

FITOTOXICIDAD Y FITORREMEDIACIÓN DE UN SUELO CONTAMINADO CON GASOLINA UTILIZANDO PLANTAS DE GIRASOL ASISTIDAS POR BACTERIAS RIZOSFÉRICAS NATIVAS

Phytotoxicity and phytoremediation of a gasoline-contaminated soil utilizing
sunflower plants assisted with native rhizosphere bacteria

Patsy Jackeline ALMAZAN-CASTEÑADA¹, Alejandro ALARCÓN^{1*}, Óscar GARCÍA-BARRADAS²,
Caliope MENDARTE-ALQUISIRA¹ y Ronald FERRERA-CERRATO¹

¹ Colegio de Postgraduados. Posgrado de Edafología. Microbiología. Carretera México-Texcoco kilómetro 36.5. Montecillo, C.P. 56264, Texcoco, Estado de México. México.

² Universidad Veracruzana. Instituto de Química Aplicada. Luis Castelazo sin número, Colonia Industrial Animas, C.P. 91190. Xalapa, Veracruz. México.

*Autor para correspondencia: aaalarconcp@gmail.com

(Recibido: junio 2023; aceptado: noviembre 2023)

Palabras clave: *Helianthus*, hidrocarburo del petróleo, biorremediación, bioaumentación.

RESUMEN

La fitorremediación es una alternativa para limpiar suelos contaminados utilizando plantas y sus microorganismos asociados. El presente trabajo evaluó la fitotoxicidad y la fitorremediación de un suelo contaminado con gasolina por plantas de girasol (*Helianthus annuus* L.) asistida con bacterias rizosféricas nativas. Esta investigación contempló tres fases experimentales partiendo de un suelo artificialmente contaminado con gasolina. La primera fase evaluó la germinación de semillas de girasol y su crecimiento en un suelo contaminado (0, 200, 400, 800, 1600, 2400 y 3200 mg/kg), observándose la germinación y la tolerancia de las plántulas en todas las concentraciones de gasolina, a los 20 días. En la segunda fase se aislaron bacterias totales del suelo contaminado y se caracterizaron mediante pruebas bioquímicas relacionadas con el crecimiento vegetal y se identificaron molecularmente. La gasolina inhibió el crecimiento bacteriano, y se seleccionaron 10 cepas con capacidad promotora del crecimiento vegetal, sobresaliendo los géneros *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Priestia*, *Massilia* y *Sphingobium*. La tercera fase consistió en un bioensayo de fitorremediación del suelo contaminado (0, 1600 y 3200 mg/kg) inoculando plantas con las 10 bacterias aisladas de la fase 2, aplicadas en consorcio. A los 60 días, a pesar de no influir en el crecimiento vegetal, las bacterias disminuyeron significativamente la presencia del contaminante en el suelo (~50 % remoción). La inoculación de girasol con bacterias nativas es una alternativa para reducir la contaminación de gasolina en el suelo.

Key words: *Helianthus*, petroleum hydrocarbon, bioremediation, bioaugmentation.

ABSTRACT

Phytoremediation is an alternative for cleaning contaminated soils using plants and associative microorganisms. This study evaluated the phytotoxicity and phytoremediation of a gasoline-contaminated soil by sunflower plants (*Helianthus annuus* L.)

assisted with native rhizosphere bacteria. The research consisted of three experimental phases based on artificially gasoline-contaminated soil. The first phase evaluated the seed germination and seedling emergence under contaminated soil (0, 200, 400, 800, 1600, 2400, and 3200 mg/kg); for 20 days, seed germination and seedling tolerance were achieved at all concentrations. The second phase of the study isolated bacteria from the contaminated soil, characterized by biochemical tests related to plant growth promotion, and molecularly identified. Gasoline inhibited bacterial growth, and ten potential plant growth-promoting bacteria were isolated, which belonged to *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Priestia*, *Massilia*, and *Sphingobium*. The third phase consisted of a bioassay for phytoremediation of gasoline-contaminated soil (0, 1600, and 3200 mg/kg) by inoculating sunflower plants with the ten bacteria obtained from phase 2 as a bacterial consortium. After 60 days, despite not having influenced plant growth, bacterial inoculation significantly diminished the soil contaminant (~50 % removal). The inoculation of the sunflower plants with ten native bacteria reduced the gasoline-contamination in soil.

INTRODUCCIÓN

La creciente industrialización y la urbanización han generado contaminantes antrópicos que afectan los ecosistemas (Hazim y Al-Ani 2019). El sector petroquímico es uno de los que más afecta porque causa contaminación en agua y suelo durante las actividades de extracción, transporte y refinamiento del petróleo, así como por fugas accidentales derivadas del mal manejo, estructuras en mal estado y robo de hidrocarburos (Cocârță et al. 2017). Lo anterior genera afectaciones a flora, fauna, poblaciones microbianas, cuerpos de agua, suelo, y a la salud humana provocando enfermedades crónicas potencialmente cancerígenas, mutagénicas y teratogénicas (Hazim y Al-Ani 2019, Chan-Quijano et al. 2020).

Para la descontaminación de suelos existen tratamientos físicos y químicos que favorecen la dispersión del contaminante, pero no de su remoción; además son alternativas costosas, causan daños al ambiente e impiden la recuperación de ciertos hábitats. Por lo anterior, es necesario el uso de biotecnologías amigables con el ambiente que promuevan los procesos naturales de remoción de contaminantes, como la biorremediación (Hou et al. 2021). La biorremediación es una alternativa de limpieza de suelos contaminados mediante el uso de plantas y microorganismos para extraer, acumular, remover, reducir, transformar, mineralizar, degradar, volatilizar o estabilizar contaminantes (Arias-Trinidad et al. 2017, Guevara-Espinoza et al. 2018). Las bacterias, entre otros microorganismos, tienen la capacidad de tomar los contaminantes orgánicos como fuente de energía y de carbono. Por su parte, las plantas también pueden oxidar o acumular contaminantes orgánicos, lo que se conoce como fitorremediación (Daryabeigi

y Hoveidi 2018, Ordoñez et al. 2018). Así, la fitorremediación aprovecha la capacidad de las plantas y sus bacterias asociadas para realizar procesos de descontaminación (Ordoñez et al. 2018).

El éxito de la fitorremediación se basa en la identificación de aquellas especies vegetales que produzcan abundante biomasa y que además toleren y degraden los contaminantes (García-Ávila et al. 2018). El girasol (*Helianthus annuus* L.) es una planta ampliamente reconocida como fitorremediadora de suelos contaminados con metales pesados y metales pesados (Gutiérrez-Espinoza et al. 2011, Adejube et al. 2017, Zehra et al. 2019). Además, tiene potencial para acumular compuestos tóxicos ya que produce abundante biomasa y mejora las condiciones del suelo contaminado, y junto con bacterias rizosféricas asociadas, el girasol podría usarse como una alternativa efectiva, económica y ecológica para acelerar la eliminación de contaminantes orgánicos del suelo (Gutiérrez-Espinoza et al. 2011, Adejube et al. 2017, Rani et al. 2019, Zehra et al. 2019).

La fitorremediación asistida por microorganismos benéficos es uno de los métodos efectivos para favorecer la limpieza ambiental por su amplia aplicabilidad, rentabilidad y naturaleza ecológica (Malik et al. 2022). Los microorganismos generan metabolitos que promueven el crecimiento vegetal y, además, reducen los niveles de toxicidad del sitio; estas asociaciones permiten que ambos componentes se establezcan en sitios contaminados y lleven a cabo la fitorremediación (Gkorezis et al. 2016). Por lo anterior, el aislamiento y la selección de microorganismos nativos adaptados a los hidrocarburos son fundamentales para garantizar el éxito de la fitorremediación (Gkorezis et al. 2016). Así, el objetivo de la presente investigación fue evaluar la fitotoxicidad

y fitorremediación de plantas de girasol en un suelo contaminado con gasolina, asistidas con bacterias rizosféricas nativas tolerantes al hidrocarburo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolecta del suelo

Se utilizó un suelo recolectado en Palmarito Tochapán, Puebla, México, sin antecedentes de contaminación por hidrocarburos de petróleo. El suelo no ha sido perturbado y se encuentra por donde pasa un ducto de gasolina que abastece a la Ciudad de México. Se consideraron los primeros 30 cm de profundidad, se secaron a temperatura ambiente y se tamizaron en malla de 2 mm (Daryabeigi y Hoveidi 2018). El suelo utilizado en cada fase experimental que se describe a continuación, no fue esterilizado para asegurar la presencia de los microorganismos nativos. Se determinaron las características físicas y químicas del suelo recolectado (laboratorio de Fertilidad de Suelos, Colegio de Postgraduados), que se muestran en el **cuadro I**. El análisis físico y químico del suelo se realizó considerando los estudios que dicta la NOM-021-RECNAT-2000 (SEMARNAT 2000).

Fase 1. Tolerancia de *Helianthus annuus* L. a gasolina

Contaminación del suelo. Para la fase 1, en 5 kg de suelo se aplicó gasolina (Magna comercial) disuelta en 0.15 L de hexano (pureza de 98.5 %, Karal[®]) que se mezcló de manera mecánica con una pala de metal para homogenizar lo mejor posible el suelo, para lograr las concentraciones de 200, 400, 800, 1600, 2400 y 3200 mg de gasolina/kg de suelo y un tratamiento testigo (sin gasolina) (Alarcón et al.

2008). Para lograr cada concentración, la gasolina agregada por cada 5 kg de suelo varió según los requerimientos por tratamiento (1000, 2000, 4000, 8000, 12 000 y 16 000 mg de gasolina). Después de contaminar el suelo, se dejó en reposo por 48 h en invernadero, para dejar evaporar el solvente que se utilizó (hexano). Pasadas las 48 h de reposo del suelo, se utilizó 1 kg por cada unidad experimental (UE) donde se sembraron 10 semillas de girasol variedad Victoria y al emerger las plántulas, se raleó a ocho plantas (Escalante-Estrada et al. 2015). Las plantas se regaron con agua potable de acuerdo con los requerimientos necesarios (~100 mL de agua por UE) y se mantuvieron por 20 días.

Posteriormente, las plantas se cosecharon y se midió la altura y la longitud radical. La biomasa seca total se determinó secando las plantas completas en bolsas de papel a 70 °C durante 72 h, posteriormente se pesaron en una balanza analítica.

Fase 2. Bacterias nativas tolerantes a gasolina en suelo contaminado

Aislamiento de bacterias tolerantes a gasolina y caracterización fenotípica de las colonias seleccionadas

A partir de 10 g de los suelos contaminados con gasolina y que fueron utilizados en la fase 1, se realizaron diluciones seriadas en solución isotónica; posteriormente, se tomaron 100 µL de las diluciones y se esparcieron con una espátula de Drigalsky sobre cajas Petri conteniendo agar nutritivo, las cajas se incubaron a 28 °C durante 72 h. Después se realizó un conteo de unidades formadoras de colonias (UFC). Las cepas bacterianas se caracterizaron fenotípicamente mediante la descripción de la forma, superficie, color, textura y bordes de cada cepa, las

CUADRO I. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LOS SUELOS SIN CONTAMINAR CON GASOLINA.

Parámetro	Valor	
	Recolecta de suelo Fase 1	Recolecta de suelo Fase 3
pH	7.4	8.3
Contenido de materia orgánica (%)	1.80	1.93
Textura (%)	*Franca	*Franca limosa
Capacidad de intercambio catiónico (Cmol(+)/kg)	13.7	14.44
P disponible (mg/kg)	79.8	61.4
Nitrógeno total (%)	0.042	0.077
Conductividad eléctrica (1/dSm)	5.12	1.1

*Según la norma mexicana NOM-021-RECNAT-2000 (SEMARNAT 2000).

caracterizaciones microscópicas se realizaron con la descripción de Ramírez-Gama et al. (2021), empleando tinción de Gram y observaciones al microscopio.

Pruebas bioquímicas de las cepas aisladas

Cada una de las pruebas se realizó de manera cualitativa para cada una de las cepas seleccionadas. La producción de índoles totales que incluyen al ácido indolacético (AIA), se realizó con el método modificado por Brick et al. (1991). El cambio de color amarillo a rosado fue considerado como actividad positiva en la producción de AIA para cada cepa bacteriana. El potencial de fijación biológica de nitrógeno (FBN) se realizó mediante el medio semisólido de malato libre de nitrógeno (NFb) en tubos de ensayo, en los que se sembró una asada correspondiente a cada cepa bacteriana, incubados a 28 °C por 168 h. El cambio de color verde esmeralda a azul se consideró como actividad positiva a la fijación de nitrógeno atmosférico para cada cepa bacteriana (Almaraz-Suarez et al. 2020). La producción de sideróforos se realizó con el método de Schwyn y Neilands (1987), la presencia de halos de color naranja alrededor del crecimiento bacteriano se consideró como actividad positiva para la producción de sideróforos. Por último, la prueba de solubilización de fosfatos se realizó en medio Pikovskaya, se evaluó como actividad positiva a las cepas bacterianas a partir de la formación de halos claros alrededor del crecimiento bacteriano (Pikovskaya 1948).

Identificación molecular de las cepas

La identificación molecular de las cepas y la reconstrucción filogenética se realizó mediante inferencia bayesiana (Fuentes-Aragón et al. 2018).

Fase 3. Fitorremediación asistida por bacterias rizosféricas nativas

Preparación del inóculo bacteriano e inoculación

Las cepas bacterianas fueron aisladas de suelo contaminado con gasolina, y seleccionadas por su capacidad de producir fitohormonas, fijar nitrógeno atmosférico, producción de sideróforos y capacidad de solubilizar fosfatos (Fase 2). Las bacterias fueron propagadas individualmente en frascos de vidrio con 180 mL de medio Luria-Bertani. Los frascos fueron incubados en agitación a 180 rpm en una incubadora orbital digital (SHKE4000, Modelo 4328) a 28 °C por 72 h. Posteriormente, las soluciones bacterianas fueron centrifugadas (Damon/IEC Division HN-SII) a 3500 rpm durante 30 min. El sobrenadante fue decantado y el botón bacteriano fue recuperado con 180 mL de agua destilada estéril, se realizaron tres

lavados con agua destilada estéril. El consorcio bacteriano se preparó con el volumen inicial del cultivo para cada cepa y para obtener un volumen final de 1800 mL con agua destilada estéril. El conteo de las UFC fue estimado a partir de 1 mL de la suspensión bacteriana del cual se hicieron diluciones decimales (10^{-1} a 10^{-6}), se tomó 0.1 mL de las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} , y se colocó en cajas de Petri con agar nutritivo con cinco repeticiones por dilución. Las cajas fueron incubadas a 28 °C y las UFC cuantificadas a las 24, 48 y 72 h. La carga bacteriana del consorcio fue de 4.0×10^8 UFC/mL. La inoculación del consorcio se realizó alrededor del sistema radical, 17 días después de la siembra, cada UE fue inoculada con 30 mL de la suspensión bacteriana de acuerdo con los tratamientos establecidos.

El suelo se contaminó disolviendo la gasolina en 375 mL de hexano, se aplicó en 10 kg de suelo, en concentraciones de 0, 1600 y 3200 mg de gasolina/kg de suelo; en cada contenedor se colocó 1 kg de suelo. Se dejó reposar por 48 h en condiciones de invernadero para dejar evaporar el solvente que se utilizó. Pasadas las 48 h de reposo, 10 semillas de girasol se sembraron en cada contenedor como unidad experimental (UE) y al emerger, se raleó a 5 plántulas por cada UE. Antes de sembrar las semillas de girasol, éstas se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 1 % (Clorox[®]) durante 10 min, y se realizó un enjuague con agua destilada estéril. Posteriormente, las semillas fueron sumergidas en alcohol al 70 % por un minuto, y se enjuagaron ocho veces con agua destilada estéril (Gutiérrez-Espinoza et al. 2011). Lo anterior se realizó debido a que en un primer intento se observó la presencia de marchitez causada por hongos después de que las semillas germinaban, de tal manera que la desinfección reduciría la incidencia que generaba esta marchitez.

Las plantas se regaron con agua potable de acuerdo con los requerimientos necesarios (~200 mL), y se mantuvieron por 60 días en condiciones de invernadero. Posteriormente, las plantas fueron cosechadas y se estimó la longitud radical, las hojas se separaron de los tallos para calcular el área foliar mediante un medidor de área foliar (Licor, LI 3000, Inc. Lincoln, NE, EUA). La biomasa seca de hojas, tallo, raíz y total se determinó secando cada órgano en un horno (SL, Shel Lab) a 70 °C por 72 h y se pesaron en balanza analítica. El área foliar específica (cm^2/g) se estimó dividiendo el área foliar entre el peso seco de las hojas (Morales-Guzmán et al. 2020). La relación raíz/parte aérea se obtuvo a partir del peso de la biomasa de las raíces entre la biomasa de la parte aérea (García-Castro et al. 2018).

Extracción y cuantificación de hidrocarburos derivados de la gasolina

Por triplicado, las muestras de suelo se secaron a temperatura ambiente, se tomaron 10 g de suelo que se colocaron en bolsas de papel filtro. Para la extracción del contaminante del suelo, se utilizó un Soxhlet; en matraces de bola de fondo plano se agregaron 200 mL de disolvente hexano y en el sifón la muestra de suelo (mínimo 8 h a 69 °C), para permitir el flujo del hexano y obtener muestras en el disolvente (Rani et al. 2019). Después, la muestra se concentró en un rotaevaporador (Modelo, RE200) y con un baño María (BM100) a 70 °C, conectado con una bomba de vacío hasta obtener muestras secas. Tras la evaporación del disolvente, se añadió hexano para obtener un volumen total de 3 mL y la solución se transfirió a viales, se dejó volatilizar a temperatura ambiente hasta secar (Hou et al. 2019).

Análisis por cromatografía de gases

Los viales fueron resuspendidos en 20 µL de hexano; se utilizó un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies, modelo 6890N, Net Work GC system), equipado con una columna DB-5, 5%-fenil-metilpolisiloxano (Agilent Technologies) de 60 metros de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 µm de espesor de película. La temperatura de inicio fue 50 °C y se mantuvo durante 5 min, posteriormente la temperatura se elevó hasta 280 °C usando una rampa de calentamiento de 20 °C/min, durante 20 min. Se usó helio como gas acarreador con un flujo de 1 mL/min, la temperatura del inyector fue 250 °C, inyección en modo de división, con una relación de 5:1.

Diseño experimental y análisis estadístico

En la Fase 1 se calculó el porcentaje de germinación, la altura de la planta, la longitud radical y la biomasa seca total, que consistió en siete tratamientos con cinco repeticiones cada uno, distribuidos en un diseño experimental completamente al azar.

En la Fase 2, se evaluaron las poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico (BFNA) en UFC/g de suelo, en un diseño experimental completamente al azar con tres niveles de contaminación del suelo (baja, media y alta) y un suelo testigo sin contaminante, con tres repeticiones cada uno.

En la Fase 3 se evaluó la altura de planta, longitud radical, relación vástago/raíz, número de hojas, área foliar, área foliar específica, biomasa seca aérea, radical y total, y se cuantificaron las UFC de BFNA. Se utilizó un experimento factorial 3x2, con tres niveles de contaminación (0, 1600 y 3200 mg/kg), y dos niveles de bioaugmentación (sin y con inoculación bacteriana); en total se obtuvieron seis tratamientos

con nueve repeticiones cada uno, distribuidos en un diseño experimental completamente al azar.

Los datos obtenidos en la Fase 1 y Fase 3 fueron sometidos al análisis de varianza, prueba de comparación de medias (LSD, $\alpha \leq 0.05$) y estimación del error estándar para cada media de cada tratamiento (SAS System 2000).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fase 1. Tolerancia de *Helianthus annuus* L. a gasolina

La germinación de las semillas de girasol no fue afectada por las concentraciones de gasolina, registrándose porcentajes de germinación mayores al 96 % (Fig. 1A). La germinación de semillas ha sido base para evaluar la toxicidad de hidrocarburos del petróleo o de contaminantes inorgánicos (Daryabeigi y Hoveidi 2018, Pernía et al. 2018). Contrario a nuestros resultados, Pernía et al. (2018) reportaron la disminución de la germinación de semillas de *Lactuca sativa* expuesta a concentraciones de hidrocarburos aromáticos policíclicos (naftaleno, fenantreno y pireno). Por su parte, Daryabeigi y Hoveidi (2018) encuentran que dosis de hidrocarburos totales del petróleo mayores a 3000 mg/kg, disminuyeron la germinación de semillas de *Kochia scoporia* L. y *Zea mays* L. Es posible que la diferencia en las respuestas entre estos resultados y los obtenidos en el presente estudio puedan deberse al tipo de hidrocarburo utilizado en los experimentos y a la especie de planta (Daryabeigi y Hoveidi 2018).

La aplicación de la gasolina en concentraciones de 200 y 400 mg/kg no alteró significativamente la altura de las plantas con respecto al tratamiento testigo; en contraste, las concentraciones de 2400 y 3200 mg/kg inhibieron significativamente la altura; por otro lado, las concentraciones de 800 y 1600 mg/kg incrementaron esta variable (Fig. 1B). Este incremento en la altura de las plantas podría deberse a un efecto de hormesis ejercido por la gasolina sobre las plantas. La hormesis se caracteriza por provocar una aparente estimulación de los procesos fisiológicos al exponer a los organismos a bajos niveles de agentes tóxicos, pero que a niveles altos, inhibe dichos procesos (Chan-Quijano et al. 2020). El efecto de hormesis se ha observado en otras plantas [*Haematoxylum campechianum* L. y *Tabebuia rosea* (Bertol.) DC] expuestas a petróleo crudo (Chan-Quijano et al. 2020). Un efecto similar se registró en la biomasa de las plantas expuestas a las menores concentraciones de la gasolina (Fig. 1C). Por otro lado, la longitud

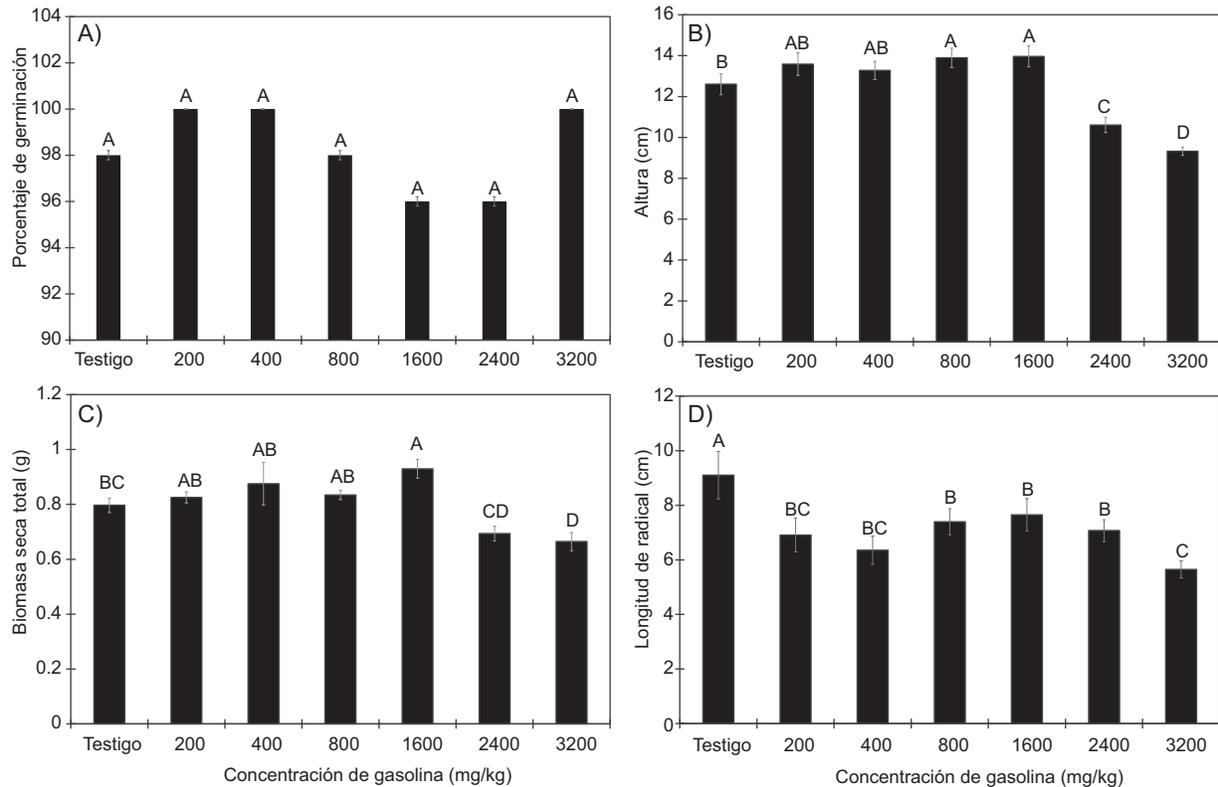


Fig. 1. A) Porcentaje de germinación de semillas de *Helianthus annuus* L., B) altura de la planta, C) biomasa seca total y D) longitud radical obtenidos en suelo agrícola contaminado con gasolina en condiciones de invernadero, durante 20 días. Barras con letras diferentes indican diferencias estadísticas (Diferencia mínima significativa, $\alpha \leq 0.05$). Medias \pm error estándar (n = 5).

radical del tratamiento testigo fue significativamente mayor con respecto a la registrada en el tratamiento con 3200 mg/kg (**Fig. 1D**). De manera similar a nuestros resultados, el crecimiento de plantas de *L. sativa*, *K. scoporia* L. y *Z. mays* L. fue menor ante la presencia de hidrocarburos aplicados en un rango de 50 a 10000 ppm (Daryabeigi y Hoveidi 2018, Pernía et al. 2018). Lo mismo sucedió en plantas de *Helianthus annuus* L. expuestas a un suelo contaminado con diferentes concentraciones que van de 226 a 1030 ppm de plomo y zinc e hidrocarburos totales de petróleo e hidrocarburos aromáticos policíclicos en un rango de 2774 a 4824 ppm (Kluk y Steliga 2019). Las altas concentraciones de contaminantes pueden reducir la longitud radical porque son el primer sitio de contacto entre las plantas y los contaminantes (Hawrot-Paw y Bąkowska 2014, Sivaram et al. 2019). La exposición directa de la raíz a los contaminantes puede ocasionar efectos tóxicos que afectan la división celular y la elongación de la zona apical, provocando deficiencia en la absorción de nutrientes y agua y restringiendo su crecimiento y desarrollo (Hawrot-Paw y Bąkowska

2014, Sivaram et al. 2019). A nuestro conocimiento, la mayoría de los estudios sobre el uso de *H. annuus* L. en la fitorremediación se han realizado para recuperar suelos contaminados con metales pesados solos o en combinación con algunos hidrocarburos, pero no con hidrocarburos solos, por lo que el presente trabajo resalta la capacidad del girasol para tolerar diferentes concentraciones de un derivado del petróleo.

Fase 2. Bacterias nativas tolerantes a gasolina en suelo contaminado

Durante la Fase 2 del presente trabajo se aislaron 10 cepas bacterianas rizosféricas tolerantes a la gasolina; ocho cepas mostraron la capacidad de producir indoles totales (AIA), tres no fueron capaces de fijar nitrógeno, sólo tres cepas dieron positivo a la producción de sideróforos y tres solubilizaron fosfato de calcio (**Cuadro II**). Siete de las 10 cepas se lograron identificar hasta género y especie, con más de un 99.8 % de similitud, y tres cepas sólo se identificaron hasta género con más del 99.7 % de similitud (**Cuadro III**). Sobresalen las bacterias de los géneros

CUADRO II. CARACTERIZACIÓN MACRO Y MICROSCÓPICA DE 10 CEPAS BACTERIANAS AISLADAS DE SUELO AGRÍCOLA CONTAMINADO (SC) ARTIFICIALMENTE CON GASOLINA (FASE 2).

Clave	Caracterización macroscópica						Caracterización microscópica					Pruebas bioquímicas		
	Forma	Elevación	Color	Textura	Borde	Halo	Morfología	Tinción gram	AIA	Sideróforos	Nfb	Solubilizadores de P		
SC1	Circular	Plana	Transparente	Viscosa	Ondulado	+	Bacilo	-	+	-	+	-		
SC2	Circular	Cóncava	Blanco	Viscosa	Entero	-	Bacilo	-	+	-	+	-		
SC3	Circular	Plana	Amarillo	Viscosa	Entero	-	Coco	-	-	-	+	-		
SC4	Circular	Plana	Blanco	Viscosa	Entero	-	Bacilo	-	+	-	-	-		
SC6	Circular	Algodonosa	Blanco	Algodonosa	Entero	-	Filamentosa	-	+	-	-	+		
SC7	Irregular	Cóncava	Blanco	Viscosa	Ondulado	-	Bacilo	-	-	+	+	+		
SC8	Circular	Plana	Rojo	Viscosa	Ondulado	-	Coco	+	+	+	+	+		
SC11	Circular	Cóncava	Blanco	Viscosa	Entero	-	Bacilo	-	+	-	+	-		
SC12	Circular	Plana	Blanco	Viscosa	Entero	+	Bacilo	-	+	-	-	-		
SC15	Circular	Cóncavo	Blanco	Cremosa	Entero	-	Bacilo	-	+	+	+	-		

IAI= Acido indolacético. NFB = medio semisólido de malato libre de nitrógeno. P = fósforo. (+) = actividad positiva, (-) = actividad negativa.

CUADRO III. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS AISLADAS DE UN SUELO AGRÍCOLA CONTAMINADO (SC) ARTIFICIALMENTE CON GASOLINA.

Clave de las cepas bacterianas	Concentración de gasolina de donde se aisló (mg/kg)	Especies y géneros bacterianos	Número de acceso GenBank	Porcentaje de similitud (%)
SC1	2400	<i>Bacillus</i> sp.	OQ559532	99.7
SC2	200	<i>Priestia megaterium</i>	OQ559533	100
SC3	200	<i>Massilia timonae</i>	OQ559534	99.9
SC4	3200	<i>Bacillus</i> sp.	OQ559535	99.9
SC6	200	<i>Streptomyces flavotricini</i>	OQ569160	100
SC7	0	<i>Pseudomonas palleroniana</i>	OQ559536	99.9
SC8	0	<i>Streptomyces flavotricini</i>		100
SC11	3200	<i>Sphingobium yanoikuyae</i>	OQ559476	99.9
SC12	2400	<i>Bacillus</i> sp.	OQ559537	99.8
SC15	3200	<i>Pseudomonas palleroniana</i>	OQ559538	99.9

Pseudomonas, *Bacillus* y *Streptomyces* con respecto a los géneros *Priestia*, *Massilia* y *Sphingobium* (**Cuadro III**).

Las especies identificadas han sido reportadas en la biorremediación de suelos contaminados con petróleo o sus derivados (Alegbeleye et al. 2017, Kuri y Shikha 2019, Mitra et al. 2020, Romano-Armada et al. 2020, Alotaibi et al. 2022, Liu et al. 2022). Además, se han registrado con una o más de las actividades que promueven el crecimiento vegetal, como fijación de nitrógeno atmosférico, solubilización de fosfatos y potasio, producción de ácido indolacético, entre otras (Romano-Armada et al. 2020, Alotaibi et al. 2022). Por lo anterior, estos aislados bacterianos se utilizaron para el bioensayo de fitorremediación (Fase 3) del presente trabajo.

Fase 3. Fitorremediación asistida por bacterias rizosféricas nativas

El desarrollo de las plantas es uno de los factores a considerar en su selección para propósitos de fitorremediación (Gkorezis et al. 2016, Daryabeigi y Hoveidi 2018). En el presente trabajo, las plantas expuestas al suelo contaminado (1600 y 3200 mg/kg) tuvieron menores longitud radical (**Fig. 2A**), número de hojas (**Fig. 2B**), altura (**Fig. 2C**), área foliar (AF) (**Fig. 2D**) y menor relación raíz/parte aérea (**Fig. 2E**), en comparación con el testigo sin inoculación bacteriana; en contraste, el área foliar específica no mostró diferencias significativas por efecto de la gasolina (**Fig. 2F**), independientemente de la inoculación bacteriana. La gasolina en el suelo disminuyó la biomasa seca aérea (**Fig. 3A**), radical (**Fig. 3B**) y total (**Fig. 3C**).

Similar a nuestros resultados, Daryabeigi y Hoveidi (2018) observaron disminución en la longitud y biomasa de plantas de *K. scoporia* L. y *Z. mays* L. expuestas a concentraciones de gasolina (1000 a

10 000 mg/kg). Los efectos de la gasolina sobre la biomasa vegetal se pueden deber a que generalmente este contaminante contiene altos niveles de compuestos volátiles de bajo peso molecular que pueden difundirse a través de las membranas y causar daño celular, lo que disminuye el desarrollo de las plantas (Gkorezis et al. 2016, Daryabeigi y Hoveidi 2018). Además de estos daños, los contaminantes orgánicos pueden modificar las asociaciones benéficas entre plantas y microorganismos debido a que modifican su biodiversidad y su capacidad de colonizar las raíces (Lenoir et al. 2016).

En el presente trabajo se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de gasolina disponible en el suelo en donde la inoculación del consorcio bacteriano redujo la gasolina remanente en el suelo, sobre todo en la concentración de gasolina más alta (3200 mg/kg) con respecto a la gasolina del suelo testigo (contaminación al tiempo inicial) (**Fig. 4A**). La presencia de girasol fue esencial para remover mayor cantidad de gasolina en el suelo (**Fig. 4B**). Las raíces modifican las características físicas y químicas del suelo y pueden disipar y modificar la biodisponibilidad de contaminantes orgánicos, lo que conlleva a la selección de comunidades microbianas rizosféricas capaces de tolerar o degradar hidrocarburos (Gutiérrez-Espinoza et al. 2011, Gkorezis et al. 2016, Adejube et al. 2017, Daryabeigi y Hoveidi 2018, Zehra et al. 2019). Nuestros resultados muestran que el consorcio bacteriano nativo tolerante a la gasolina puede remover dicho hidrocarburo hasta ~50 %, especialmente en la concentración más alta (**Fig. 4B**). Se demuestra que los microorganismos nativos cumplen un papel importante en la degradación de contaminantes orgánicos y son base importante para eliminar hidrocarburos de petróleo del ecosistema (Guarino et al. 2017).

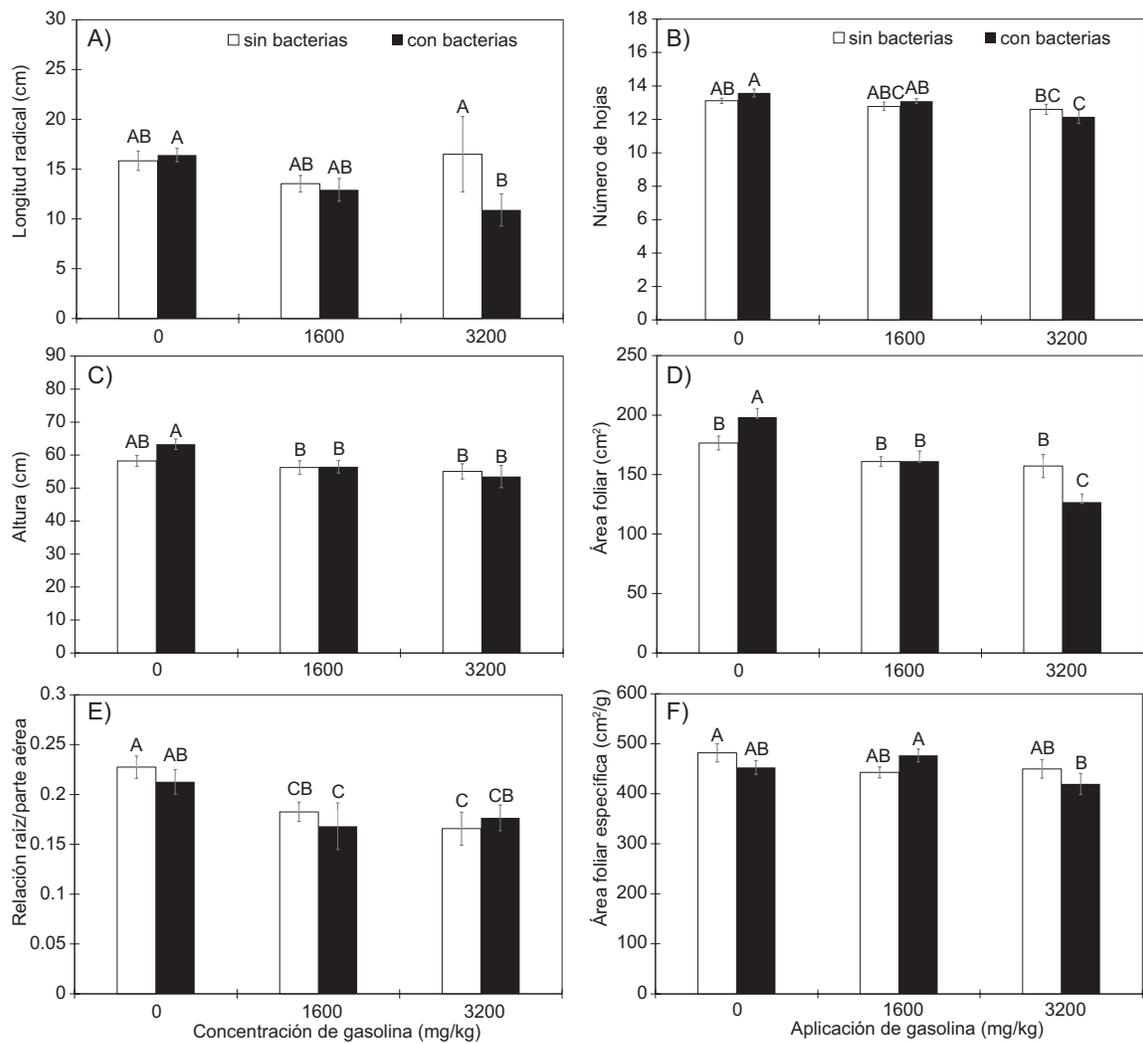


Fig. 2. Desarrollo de plantas de *Helianthus annuus* L. creciendo en un suelo contaminado artificialmente con 0, 1600 y 3200 mg de gasolina/kg de suelo, después de 60 días. A) longitud radical (cm), B) número de hojas C) altura (cm), D) área foliar E) relación raíz/parte aérea y F) área foliar específica (cm²/g). Barras con letras diferentes indican diferencias estadísticas (diferencia mínima significativa, $\alpha \leq 0.05$). Media \pm error estándar, n = 9.

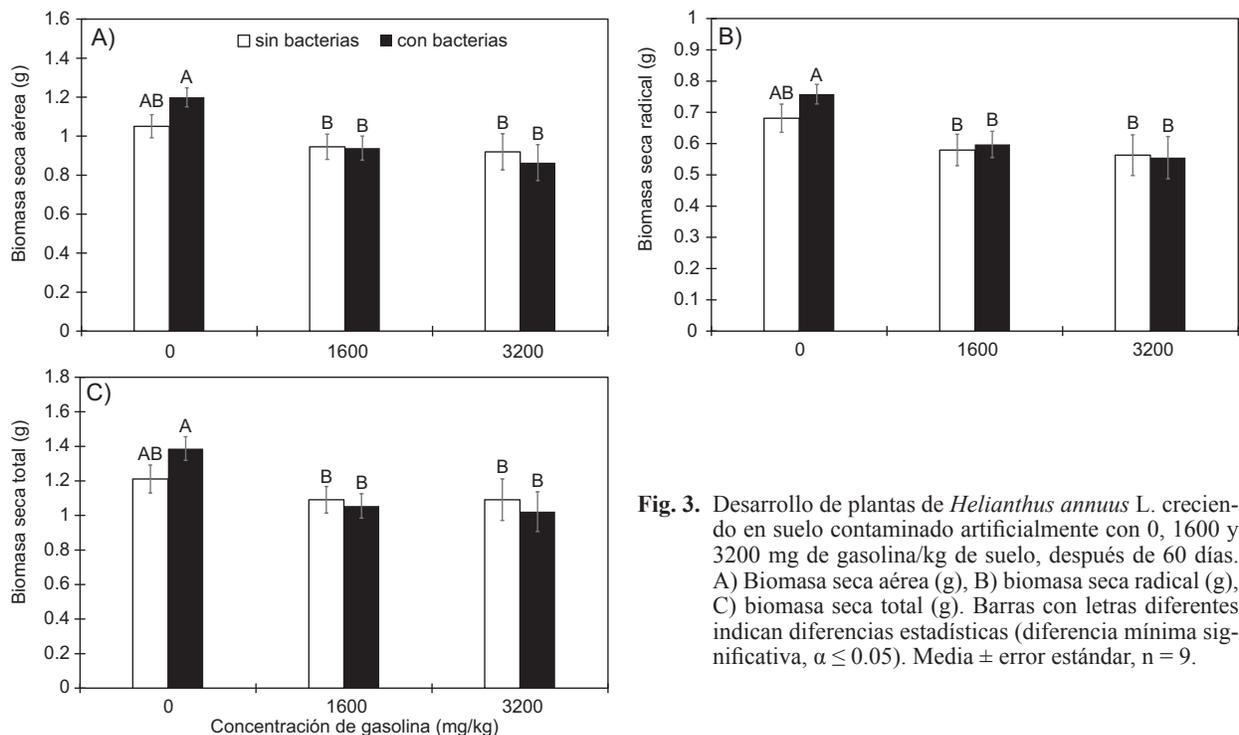


Fig. 3. Desarrollo de plantas de *Helianthus annuus* L. creciendo en suelo contaminado artificialmente con 0, 1600 y 3200 mg de gasolina/kg de suelo, después de 60 días. A) Biomasa seca aérea (g), B) biomasa seca radical (g), C) biomasa seca total (g). Barras con letras diferentes indican diferencias estadísticas (diferencia mínima significativa, $\alpha \leq 0.05$). Media \pm error estándar, n = 9.

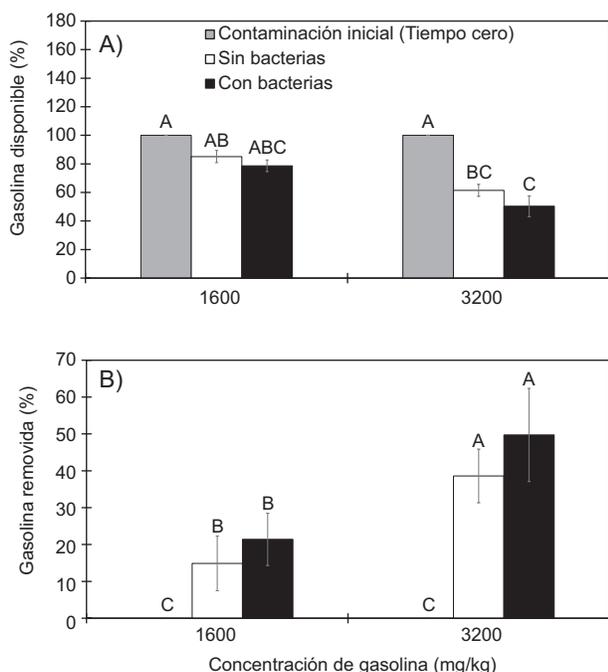


Fig. 4. Efecto de *Helianthus annuus* L. sin bacterias (barras blancas) y con bacterias (barras negras) sobre: A) contenido de gasolina disponible y B) porcentaje de gasolina removida en un suelo contaminado con 1600 y 3200 mg/kg, después de 60 días. Barras con letras diferentes indican diferencias estadísticas (diferencia mínima significativa, $\alpha \leq 0.05$). Media \pm error estándar, $n = 3$.

CONCLUSIONES

Las semillas de girasol mostraron capacidad de germinar en todas las concentraciones de gasolina en el suelo. Sin embargo, las variables de crecimiento de las plántulas de girasol fueron afectadas ante concentraciones de gasolina de 2400 y 3200 mg/kg.

Las 10 cepas bacterianas nativas seleccionadas mostraron actividades fisiológicas relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal; además, toleraron hasta 3200 mg/kg de gasolina en el suelo. Los géneros bacterianos identificados fueron *Bacillus*, *Streptomyces* y *Pseudomonas*, así como *Priestia*, *Massilia* y *Sphingobium*.

La inoculación del consorcio bacteriano en las plantas de girasol favoreció la remoción de la gasolina en el suelo. Por lo anterior, el girasol inoculado con bacterias nativas tolerantes a gasolina puede ser una alternativa efectiva para reducir la contaminación en un suelo contaminado con este compuesto.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al CONAHCYT el apoyo financiero para los estudios de maestría de P.J A-C., y para la estancia posdoctoral de C. M-A. Asimismo, se agradece a la Dra. Ma. Remedios Mendoza-López de la Unidad de Servicios de Apoyo en Resolución Analítica (SARA)-Universidad Veracruzana, por su apoyo técnico en el análisis cromatográfico.

REFERENCIAS

- Alarcón A., Davies F.T., Autenrieth R.L. y Zuberer D.A. (2008). Arbuscular mycorrhiza and petroleum-degrading microorganisms enhance phytoremediation of petroleum-contaminated soil. *International Journal of Phytoremediation* 10 (4), 251-263. <https://doi.org/10.1080/15226510802096002>
- Adejube A.A.H., Anteyi A., Garba F.H., Oyekunle O.A. y Kudaisi F.O. (2017). Bioremediating activity of sunflower (*Helianthus annuus* L.) on contaminated soil from Challawa Industrial Area, Kano-State Nigeria. *International Journal of Agriculture and Earth Science* 3 (5), 1-11.
- Alegbeleye O.O., Opeolu B.O. y Jackson V. (2017). Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) compounds: (acenaphthene and fluorene) in water using indigenous bacterial species isolated from the Diep and Plankenburg rivers, Western Cape, South Africa. *Brazilian Journal of Microbiology* 48 (2), 314-325. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.07.027>
- Almaráz-Suárez J.J., Pineda-Mendoza D.Y. y Heredia-Acuña C. (2020). Métodos prácticos para el estudio de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. En: *Microbiología aplicada a la agricultura y agroecosistemas, principios y técnicas para su investigación*. (R. Ferrera-Cerrato, J. Delgadillo-Martínez, A. Alarcón, J. Alvarado-López, J. Pérez-Moreno, J.J. Almaraz-Suárez, Eds.). Colegio de Postgraduados, Estado de México, México, pp. 227-240.
- Alotaibi F., St-Arnaud M. y Hijri M. (2022). In-depth characterization of plant growth promotion potentials of selected alkanes-degrading plant growth-promoting bacterial isolates. *Frontiers in Microbiology* 13, 863702. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.863702>
- Arias-Trinidad A., Rivera-Cruz M.A., Roldán-Garrigós A., Aceves-Navarro L.A., Quintero-Lizaola R. y Hernández-Guzmán J. (2017). Uso de *Leersia hexandra* (Poaceae) en la fitorremediación de suelos contaminados con petróleo fresco e intemperizado. *Revista de Biología Tropical* 65 (1), 21-30.

- Brick J.M., Bostock R.M. y Silverstone S.E. (1991). Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology* 57 (2), 535-538. <https://doi.org/10.1128/aem.57.2.535-538.1991>
- Cocârță D.M., Stoian M.A. y Karademir A. (2017). Crude oil contaminated sites: Evaluation by using risk assessment approach. *Sustainability* 9, 1365. <https://doi.org/10.3390/su9081365>
- Chan-Quijano J.G., Torres-López K.L., Martínez-Rabelo F. y González-Conzuelo M.B. (2020). Soil contamination by petroleum in Tabasco, Mexico, and its environmental repercussions. *Gaia Scientia* 14 (3), 75-91. <https://doi.org/10.22478/ufpb.1981-1268.2020v14n3.54490>
- Daryabeigi Z.A. y Hoveidi H. (2018). Evaluation of the potential of Burningbush (*Kochia scoparia* (L.) Schard) and maize (*Zea mays* L.) and the role of soil organic amendment in phytoremediation of gasoline-contaminated soils. *International Journal of Environmental Research* 12 (3), 327-336. <https://doi.org/10.1080/15226514.2012.723067>
- Escalante-Estrada J.A.S., Rodríguez-González M.T. y Escalante-Estrada Y.I. (2015). Fenología, biomasa y rendimiento de cultivares de girasol en Valles Altos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 2, 307-311.
- Fuentes-Aragón D., Juárez-Vázquez S.B., Vargas-Hernández M. y Silva-Rojas H.V. (2018). *Colletotrichum fructicola*, a member of *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato, is the causal agent of anthracnose and soft rot in avocado fruits cv. "Hass". *Mycobiology* 46 (2), 92-100. <https://doi.org/10.1080/12298093.2018.1454010>
- Gutiérrez-Espinoza L.R., Melgoza-Castillo A., Alarcón-Herrera M.T., Ortega-Gutiérrez J.A., Prado-Tarango D.E. y Cedillo-Alcantar M.E. (2011). Germinación del girasol silvestre (*Helianthus annuus* L.) en presencia de diferentes concentraciones de metales. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal* 2 (1), 49-56.
- Gkorezis P., Daghio M., Franzetti A., Van Hamme J.D., Sillen W. y Vangronsveld J. (2016). The interaction between plants and bacteria in the remediation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Frontiers in Microbiology* 7, 1836. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01836>
- Guarino C., Spada V. y Sciarriello R. (2017). Assessment of three approaches of bioremediation (Natural attenuation, landfarming and bioaugmentation-assisted landfarming) for a petroleum hydrocarbons contaminated soil. *Chemosphere* 170, 10-16. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.165>
- García-Ávila C., Villada Sierra L.A. y Gómez J.R. (2018). Evaluación de la adaptación de *Helianthus annuus* en asocio con hongos micorrízicos en suelos contaminados con plomo. *Cuaderno Activa* 10 (1), 93-111. <https://doi.org/10.53995/20278101.497>
- García-Castro K.D., Romo-Campos R. de L., Pereira C.J. y Gómez-Rubio R. (2018). Tasa relativa de crecimiento en plántulas de dos poblaciones de *Magnolia pugana* (Magnoliaceae) en distintos niveles de luz y fertilidad del suelo. *Revista de Biología Tropical* 66 (2), 622-633. <https://dx.doi.org/10.15517/rbt.v66i2.33394>
- Guevara-Espinosa Ma.D., Cruz Miranda N., Rivera Morales Ma.C. y Fuentes Ortiz A.K. (2018). Phytoremediation of soils contaminated with Mn and Cu from *Ocimum basilicum*. *Revista Latinoamericana el Ambiente y las Ciencias* 9 (22), 76-89.
- Hawrot-Paw M. y Bąkowska T. (2014). Growth and development of selected plant species in the phytoremediation of diesel oil contaminated soil. *Environment Protection Engineering* 40 (4).
- Hazim R.N. y Al-Ani M.A. (2019). Effect of petroleum hydrocarbons contamination on soil microorganisms and biodegradation. *Rafidain Journal Science* 28 (1), 13-22.
- Hou L., Liu R., Li N., Dai Y. y Yan J. (2019). Study on the efficiency of phytoremediation of soils heavily polluted with PAHs in petroleum-contaminated sites by microorganism. *Environmental Science and Pollution Research* 26, 31401-31413. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05828-1>
- Hou J., Wang Q., Liu W., Zhong D., Ge Y., Christie P. y Luo Y. (2021). Soil microbial community and association network shift induced by several tall fescue cultivars during the phytoremediation of a petroleum hydrocarbon-contaminated soil. *Science of the Total Environment* 792, 148411. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148411>
- Kluk D. y Steliga T. (2019). Potential of *Helianthus annuus* for phytoremediation of lead, zinc, total petroleum hydrocarbons (TPH) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soil. *NAFTA-GAZ* 7, 379-387. <http://dx.doi.org/10.18668/NG.2019.07.01>
- Kuri M.L. y Shikha R. (2019). Biodegradation of petroleum oil by a novel *Bacillus megaterium* strain isolated from contaminated soil of Neemrana, Alwar, Rajasthan, India. *International Journal of Biotechnology and Bioengineering Research* 10 (1), 17-27.
- Lenoir I., Lounes-Hadj S.A. y Fontaine J. (2016). Arbuscular mycorrhizal fungal-assisted phytoremediation of soil contaminated with persistent organic pollutants: A review. *European Journal of Soil Science* 67 (5), 624-640. <https://doi.org/10.1111/ejss.12375>
- Liu X., Ji J., Zhang X., Chen Z., He L. y Wang C. (2022). Microbial remediation of crude oil in saline conditions by oil-degrading bacterium *Priestia megaterium*

- FDU301. Applied Biochemistry and Biotechnology 1-19. <https://doi.org/10.1007/s12010-022-04245-4>
- Malik B., Pirzadah T.B. y Hakeem K.R. (2022). Chapter 20 - Phytoremediation of persistent organic pollutants (POPs). En: Phytoremediation. Biotechnological strategies for promoting invigorating environs (R.A. Bhat, F.M. Policarpo Tonelli, G.H. Dar y K. Hakeem, Eds.). Academic Press, Cambridge, Massachusetts, EUA, pp. 415-436. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89874-4.00010-8>
- Mitra M., Nguyen K.M., Box T.W., Gilpin J.S., Hamby S.R., Berry T.L. y Duckett E.H. (2020). Isolation and characterization of a novel *Sphingobium yanoikuyae* strain variant that uses biohazardous saturated hydrocarbons and aromatic compounds as sole carbon sources. F1000Research 9, 767. <https://doi.org/10.12688/f1000research.25284.1>
- Morales-Guzmán G., Alarcón A., Ferrera-Cerrato R., Rivera-Cruz M.C., Torres-Bustillos L.G. y Mendoza-López M.R. (2020). Efecto de bacterias emulsificantes en la atenuación de la fitotoxicidad de suelos contaminados con petróleo intemperizado. Revista de Biología Tropical 68 (2), 692-703.
- SEMARNAT (2000). Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Diario Oficial de la Federación, CdMx, México. 31 de diciembre de 2002.
- Ordoñez B.D.E., Abella M.C.A., Echeverry T.A., Paz L.L.M. y Benítez-Campo N. (2018). Biodegradación de hidrocarburos alifáticos saturados por microorganismos aislados de suelo contaminado con derivados del petróleo. Revista de Ciencias 22 (2), 33-44.
- Pernía B., Rojas-Tortolero D., Sena L., De Sisto A., Inojosa Y. y Naranjo L. (2018). Fitotoxicidad de HAP, crudos extra pesados y sus fracciones en *Lactuca sativa*: una interpretación integral utilizando un índice de toxicidad modificado. Revista Internacional de Contaminación Ambiental 34 (1), 79-91. <https://doi.org/10.20937/RICA.2018.34.01.07>
- Pikovskaya R. (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. Mikrobiologiya 17, 362-370.
- Ramírez-Gama R.M., Urzú Hernández M. del C., Camacho Cruz A., Tsuzuki Reyes M.G. y Esquivel-Cote R. (2021). Cultivo y caracterización de microorganismos. En: Técnicas básicas de microbiología y su fundamento. (R.M., Ramírez-Gama, M. del C. Urzú Hernández, A. Camacho Cruz, M.G. Tsuzuki Reyes y R. Esquivel-Cote, Eds.). Trillas, CdMx, México, pp. 110-173.
- Romano-Armada N., Yañez-Yazlle M.F., Irazusta V.P., Rajal V.B. y Moraga N.B. (2020). Potential of bioremediation and PGP traits in *Streptomyces* as strategies for bio-reclamation of salt-affected soils for agriculture. Pathogens 9 (2), 117. <https://doi.org/10.3390/pathogens9020117>
- Rani R., Kumar V., Usmani Z., Gupta P. y Chandra A. (2019). Influence of plant growth promoting rhizobacterial strains *Paenibacillus* sp. IITISM08, *Bacillus* sp. PRB77 and *Bacillus* sp. PRB101 using *Helianthus annuus* on degradation of endosulfan from contaminated soil. Chemosphere 225, 479-489. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.037>
- Schwyn B. y Neilands J.B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Analytical Biochemistry 160 (1), 47-56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)
- Sivaram A.K., Logeshwaran P., Lockington R., Naidu R. y Megharaj M. (2019). Phytoremediation efficacy assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soils using garden pea (*Pisum sativum*) and earthworms (*Eisenia fetida*). Chemosphere 229, 227-235. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.005>
- Zehra A., Sahito Z.A., Tong W., Tang L., Hamid Y., Khan M.B., Ali Z., Naqvi B. y Yang X. (2019). Assessment of sunflower germplasm for phytoremediation of lead-polluted soil and production of seed oil and seed meal for human and animal consumption. Journal of Environmental Sciences 87, 24-38. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2019.05.031>