción de alginato en diferentes fuentes de carbono y el efecto de la promoción de crecimiento vegetal cuando *Raphanus sativus* L es inoculado con los aislados.

Objetivos Específicos

1. Determinar las concentraciones máximas de gasolina y diésel que toleran los aislados de *Azotobacter* sp. sin comprometer su crecimiento.
2. Evidenciar cómo afectan las diferentes fuentes de carbono (sacarosa, fructosa y la combinación de sacarosa y diésel) en la producción de alginato por los aislados de *Azotobacter* sp.
3. Evaluar el efecto de la mono-inoculación y co-inoculación de los aislados de *Azotobacter* sp. en los parámetros de crecimiento de *Raphanus sativus* L.

Materiales y Métodos

Material biológico

Las cepas bacterianas provinieron del Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana del Instituto de Ciencias Microbiológicas (ICUAP-BUAP). Se reactivaron y cultivaron *Azotobacter vinelandii* (cepas AEIV y S4Ta) y *Azotobacter chroococcum* (SM3.2) en medio sólido Burk con sacarosa. Se sembraron hasta obtener colonias metabólicamente activas. Posteriormente, se aislaron colonias con fenotipos distintivos: *A. vinelandii* AEIV mostró colonias mucoides; *A. vinelandii* S4Ta, mucoides y brillantes; y *A. chroococcum* SM3.2, puntiformes y blanquecinas.

Supervivencia y Crecimiento en Presencia de Hidrocarburos

Para evaluar la capacidad de las cepas de *Azotobacter vinelandii* (AEIV y S4Ta) y *Azotobacter chroococcum* (SM3.2) para tolerar y crecer en presencia de hidrocarburos, se siguió el siguiente protocolo:

Las cepas fueron sembradas en medio mínimo Burk con Sacarosa (BS) en estado sólido, suplementado con ácido nalidíxico (10 mg/mL). Tras obtener colonias aisladas y metabólicamente activas, se utilizó una colonia representativa de cada cepa para inocular 15 mL de medio PY líquido suplementado con ácido nalidíxico (10 mg/mL) en tubos cónicos de 50 mL. Estos cultivos se incubaron a 30°C y 190 rpm hasta alcanzar una fase exponencial adecuada (aproximadamente 24 horas), sirviendo como pre-inóculos.

A partir de los pre-inóculos se tomó 1 mL y se determinó la Densidad Óptica (DO) a 545 nm en un espectrofotómetro de luz visible (DLAB SP-V1100). Se ajustó el volumen de cada pre-inóculo para iniciar los cultivos experimentales con una DO inicial estandarizada de 0.02. El cultivo se estableció en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 25 mL de medio líquido BS. Se establecieron los siguientes tratamientos realizados por triplicado para cada cepa (*A. vinelandii* AEIV, *A. vinelandii* S4Ta y *A. chroococcum* SM3.2). El control se realizó en medio BS suplementado con sacarosa al 2% (p/v) como única fuente de carbono, para asegurar la viabilidad y crecimiento óptimo de las cepas en condiciones no estresantes. Para los tratamientos con diésel y gasolina el medio BS fue suplementado a concentraciones de 2% (v/v; 500 µL), 3% (v/v; 750µL) y 4% (v/v; 1 mL) como única fuente de carbono. Además, se planteó un tratamiento combinado de sacarosa al 1% (p/v) y diésel al 2% (v/v; 500 µL).

La supervivencia y el crecimiento de las cepas en presencia de hidrocarburos se evaluaron cada 24 horas durante 168 horas mediante la metodología de Goteo por Sellado en Placa Masivo (GSPM), según lo descrito por Corral-Lugo y colaboradores (2012). Brevemente, a partir de cada cultivo bacteriano, se tomaron alícuotas que fueron sometidas a diluciones seriadas decimales con sulfato de magnesio ($MgSO_4$) 10 mM esteril. Posteriormente, las alícuotas de estas diluciones se gotearon sobre placas de medio agar BS. Las placas se incubaron a 30°C, y el

número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL) se cuantificó tras 24 horas de incubación, lo que permitió determinar la población bacteriana.

Determinación de la Producción de Alginato

Para evaluar la capacidad de las cepas de *Azotobacter vinelandii* (AEIV y S4Ta) y *Azotobacter chroococcum* (SM3.2) para producir alginato en presencia de diferentes fuentes de carbono, se empleó el siguiente procedimiento:

Las cepas de *Azotobacter vinelandii* (AEIV y S4Ta) y *Azotobacter chroococcum* (SM3.2) se cultivaron inicialmente en medio BS sólido suplementado con ácido nalidíxico (10 mg/mL). Tras obtener colonias aisladas y metabólicamente activas, se utilizó una colonia representativa de cada cepa para inocular 25 mL de medio PY líquido suplementado con ácido nalidíxico (10 mg/mL) en tubos cónicos de 50 mL. Estos cultivos se incubaron a 30°C y 190 rpm hasta alcanzar una fase exponencial adecuada (aproximadamente 24 horas), sirviendo como pre-inóculos.

Transcurridas las 24 horas, los pre-inóculos se centrifugaron a 4500 rpm durante 12 minutos a temperatura ambiente para la recuperación de la pastilla celular. La pastilla se lavó una vez y se resuspendió en 500 µL de sulfato de magnesio (MgSO₄) 10 mM esteril, con el fin de estabilizar las membranas celulares y facilitar la posterior inoculación. Un volumen de 100 µL de esta suspensión se utilizó para inocular matraces Erlenmeyer de 125 mL que contenían 50 mL de medio líquido BS estéril. Se establecieron los siguientes tratamientos por triplicado para cada cepa: medio BS con sacarosa al 2% (p/v), medio BS con fructosa al 2% (p/v), medio BS con sacarosa al 1% (p/v) y diésel al 2% (v/v; 1 mL). Los cultivos se incubaron a 30°C en una agitadora orbital a 190 rpm durante 72 horas.

Después del periodo de incubación, se tomaron 3 mL de cada cultivo y se transfirieron a tubos cónicos de 15 mL. Para facilitar la liberación del alginato, se añadió 500 µL de EDTA disódico 0.01 M y se mezcló vigorosamente por inversión. Las muestras se centrifugaron a 4500 rpm durante 12 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante, que contenía el alginato disuelto, se recuperó

cuidadosamente y se transfirió a un nuevo tubo cónico de 15 mL. La pastilla celular remanente se almacenó a -20°C para la determinación del contenido proteico.

Para precipitar el alginato del sobrenadante, se añadió isopropanol en una proporción de 2:1 (v/v, isopropanol:sobrenadante). La mezcla se agitó suavemente y se dejó reposar a temperatura ambiente. El precipitado de alginato se recuperó mediante centrifugación a 4500 rpm durante 12 minutos a temperatura ambiente. El isopropanol excedente se decantó cuidadosamente, y los precipitados de alginato se secaron a temperatura ambiente durante toda la noche para eliminar completamente el solvente. La solución de ácido sulfúrico-boratos (H_2SO_4 -Boratos) se preparó un día antes de su uso. Esta solución se formuló disolviendo ácido bórico (H_3BO_3) al 3.9 M e hidróxido de potasio (KOH) al 1.79 M en un volumen final de 100 mL de agua destilada. De esta solución concentrada, se tomaron 25 mL y se mezclaron con ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4 , 98% p/p) para llevar a un volumen final de 1 L de H_2SO_4 -Boratos. La mezcla se mantuvo en agitación magnética durante toda la noche para asegurar la disolución completa de los cristales de ácido bórico. La solución de carbazol al 0.1% (p/v) se preparó disolviendo carbazol en etanol 95% (v/v) y se almacenó en oscuridad. El alginato seco se resuspendió completamente en 1 mL de solución de cloruro de sodio (NaCl) al 0.85% (p/v) mediante vórtex vigoroso. Para el ensayo, colorimétrico, en tubos de ensayo de vidrio previamente enfriados en hielo, se depositaron 3 mL de la solución H_2SO_4 -Boratos. Cuidadosamente, se añadieron 350 μL de las muestras de alginato suspendido sobre la superficie de la solución ácida; evitando la mezcla inmediata. Inmediatamente después, se agregaron 100 μL de la solución de carbazol al 0.1%. Los tubos se mezclaron cuidadosamente mediante vórtex, sellando la entrada con una canica de vidrio para evitar la pérdida de vapores.

Las reacciones se incubaron en un baño maría a 50°C durante 30 minutos. Durante este periodo, se observó el desarrollo de una coloración violeta-bugambilia brillante, indicativa de la presencia de alginato (la aparición de coloración oscura indica contaminación o reacción inespecífica). Transcurridos los 30 minutos, los tubos se retiraron y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. La coloración obtenida es

estable por 1 a 2 horas. Finalmente, la absorbancia de cada muestra se midió a 530 nm en un espectrofotómetro UV-Vis, utilizando celdas de cuarzo a 1 cm de paso de luz. Para la cuantificación del alginato, se construyó una curva de calibración utilizando una solución estándar de alginato puro de 10 mg/ 10 mL. Se prepararon las siguientes concentraciones de alginato:

Tabla 1. Curva de calibración de alginato.

Tubo	µl de Sol. Stock	µl de H ₂ O	Concentraciones de alginato (mg/mL)
1	350	0	1.0
2	280	70	0.8
3	210	140	0.6
4	140	210	0.4
5	70	280	0.2
6	35	315	0.1
7	17.5	332.5	0.05
Blanco	0	350	0

Cada estándar se procesó siguiendo el mismo procedimiento colorimétrico que las muestras experimentales. Los resultados de la absorbancia de las muestras se interpolaron en la curva de calibración para determinar la concentración de alginato producida por las cepas de *Azotobacter*.

Determinación de Proteínas Totales

Para cuantificar el contenido total de proteínas celulares de las pastillas recuperadas tras la extracción de alginato, se utilizó el método colorimétrico de Lowry y colaboradores (1951), modificado para su aplicación en suspensiones celulares. La cuantificación de proteínas permite normalizar la producción de alginato por la biomasa microbiana.

Las pastillas celulares (previamente almacenadas a -20°C tras la extracción de alginato) se suspendieron en 1 mL de sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) a 10 mM. Es esencial para asegurar una suspensión homogénea y completa mediante vortex.

En tubos de microcentrífuga de 1.5 mL se preparó la reacción de la siguiente manera: Se adicionaron 190 μL de agua destilada estéril y se añadieron 10 μL de la suspensión celular resuspendida, obteniendo un volumen final de muestra de 200 μL . Se agregó 1 mL de la solución reactiva de Lowry (Sol. A: Na_2CO_3 2% y NaOH 0.1N, Sol. B: Tartrato de NaK 2% y Sol. C: CuSO_4 1%). La mezcla se vortexeó vigorosamente y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Transcurridos los 10 minutos, se adicionaron 100 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido. La mezcla se homogeneizó cuidadosamente mediante inversión o vórtex suave y se incubó a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 minutos para el desarrollo de color. Finalmente, la solución se vortexeó de manera vigorosa para asegurar la homogeneidad e inmediatamente se transfirieron las alícuotas a celdas de cuarzo. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 650 nm.

Simultáneamente a las muestras, se preparó una curva de calibración utilizando albúmina sérica bovina (BSA, Sigma-Aldrich) como estándar, a una concentración stock de 2 mg/mL. Se utilizaron las siguientes concentraciones de BSA:

Tabla 2. Curva de calibración de albúmina.

BSA (μL)	Agua destilada (μL)	Concentraciones de BSA ($\mu\text{g/mL}$)
0	200	0
2	198	4
4	196	8
8	192	16
16	189	32
32	168	64

Las concentraciones de proteínas en las muestras se determinaron por interpolación en la curva de calibración lineal obtenida a partir de los estándares de BSA.

Desinfección y Germinación de Semillas

Para la obtención de plántulas de rábano (*Raphanus sativus* L.) estériles y uniformes, se siguió un protocolo de desinfección superficial y germinación controlada. Las semillas utilizadas fueron de la variedad Champion, lote 2330 1590, con un porcentaje de germinación del 85% y una pureza del 99%.

Las semillas se lavaron con agua destilada para eliminar los productos agroquímicos que protegen a la semilla certificada. Posteriormente, se procedió a la desinfección, para lo cual las semillas se lavaron cinco veces con agua destilada y se sumergieron en hipoclorito de sodio al 6% durante tres minutos. Enseguida las semillas se lavaron al menos cinco veces con agua destilada estéril para remover completamente el hipoclorito de sodio. A continuación, las semillas se sumergieron en etanol al 70% (v/v) durante 3 minutos. Finalmente, las semillas se lavaron cinco veces con agua destilada estéril para eliminar el etanol. Los lavados se extendieron hasta que el olor a alcohol fuera imperceptible.

Las semillas desinfectadas se sembraron asépticamente en placas Petri estériles que contenían 15 mL de agar agua al 1.5% (p/v). Se colocaron 50 semillas por placa, procurando una distribución uniforme para evitar el contacto. Las placas Petri se sellaron con cinta adhesiva para mantener la humedad y un ambiente estéril. Posteriormente, se incubaron en un cuarto oscuro a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. La germinación se monitorea diariamente, y las semillas se consideraron germinadas una vez que se observó la emergencia de la radícula, lo cual ocurrió aproximadamente 5 días después de la siembra. Las plántulas con radículas entre 2-3 cm de longitud fueron seleccionadas para los experimentos posteriores.

Condiciones de Invernadero y Riego

Una vez que las plántulas de rábano (*Raphanus sativus* L.) desarrollaron su radícula fueron cuidadosamente trasplantadas a bolsas negras de vivero (15 x 25 cm), previamente esterilizadas mediante exposición a luz UV durante 7 minutos. Cada bolsa contenía turba estéril, donde se sembraron dos plántulas por bolsa; transcurridos 10 días post-trasplante, se seleccionó la plántula de mayor tamaño y vigor, descartando la de menor desarrollo para evitar la competencia por nutrientes y asegurar la uniformidad en el experimento.

Las bolsas fueron colocadas en condiciones de invernadero, en donde recibían luz solar (no directa) por un máximo de siete horas diarias, con un rango de temperatura mínima de 8°C y una máxima de 27°C.

El régimen de riego consistió en dos aplicaciones diarias (por la mañana y por la noche) con agua destilada estéril. Se suministró un volumen aproximado de 100 mL de agua por planta en cada riego, ajustándose este volumen para mantener la turba a capacidad de campo y evitar la saturación hídrica, monitoreando visualmente la humedad del sustrato. Adicionalmente, se aplicó la solución nutritiva de Murashige y Skoog (MS) cada 72 horas después del trasplante a la turba estéril. La primera aplicación se realizó a las 72 horas, la segunda a las 144 horas y la tercera a las 288 horas post-trasplante. Este programa de fertilización se mantuvo durante todo el periodo experimental de 41 días.

Preparación de los Inóculos

Los inóculos bacterianos se prepararon de manera individual a partir de las cepas seleccionadas de *Azotobacter vinelandii* (AEIV y S4Ta) y *Azotobacter chroococcum* (SM3.2). Las cepas se sembraron en placas Petri que contenían medio mínimo BS sólido por la técnica de sembrado masivo, y se incubaron a 30°C durante 72 horas.

El crecimiento celular de cada una de las cepas bacterianas se ajustó a una población de 1×10^8 UFC/mL y se resuspendió en 30 mL de agua destilada estéril en botellas en vidrio de 400 mL. La co-inoculación se preparó con 33% de cada uno de

los inóculos individuales en un volumen total de 30 mL. Para determinar la población bacteriana se realizó el método de goteo en placa (drope plate). Esta técnica se fundamenta en la realización de diluciones decimales seriadas, donde se toman 100 µL de los inóculos y se diluyen en 900 µL de sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO₄ · 7H₂O) a 10 mM, hasta alcanzar las diluciones deseadas. Finalmente, se sembraron 20 µL de cada dilución adecuada en placas con medio de cultivo sólido (medio BS), y se incubaron a 30°C por 48 horas para el conteo de colonias.

Inoculación de Bacterias

La inoculación de las plántulas de rábano con las cepas bacterianas se realizó a los 20 días posteriores al trasplante a las bolsas de vivero. Se aplicó un volumen de 500 µL del inóculo bacteriano directamente sobre la turba estéril, lo más cercano posible al tallo de cada planta. Las plantas fueron inoculadas de acuerdo con los siguientes tratamientos experimentales:

Tabla 3. Población bacteriana registrada para la inoculación.

Tratamiento	Tipo de inóculo	Población bacteriana aplicada (UFC/mL)
Grupo control	Sin inóculo	Sin presencia
<i>Azotobacter vinelandii</i> AEIV (E)	Mono-inoculación	3.09 x 10 ⁷
<i>Azotobacter vinelandii</i> S4Ta (4T)	Mono-inoculación	2.49 x 10 ⁸
<i>Azotobacter chroococcum</i> SM3.2 (3.2)	Mono-inoculación	2.43 x 10 ⁷
<i>Azotobacter vinelandii</i> (AEIV y S4Ta) <i>Azotobacter chroococcum</i> (SM3.2)	Co-Inóculo	4.5 x 10 ⁷

Cosecha y Toma de Datos Morfométricos

Las plantas de *R. sativus* L. se cosecharon 41 días después de haber sido trasplantadas a la turba contenida en bolsas negras para vivero.

Para la evaluación de la biomasa, cada planta fue retirada cuidadosamente. Las raíces se sumergieron en un recipiente con agua para quitar el exceso de turba adherida, evitando dañar las estructuras radiculares. Inmediatamente después de la limpieza, se procedió a determinar el peso fresco de la parte aérea (tallo y hojas) y de la raíz por separado, utilizando una balanza analítica (Bonvoisin). Para obtener el peso seco tanto de la parte aérea como de la raíz de la planta, se colocaron en sobres de papel individuales y debidamente etiquetados. Los sobres se llevaron a un horno de secado a una temperatura de 75°C por 120 horas, hasta alcanzar un peso constante, lo que aseguró la eliminación total de la humedad. Una vez frías, las muestras se pesaron nuevamente en la balanza analítica para registrar el peso seco.

Se registraron los siguientes parámetros de crecimiento y desarrollo de las plantas:

Longitud total de la planta: Medida desde la base del tallo hasta el ápice de la hoja más larga, utilizando una regla milimetrada.

Estas medidas se corroboraron utilizando el programa ImageJ (versión 1.54g).

Longitud de la raíz: Medida desde la base del tallo hasta la punta de la raíz principal, utilizando una regla milimetrada.

Evaluación de la Presencia de Bacterias en la raíz

Para determinar la capacidad de colonización de las cepas bacterianas inoculadas en las raíces de las plantas de rábano (*R. sativus* L.), se realizó un muestreo aleatorio de cinco plantas por cada tratamiento experimental a los 41 días después de la siembra en bolsas de vivero.

En un ambiente estéril, las raíces de cada planta seleccionada se retiraron de manera cuidadosa, eliminando el exceso de turba adherida. A continuación, cada sistema radicular, se colocó individualmente en un tubo estéril de 50 mL que contenía 35 mL de solución de sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) a 10 mM. Los tubos se agitaron vigorosamente en un vórtex durante tres minutos

aproximadamente para desprender las células bacterianas asociadas a la superficie radicular y luego se dejaron reposar por 10 minutos.

La cuantificación de bacterias recuperadas de la raíz se realizó mediante la metodología de Goteo por Sellado en Placa Masiva (GSPM) descrita por Corral-Lugo *et al.*, 2012 en los siguientes medios: medio BS suplementado con ácido nalidíxico (10 mg/mL), para el recuento general de los aislados de *Azotobacter sp.*, en medio Agar Triple Azúcar (TSI) para recuperar específicamente la cepa *Azotobacter vinelandii* AEIV, aprovechando sus características metabólicas distintivas en este medio.

Análisis Estadístico

Para evaluar la supervivencia ante la presencia de diferentes concentraciones de hidrocarburos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de Tukey. Por otra parte, para evaluar la producción de alginato se desarrolló un análisis de varianza (ANOVA) para comparar la diferencia de medias entre grupos y una prueba de Tukey.

Finalmente, para evaluar los datos morfométricos de *Raphanus sativus* L., se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) para comparar la diferencia de medias entre las cepas y una prueba de Tukey.

Resultados

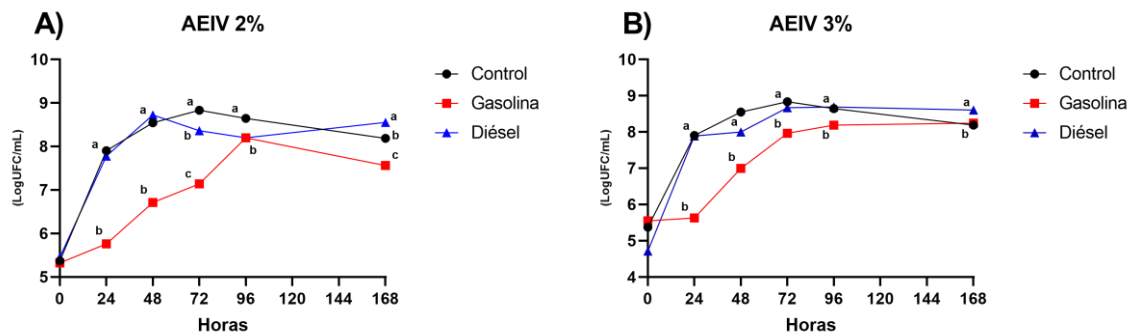
Supervivencia Bacteriana a Hidrocarburos.

Se evaluó la capacidad de supervivencia de las cepas *A. vinelandii* AEIV y S4Ta, y *A. chroococcum* SM3.2 en presencia de hidrocarburos (gasolina y diésel) en concentraciones de 2%, 3% y 4%. Adicionalmente, se probó una combinación de dos fuentes de carbono: sacarosa al 10% y 2% del hidrocarburo.

El análisis del crecimiento de *A. vinelandii* AEIV en presencia de los distintos tratamientos reveló patrones diferenciados, mostrando diferencias estadísticas

($F_{(2,15)} = 1392$, $P < 0.0001$) al ser tratada con la combinación de fuentes de carbono. La cepa exhibió su mayor densidad poblacional (8.53×10^8 UFC/mL) a las 24 horas cuando se cultivó con la combinación de sacarosa al 1% y diésel al 2%. Este resultado mostró una diferencia significativa frente al control (7.9×10^7 UFC/mL, $P < 0.0001$) (Figura 4, D). Por el contrario, la combinación de sacarosa al 1% más gasolina al 2% presentó una marcada inhibición del crecimiento durante las primeras 48 horas, lo que se registró también una diferencia significativa con el control ($P < 0.0001$; Figura 4, D).

En los tratamientos individuales con diésel y gasolina al 2% y 3%, se observaron tendencias contrastantes. Mientras que el crecimiento en diésel, a estas concentraciones se mantuvo similar o cercano al control, el crecimiento en gasolina mostró una disminución significativa en la población bacteriana durante las primeras 72 horas ($P = 0.0001$, Figura 4, A y B). Finalmente, a la concentración del 4%, ambos hidrocarburos ejercieron un efecto inhibitorio considerable. La población máxima en diésel al 4% fue de 6.35×10^7 UFC/mL a las 48 horas, mientras que en gasolina al 4% fue de 6.8×10^7 UFC/mL en el mismo punto de tiempo. Ambos tratamientos mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($P < 0.0001$, Figura 4, C).



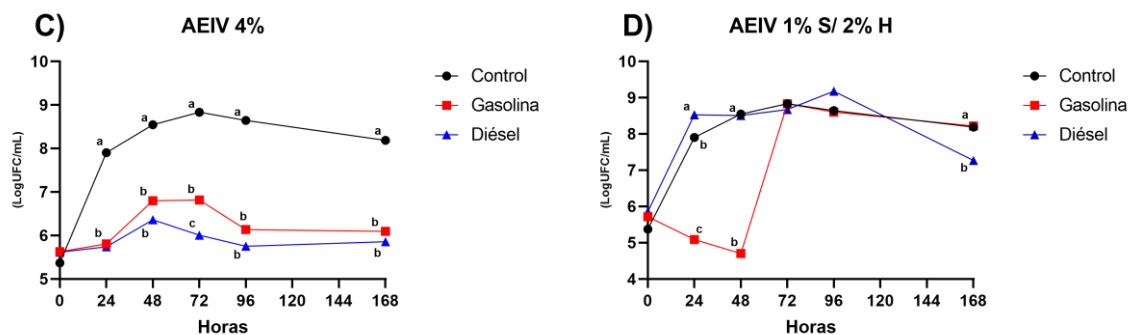


Figura 4. Promedio de las poblaciones de *Azotobacter vinelandii* AEIV. A: concentración de la fuente de carbono al 2%; B: concentración de la fuente de carbono al 3%, C: concentración de la fuente de carbono al 4% y D: concentración de la fuente de carbono combinada, sacarosa al 1% y 2% de hidrocarburos (línea con círculos negros (control positivo), línea con cuadrados rojos (gasolina), línea con triángulos azules (diésel)). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas, tomando en cuenta que el **análisis estadístico se realizó por punto (en cada hora)** de evaluación entre las tres cepas.

El análisis del crecimiento de *A. vinelandii* S4Ta reveló una notable tolerancia y una mejora en el crecimiento ($F_{(2,15)} = 13.22$, $P = 0.0005$) en presencia de los hidrocarburos. La cepa mostró una mejora significativa con la combinación de sacarosa al 1% más diésel al 2%, y alcanzó una densidad poblacional máxima de 8.56×10^8 UFC/mL a las 72 horas. Este valor presentó una diferencia estadísticamente significativa ($P = 0.0005$) frente al control (7.74×10^7 UFC/mL) (Figura 5, D). Por su parte, la combinación de sacarosa al 1% con gasolina al 2% mantuvo un crecimiento similar al del control durante el periodo de incubación.

En los tratamientos individuales con diésel al 2%, la cepa registró una población máxima de 8.23×10^8 UFC/mL a las 48 horas, mostrando también una diferencia significativa respecto al control ($P < 0.0001$). En contraste, el crecimiento en gasolina al 2% se mantuvo similar al control durante las primeras 72 horas (Figura 5, A).

A concentraciones más altas (3% y 4%), la cepa presentó tendencias diferenciadas entre los hidrocarburos. En diésel, se observó una mejora significativa en el crecimiento durante las primeras 72 horas, con poblaciones máximas de 8.04×10^7 UFC/mL (a las 48 horas) para el 3% ($P = 0.0004$) y 8.30×10^8 UFC/mL (a las 48

horas) para el 4% ($P < 0.0001$). Por el contrario, en gasolina a estas mismas concentraciones (3% y 4%), el crecimiento bacteriano se mantuvo similar al control durante las primeras 72 horas, y se observó una disminución poblacional posterior a este tiempo (Figura 5, B y C).

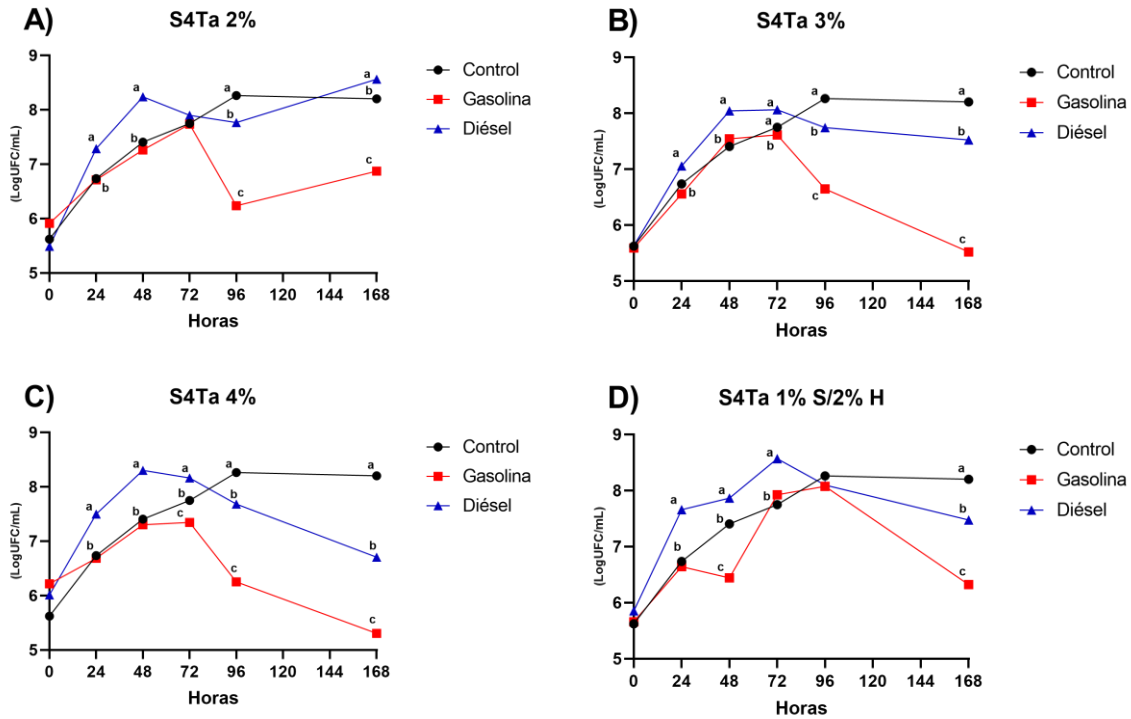


Figura 5. Promedio de las poblaciones de *Azotobacter vinelandii* S4Ta. A: concentración de la fuente de carbono al 2%; B: concentración de la fuente de carbono al 3%, C: concentración de la fuente de carbono al 4% y D: concentración de la fuente de carbono combinada, sacarosa al 1% y 2% de hidrocarburos (línea con círculos negros (control positivo), línea con cuadrados rojos (gasolina), línea con triángulos azules (diésel). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas, tomando en cuenta que el **análisis estadístico se realizó por punto (en cada hora)** de evaluación entre las tres cepas.

El análisis de la cepa *A. chroococcum* SM3.2 reveló que en presencia de diésel al 2%, mostró una mejora significativa en el crecimiento durante las primeras 24 horas ($P < 0.0001$). Alcanzó una densidad poblacional de 9.71×10^9 UFC/mL, valor estadísticamente significativo y superior al del control (7.66×10^7 UFC/mL). Por el contrario, en gasolina al 2%, el crecimiento se mantuvo por debajo del control, registrando una población máxima de 8.14×10^7 UFC/mL a las 96 horas (Figura 6, A).

Al exponer la cepa a una concentración del 3% de los hidrocarburos, se observó que el diésel promovió un mayor crecimiento bacteriano, alcanzando 9.02×10^9 UFC/mL a las 48 horas ($P = 0.0008$). En cambio, el crecimiento en gasolina al 3% se mantuvo cercano a los niveles del control durante el periodo de incubación (Figura 6, B).

Finalmente, al combinar los hidrocarburos al 2% con sacarosa al 1%, la cepa mostró un crecimiento similar al control en la condición de sacarosa más diésel. No obstante, en la combinación de sacarosa al 1% con gasolina al 2%, la cepa floculó a las 24 horas de incubación, lo que impidió su análisis posterior (Figura 6, C).

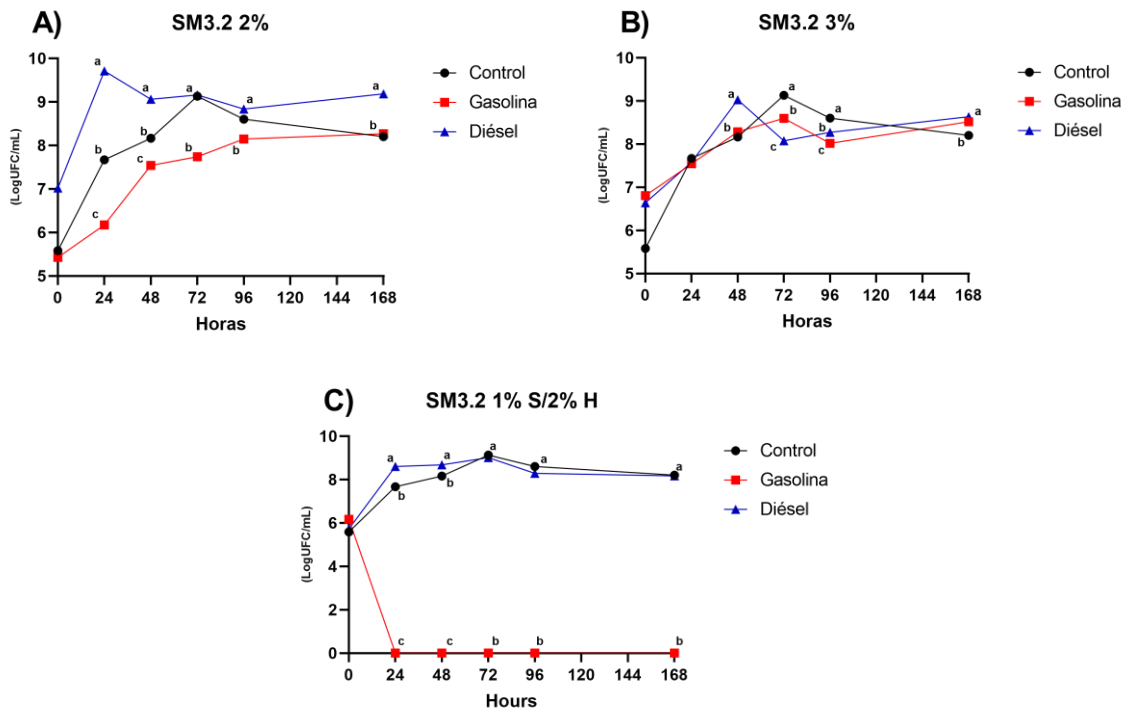


Figura 6. Promedio de las poblaciones de *Azotobacter chroococcum* SM3.2. A: concentración de la fuente de carbono al 2%; B: concentración de la fuente de carbono al 3% y C: concentración de la fuente de carbono combinada, sacarosa al 1% y 2% de hidrocarburos (línea con círculos negros (control positivo), línea con cuadrados rojos (gasolina), línea con triángulos azules (diésel). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas, tomando en cuenta que el **análisis estadístico se realizó por punto (en cada hora)** de evaluación entre las tres cepas.

Evaluación de la Producción de Alginato.

Se cuantificó la producción de alginato de las tres cepas de *Azotobacter* sp. al exponerlas a diferentes fuentes de carbono; fructosa al 2%, una combinación de sacarosa al 1% más diésel al 2%, y sacarosa al 2%. Esta última se empleó como control positivo, debido a que es la fuente de carbono óptima para las cepas.

Los resultados obtenidos de las cepas de *A. vinelandii* (AEIV) mostraron una mejora estadísticamente significativa ($F_{(2,17)}=692.4$, $P<0.0001$) en la producción de alginato. La producción del polímero por parte de la cepa *A. vinelandii* AEIV usando como fuente de carbono fructosa al 2% (16.35 mg alg/mg prot) fue cuatro veces superior en comparación a su producción en sacarosa al 2% (4.02 mg alg/mg prot), su fuente de carbono óptima ($P < 0.0001$). Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre estos tratamientos ($P < 0.0001$, Figura 7). De manera similar se observó un incremento en la producción de alginato con la fuente de carbono combinada de sacarosa al 1% más diésel al 2% (8.94 mg alg/ mg prot) al comparar con sacarosa al 2%, donde la producción del polímero se duplicó ($P < 0.0001$). Esto evidenció diferencias estadísticamente significativas (Figura 7).

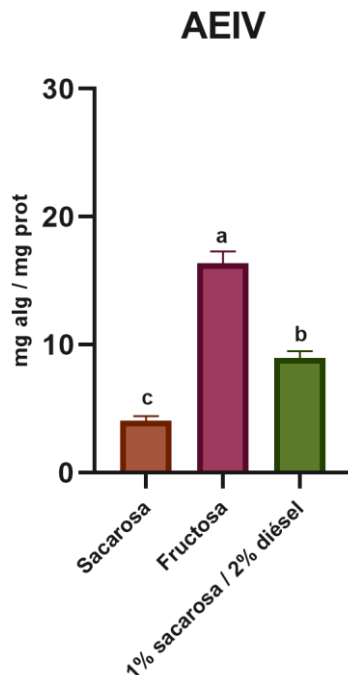


Figura 7. Cuantificación de la producción de alginato de la cepa *A. vinelandii* AEIV, en diferentes fuentes de carbono (Medio BS, 72 horas a 30°C). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas. Tukey post-hoc ($F_{(2,17)} = 692.4$, $P < 0.0001$)

Los resultados obtenidos de las cepas de *A. vinelandii* (S4Ta) mostraron una mejora estadísticamente significativa ($F_{(2,12)}=111.2$, $P < 0.0001$) en la producción de alginato. La producción de alginato por parte de la cepa *A. vinelandii* S4Ta mostró una mejora utilizando fructosa al 2% como fuente de carbono (23.84 mg alg/mg prot). Esta condición duplicó la producción del polímero en comparación con el alginato obtenido con sacarosa al 2% (12.29 mg alg/mg prot; $P < 0.0001$). Sin embargo, cuando la bacteria empleó la combinación de sacarosa al 1% más diésel al 2% como fuente de carbono (10.07 mg alg/mg prot) la producción disminuyó ($P = 0.1503$). Se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar la fructosa con las otras dos fuentes de carbono ($P < 0.0001$, Figura 8).

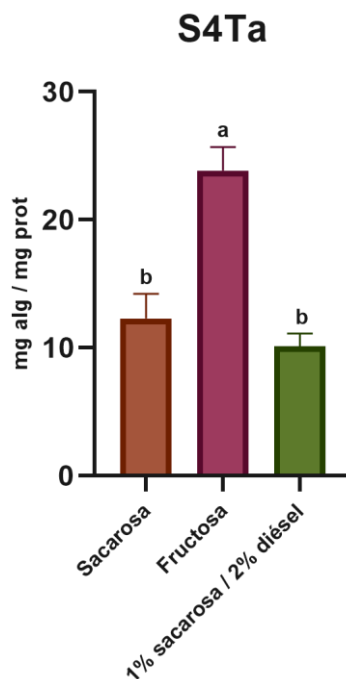


Figura 8. Cuantificación de la producción de alginato de la cepa *A. vinelandii* S4Ta, en diferentes fuentes de carbono (Medio BS, 72 horas a 30°C). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas. Tukey post-hoc ($F_{(2,12)} = 111.2$, $P < 0.0001$).

Los resultados obtenidos de las cepas de *A. chroococcum* (SM3.2) mostraron una mejora estadísticamente significativa ($F_{(2,8)}=163.0$, $P < 0.0001$) en la producción de

alginato. La producción del polímero en la cepa *A. chroococcum* SM3.2 también presentó un incremento de alginato utilizando fructosa al 2% como fuente de carbono (9.45 mg alg/mg prot). Se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar este valor con la fuente de carbono óptima sacarosa al 2% (2.36 mg alg/mg prot; $P < 0.0001$). Además, con la fuente de carbono combinada de sacarosa 1% más diésel al 2% (2.34 mg alg/mg prot) la producción de alginato fue similar a la obtenida con sacarosa al 2% ($P = 0.9983$; Figura 9).

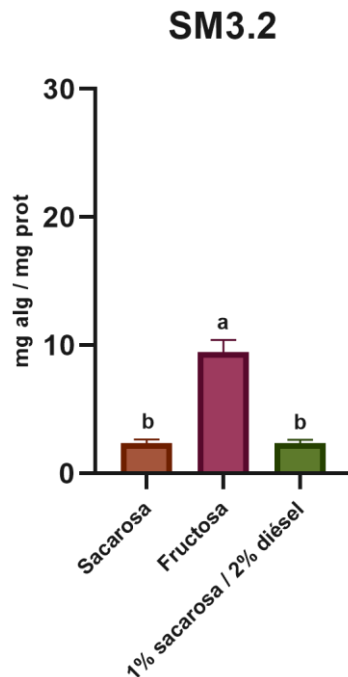


Figura 9. Cuantificación de la producción de alginato de la cepa *A. chroococcum* SM3.2, en diferentes fuentes de carbono (Medio BS, 72 horas a 30°C). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas. Tukey post-hoc ($F_{(2,8)} = 163.0$, $P < 0.0001$).

Al comparar las tres cepas, se observó una mayor producción de alginato en la cepa *A. vinelandii* S4Ta utilizando sacarosa al 2% como fuente de carbono. Esta producción fue cuatro veces superior en comparación con la cepa *A. vinelandii* AEIV. Respecto a *A. chroococcum* SM3.2, la cepa *A. vinelandii* S4Ta mostró una producción seis veces mayor. En ambas comparaciones se presentaron diferencias estadísticas significativas ($P < 0.0001$; Figura 10).

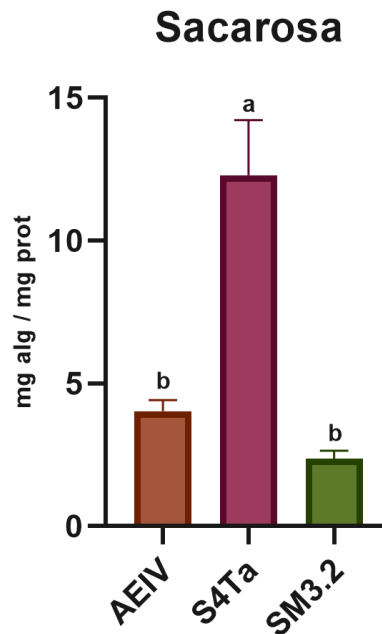


Figura 10. Cuantificación de la producción de alginato con sacarosa como única fuente de carbono (Medio BS, 72 horas a 30°C). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas. Tukey post-hoc ($F_{(2,13)} = 122.0$, $P < 0.0001$).

De manera similar, esta tendencia se mantuvo al comparar la producción del polímero cuando la fuente de carbono fue fructosa al 2%. La cepa *A. vinelandii* S4Ta volvió a presentar la mayor producción del polímero en comparación a las cepas *A. vinelandii* AEIV y *A. chroococcum* SM3.2. Además, se observó que la cepa *A. chroococcum* SM3.2 posee la menor producción de alginato en comparación con *A. vinelandii* AEIV y *A. vinelandii* S4Ta. Estos resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.0001$; Figura 11).

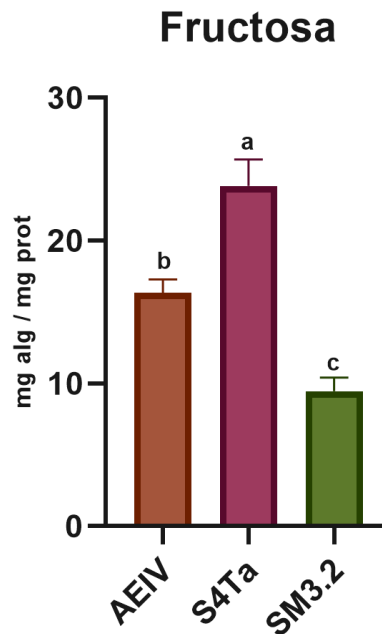


Figura 11. Cuantificación de la producción de alginato con fructosa como única fuente de carbono (Medio BS, 72 horas a 30°C). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas. Tukey post-hoc ($F_{(2,15)} = 147.7$, $P < 0.0001$).

Por otra parte, al comparar la producción del polímero en la fuente de carbono combinada de sacarosa al 1% más diésel al 2%, se observó una diferencia únicamente con la cepa *A. chroococcum* SM3.2. Esta cepa presentó una producción inferior en comparación con *A. vinelandii* AEIV y *A. vinelandii* S4Ta, lo que resultó en diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.0001$; Figura 12).

Sacarosa 1% / Diésel 2%

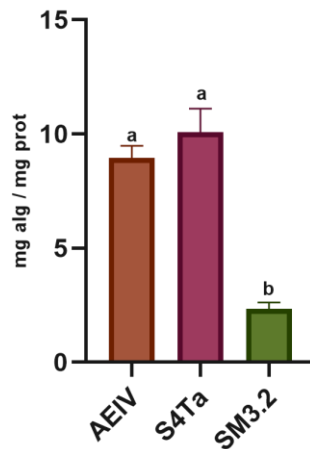


Figura 12. Cuantificación de la producción de alginato con la combinación de sacarosa al 1% más diésel al 2% como única fuente de carbono (Medio BS, 72 horas a 30°C). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas. Tukey post-hoc ($F_{(2,9)} = 128.9$, $P < 0.0001$).

Promoción de crecimiento de la PGPR en *Raphanus sativus* L.

Los datos morfométricos de *R. sativus* L. se evaluaron a los 41 días posteriores a la siembra. Se determinó el peso seco de la biomasa de la parte foliar y radicular; así como la longitud foliar y radicular.



Figura 13. Comparación del desarrollo de *Raphanus sativus* L. tratado con las cepas de *A. vinelandii* AEIV, *A. vinelandii* S4Ta y *A. chroococcum* SM3.2.

Las plantas tratadas con la co-inoculación presentaron un mayor peso seco foliar (0.315 g), seguido de las plantas inoculadas con *A. vinelandii* S4Ta, *A. vinelandii* AEIV y *A. chroococcum* SM3.2 respectivamente. Estos tratamientos mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control, que presentó el menor peso foliar (0.237 g; $P < 0.0001$) (Figura 14).

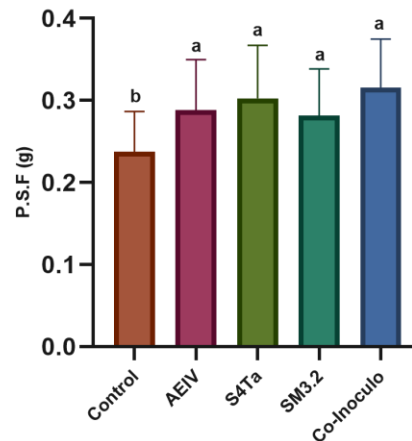


Figura 14. Media del Peso Seco Foliar (P.S.F) presentes en *Raphanus sativus* L. a los 41 días después de la siembra e inoculadas con PGPR: Control: Sin inoculación; AEIV: inoculación con *A. vinelandii* AEIV; S4Ta: inoculación con *A. vinelandii* S4Ta; SM3.2: inoculación con *A. chroococcum* SM3.2 y Co-Inóculo. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas. Tukey post-hoc ($F_{(4,145)} = 7.726$, $P < 0.0001$).

En cuanto al peso seco radicular, la co-inoculación produjo el mayor peso de la raíz (0.223 g), seguida por la cepa *A. chroococcum* SM3.2 (0.151 g). Este último valor mostró un peso seco radicular estadísticamente significativo en comparación del control (0.114 g) ($P < 0.013$). En contraste las cepas *A. vinelandii* AEIV y S4Ta no presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto al control, aunque sí presentaron una diferencia estadística con la co-inoculación ($P < 0.0001$; Figura 15).

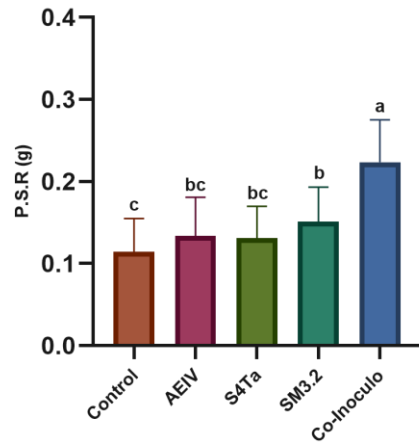


Figura 15. Media del Peso Seco Radicular (P.S.R) presentes en *Raphanus sativus* L. a los 41 días después de la siembra e inoculadas con PGPR: Control: Sin inoculación; AEIV: inoculación con *A. vinelandii* AEIV; S4Ta: inoculación con *A. vinelandii* S4Ta; SM3.2: inoculación con *A. chroococcum* SM3.2 y Co-Inóculo. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas. Tukey post-hoc ($F_{(4,145)} = 27.99$, $P < 0.0001$).

La longitud foliar registró una tendencia similar entre los tres tratamientos de mono-inoculación (16.777 cm). De igual manera se observó una diferencia estadísticamente significativa en el co-inóculo (13.974 cm) con respecto a las cepas *A. vinelandii* AEIV y S4Ta. El control presentó la menor longitud foliar (11.884 cm) al compararlo con todos los demás tratamientos ($P < 0.0001$; Figura 16).

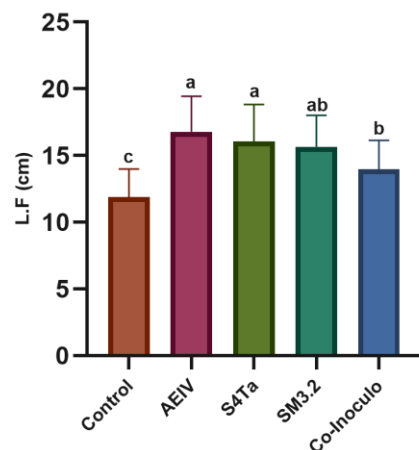


Figura 16. Media de la Longitud Foliar (L.F) presentes en *Raphanus sativus* L. a los 41 días después de la siembra e inoculadas con PGPR: Control: Sin inoculación; AEIV: inoculación con *A. vinelandii* AEIV; S4Ta: inoculación con *A. vinelandii* S4Ta; SM3.2: inoculación con *A. chroococcum* SM3.2 y

Co-Inóculo. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas. Tukey post-hoc ($F_{(4,145)} = 19.58, P < 0.0001$)

En la longitud radicular, se registró una mayor longitud en la cepa *A. vinelandii* AEIV (13.552 cm), seguida de la co-inoculación (13.180 cm). Por otro lado, las cepas *A. vinelandii* S4Ta y *A. chroococcum* SM3.2 no presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (11.268 cm) ($P = 0.0006$, Figura 17).

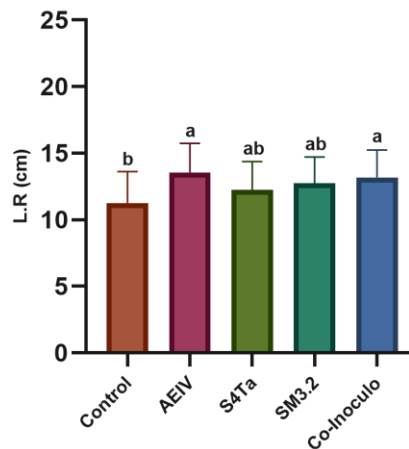


Figura 17. Media de la Longitud Radicular (L.R) presentes en *Raphanus sativus* L. a los 41 días después de la siembra e inoculadas con PGPR: Control: Sin inoculación; AEIV: inoculación con *A. vinelandii* AEIV; S4Ta: inoculación con *A. vinelandii* S4Ta; SM3.2: inoculación con *A. chroococcum* SM3.2 y Co-Inóculo. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas. Tukey post-hoc ($F_{(4,145)} = 5.178, P = 0.0006$).

Evaluación de la Presencia de Bacterias en la Raíz de *R. sativus* L.

Se observó una eficiente colonización por parte de las tres cepas *Azotobacter* spp. La inoculación de las plántulas se realizó con una población en el orden de 10^7 UFC/mL para *A. vinelandii* AEIV y S4Ta, *A. chroococcum* SM3.2 y la co-inoculación de las tres cepas. Se registró una alta supervivencia de las cepas bacterianas que colonizaron la rizósfera de la planta en su última etapa de crecimiento, alcanzando poblaciones del orden de 10^9 UFC/mL tanto en las cepas individuales como en la

co-inoculación. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la colonización entre los cuatro tratamientos ($P = 0.7313$; Figura 18).

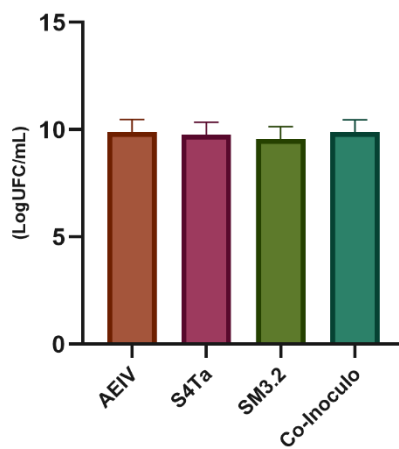


Figura 18. Colonización de la raíz de *Raphanus sativus* L. a los 41 días después de la siembra e inoculada con PGPR. Tukey post-hoc ($F_{(3,26)} = 0.4328$, $P = 0.7313$).

Discusión

Supervivencia Bacteriana a Hidrocarburos

Los resultados de este estudio demuestran diferencias significativas en la capacidad de dos cepas de *A. vinelandii* AEIV y S4T, para tolerar y utilizar hidrocarburos como sustrato. La cepa AEIV alcanzó su máxima densidad poblacional a las 24 horas únicamente en presencia de sacarosa al 1% y diésel al 2%. Este patrón sugiere que un sustrato fácilmente asimilable es necesario para activar los sistemas enzimáticos iniciales requeridos para la degradación de hidrocarburos más complejos (Parthipan *et. al.*, 2017). Por el contrario, la cepa S4Ta exhibió una tolerancia superior, al mostrar mejoras significativas en el crecimiento tanto en combinación con sacarosa como en presencia de diésel puro a concentraciones de hasta 4%, donde alcanzó poblaciones del orden de 10^8 UFC/mL a las 48 horas.

La capacidad de la cepa S4Ta para desarrollarse en altas concentraciones de diésel resulta particularmente notable al compararla con reportes previos. Muñoz de la Cruz y colaboradores (2024) observaron que *A. vinelandii* ATCC 12837, en diésel

al 8%, alcanzó 5.85×10^8 UFC/mL después de 50 días de incubación. Nuestra cepa S4Ta logró una densidad poblacional comparable en solo 48 horas y a una concentración del 4%, lo que sugiere una cinética de adaptación y degradación significativamente mayor. El incremento de la población bacteriana podría estar relacionado con una mayor producción de biotensioactivos, como ramnolípidos y surfactina, mecanismo que Parthipan y colaboradores (2017) identificaron como crucial para la emulsificación y posterior asimilación de hidrocarburos por bacterias degradadoras como *Pseudomonas* sp.

La respuesta de los aislados de *Azotobacter* contrastante a la gasolina, mostró efectos inhibitorios más marcados en ambas cepas, puede atribuirse a la mayor proporción de compuestos aromáticos tóxicos (BTEX) en este combustible. Xu y colaboradores (2018) destacaron que estos compuestos, más solubles y biodisponibles que los alifáticos del diésel, pueden dañar irreversiblemente la integridad de las membranas celulares. La disminución poblacional de *A. vinelandii* S4Ta después de 72 horas en gasolina al 3% y 4% sugiere que, a pesar de sus mecanismos de tolerancia, la exposición prolongada conduce a un estrés metabólico.

Cabe destacar que ambas cepas de este estudio superaron ampliamente los niveles poblacionales reportados por Ikechukwu y Onwurah (2004) para *A. vinelandii* en mezclas de hidrocarburos al 5% (6.09×10^6 UFC/mL). Esta superioridad en el desempeño de cepas nativas AEIV y S4Ta resalta su potencial para aplicaciones en biorremediación, especialmente en sitios con contaminación por diésel donde la adición de co-sustratos podría no ser necesaria, optimizando así las estrategias de intervención.

Los resultados de este estudio demuestran que la cepa *A. chroococcum* SM3.2 presenta una capacidad notable para utilizar el diésel como sustrato, evidenciada por una estimulación del crecimiento a concentraciones del 2% y 3% estadísticamente significativas. El hecho de que la densidad poblacional supere en dos órdenes de magnitud al control, así como los valores reportados por Thavashi y colaboradores, (2006), quienes observaron un máximo de 9.08×10^8 UFC/mL para

A. chroococcum en diésel al 0.5%, sugiere la presencia de mecanismos de degradación y adaptación metabólica particularmente eficientes en las cepas de este estudio. Este desempeño superior podría explicarse por una robusta producción de biotensioactivos, los cuales, son secretados por *Azotobacter* para emulsificar a los hidrocarburos, lo que aumenta así su biodisponibilidad para la asimilación celular (Thavashi *et. al.*, 2006).

Por el contrario, la respuesta inhibitoria observada con la gasolina, donde el crecimiento se mantuvo por debajo o cercano al control, puede atribuirse a la mayor presencia de compuestos aromáticos tóxicos y altamente volátiles (como el benceno, tolueno y xilenos), los cuales son más abundantes en la gasolina que en el diésel (Xu X. *et. al.*, 2018). Estos compuestos pueden dañar las membranas celulares e interferir con procesos metabólicos esenciales, donde la floculación y el cese del crecimiento indican un estrés metabólico severo o una posible toxicidad sinérgica. Este hallazgo coincide con lo observado por Thavashi y colaboradores (2009), quienes identificaron que una concentración del 2% era el límite adecuado para la supervivencia de aislados marinos de la misma especie, aunque obtenidos resultados en este trabajo indican que este umbral es dependiente del tipo de hidrocarburo y de la cepa bacteriana.

Para la cepa *A. chroococcum* SM3.2 la adición de sacarosa al 1% con diésel al 2% no produjo un efecto sinérgico en el crecimiento, el cual se mantuvo similar al control.

Evaluación de la Producción de Alginato

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la cepa *A. vinelandii* AEIV presentó una producción diferencial de alginato en función de la fuente de carbono utilizada. En particular, la producción alcanzada con fructosa al 2% fue significativamente mayor en comparación con sacarosa al 2%, superando en cuatro veces su rendimiento. Este hallazgo presenta una tendencia similar reportado por López-Pliego (2018), quien trabajó con la misma cepa bajo condiciones similares. Se observó una producción del polímero similar cuando la cepa fue expuesta a la

sacarosa como fuente de carbono, mientras que ante fructosa la autora reporta una producción del polímero en un rango de 3.7 a 4.5 mg alg/mg prot. La tendencia del incremento de la producción de alginato en fructosa es similar; sin embargo, en el presente estudio se reportó cuatro veces mayor posiblemente debido a una cuestión metodológica.

Asimismo, al evaluar la producción del metabolito en la cepa *A. vinelandii* AEIV con la fuente de carbono combinada de sacarosa al 1% más diésel al 2%, se observó una producción intermedia que duplicó la cantidad del metabolito respecto al emplear la sacarosa al 2%. Este incremento resulta particularmente relevante, ya que sugiere un posible efecto sinérgico de la fuente hidrocarbonada en la estimulación del metabolismo secundario, lo que favorece la biosíntesis del polímero.

La cepa *A. vinelandii* S4Ta incrementó significativamente la producción de alginato cuando se utilizó fructosa al 2% como fuente de carbono, alcanzando valores casi el doble de los observados con sacarosa al 2%. Este comportamiento coincide parcialmente con lo reportado por Trujillo-Roldán (2015), quien encontró que la fructosa permitía una producción de 5.11 g/L de alginato, mientras que la sacarosa alcanzaba 2.1 g/L en la cepa *A. vinelandii* ATCC 9046, lo que demuestra la eficiencia de la producción del alginato en presencia de fructosa como fuente de carbono.

Al comparar con el estudio de García (2019), quien reportó una producción de la cepa *A. vinelandii* S4Ta de 10.41 mg alg/mg prot en condiciones de cultivo similares utilizando sacarosa, nuestros resultados muestran una ligera mejora en el rendimiento con esta misma fuente de carbono. Esto indica que bajo nuestras condiciones experimentales (tiempo de cultivo 72 horas) la cepa *A. vinelandii* S4Ta presentó un desempeño superior. Por otro lado, cuando se utilizó la combinación de sacarosa al 1% con diésel al 2% como fuente de carbono, la producción de alginato disminuyó significativamente, resultando inferior a lo observado con fructosa y con sacarosa de manera individual. Esta disminución sugiere que la presencia de hidrocarburos puede limitar la síntesis del polímero, posiblemente debido a un

desvío metabólico hacia rutas de adaptación al estrés o a la toxicidad parcial del diésel sobre la bacteria.

La cepa *A. chroococcum* SM3.2 mostró una producción de alginato significativamente mayor cuando se utilizó fructosa al 2% como fuente de carbono, en comparación con las fuentes de carbono sacarosa al 2% y la combinación sacarosa 1% más diésel 2%. Estos resultados evidencian una preferencia metabólica marcada por la fructosa en esta cepa, ya que las diferencias observadas fueron estadísticamente significativas.

Al contrastar estos hallazgos con lo reportado por García (2019), quien obtuvo una producción de 4.5 mg alg/mg prot utilizando sacarosa como fuente de carbono en la cepa *A. vinelandii* SM3, se observa que la producción obtenida en el presente trabajo con *A. chroococcum* SM3.2 cultivada en fructosa resulta superior. Esto sugiere que, aunque ambas especies pertenecen al mismo género, su capacidad de síntesis de alginato puede estar influenciada de manera diferencial por la fuente de carbono empleada. Asimismo, cabe destacar que el valor obtenido en este estudio con sacarosa es inferior al registrado por García (2019), lo cual podría deberse a diferencias en las condiciones experimentales.

Al comparar los resultados entre las cepas y las fuentes de carbono se evidencia que la cepa *A. vinelandii* S4Ta presenta una capacidad significativamente superior de producción de alginato en comparación con las cepas *A. vinelandii* AEIV y *A. chroococcum* SM3.2, tanto en medios suplementados con sacarosa al 2% como con fructosa al 2%. En el caso de la sacarosa, la cepa S4Ta produjo aproximadamente cuatro veces más alginato que AEIV y seis veces más que SM3.2, lo que demuestra una mejora en su producción consistente de esta cepa frente a otras especies y cepas evaluadas. Estos resultados coinciden con lo reportado por García (2019), quien observó que S4Ta alcanzó una producción de 10.41 mg alg/mg prot, nueve veces mayor que AEIV (2.5 mg alg/mg prot). En este sentido el aumento en la relación encontrada en nuestro trabajo respecto a AEIV (4 veces) es menor a la reportada por dicho autor, aunque ambas observaciones refuerzan la tendencia de

que S4Ta posee un potencial de producción marcadamente mayor que AEIV bajo distintas condiciones de cultivo.

Asimismo, al emplear fructosa como fuente de carbono, la tendencia se mantuvo, siendo S4Ta la cepa con mayor rendimiento y *A. chroococcum* SM3.2 la que presentó la menor producción.

En cuanto a la condición combinada (sacarosa 1% más diésel 2%), se observó que únicamente *A. chroococcum* SM3.2 mostró una producción significativamente menor respecto a S4Ta y AEIV. Esto sugiere que las cepas de *A. vinelandii* son más eficientes en el aprovechamiento de fuentes mixtas de carbono en comparación con *A. chroococcum*. Estos hallazgos se relacionan con lo reportado por Yoneyama (2015), quien observó que *A. vinelandii* ATCC 12837 fue capaz de producir 0.5 mg/mL de alginato en presencia de glicerol al 2%, un subproducto del diésel, mientras que en sacarosa al 2% la producción fue de 0.3 mg/mL. De manera similar, Yoshida (2022) describió que la misma cepa, al crecer en glicerol crudo al 0.2%, produjo 44 µg/mL de alginato, lo que confirma la capacidad de la especie para metabolizar compuestos derivados del diésel. Nuestros resultados son superiores a los reportados por Yoshida (2022) y Yoneyama (2015), en términos de concentración, dado que la producción de nuestras cepas fue significativamente mayor bajo condiciones combinadas de sacarosa y diésel.

Aunado a esto, la cepa AEIV permitió comparar la producción de alginato empleando sacarosa al 2% con la fuente de carbono con la combinación de sacarosa al 1% más diésel al 2%; en este caso, se observaron diferencias estadísticas. Sin embargo, tanto en la cepa S4Ta y SM3.2 no hubo diferencias estadísticas entre ambas fuentes de carbono, lo que evidencia que, aún disminuyendo la concentración de sacarosa y añadiendo otra fuente de carbono como el diésel, la producción entra ambas condiciones fue similar, lo que representa un ahorro del 50% de sacarosa sin sacrificar la producción del polímero. Asimismo, los resultados obtenidos por Trujillo-Roldán (2015) con la cepa *A. vinelandii* ATCC 9046 evidencian que existen diversas fuentes de carbono alternativas capaces de sostener la producción de alginato, como la glucosa (3.1 g/L), la galactosa (2.2 g/L),

el suero de leche (1.20 g/L) e incluso subproductos agroindustriales como el jugo de caña de azúcar (0.45 g/L). Estos hallazgos abren la posibilidad de explorar fuentes de carbono de bajo costo o provenientes de residuos industriales y agrícolas, lo cual no solo podría incrementar la viabilidad económica del proceso, sino también contribuir a un enfoque más sostenible en la producción de biopolímeros como el alginato.

En conjunto, los resultados confirman una alta producción de alginato de la cepa S4T respecto a *A. vinelandii* AEIV y *A. chroococcum* SM3.2 en distintas fuentes de carbono y aportan evidencia adicional de la capacidad de *A. vinelandii* para metabolizar combinaciones de azúcares y derivados del diésel, aunque con rendimientos que, dependiendo de las condiciones de cultivo, pueden ser inferiores o superiores a lo previamente reportado en cepas de referencia.

Promoción de Crecimiento de la PGPR en *Raphanus sativus* L.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran un efecto promotor del crecimiento vegetal significativo del rábano cuando se emplea una co-inoculación de cepas de *A. vinelandii* (S4Ta y AEIV) y *A. chroococcum* (SM3.2) superior en comparación con las mono-inoculaciones de las plantas. Se observó un incremento notable en los parámetros morfométricos como peso seco foliar, peso seco radicular, longitud foliar y longitud radicular.

Varios estudios han reportado que *A. vinelandii* y *A. chroococcum* mejoran el crecimiento de plantas de la familia *Brassicaceae*, incluido *R. sativus*, en mono-inoculación. Por ejemplo, Sun y colaboradores (2022) observaron que la co-inoculación de cepas *A. vinelandii* spp. incrementó la biomasa seca de *R. sativus* de 22 a 30% en condiciones de invernadero, dependiendo de la cepa. De igual forma el estudio realizado por Martínez-Viveros y colaboradores (2010) reportó que en la cepa *A. vinelandii* produjo un incremento del 18-27% en *Brassica* spp. en condiciones de invernadero. Si bien el incremento total de biomasa observado en este estudio (10%) fue menor que los valores máximos reportados por dichos autores, es importante destacar que el aumento en la biomasa aérea (27%) se

encuentra dentro del rango superior documentado previamente. Por otra parte, el aumento de la biomasa radicular (16%) podría estar relacionado con la distribución de nutrientes en la planta.

La cepa *A. chroococcum* SM3.2 presentó un aumento en biomasa total del rábano (23%). Este porcentaje es menor comparado con lo obtenido por Kizikaya (2009), quién reportó un aumento del 28-32% en peso seco total en *Triticum aestivum* (trigo) al ser mono-inoculado con 11 aislados de *A. chroococcum*. Así mismo, al analizar el incremento de biomasa, los datos obtenidos se asemejan parcialmente a los hallazgos de Egamberdieva y colaboradores (2017), quienes observaron un incremento del 25% en la biomasa aérea y 34% en radicular en *Brassica juncea* (mostaza india). En este trabajo, el aumento de la biomasa radicular fue de 32%, lo que se aproxima al valor reportado por dichos autores, mientras que el incremento en la biomasa aérea (18%) fue inferior, lo que puede deberse a las diferencias metabólicas de cada tipo de planta utilizadas en estos trabajos.

El tratamiento de la co-inoculación de *A. vinelandii* y *A. chroococcum* mostró un efecto promotor más pronunciado que las mono-inoculaciones, lo que demuestra una interacción sinérgica entre ambas cepas evaluadas. Esto evidencia un incremento de la biomasa radicular en un 95% en comparación con el control no inoculado. Este valor superó de manera notable lo reportado por Egamberdieva y colaboradores (2017), quienes registraron que la co-inoculación de *A. vinelandii* y *A. chroococcum* sp. en *B. juncea* incrementó la biomasa total en un 45-48% respecto a los controles no inoculados, debido que la interacción PGPR- planta induce una mayor eficiencia en la utilización de recursos. En contraste, la biomasa total en el rábano presentó un aumento del 53%, observándose un mayor desarrollo de planta en la co-inoculación en comparación de los mono-inóculos, de forma similar a lo reportado por los autores, donde se observa un aumento en la biomasa de *B. juncea* en su tratamiento de co-inoculación en contraste a las mono-inoculaciones.

Evaluación de la Presencia de Bacterias en la Raíz de *R. sativus* L.

Las dos cepas de *A. vinelandii* (AEIV y ST4a) y *A. chroococcum* SM3.2 lograron establecerse de manera consistente, manteniendo poblaciones altas y estables en la rizósfera de las plantas. Esta persistencia sugiere una buena capacidad de colonización de la raíz.

Estudios previos han demostrado que *A. vinelandii* y *A. chroococcum* poseen una notable capacidad de colonizar la rizosfera de plantas de la familia *Brassicaceae*, a la que pertenece *R. sativus*. Por ejemplo, Martínez-Viveros y colaboradores (2010) reportaron que *A. chroococcum* A4 puede colonizar eficientemente la rizósfera de cultivos como *Brassica oleracea* (col silvestre), formando biofilms y compitiendo con la microbiota nativa gracias a su producción de exopolisacáridos y sideróforos. En dicho estudio, la densidad máxima de colonias bacterianas alcanzó valores en el orden 10^7 UFC/g de suelo en condiciones de tierra esterilizada. Otro estudio realizado por Liew y colaboradores (2015) reportó que la mono-inoculación de *A. vinelandii* ATCC 12837 mostró complicaciones en la colonización de la rizósfera de la planta *Oryza sativa* (arroz), al observar una población bacteriana de 10^6 UFC/mL y culminar el experimento con una población bacteriana de 10^6 UFC/mL, al cabo de dos semanas de inoculación de rizósfera. En contraste, en el presente estudio se registró densidades bacterianas superiores, al alcanzar de dos a tres órdenes de magnitud superior a la población que se inoculó, lo que indica que las cepas utilizadas presentan una mayor eficiencia de colonización de la raíz.

Por su parte Narula y colaboradores (2007), reportaron que la mono-inoculación de *A. chroococcum* Mac 27 puede colonizar de manera eficiente la rizosfera de *T. aestivum* (Trigo). Cuantificaron una población inicial de 10^5 UFC/mL y una colonización final de 1.32×10^7 UFC/mL a los 28 días del experimento con estrés hidropónico, mientras que en condiciones de invernadero a los 60 días de la inoculación se reportó una población bacteriana de 3.48×10^7 UFC/mL dependiente del tratamiento de nutrientes (fósforo y nitrógeno). Los resultados obtenidos por Narula (2017) son similares a los obtenidos en el presente estudio; sin embargo, debemos resaltar que tanto el periodo de tiempo del experimento como los

nutrientes del suelo difieren de los utilizados en este estudio, donde el desarrollo del rábano fue de 41 días, y la aplicación de una mayor cantidad de nutrientes en el sustrato. Se observó que a mayor cantidad de nutrientes en el suelo menor será el tiempo requerido para el crecimiento de la planta, y la población bacteriana no se verá tan afectada.

Conclusiones

El presente estudio permitió establecer que los aislados de *Azotobacter vinelandii* S4Ta y *Azotobacter chroococcum* SM3.2 presentaron diferentes niveles de tolerancia a hidrocarburos, siendo más resistentes al diésel que a la gasolina. Esto confirma su potencial para aplicaciones en biorremediación de entornos contaminados con este xenobiótico. Asimismo, se evidenció que la fuente de carbono influye de manera decisiva en la producción de alginato, destacando la fructosa como la fuente más eficiente para estimular su síntesis, y la cepa *A. vinelandii* S4Ta como la de mayor rendimiento. La combinación de sacarosa con diésel mostró un efecto variable según la cepa, incluso permitiendo un ahorro significativo de sacarosa sin comprometer la producción del polímero en ciertas condiciones. Finalmente, se comprobó que tanto las inoculaciones individuales de *A. vinelandii* AEIV y S4Ta, y *A. chroococcum* SM3.2 como la co-inoculación de las cepas, ejercen un efecto promotor significativo en el crecimiento de *Raphanus sativus* L. Dicho efecto se correlaciona con una eficiente colonización radicular, lo que resalta el valor de estas bacterias no solo como agentes degradadores de hidrocarburos, sino también como biofertilizantes con aplicaciones prometedoras en la agricultura sostenible.

Perspectivas

- Evaluar la promoción de crecimiento vegetal bajo estrés por hidrocarburos.
- Evidenciar si hay diferencia entre la calidad y composición del polímero al cambiar la fuente de carbono.

- Identificar la presencia de genes y la expresión de estos, que contribuyan con la oxidación de hidrocarburos y la promoción de crecimiento vegetal.

Bibliografía

1. Aasfar A., Bargaz A., Yaakoubi K., Hilali A., Bennis I., Zeroual Y., et. al. (2021). Nitrogen Fixing Azotobacter Species as Potential Soil Biological Enhancers for Crop Nutrition and Yield Stability. *Frontiers in Microbiology*. DOI: 10.3389/fmicb.2021.628379.
2. Aguado-Santacruz, Gerardo A., Moreno-Gómez, Blanca, Jiménez-Francisco, Betzaida, García-Moya, Edmundo, & Preciado-Ortiz, Ricardo E.. (2012). Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. *Revista fitotecnia mexicana*, 35(1), 9-21
3. Alami Y, Achouak W, Marol C, Heulin T. 2000. Rhizosphere Soil Aggregation and Plant Growth Promotion of Sunflowers by an Exopolysaccharide-Producing Rhizobium sp. Strain Isolated from Sunflower Roots. *Appl Environ Microbiol* 66: <https://doi.org/10.1128/AEM.66.8.3393-3398.2000>
4. Aldor I.S, Keasling J. D. Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. *Current Opinion in Biotechnology*. 14: 475-483. 2003.
5. Ali, M. H., Khan, M. I., Naveed, M., & Tanvir, M. A. (2023). Microbe-assisted rhizoremediation of hydrocarbons and growth promotion of chickpea plants in petroleum hydrocarbons-contaminated soil. *Sustainability*, 15(7), 6081.
6. Alotaibi, F., Alharbi, S. A., Alotaibi, K. A., & Alzahrani, S. A. (2022). In-Depth Characterization of Plant Growth Promotion Potentials of Selected Alkanes-Degrading Plant Growth-Promoting Bacterial Isolates.
7. Arora, M., Saxena, P., Abdin, M. Z., & Varma, A. (2018). Interaction between *Piriformospora indica* and *Azotobacter chroococcum* governs better plant physiological and biochemical parameters in *Artemisia annua* L. plants grown under in vitro conditions. *Symbiosis*, 75(2), 103–112. <https://doi.org/10.1007/s13199-017-0519-y>
8. Balogh, B., Jones J.B., Iriarte, F., Momol, M. (2010) Phage therapy for plant disease control. *Curr Pharm Biotechnol* 11:48–57
9. Balseiro-Romero, M., Gkorezis, P., Kidd, P. S., Van Hamme, J., Weyens, N., Monterroso, C., & Vangronsveld, J. (2017). "Use of plant growth promoting bacterial strains to improve *Cytisus striatus* and *Lupinus luteus* development for potential application in phytoremediation." *Science of The Total Environment*, 581-582, 676-688. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2016.12.180](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.180)
10. Banihani S. A. (2017). Radish (*Raphanus sativus*) and Diabetes. *Nutrients*, 9(9), 1014. <https://doi.org/10.3390/nu9091014>
11. Bashan, Y., de-Bashan, L. E., Prabhu, S. R., & Hernandez, J. P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives. *Plant and Soil*, 378(1-2), 1-33.
12. Bittner, A., Cieśła, A., Gruden, K., Lukan, T., Mahmud, S., Teige, M., Vohtknecht, U. C., & Wurzing, B. (2022). Organelles and phytohormones: a network of interactions

- in plant stress responses. *Journal of experimental botany*, 73(21), 7165–7181. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac384>
13. Boström, C. E., et. al. (2002). Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environmental Health Perspectives*, 110(Suppl 3), 451-488.
 14. Bottini, R., Cassán, F., & Piccoli, P. (2004). Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Applied microbiology and biotechnology*, 65(5), 497–503. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1696-1>
 15. Boyd, E. S., & Peters, J. W. (2013). New insights into the evolutionary history of biological nitrogen fixation. *Frontiers in microbiology*, 4, 201. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00201>
 16. Boyd, P & Ellwood, M. (2010). The biogeochemical cycle of iron in the ocean. *Nature Geosci* 3, 675–682. <https://doi.org/10.1038/ngeo964>
 17. Brennerova, M. V., Josefiova, J., Brenner, V., Pieper, D. H., & Junca, H. (2009). Metagenomics reveals diversity and abundance of meta-cleavage pathways in microbial communities from soil highly contaminated with jet fuel under air-sparging bioremediation. *Environmental microbiology*, 11(9), 2216–2227. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01943.x>
 18. Brito, O., Ize, I., Gavilan, A. (2003). La restauración de suelos contaminados con hidrocarburos en México. *Gaceta ecológica*. 69: 83-92
 19. Calvo, J. & Martínez-Martínez. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos
 20. **Costa, O. Y., et. al. (2018)**. Microbial extracellular polymeric substances: Ecological function and impact on soil aggregation. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1636. DOI: [10.3389/fmicb.2018.01636](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01636)
 21. Curtis, I. S. (2003). The noble radish: past, present and future. *Trends in Plant Science*, 8(7), 305-307.
 22. Egamberdieva, D., et. al. (2017). Phytohormones and beneficial microbes: Essential components for plants to balance stress and fitness. *Soil Biology and Biochemistry*, 112, 40–50.
 23. Elhaisoufi, W., Khourchi, S., Ibyasser, A., Ghoulam, C., Rchiad, Z., Zeroual, Y., Lyamlouli, K., & Bargaz, A. (2020). Phosphate Solubilizing Rhizobacteria Could Have a Stronger Influence on Wheat Root Traits and Aboveground Physiology Than Rhizosphere P Solubilization. *Frontiers in plant science*, 11, 979. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00979>
 24. Fernández, R. (2024). *Volumen de petróleo producido a nivel mundial*. Statista. <https://es.statista.com/estadisticas/635470/volumen-de-petroleo-producido-a-nivel-mundial/>
 25. Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2010). *The biofilm matrix*. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623–633. DOI:10.1038/nrmicro2415
 26. Flemming, HC., Wingender, J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 8, 623–633 (2010). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
 27. Frampton, R.A., Pitman, A.R., Fineran P.C. (2012). Advances in bacteriophage-mediated control of plant pathogens. *Int J Microbiol*.
 28. Fukami, J., de la Osa, C., Ollero, F. J., Megías, M., & Hungria, M. (2018). Co-inoculation of maize with *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium tropici* as a strategy to mitigate salinity stress. *Functional plant biology: FPB*, 45(3), 328–339. <https://doi.org/10.1071/FP17167>

29. Gadd, G. M. (2010). "Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation." *Microbiology*, 156(3), 609-643.
30. Galindo E, Peña C, Nuñez C, Segura D, Espín G. (2007). Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microbial Cell Factories* 6: 7-211.
31. García, G. D. (2019). Aislamiento y caracterización de cepas de *Azotobacter* spp. Y el efecto de la sobreexpresión de los srna: rsmz1 y rsmz6 sobre la producción de alginato. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
32. Gawin, A., Tietze, L., Aarstad, O. A., Aachmann, F. L., Brautaset, T., & Ertesvåg, H. (2020). functional characterization of three *Azotobacter* chroococcum alginate-modifying enzymes related to the *Azotobacter vinelandii* AlgE mannuronan C-5-epimerase family
33. Ghimire, S., Adhikari, B., Pandey, S., Belbase, K., Lamichhane, S., & Pathak, R. (2020). Effect of different organic manure on growth and yield of radish in Deukhuri, Dang, Nepal. *Acta Sci. Agric*, 4, 1-5.
34. Glick B. R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological research*, 169(1), 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.009>
35. Glick, B. R. (2010). Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnology Advances*, 28(3), 367-374.
36. Glick, B. R., & Stearns, J. C. (2011). "Making phytoremediation work better: Maximizing a plant's growth potential in the midst of adversity." *International Journal of Phytoremediation*, 13(Suppl. 1), 4-16. DOI: [10.1080/15226514.2011.568533](https://doi.org/10.1080/15226514.2011.568533)
37. Gomes, G. L. B., & Scortecchi, K. C. (2021). Auxin and its role in plant development: structure, signalling, regulation and response mechanisms. *Plant biology (Stuttgart, Germany)*, 23(6), 894–904. <https://doi.org/10.1111/plb.13303>
38. Govindasamy, C., Arulpriya, M., Ruban, P., Francisca, J.L. and Ilayaraja, A. (2011) Concentration of Heavy Metals in Seagrasses Tissue of the Palk Strait, Bay of Bengal. *International Journal of Environmental Sciences*, 2, 145-153. <https://doi.org/10.11594/jtls.02.01.01>
39. Gurikar, C., Naik, M. K., & Sreenivasa, M. Y. (2016). *Azotobacter*: PGPR activities with special reference to effect of pesticides and biodegradation. En D. Singh, H. Singh & R. Prabha (Eds.), *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity* (pp. 229–244). Springer India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2647-5_13
40. Hara M., Torazawa D., Asai T., Takahashi I. (2011). Variations in the soluble sugar and organic acid contents in radish (*Raphanus sativus* L.) cultivars. *Int. J. Food Sci. Technol.* 46, 2387–2392. doi: 10.1111/j.1365-2621.2011.02761.x
41. Hay I. D. Wang Y. Moradoli M. F., Rehman Z. U. Rehm B. H. A. Genetic and regulation of bacterial alginate production. *Environmental microbiology*. 16: 2997 – 3011. 2014.
42. Hay, I. D., et. al. (2013). Microbial alginate production, modification and its applications. *Microbial Biotechnology*, 6(6), 637-650. DOI: [10.1111/1751-7915.12076](https://doi.org/10.1111/1751-7915.12076)
43. Hay, I. D., Wang, Y., Moradali, M. F., Rehman, Z. U., & Rehm, B. H. A. (2014). Genetics and regulation of bacterial alginate production. *Environmental Microbiology*, 16(10), 2997–3011. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12389>

44. Hernández-Villaseñor, R. (2024). Cultivo de Rábano: Guía Práctica de Siembra
45. Ikechukwu, O., & Onwurah, I. (2004). Enhanced bioremediation of crude oil-contaminated soil by a *Pseudomonas* species and mutually associated adapted *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. <https://doi.org/10.1002/JCTB.1009>
46. Iqbal, M. y Ashraf, M. (2013). Gibberellic acid mediated induction of salt tolerance in wheat plants: Growth, ionic partitioning, photosynthesis, yield and hormonal homeostasis. *Environmental and Experimental Botany*. 86. 76-85.
47. Jensen H. L. The *Azotobacteriaceae*. Department of Bacteriology, Stante Laboratory of Plant Culture, Lyngby, Denmark. 18: 195-214. 1954.
48. Jha, B., Gontia, I. & Hartmann, A. The roots of the halophyte *Salicornia brachiata* are a source of new halotolerant diazotrophic bacteria with plant growth-promoting potential. *Plant Soil* 356, 265–277 (2012). <https://doi.org/10.1007/s11104-011-0877-9>
49. Jing, Y.-D., He, Z.-L., & Yang, X.-E. (2007). Role of soil rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Journal of Zhejiang University Science B*, 8(3), 192–207. doi: 10.1631/jzus.2007.B0192.
50. Kennedy, C., Rudnick, P., MacDonald, M. L., & Melton, T. (2015). *Azotobacter*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–33. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01207>
51. Khattak K.F. (2011). Nutrient composition, phenolic content and free radical scavenging activity of some uncommon vegetables of Pakistan. *Pak. J. Pharm.*
52. Kizilkaya, R. (2009). *Yield response and nitrogen concentrations of spring wheat inoculated with *Azotobacter chroococcum*. *Applied Soil Ecology*, 42(3), 276–281.
53. Kramer, J., Özkaya, Ö., & Kümmerli, R. (2020). Bacterial siderophores in community and host interactions. *Nature reviews. Microbiology*, 18(3), 152–163. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0284-4>
54. Kumar, S., Kumar, V., & Prakash, O. (2015). Pharmacognostic and pharmacological potential of *Raphanus sativus* L. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 4(1), 144-149.
55. Kumar, V., Raghuvanshi, N., Pandey, A.K., Kumar, A., Thoday-Kennedy, E. & Kant, S. (2023). "Role of Halotolerant Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in Mitigating Salinity Stress: Recent Advances and Possibilities" *Agriculture* 13, no. 1: 168. <https://doi.org/10.3390/agriculture13010168>
56. Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2012). Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 37(1), 106-126.
57. Leyser O. (2018). Auxin Signaling. *Plant physiology*, 176(1), 465–479. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00765>
58. Liew, P. W., Jong, B. C., & Najimudin, N. (2015). Hypothetical protein Avin_16040 as the S-layer protein of *Azotobacter vinelandii* and its involvement in plant root surface attachment. *Applied and environmental microbiology*, 81(21), 7484–7495. <https://doi.org/10.1128/AEM.02081-15>
59. Liu, G., Greenshields, D. L., Sammynaiken, R., Hirji, R. N., Selvaraj, G., Wei, Y. 2007. Targeted alterations in iron homeostasis underlie plant defense responses. *Journal of Cell Science*, 120(4), 596-605. doi: 10.1242/jcs.001362
60. Liu, Y., et. al. (2023). Transcriptomic and physiological analyses reveal the molecular mechanism of PAH phytotoxicity in *Arabidopsis* roots. *Journal of Hazardous Materials*, 441, 129943.

61. López-Pliego, L., García-Ramírez, L., Cruz-Gómez, E. A., Domínguez-Ojeda, P., López-Pastrana, A., Fuentes-Ramírez, L. E., Núñez, C., & Castañeda, M. (2018). Transcriptional Study of the RsmZ-sRNAs and Their Relationship to the Biosynthesis of Alginate and Alkylresorcinols in *Azotobacter vinelandii*. *Molecular Biotechnology*, 60:670–680. El artículo fue publicado en línea el 10 de julio de 2018 y el DOI es <https://doi.org/10.1007/s12033-018-0102-7>.
62. Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63, 541-556. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>
63. Manoj, S. R.; Karthik, C.; Kadirvelu, K.; Arulselvi, P. I.; Shanmugasundaram, T.; Bruno, B.; Rajkumar, M. (2020). Understanding the molecular mechanisms for the enhanced phytoremediation of heavy metals through plant growth promoting rhizobacteria: A review. *Journal of Environmental Management*, 254:109779. DOI: 10.1016/j.jenvman.2019.109779.
64. Mariana Diaconu, Lucian Vasile Pavel, Raluca-Maria Hlihor, Mihaela Rosca, Daniela Ionela Fertu, Markus Lenz, Philippe Xavier Corvini, Maria Gavrilescu, Characterization of heavy metal toxicity in some plants and microorganisms—A preliminary approach for environmental bioremediation, *New Biotechnology*, Volume 56, 2020, Pages 130-139, ISSN 1871-6784, <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2020.01.003>.
65. Martínez-Viveros, O, Jorquera, M.A, Crowley, D.E, Gajardo, G, & Mora, M.L. (2010). MECHANISMS AND PRACTICAL CONSIDERATIONS INVOLVED IN PLANT GROWTH PROMOTION BY RHIZOBACTERIA. *Journal of soil science and plant nutrition*, 10(3), 293-319. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162010000100006>
66. Miranda, A., Peralta, L., Valdés, A., García, M., Sánchez, M., (2008). Diseño de una planta productora de ácido algínico y alginatos a partir de *Azotobacter vinelandii*. *Tecnología, Ciencia, Educación*, 2(23):91-98.
67. Morcillo, R. J., & Manzanera, M. (2021). The effects of plant-associated bacterial exopolysaccharides on plant abiotic stress tolerance. *Metabolites*, 11(6), 337.
68. Muñoz-de la Cruz, K. M., Valencia-Luna, G. A., Pérez-Armendáriz, B., & Ortega-Martínez, L. D. (2024). *Tagetes erecta* y *Azotobacter vinelandii* inmovilizadas para la biorremediación de diésel en suelos agrícolas. *Revista Internacional De Contaminación Ambiental*, 40, 619–630. <https://doi.org/10.20937/RICA.54904>
69. Narrillos Rodríguez, E. (2014). Estudio de sideróforos procedentes de bacterias patógenas de peces de acuicultura. Tesis de licenciatura en Química. Universidade da Coruña. 76 pp
70. Narula N, Remus R, Deubel A, Granse A, Dudeja SS, Behl RK, Merbach W. Comparison of the effectiveness of wheat roots colonization by *Azotobacter chroococcum* and *Pantoea agglomerans* using serological techniques. *Plant Soil Environ*. 2007;53(4):167-176. doi: 10.17221/2312-PSE.
71. Noar, J. D. y Bruno-Bárcena, J. M. (2018). *Azotobacter vinelandii*: The source of 100 years of discoveries and many more to come. *Microbiology*. DOI: 10.1099/mic.0.000643
72. NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012. Que establece los límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestro en la caracterización y especificaciones para la remediación. Publicado en el Diario Oficial de la Federación el 23 de agosto 2010.
73. Nwodo, U. U., Green, E., & Okoh, A. I. (2012). Bacterial Exopolysaccharides: Functionality and Prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(11), 14002-14015. <https://doi.org/10.3390/ijms131114002>

74. Oh, S. J., Moon, K. H., Song, E. Y., Wi, S. H., & Koh, S. C. (2019). Photosynthesis, Productivity, and Mineral Content of Winter Radishes by Soil Type on Jeju Island. *Horticultural Science and Technology*, 37(2), 167-177. doi:10.12972/kjhst.20190017
75. Oleńska, E., Małek, W., Wójcik, M., Swiecicka, I., Thijs, S., & Vangronsveld, J. (2020). "Beneficial features of plant growth-promoting rhizobacteria for improving plant growth and health in challenging conditions: A methodical review." *Science of The Total Environment*, 743, 140682. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2020.140682](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140682)
76. Oliveira, J. A., et. al. (2020). "FTIR analysis of metal-binding sites in bacterial exopolysaccharides." *Química Nova*, 43(5), 589-597.
77. Omarova, M., Swientoniewski, L. T., Tsengam, I. K. M., Panchal, A., Yu, T., Blake, D. A., ... & John, V. (2018). Engineered clays as sustainable oil dispersants in the presence of model hydrocarbon degrading bacteria: the role of bacterial sequestration and biofilm formation. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 6(11), 14143-14153.
78. Parthipan P, Elumalai P, Sathishkumar K, Sabarinathan D, Murugan K, Benelli G, Rajasekar A. Biosurfactant and enzyme mediated crude oil degradation by *Pseudomonas stutzeri* NA3 and *Acinetobacter baumannii* MN3. *3 Biotech*. 2017 Oct;7(5):278. doi: 10.1007/s13205-017-0902-7. Epub 2017 Aug 7. PMID: 28794933; PMCID: PMC5545984.
79. Pemex, (2016). Elaboración de productos petrolíferos. Recuperado de <http://ebdi.pemex.com/bdi/bdiController.do?action=temas>)
80. Pereira, S. I., et. al. (2021). "Exopolysaccharides from rhizobacteria in metal bioremediation: Mechanisms and applications." *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(3), 1125-1136.
81. Perera, F. P., et. al. (2022). Prenatal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and cognitive dysfunction in children: A longitudinal cohort study. *Environmental Health Perspectives*, 130(2), 027001.
82. Petróleos Mexicanos (PEMEX). (2006). *Diccionario de términos petroleros*. Subdirección de Distribución y Comercialización, Empresa de Transporte por Ducto. Recuperado de https://ebdi.pemex.com/bdi/docs/Diccio_marzo2006-4_en.pdf
83. Pilon-Smits, E. (2005). "Phytoremediation of toxic metals: Using plants to clean up the environment." *Annual Review of Plant Biology*, 56, 15-39. DOI: [10.1146/annurev.arplant.56.032604.144214](https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144214)
84. Prasad H., Sajwan P., Kumari M. y Solanki S.P.S. (2017). Effect of organic manures and biofertilizer on plant growth, yield and quality of horticultural crop: A review. *International Journal of Chemical Studies* 5(1), 217-221
85. Ramos Solano, B., Barriuso, J. and Gutiérrez Mañero, F.J. (2008). Physiological and Molecular Mechanisms of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). In *Plant-Bacteria Interactions*. <https://doi.org/10.1002/9783527621989.ch3>
86. Remminghorst, U., & Rehm, B. H. A. (2006). Bacterial alginates: From biosynthesis to applications. *Biotechnology Letters*, 28(21), 1701-1712.
87. Rodríguez, L. S. (2017). Impacto geotécnico de los derrames de diésel en suelos finos. (Tesis de posgrado), Escuela Colombia de Ingeniería Julio Garavito. Bogotá, Colombia. Recuperado de

- <https://repositorio.escuelaing.edu.co/bitstream/001/546/1/Rodr%C3%ADguez%20Cuervo%2c%20Lady%20Sof%C3%ADa%20-%202017.pdf>
88. Sadoff H. L. Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriological Review*. 39: 516-539. 1975.
 89. Sakakibara H. (2021). Cytokinin biosynthesis and transport for systemic nitrogen signaling. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 105(2), 421–430. <https://doi.org/10.1111/tpj.15011>
 90. Sanchez-Gonzalez, M. E., Mora-Herrera, M. E., Wong-Villarreal, A., De La Portilla-López, N., Sanchez-Paz, L., Lugo, J., Vaca-Paulín, R., Del Aguila, P., & Yañez-Ocampo, G. (2022). Effect of pH and Carbon Source on Phosphate Solubilization by Bacterial Strains in Pikovskaya Medium. *Microorganisms*, 11(1), 49. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010049>
 91. Santos, M. S., Nogueira, M. A., & Hungria, M. (2019). Microbial inoculants: Reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. *AMB Express*, 9(1), 205. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0932-0>
 92. Santoyo, G., Urtis-Flores, C. A., Loeza-Lara, P. D., Orozco-Mosqueda, M. D. C., & Glick, B. R. (2021). Rhizosphere Colonization Determinants by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR). *Biology*, 10(6), 475. <https://doi.org/10.3390/biology10060475>
 93. Schalk, I. J., Mislin, G. L., & Brillet, K. (2012). Structure, function and binding selectivity and stereoselectivity of siderophore-iron outer membrane transporters. *Current topics in membranes*, 69, 37–66. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394390-3.00002-1>
 94. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2020). Rábano. Gobierno de México. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/726314/Rabano.pdf>
 95. Seo M.-S., Chung J.-H., Park B.-S., Kim J.S. (2018). Analysis of Sugars Content by Genotypes in 82 Radish (*Raphanus sativus* L.) *Korean J. Plant*
 96. Shenoy, V. V., & Kalagudi, G. M. (2005). Enhancing plant phosphorus use efficiency for sustainable cropping. *Biotechnology advances*, 23(7-8), 501–513. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.01.004>
 97. SIAP (2023). *Anuario Estadístico de la Producción Agrícola*. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera.
 98. Singh, R., Parihar, P., Singh, S., Mishra, R. K., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2017). Reactive oxygen species signaling and stomatal movement: Current updates and future perspectives. *Redox biology*, 11, 213–218. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.11.006>
 99. Socolofsky, M. D., and Wyss, O. Resistance of the *Azotobacter* cyst. *Journal of Bacteriology*. 84:119-124. 1962.
 100. Stijn Spaepen, Jos Vanderleyden, Roseline Remans, Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling, *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 31, Issue 4, July 2007, Pages 425–448, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x>
 101. Sumbul, A., Ansari, R. A., Rizvi, R., & Mahmood, I. (2020). *Azotobacter*: A potential bio-fertilizer for soil and plant health management. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27, 3634–3640.
 102. Sun, N., Gu, Y., Jiang, G., Wang, Y., Wang, P., Song, W., Ma, P., Duan, Y., & Jiao, Z. (2022). Bacterial Communities in the Endophyte and Rhizosphere of White

- Radish (*Raphanus sativus*) in Different Compartments and Growth Conditions. *Frontiers in microbiology*, 13, 900779. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.900779>
103. Takehara, S., Ueguchi-Tanaka, M. (2018). Gibberellin. In: Hejátko, J., Hakoshima, T. (eds) *Plant Structural Biology: Hormonal Regulations*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-91352-0_6
 104. Tara, N., Afzal, M., Ansari, T. M., Tahseen, R., & Iqbal, S. (2014). Phytoremediation potential of *Sesbania sesban* (L.) Merr. combined with bacterial consortium for the remediation of diesel contaminated soil. *International Journal of Phytoremediation*, 16(7-8), 717-724. <https://doi.org/10.1080/15226514.2013.856846>
 105. Thavasi R, Subramanyam Namburu VR, Jayalakshmi S, Balasubramanian T, Banat IM. Biosurfactant production by *Azotobacter chroococcum* isolated from the marine environment. *Mar Biotechnol* (NY). 2009 Sep-Oct;11(5):551-6. doi: 10.1007/s10126-008-9162-1. Epub 2008 Nov 26. PMID: 19034398.
 106. Thavasi R., Jayalakshmi S., Balasubramanian T., Banat I.M. Biodegradation of crude oil by nitrogen fixing marine bacteria *Azotobacter chroococcum*. *Research J Microbiol*. 2006. DOI reportado: 10.3923/jm.2006.401.408.
 107. Trujillo-Roldán, M. A.; Monsalve-Gil, J. F.; Cuesta-Álvarez, A. M.; Valdez-Cruz, N. A. (2015). The production, molecular weight and viscosifying power of alginate produced by *Azotobacter vinelandii* is affected by the carbon source in submerged cultures. *DYNA*. DOI: 10.15446/dyna.v82n194.44201.
 108. Urtuvia, V., Maturana, N., Acevedo, F., Peña, C., & Díaz-Barrera, A. (2017). Bacterial alginate production: an overview of its biosynthesis and potential industrial production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(11). <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2363-x>
 109. Van De Velde, K., Ruelens, P., Geuten, K., Rohde, A., & Van Der Straeten, D. (2017). Exploiting DELLA Signaling in Cereals. *Trends in plant science*, 22(10), 880–893. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.07.010>
 110. Vásquez MC, Guerrero-Figueroa JT & Quintero AP (2010) *Biorremediación de lodos contaminados con aceites lubricantes usados*. *Rev. Col. Biotecnol*. 2: 141-157.
 111. Vásquez MC, Prada PA & Mondragon MA (2010) *Optimización del proceso de compostaje de productos post-cosecha (cereza) del café con la aplicación de microorganismos nativos*. *Nova*. 8: 213-219.
 112. Vejan P., Khadiran T., Abdullah R., Ismail S. y Dadrasnia A. (2019). Encapsulation of plant growth promoting Rhizobacteria-prospects and potential in agricultural sector: A review. *Journal of Plant Nutrition*42 (19), 2600-2623. <https://doi.org/10.1080/01904167.2019.1659330>
 113. Verma, S. & Kuila, A. (2019). Bioremediation of heavy metals by microbial process. *Environmental Technology & Innovation*, 14, 100369. DOI: 10.1016/j.eti.2019.100369.
 114. Vester, B. and Douthwaite, S. (2001). Minireview. Macrolide resistance Conferred by Base substitutions in 23S rRNA. *Antimicrob Agents Chemother*. 45(1):1-12.
 115. Villacorta Chiclayo, S. Y. (2013). Efecto de *Azotobacter chroococcum* y *Bradyrhizobium yuanmingense* sobre el crecimiento de *Capsicum annuum* L. var longum “páprika” en condiciones de laboratorio.

116. Vogler., J. (2024, septiembre 14). Conoce las Estructuras del Sector Petrolero más Importantes. *Inspenet*. <https://inspenet.com/articulo/estructuras-del-sector-petrolero-importantes/>
117. Volke T. y Velasco J. (2002). *Tecnologías de remediación para suelos contaminados*. Instituto Nacional de Ecología, México, 64 pp.
118. Wang, X., Wang, Y., & Xu, J. (2010). Traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of *Raphanus sativus* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 128(2), 291-301.
119. Wani SA, Chand S, Wani MA, et. al (2016) Azotobacter chroococcum - A Potential Biofertilizer in Agriculture: An Overview. In: Hakeem Kh R, Akhtar J, Sabir M (Eds) Soil Science: Agricultural and Environmental Prospectives. Springer pp. 333–348. https://doi.org/10.1007/978-3-319-34451-5_15
120. Xu, X., Liu, W., Tian, S., Wang, W., Qi, Q., Jiang, P., Gao, X., Li, F., Li, H., & Yu, H. (2018). Petroleum Hydrocarbon-Degrading Bacteria for the Remediation of Oil Pollution Under Aerobic Conditions: A Perspective Analysis. *Frontiers in microbiology*, 9, 2885. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02885>
121. Yoneyama, F., Yamamoto, M., Hashimoto, W., & Murata, K. (2015). Production of polyhydroxybutyrate and alginate from glycerol by *Azotobacter vinelandii* under nitrogen-free conditions. *Bioengineered*, 6(4), 209–217. <https://doi.org/10.1080/21655979.2015.1040209>
122. Yong, J. W., Ge, L., Ng, Y. F., & Tan, S. N. (2009). The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 14(12), 5144–5164. <https://doi.org/10.3390/molecules14125144>
123. Yoshida, N., Takase, R., Sugahara, Y. et. al. Direct production of polyhydroxybutyrate and alginate from crude glycerol by *Azotobacter vinelandii* using atmospheric nitrogen. *Sci Rep* 12, 8032 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11728-1>
124. Zhang, R., et. al. (2022). ROS-induced photosystem damage drives PAH phytotoxicity in crops: Evidence from chlorophyll fluorescence imaging. *Environmental Science & Technology*, 56(12), 8319–8329.
125. Zhang, W., Chen, Y., Huang, K., Wang, F., & Mei, Z. (2023). Molecular Mechanism and Agricultural Application of the NifA-NifL System for Nitrogen Fixation. *International journal of molecular sciences*, 24(2), 907. <https://doi.org/10.3390/ijms24020907>