

**ANÁLISIS DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN VEGETAL DE  
*Leersia hexandra* Swartz EN EL TRÓPICO HÚMEDO MEXICANO  
EN FUNCIÓN DE PETRÓLEO Y SURFACTANTE**

**GROWTH ANALYSIS AND PLANT PRODUCTION OF  
*Leersia hexandra* Swartz IN TROPIC WET MEXICAN IN FUCTION  
ON PETROLEUM AND SURFACTANT**

**Magín González-Moscoso<sup>1</sup>, María del Carmen Rivera-Cruz<sup>1</sup>,  
Julián Delgado-Martínez<sup>2</sup> y Luz del Carmen Lagunes-Espinoza<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Colegio de Postgraduados Campus Tabasco. Periférico Carlos A. Molina, Km 3.5.  
Carretera Cárdenas-Huimanguillo. H. Cárdenas, Tabasco 86500, México.

<sup>2</sup>Colegio de Postgraduados Campus Montecillos. Carretera México-Texcoco Km 36.5,  
Texcoco, Estado de México 56230, México. Correo electrónico: mariari@colpos.mx

---

**RESUMEN**

*Leersia hexandra* Swartz es una especie forrajera que crece en humedales del trópico en México. Este pasto se estableció en forma natural en sitios contaminados con derrames crónicos de petróleo crudo en el ejido José Narciso Roviroso, a dos kilómetros al suroeste del Complejo Procesador de Gas La Venta, en Huimanguillo, Tabasco, México. Se desconoce su potencial de adaptación y crecimiento en Gleysol con petróleo fresco y asistido con Tween® 80 (Tw) en el proceso de recuperación ambiental. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de la concentración de hidrocarburos totales del petróleo fresco (HTP's) y asistido con el surfactante comercial Tw en el crecimiento, pigmentos clorofilianos y producción de materia seca de *L. hexandra*. Se realizó un experimento en microtúnel con 15 tratamientos basado en cinco concentraciones de HTP's (mg kg<sup>-1</sup> base seca): 693 biogénico, 4 000, 30000, 60 000, 90 000 y tres concentraciones de Tw(%): 0, 2.5 y 5. Las variables evaluadas

a los 30, 60, 120 y 180 días después de establecido el experimento (dds) fueron: 1) longitud de estolones (LE), 2) número de plantas jóvenes en el macollo (PJM), y 3) tasa de crecimiento (TCR). Las variables evaluadas al día 180 dds fueron: a) concentración de clorofilas a, b y total (Cla, Clb, Clt), b) materia seca aérea (MSA), de raíz (MSR) y volumen radical (VR). La PJM y TCR en los cuatro tiempos registraron diferencias por efecto del petróleo y Tw. Las PJM, MSR y VR aumentaron a los 180 dds con la mayor concentración de HTP's y de Tw. El efecto de 90 000 mg kg<sup>-1</sup> HTP's incrementó la TCR, PJM, MSR y VR pero en LE, Cla y Clb no existieron diferencias estadísticas. La concentración 5% Tw estimuló la PJM, Clb, MSA. Estos resultados demuestran la habilidad del pasto *L. hexandra* para aumentar la TCR, mayor cantidad de PJM y un sistema radical más denso en Gleysol con  $\leq 90\ 000$  petróleo fresco y 5% del surfactante Tw. Nosotros recomendamos usar 5% de Tween® 80 antes del transplante de *L. hexandra* para recuperar Gleysoles con

$\leq 90000$  mg kg<sup>-1</sup> de HTP's de petróleo fresco en el trópico húmedo mexicano.

**Palabras clave:** Petróleo, surfactante, tasa de crecimiento, pasto.

### ABSTRACT

*Leersia hexandra* Swartz is a forage specie that grows in tropical wetlands in Mexico. This grass is established at sites contaminated with chronic crude oil spills in the José Narciso Rovirosa ejido, two kilometers southwest of the La Venta Gas Processing Complex in Huimanguillo, Tabasco, Mexico. Its potential for adaptation and growth in Gleysol with fresh oil and assisted with Tween® 80 (Tw) in the process of environmental recovery is unknown. There is no knowledge on its production and growth potential when growing in Gleysol exposed to fresh crude oil and supplemented with Tween® 80 (Tw) for environmental recovery purposes. The aim of the study was to evaluate the effect of the concentration of total hydrocarbons fresh oil (TPH) and assisted with the commercial surfactant Tw in the growth, chlorophyll pigments and dry matter production of *L. hexandra*. An experiment was conducted in a microtunnel using 15 treatments based on five concentrations of TPH (mg kg<sup>-1</sup> dry basis): 693 biogenic oil, 4000, 30000, 60000, 90000; and three concentrations of Tw (%): 0, 2.5 and 5. The variables evaluated at 30, 60, 120 and 180 days after the establishment of the experiment (dds) were: 1) length of stolons (LE), 2) number of seedlings per cluster (PJM), and 3) growth rate (TCR). The variables evaluated at 180 dds were: a) concentration of chlorophylls a, b and total (Cla, Clb, Clt), b) aerial dry matter (MSA), root dry matter (MSR) and root volume (VR). The PJM

and TCR differed between the four times evaluated due to effect of oil and Tw. The PJM, MSR and VR increased at 180 dds with the highest concentration of TPH and Tw. The effect of 90000 mg kg<sup>-1</sup> was an increase in TCR TPH, PJM, MSR and VR, but LE, Cla and Clb showed no statistical differences. A concentration of 5% of Tw stimulated the PJM, Clb, MSA, MSR and VR. These results demonstrate the ability of *L. hexandra* to increase its TCR, PJM and root system when growing in Gleysol with  $\leq 90000$  mg kg<sup>-1</sup> of fresh oil and Tw (5%). We recommend using Tween-80 at 5% before transplanting *L. hexandra* for the environmental recovering of Gleysols contaminated with  $\leq 90000$  mg kg<sup>-1</sup> of TPH in the Mexican humid tropics.

**Key words:** petroleum, surfactant, relative growth rate, grass.

### INTRODUCCIÓN

Los hidrocarburos del petróleo son contaminantes persistentes en el suelo, sus efectos tóxicos ya han sido documentados (Rivera-Cruz, 2011a; Trujillo-Narcía *et al.*, 2012; Orozco-Soto *et al.*, 2014). El tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo puede ser físico, químico y biológico. Las tecnologías asistidas con surfactantes no iónicos como el Tween® 80 (Lee *et al.*, 2005) y la fitorremediación han demostrado eficiencia en la recuperación de suelos contaminados con petróleo (Merkl *et al.*, 2005). El Tween® 80 (polietileno glicol monooleato de sorbitan) es un agente tensoactivo utilizado para retener, solubilizar y mejorar la disponibilidad de los contaminantes de una manera poco tóxica para los organismos del suelo (Shcherbakova *et al.*, 1999; Jiménez, 2001; Moreno-Medina, 2011;

Farghaly *et al.*, 2015). La fitorremediación utiliza plantas y microorganismos del suelo; para degradar, asimilar o metabolizar los hidrocarburos del petróleo (Merkel *et al.*, 2005), pero la remoción es lenta e incompleta. La aplicación de la fitorremediación después de la formación de la emulsión del petróleo, inducida por el surfactante y para incrementar su remoción, requiere de plantas adaptadas a estas condiciones.

Diversos investigadores en pruebas de toxicidad de contaminantes indican que la respuesta de plantas y microorganismos es diferente: el Tween® 80 en concentraciones iguales y/o mayores a 3% causan daños en membranas celulares (Paris, 2008) e induce la muerte del organismo, los hidrocarburos del petróleo fresco en concentraciones de 50000 a 100 000 mg kg<sup>-1</sup> causan inhibición en el crecimiento y producción de biomasa pero algunas gramíneas, como los pastos tropicales, se adaptan a las condiciones de estrés causadas por el petróleo (Aprill y Sims, 1990; Chen *et al.*, 2004; Rivera-Cruz y Trujillo-Narcía, 2004; Sang-Hwan *et al.*, 2007; Maldonado-Chávez *et al.*, 2010).

Los pastos han sido objeto de estudio debido a su densa red de raíces que llegan hasta 2.7 m de profundidad, elongación superficial y su tolerancia a condiciones de estrés (Gould y Shaw, 1992; Orozco-Soto *et al.*, 2014). *L. hexandra* es un pasto forrajero que se encuentra en las regiones tropicales húmedas donde produce dos t•ha<sup>-1</sup>•año<sup>-1</sup> de materia seca. Invade humedales por la acumulación de follaje y raíz que forma sobre el suelo y el agua, lo que facilita el tránsito de animales en la pradera inundada. Presenta un follaje muy suave, semidecumbente, de tallos flexibles con hojas angostas y pequeñas (Rodríguez-Carrasquel, 1983; Vegetti, 2002). El

pasto *L. hexandra* desplaza otras especies vegetales establecidas en humedales en el estado de Tabasco, contaminados con hidrocarburos del petróleo intemperizado (Rivera-Cruz, 2011 b) y con una producción de biomasa seca de 11.5 t ha<sup>-1</sup>•año<sup>-1</sup> (Rivera-Cruz y Trujillo-Narcía, 2013).

Los antecedentes indican que la concentración y la estructura química de los xenobióticos que establecen contacto con la planta afectan su crecimiento y fisiología. Al respecto, dosis grandes de petróleo en el suelo originan respuestas adversas en las plantas superiores (fitotoxicidad) (Kapustka y Reporter, 1998). Según Plice (1948) cuando las concentraciones son bajas se estimula el crecimiento vegetativo, pero según Rivera-Cruz y Trujillo-Narcía (2004) y Cartmill *et al.* (2014) concentraciones altas del orden de 50 000 y 100 000 mg kg<sup>-1</sup> de HTP's, disminuyen el crecimiento y la producción de materia seca de los pastos *Echinochloa polystachya*, *Brachiaria mutica* y *Lolium multiflorum* después de seis meses de cultivo en condiciones controladas.

A pesar que los pastos han demostrado capacidad de adaptación a hidrocarburos del petróleo que le confieren importancia en pruebas de toxicidad, adaptación y fitorremediación de los hidrocarburos, se desconoce la respuesta a la aplicación de Tween® 80 combinado con petróleo fresco. Este conocimiento es de utilidad para la recuperación de suelo usando tecnologías combinadas. El Tween® 80 es aplicado como un remediador de emergencia *in situ* en agua y suelo, para la biodisponibilidad de los hidrocarburos en el ambiente (Kim y Weber, 2005), sin considerar los efectos en la planta. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de diferentes concen-

traciones de petróleo fresco y Tween® 80 en el crecimiento, concentración de pigmentos clorofilianos, y producción de *L. hexandra*, para seleccionar parámetros de la planta que indiquen adaptación a Gleysol contaminado con petróleo y asistido con Tween® 80, que permita recomendar una tecnología química y biológica para suelos del trópico húmedo mexicano.

## MATERIAL Y MÉTODOS

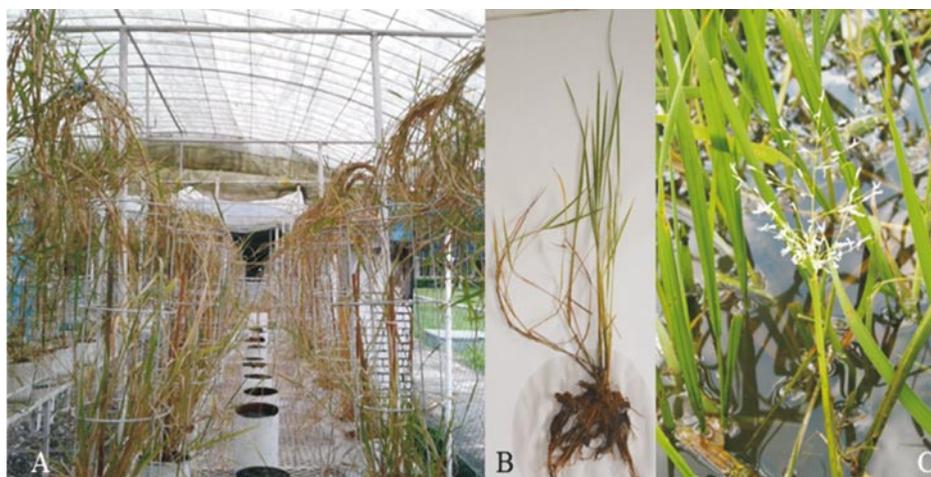
### Suelo, petróleo, Tween® 80 y producción de plántulas

El sitio se localiza en el ejido Blasillo 2a. Sección, La Venta Huimanguillo, Tabasco, México (18° 03' 8.0" N y 93° 56' 6.3" O). Se colectó suelo de la capa superficial (0-30 cm) de un GL, se determinaron rasgos físicos y químicos: textura arcillosa (método hidrométrico; Bouyoucos, 1962), pH 5.43

(potenciometría), MO 29.98% y Ntotal fue 0.66% (microKjeldhal, Page *et al.*, 1982), CO 17.39% (combustión seca, Walkley y Black, 1934), S-SO4 175.33 mg kg<sup>-1</sup> (turbidimetría) y CIC 48.92 cmol kg<sup>-1</sup> (acetato de amonio, Rhoades, 1982).

El petróleo fresco (PF) utilizado fue extraído del campo petrolero Cinco Presidentes, localizado en la parte noroccidental de Tabasco, en la plataforma continental frente al Golfo de México. El petróleo es del tipo Istmo mediano con 36.31° de densidad, está constituido por 56.4% de la fracción saturados, 23.7% de aromáticos y 14% de asfaltenos y resinas. El surfactante utilizado es el Tween® 80 (monooleato de polioxietileno sorbitan) (Tw).

Los tallos del pasto se colectaron en un sitio contaminado por derrames crónicos de petróleo desde hace 30 años, en el ejido



**Fig. 1 .** Pasto *Leersia hexandra* Swartz. A) crecimiento de planta en microtúnel, b) planta con raíz, tallo y hojas, C) planta con flor en humedal en La Venta, Tabasco, México.

José Narciso Rovirosa, a dos kilómetros al suroeste del Complejo Procesador de Gas La Venta, Huimanguillo, Tabasco. Se preparó almácigo en charola de plástico con suelo tamizado en malla 12 (2 mm de diámetro). *L. hexandra* es un pasto perenne, con rizosfera sumergida en el agua y enraizada en el GL inundado al menos durante seis meses al año. El pasto tiene raíces ramificadas, fibrosas y estoloníferas (fig. 1). De los tallos maduros de *L. hexandra*, se cortaron estolones de cinco cm de longitud con raíces, y se sembraron 32 días antes de establecer el experimento, para el traslado a las unidades experimentales. La altura de las plántulas establecidas en el experimento fue  $20.8 \pm 3.5$  cm (32 días después de sembradas en el almácigo).

### Diseño experimental

Se realizó un experimento en microtúnel por 180 días en H. Cárdenas, Tabasco, México. La temperatura promedio bajo microtúnel fue de  $32 \pm 4.7^\circ\text{C}$ . El diseño experimental fue completamente al azar con 15 tratamientos y tres repeticiones, con arreglo de dos factores completos: 1) HTP's: 693 HTP's biogénico (testigo), 4 000, 30000, 60 000 y 90000 mg kg<sup>-1</sup> base seca, y 2) concentración de Tween® 80; 0, 2.5 y 5%. La unidad experimental (UE) fue un contenedor de vidrio (14.5x15 cm, diámetro y altura) con 1.5 kg de suelo tamizado.

El suelo (1.5 kg) se mezcló por separado con 6, 45, 90 y 135 g de petróleo fresco y se homogeneizó con una varilla de vidrio. con una varilla de vidrio. La mezcla suelo-petróleo se colocó en los contenedores de vidrio. El Tween® 80 se pesó 0, 32.5 y 75 g y se diluyó en 420 mL de agua, esta mezcla se adicionó al suelo con petróleo de

las UE según tratamiento para obtener las concentraciones de 0, 2.5 y 5%. En cada UE se transplantó una plántula de *L. hexandra* y se aplicó riego cada 24 h para mantener condiciones de anegamiento del suelo.

### Variables de crecimiento y producción

Las variables evaluadas a los 30, 60, 120 y 180 dds en *L. hexandra* fueron longitud de los estolones (LE), número de plantas jóvenes del macollo (PJM) y tasa de crecimiento relativa (TCR). La TCR se determinó mediante la fórmula de Hunt et al. (2002):

$$\text{TCR} = (\ln w_2 - \ln w_1) / (t_2 - t_1)$$

dónde:

ln = logaritmo natural

w = longitud de estolón

t = tiempo (mes)

La concentración de los pigmentos clorofilianos (clorofila a, clorofila b y clorofila total) en hoja se evaluó a los 180 dds, por la técnica de colorimetría con N, N-dimetilformamida, e incubación durante 24 h en la oscuridad. En espectrofotómetro UV-visible se leyó la absorbancia a 647 y 664 nm. El cálculo de la concentración de clorofila ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) se realizó de acuerdo a la fórmula de Morán (1982):

$$\text{clorofila a} = 12.64 (A_{664}) - 2.99 (A_{647}),$$

$$\text{clorofila b} = 23.26 (A_{647}) - 5.6 (A_{664}),$$

$$\text{clorofila total} = 7.04 (A_{664}) + 20.27 (A_{647})$$

La producción de materia seca aérea (MSA) y de la raíz (MSR) de la planta se evaluó a los 180 dds. El material vegetal se cosechó y se secó a  $70^\circ\text{C}$  durante cinco días. El volumen radical se evaluó con la técnica de desplazamiento (Böhm, 1979).

## Análisis estadístico

A las variables en estudio se les realizó análisis de varianza (ANDEVA), se compararon las medias con la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) y correlación bivariada de Pearson mediante el programa estadístico del SAS, versión 9.1 (SAS, 2005).

## RESULTADOS

### Plantas jóvenes del macollo, longitud de estolones y tasa de crecimiento relativo

Los datos del análisis de varianza reportados en la tabla I, de la variable LE al 30 y 60 dds, mostró diferencias significativas por efectos de concentraciones de HTP's, el surfactante Tw y su interacción. En contraste para PJM y TCR ocurrió efecto significativo de concentración y su interacción en los cuatro tiempos evaluados, con excepción de la interacción HTP's x Tw a los 30 dds para PJM y del efecto de Tw a los 60 dds.

### Concentración de petróleo

La concentración de 4 000 mg kg<sup>-1</sup> de HTP's incrementó la LE y la TCR respecto al testi-

go durante los primeros 30 dds (tabla II). A partir de la concentración de 4000 mg kg<sup>-1</sup> de HTP's, conforme aumentó la concentración disminuyó de manera significativa la LE y la TCR a los 30 y 60 dds. Los resultados a los 60 y a los 180 dds no tuvieron diferencias significativas por efecto de dosis en LE, pero en TCR la respuesta registró diferencias. La tendencia es creciente con el aumento de la concentración de HTP's. El mismo efecto se identificó en la cantidad de plantas jóvenes a los 180 días del experimento. La máxima TCR fue de 5 a 7 cm día<sup>-1</sup>, fue a los 60 dds en suelos con las cinco concentraciones de HTP's, disminuyó al aumentar el tiempo, alcanzando la mínima de 0.5 a 1.4 cm día<sup>-1</sup> a los 180 dds.

### Concentración de Tween® 80

Los datos de la tabla II muestran la disminución significativa de la LE por efecto del surfactante Tw desde los 30 hasta los 120 dds. A los 180 dds no se observaron diferencias en LE entre concentraciones. Al igual que con las concentraciones de HTP's, la cantidad de PJM registró efecto significativo positivo por efecto de la concentración de Tw desde los 60 hasta los 180 dds. Por otro lado, a los

**Tabla I.** Análisis de varianza para longitud de estolones (LE), plantas jóvenes en macollo (PJM) y tasa de crecimiento relativo (TCR).

Fuente de variación	LE (cm)				PJM			TCR (cm día <sup>-1</sup> )				
	30	60	120	180	30	60	120	180	30	60	120	180
	-----Días después de la siembra-----											
Concentración HTP's (CHTP's)	**	**	NS	NS	*	**	**	**	**	*	*	**
Concentración Tw (CTw) (CHTP's) (CTw)	**	*	NS	NS	NS	*	*	**	**	**	*	*

\*, \*\* =  $p \leq 0.05$ , 0.01, respectivamente, NS = no significativo a  $p \leq 0.05$ . HTP's: hidrocarburos totales del petróleo. Tw: Tween® 80, n = 3.

**Tabla II.** Longitud de estolones (LE), plantas jóvenes en macollo (PJM) y tasa de crecimiento relativo (TCR) en concentración de hidrocarburos totales del petróleo (CHTP's) en función de la concentración de Tween® 80 (CTw).

Fuente de variación	LE (cm)			PJM			TCR (cm día <sup>-1</sup> )					
	30	60	180	30	60	180	30	60	180			
-----Días después de la siembra-----												
CHTP's (mgkg <sup>-1</sup> )												
693 Biogénico	98	280ab	405a	455a	6b	11c	18d	21d	2b	6ab	2.6ab	0.5c
4000	128a	312a	424a	450a	8ab	14b	23cd	27c	3.5a	6ab	2b	0.6bc
30000	89b	290ab	418a	475a	9a	15ab	27bc	31bc	2b	7a	2.5ab	0.5c
60000	58c	246bc	410a	460a	8ab	16a	32ab	37ab	1.2c	6ab	3.5a	1.0ab
90000	62c	221c	379a	443a	8ab	16a	36a	39a	1.3c	5b	2.3ab	1.4a
CTw (%)												
0	104a	303a	421a	459a	7a	11b	20c	24c	2.7a	6.6a	1.7b	1.0a
2.5	101a	295a	435a	478a	9a	15a	27b	32b	2.6a	6.1a	2.9a	0.6b
5	57b	212b	366b	434a	7a	16a	34a	38a	1.2b	5.3b	3.2a	0.8ab
Media general	87	270	407	457	8	14	27	31	2.2	6.0	2.6	0.8
CV (%)	15.5	12.5	13.8	12.7	25	13.1	16.7	14.5	20	13.2	33.7	45.2

En columna letras similares indican que los valores son estadísticamente iguales (Tukey,  $\leq 0.05$ , n = 3).

120 y 180 dds la concentración de 5% de Tw estimuló 41.2 y 36.8% la cantidad de PJM en función al tratamiento testigo, respectivamente. Las TCR mayores (6.6, 5.3, 6.1 cm día<sup>-1</sup>) se midieron a los 60 dds en todos los tratamientos, después disminuyó de 0.6 a 1 cm día<sup>-1</sup> a los 180 dds. Durante los primeros 60 dds ocurrió disminución significativa de la TCR por efecto del incremento de la concentración de Tw.

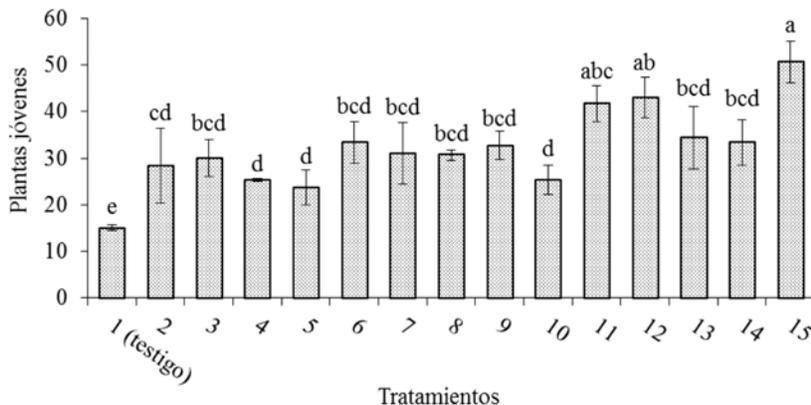
### Concentración de petróleo y Tween® 80

La interacción concentración de HTP's y de Tw sucedió en LE sólo a los 30 y 60 dds; en PJM a partir de los 60 dds y en TCR durante todo el ciclo experimental (tabla I). La figura 2 muestra el efecto de la interacción de HTP's\*Tw en PJM, se aprecia que los 14 tratamientos fueron mayores que el testigo

(T1), por lo tanto la producción de brotes nuevos fue estimulada por la sinergia entre los HTP's del petróleo y el Tw. El mayor número de PJM (51) se contó en el tratamiento 15, constituido por 90 000 mg kg<sup>-1</sup> de petróleo combinado con 5% de Tw.

### Concentración de pigmentos clorofilianos

Los datos del ANDEVA de la tabla III resaltan los efectos significativos en la clorofila a (Cla) y en la total (ClT) por efecto de las concentraciones de HTP's y Tw. Las concentraciones de Cla, Clb y ClT no fueron significativas por efecto del petróleo, sin embargo, la cantidad del surfactante Tw indujo efecto significativo ( $r = 0.362^*$ ) respecto a la concentración de Cla ( $r = 0.310^*$ ) y la ClT ( $r = 0.362^*$ ) (tabla V).



**Fig. 2.** Variación de plantas jóvenes de macollo en *Leersia hexandra* por efecto de concentración de petróleo fresco y Tween® 80 a los 180 días después de la siembra. Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ,  $n = 3$ ).

**Tabla III.** Anova de dos factores (CHTP's) (CTw) para todos los parámetros estudiados en planta de *Leersia hexandra* a los 180 días después de la siembra.

Variables	Concentración de HTP's [CHTP's]	Concentración Tween 80 [CTw]	Interacción [HTP's][CTw]
Clorofila a	*	*	NS
Clorofila b	NS	NS	NS
Clorofila total	NS	*	NS
MS de raíz	**	**	*
MS aérea	**	**	**
MS total	NS	**	**
Volumen radical	**	**	**

\*, \*\*  $p \geq 0.05, 0.01$ , significativa y altamente significativa, respectivamente, NS = no significativo. MS: Materia seca. n = 3.

### Materia seca y volumen radical

#### Concentración de hidrocarburos totales del petróleo

Se observaron diferencias significativas de la MS aérea, MS radical y VR en función de las concentración de HTP's y Tw (tabla IV). La producción de MS aérea disminuyó por efecto del petróleo ( $r = -0.425^*$ ) (tabla V). La mayor cantidad de MS aérea (55.12 y 54.5 g) se formó en plantas establecidas en el suelo testigo y con 4 000 mg kg<sup>-1</sup> de HTPs, en cambio la menor (43.3 g) fue en suelo con 90 000 mg kg<sup>-1</sup>, la disminución fue 16% respecto al testigo. Los valores de la MS radical y el VR aumentaron con el incremento de la concentración de HTP's ( $r = 0.632^{**}, 0.817^{**}$ ) (tabla V). La mayor cantidad de MS radical y VR (12.20 g y 188.33 cm<sup>3</sup>) se formó en plantas que crecieron en suelo con 90000 mg kg<sup>-1</sup> de HTP's, el incremento fue 53.2 y 61.4% con respecto a la planta cultivada en suelo sin petróleo (693 biogénico) (tabla IV).

### Dosis de Tween® 80

La MS aérea, MS radical y VR tienen relación positiva con la concentración de Tw (0.545\*, 0.532\* y 0.332\*) (tabla V). El aumento de MS aérea, MS radical y VR fue 26.98, 43.2 y 56.8%, respectivamente por efecto de 5% de Tw adicionado en el suelo. La relación MS aérea/MS radical fue mayor en suelo testigo respecto a las 14 relaciones en los tratamientos con petróleo (tabla IV).

#### Interacción de hidrocarburos totales del petróleo y Tween® 80

El ANDEVA de la MS aérea y de la MS radical registró diferencias altamente significativas para la interacción HTP's\*Tw (tabla III). En la figura 3 se observan diferencias significativas (Tukey  $p \leq 0.05$ ) por efecto de esta interacción en los 15 tratamientos. Los 14 tratamientos sometidos a los dos factores presentan mayor acumulación de MS aérea y MS radical respecto al testigo (T1). Se iden-

**Tabla IV.** Clorofila (Cl), materia seca (MS) y volumen radical (VR) en concentración de hidrocarburos totales del petróleo (CHTP's) en función de la concentración de Tween® 80 (CTw).

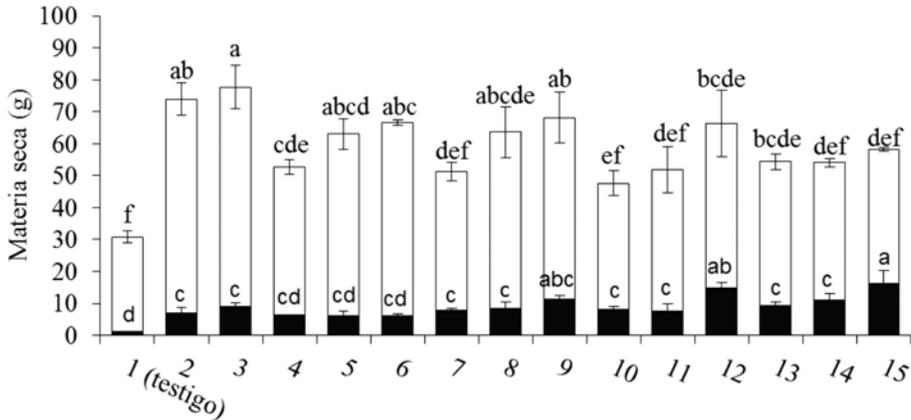
Fuente de Variación	Clorofila ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ )		MS (g)		MSA/MSR	VR ( $\text{cm}^3$ )
	a	b	Aérea	Radical		
<b>CHTP's (<math>\text{mg kg}^{-1}</math>)</b>						
693 Biogénico	13.76a*	4.62a	18.60a	55.12a	5.71c	72.64c
4 000	11.79a	4.85a	16.84a	54.58a	6.16c	70.83c
30 000	11.94a	4.16a	16.29a	51.83ab	9.17b	93.33bc
60 000	14.38a	5.43a	19.8a	44.99bc	10.23ab	130.56b
90 000	13.80a	4.71a	18.72a	43.33c	12.20a	188.33a
<b>CTw (%)</b>						
0	11.93a	4.1a	16.16b	40.81b	6.53c	87.25a
2.5	13.62a	5.11a	18.95a	53.22a	8.06b	115.67a
5	13.85a	5.02a	19.09a	55.88a	11.50a	130.50a
Media general	13.13	4.75	18.07	49.97	8.70	111.13
CV (%)	16.32	29.10	16.06	10.63	19.35	13.31

\* Dentro de columna letras similares indican valores estadísticamente iguales (Tukey,  $\leq 0.05$ ,  $n = 3$ ).

**Tabla V.** Correlación de variables.

Parámetro	Tw	PJM	LE	TCR	Clorofila a	Clorofila b	Clorofila total	MS aérea	MS raíz	MS total	Volumen radical
HTP's	NS	0.583**	NS	0.522*	NS	NS	NS	-	0.632**	NS	0.817**
Tw		0.529*	NS	NS	0.310*	NS	0.362*	0.425**	0.532*	0.660**	0.332*
PJM			NS	0.322*	NS	NS	0.304*	0.545*	0.777**	0.431*	0.783**
LE				NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
TCR					NS	NS	NS	NS	0.307*	NS	0.364*
Clorofila a						0.347*	0.911**	NS	NS	NS	NS
Clorofila b							0.698**	NS	NS	0.355*	NS
Clorofila total								0.313*	NS	0.364*	NS
MS aérea								0.310*	NS	0.952**	NS
MS raíz										0.431*	0.777**
MS total											NS

\* Significativo. \*\* Altamente significativo. NS: no significativo.



**Fig. 3.** Variación en la producción de materia seca radical (■) y aérea (□) de *Leersia hexandra* por efecto de concentración de Tween® 80 y petróleo fresco a los 180 días después de la siembra. Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ,  $n = 3$ ).

tificó tendencia directamente proporcional de la MS aérea y MS radical con la Tw entre tratamientos, sin y con petróleo.

La mayor producción de MS aérea (68.8 g) se observó en suelo testigo con 5% de Tw (T3), la menor (29.6 g) en el tratamiento testigo (T1). Sobresale que la mayor MS radical (16.5 g) se formó en el tratamiento con 90 000 mg kg<sup>-1</sup> HTP's y 5% de Tw (T15), y la menor (1.2 g) en tratamiento testigo (fig. 3). La relación MS aérea/MS radical fue mayor en suelo testigo respecto a las 14 relaciones en los tratamientos con petróleo (tabla IV).

## DISCUSIÓN

### Longitud de estolones, tasa de crecimiento y plantas jóvenes

La presente investigación muestra la importancia del pasto nativo *L. hexandra* en la adaptación a petróleo fresco y al surfactante Tween® 80 en GL del trópico húmedo. Estudios en suelos contaminados con metales pesados han demostrado la adaptación del pasto al acumular hasta 2 978 mg kg<sup>-1</sup> de cromo (Xue-Hong *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2011). En el caso de suelo con altas concentraciones de HTP's asistido con el

surfactante Tween® 80, la adaptación del pasto mostró que crece a pesar de las condiciones de estrés. La LE a los 180 dds fue similar en los 15 tratamientos evaluados, y la producción de PJM y TCR fue mayor en los 14 tratamientos con petróleo y Tween® 80 respecto al tratamiento testigo (tabla II).

Los resultados de TCR de 14 tratamientos registrados el día 60, fueron valores de 5 y 7 cm d<sup>-1</sup>; después, a los 120 y 180 dds los valores disminuyeron y son semejantes a los valores reportados por Tejon (1978) en *L. hexandra* en condiciones tropicales y sin estrés. Al respecto, según Grosshans y Kenkel (1997) y Awah *et al.* (2012) un factor determinante que explica la adaptación de *L. hexandra* a factores de estrés abióticos es su forma de crecimiento y multiplicación estolonifera que le permite invadir con mayor facilidad ambientes alterados por el hombre. En la formación de PJM de *L. hexandra* en suelo contaminado con petróleo y asistido con Tw, sobresalió la estimulación hasta en 70.6% cuando la planta fue expuesta a 90 000 mg kg<sup>-1</sup> HTPs y 5% de Tween® 80 (T15).

La respuesta en el crecimiento de *L. hexandra* observado en esta investigación sugiere adaptación a petróleo y Tween® 80. Una primera explicación de esta respuesta es que las plantas en suelos contaminados con petróleo están en condiciones similares a un estrés abiótico, ya que debido al efecto de la contaminación se presenta déficit de agua y de oxígeno así como baja disponibilidad de P en el suelo (Wyszowska y Kucharski, 2000). Cuando las plantas están sujetas a estrés abiótico inducen aumento de moléculas reactivas de oxígeno (MRO) en sus células, lo que conduce a estrés oxidativo. Moléculas como O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y radicales OH<sup>-</sup> provocan

daños a nivel de membrana celular, esto induce la inhibición del crecimiento vegetal (Liu *et al.*, 2009; Gill y Tuteja, 2010; Peralta-Pérez y Volke-Sepúlveda, 2012; Oladane, 2014). En general las plantas responden a este estrés con mecanismos de defensa para protegerse del daño; pero se ha observado que las plantas con altos niveles de antioxidantes constituidos o inducidos tienen mejor resistencia al daño (Oladane, 2014). La adaptación controla los niveles de MRO por la regulación de una red de defensa antioxidantes que incluye reacciones enzimáticas, para evitar la toxicidad celular y asegurar sus funciones de señalización como son el control de la proliferación y muerte celular (Mittler, 2002). Una segunda explicación para el incremento de PJM es que la planta es estimulada por petróleo y Tw a la síntesis de etileno a nivel celular, lo que contribuye en el crecimiento vegetal, en particular el desarrollo embrionario (germinación y retoños): 1) mitosis y diferenciación celular, y 2) expansión celular y acumulación de reservas (proteínas, grasas y almidón) (Salisbury y Ross, 2000; Escaso *et al.*, 2010).

### **Pigmentos clorofilianos**

La capacidad de adaptación de *L. hexandra* a diferentes concentraciones de HTP's y Tw no manifestó cambios en la concentración de los pigmentos clorofilianos (tabla IV). La disminución en clorofila es uno de los principales síntomas de clorosis manifestada por las plantas bajo estrés por niveles altos de hidrocarburos en el suelo; además las variaciones de la relación clorofila/carotenoides está asociada al estrés ambiental, por lo que se ha considerado un buen indicador de estrés en la planta (Jangpromma *et al.*, 2010).

La disminución de clorofila por exposición de la planta a hidrocarburos ha sido probado por Agnello *et al.* (2015) en hojas de *Medicago sativa* al utilizar Tween® 80 para estimular la degradación de hidrocarburos en el suelo. Otros estudios con pasto *Lolium multiflorum* evidenciaron disminución de la clorofila a al exponerlos a 3 000 hasta 15 000 mg kg<sup>-1</sup> de petróleo crudo (Cartmill *et al.*, 2014). Así mismo, Jajoo *et al.* (2014) encontraron disminución de 61.5 y 48.7% en el contenido de clorofila a en *Arabidopsis thaliana* expuesta a antraceno y pireno en el suelo, respectivamente. La concentración de clorofila en *L. hexandra* no mostró respuesta debido a la capacidad de esta planta para adaptarse al estrés por contaminación de HTP's (tablas III, IV y V).

En contraste, la adición de 5% del surfactante Tw indujo mayor contenido de clorofila total (19.09 µg cm<sup>2</sup>) en *L. hexandra* (tabla IV). El efecto del Tween® 80 en la concentración de clorofila total puede explicarse a la capacidad del surfactante para la degradación de las moléculas orgánicas de los HTP's y hacerlas disponibles en la solución del suelo (Volkering *et al.*, 1998). También posiblemente a una mayor disponibilidad de N oxidado en la rizosfera (Escaso *et al.*, 2010) derivado del N fijado por las bacterias fijadoras de vida libre, el cual es utilizado por las plantas para la síntesis de la clorofila y la fotosíntesis (Salisbury y Ross, 2000), que según Cartmill *et al.* (2014) apoya el aumento de crecimiento de la planta fundamentado en la tolerancia al estrés.

### **Masa seca y volumen radical**

Ocurrió efecto negativo de los HTP's en la MS aérea de *L. hexandra* pero en la MS radical y VR del pasto el efecto fue positivo.

La disminución de MS aérea del pasto se atribuye a que el petróleo forma una capa cerosa sobre los agregados del suelo y en la raíz, impide la disponibilidad de nutrientes en el suelo y la asimilación por parte de la planta (Quiñones-Aguilar *et al.*, 2003; Rivera Cruz *et al.*, 2004; Merkl *et al.*, 2005).

La estimulación de la MS radical y el VR posiblemente se debe que el estrés inducido en *L. hexandra* por el petróleo y el Tw estimuló la elongación celular y el crecimiento de la raíz en busca de espacios porosos y agua, debido a la biosíntesis de etileno que induce el aumento del número de raíces (Escaso *et al.*, 2010)

La concentración de Tw y la interacción HTP's\*Tw indican la estimulación de los tres parámetros de producción en *L. hexandra*. Ambas sustancias aparentemente estimularon el crecimiento del tejido vegetal a través de la diferenciación de mayor cantidad de follaje aéreo y de raíces. En condiciones de estrés por petróleo (Alanís y Guerrero, 2004; Merkl *et al.*, 2005) que si están presentes las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, los exudados de la raíz estimulan su crecimiento, lo que a su vez disminuye el estrés al reducir la acumulación de etileno y facilita la toma de nutrientes y la degradación de contaminantes del suelo (Chaudhry *et al.*, 2005; Zhuang *et al.*, 2007). Las bacterias utilizan ACC (enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa), es el precursor de etileno como fuente de N, lo que conlleva a una disminución de la síntesis de etileno. Al prevenir la síntesis de etileno se ha observado tolerancia al estrés (Greenberge, 2007). La disminución del estrés se asocia a otras hormonas involucradas en el crecimiento radical como las auxinas, actúan para promover el desarrollo de los brotes y

la formación de raíces laterales (Escaso *et al.*, 2010).

El resultado de la mezcla agua-aceite con el surfactante Tween® 80 es una emulsión, que disuelve una parte del surfactante Tw en el agua y la otra parte en el aceite. La emulsión es un sistema estable, heterogéneo, de dispersión de un líquido a otro líquido inmiscible entre ellos, puede servir para el encapsulamiento de los hidrocarburos y después ser liberados a los haces vasculares conductores de la planta (Aranberri *et al.*, 2006), pero también en la solución del suelo los hidrocarburos en la emulsión se disponen como fuente de carbono y energía para los microorganismos, liberando nutrimentos esenciales para la planta (Banat *et al.*, 2000). Algunos estudios indican que el uso de ácido giberélico (GA3) y Tween® 80, para la recuperación de suelos contaminados con benzo(a)pireno, mejora el crecimiento de *Tagetes patula* hasta en 55% con respecto al testigo. Así mismo, Agnello *et al.* (2015) observaron tendencia de aumento en la biomasa de *Medicago sativa* al utilizar Tween® 80 en suelo contaminado.

## CONCLUSIONES

Las concentraciones de HTP's, Tw y la interacción HTP's\*Tw estimularon en *Leersia hexandra* la tasa de crecimiento relativo, la producción de nuevas plantas jóvenes del macollo, la materia seca radical y volumen radical; pero la longitud de estolones, concentración de clorofila a, clorofila b y total sin cambio alguno. Sin embargo, la elevada concentración de HTP's del petróleo fresco al día 180 causó la disminución de la materia seca aérea de *Leersia hexandra*, la concentración de Tw y la interacción HTP's\*Tw la estimulan. El incremento inducido por los

HTP's y Tw al día 180 en los cuatro parámetros de crecimiento (tasa de crecimiento relativo, producción de nuevas plantas jóvenes del macollo, materia seca radical, así como el incremento de la producción de materia aérea de *L. hexandra* en Gleysol con HTP's\*Tw, indican adaptación de *L. hexandra* a condiciones de estrés abiótico de Gleysol con  $\leq 90\ 000$  mg kg<sup>-1</sup> de HTP's y asistido con 5% del surfactante Tween® 80. El uso del 5% de Tween® 80 antes del trasplante de *L. hexandra* se recomienda como tecnología recuperación de Gleysol con  $\leq 90\ 000$  mg kg<sup>-1</sup> de HTP's de petróleo fresco en el trópico húmedo mexicano.

## AGRADECIMIENTOS

El primer autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) de México, por la beca económica núm. 374198, otorgada durante los estudios de Maestría en Ciencias en el Colegio de Postgraduados Campus Tabasco.

## LITERATURA CITADA

- Agnello, A.C.; Huguenot, E.D. van Hullebusch, y G. Esposito, 2015. "Phytotoxicity of Citric Acid and Tween® 80 for Potential Use as Soil Amendments in Enhanced Phytoremediation". *Int. J. Phytorem.*, **17**: 669-667.
- Alanis, G.E., y L.I. Guerrero, 2004. "Pseudomonas en biotecnología". *Rev. Biotecnol.*, **9**: 26-37.
- Aprill, W., y C.R. Sims, 1990. "Evaluation of the use of grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbons treatment in soil". *Chemosphere*, **20**: 254-265.

- Aranberri, I.; B.S. Binks, J.H. Clint, y P.D.I. Fletcher, 2005. "Elaboración y caracterización de emulsiones estabilizadas por polímeros y agentes tensoactivos". *Rev. Iberoam. Polím.*, **7**: 212-231.
- Awah, T.M.; D. Kuitcha, A. Magha, J. Ndjama, y B.V.K. Kabeyene, 2012. "Occurrence of macrophytes in the Mezam river system in Bamenda (Cameroon) and their role in nutrient retention". *Syllabus Rev., Sci. Ser.*, **3**: 1-10.
- Banat, I.M.; R.S. Makkar y S.S. Cameotra, 2000. "Potential commercial applications of microbial surfactants". *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **53**: 495-508.
- Böhm, W., 1979. "Methods of studying root systems". Billing, W.D.; F. Golley, O.L. Lange, y J.S. Olson (Eds.). *Ecological studies* no. 33. Springer Verlag. Berlin., 188 pp.
- Bouyoucos, G., 1962. "Hydrometer method for particle-size analysis of soils". *Agron. J.*, **54**: 464-465.
- Cartmill, A.D.; D.L. Cartmill y A. Alarcón, 2014. "Controlled release fertilizer increased phytoremediation of petroleum-contaminated sandy soil". *Int. J. Phytorem.*, **16**: 285-301.
- Chaudhry, Q.; M. Blom-Zandstra, S. Gupta, y E.J. Joner, 2005. Utilizing the synergy between plants and rhizosphere microorganisms to enhance breakdown of organic pollutants in the environment. *Environ. Sci. Poll. Res.Int.*, **12**: 34-48.
- Chen, Y.; X. Li, y Z. Shen, 2004. "Leaching and uptake of heavy metals by ten different species of plants during an EDTA-assisted phytoextraction process". *Chemosphere*, **57**: 187-196.
- Escaso, S.F.; G.J.L Martínez y C.M.R. Planeló, 2010. "Fundamentos básicos de fisiología vegetal y animal". Pearson Educación, S.A. Madrid, España, 251 pp.
- Farghaly, A.; A. Tawfik, y I.M.G Eldin, 2015. "Surfactant-supplemented mixed bacterial cultures to produce hydrogen from paperboard mill wastewater". *Eng. Life Sci.*, **15**: 525.
- Gill, S.S., y N. Tuteja, 2010. "Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants". *Plant. Physiol. Biochem.*, **48**: 909-930.
- Gould, F.W., y R.B. Shaw, 1992. "Gramíneas. Clasificación Sistemática". 1a. ed. AGT Editor, S.A. México, 381 pp.
- Greenberg, B.M., 2007. "Field and laboratory test of multi-process phytoremediation system for decontamination of petroleum and salt impacted soils". Symposium Batelle Press. *Proceeding of the 9th International in situ on site Remediation*. En línea: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.503.6423&rep=rep1&type=pdf>
- Grosshans, R.E.; y N.C Kenkel, 1997. Dynamics of emergent vegetation along natural gradients of water depth and salinity in a prairie marsh: delayed influences of competition". *UFS Delta Marsh Ann. Report.*, **32**: 83-93.

- Hunt, R.; D.R. Causton, B. Shipley, y P. Askew, 2002. "A modern tool for classical plant growth analysis". *Ann. Botany*, **90**: 485-488.
- Jankiewicz, L.S., 2003. *Reguladores del crecimiento, desarrollo y resistencia en plantas*. Mundi-Prensa de Madrid, Esp. 477 pp.
- Jajoo, A.N.; R. Mekala, R.S.Tomar, M. Grieco, M. Tikkanen, y E.M. Aro, 2014. "Inhibitory effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) on photosynthetic performance are not related to their aromaticity". *J.Photochem. Photobiol. B: Biology*, **137**: 151-155.
- Jangpromma, N.; P. Songsri, S. Thammairak, y P. Jaisil P., 2010. "Rapid assessment of chlorophyll content in sugarcane using a SPAD chlorophyll meter across different water stress conditions". *Asian J. Plant. Sci.*, **9**: 368-374.
- Jiménez, C.B.E., 2001. "La contaminación ambiental en México: causas, efectos y tecnología apropiada. México": Limusa, Colegio de Ingenieros Ambientales de México, A.C., Instituto de Ingeniería de la UNAM y FEMISCA. México, DF. 926.
- Kin, H.S.; y W.J.J. Weber, 2005. "Polycyclic aromatic hydrocarbon behavior in bioactive soil slurry reactors amended with a nonionic surfactant". *Environ. Toxicol. Chem.*, **24**: 268-276.
- Kapustka, L., y M. Reporter, 1998. "Terrestrial primary producers". P. Calow (ed.) *Handbook of Ecotoxicology*. Blackwell Science. Gran Britain, 294 pp.
- Lee, D.H.; E.S. Kim, y H.W. Chang, 2005. "Effect of Tween surfactant components for remediation of toluene-contaminated groundwater". *Geosci. J.*, **9**: 261-267.
- Liu, H.; D. Weisman, Y. Ye, B. Cui, Y. Huang, A. Colón-Carmona, y Z. Wang, 2009. "An oxidative stress response to polycyclic aromatic hydrocarbon exposure is rapid and complex in *Arabidopsis thaliana*". *J. Plant. Sci.*, **176**: 375-382.
- Maldonado-Chávez, E.; M.C. Rivera-Cruz, F. Izquierdo-Reyes, y D.J. Palma-López, 2010. "Efectos de rizósfera, microorganismos y fertilización en la biorremediación y fitorremediación de suelos con petróleos crudo nuevo e intemperizado". *Universidad y Ciencia Trópico Húmedo*, **26**: 121-136.
- Merkel, N.; R. Schultze-Kraft, y C. Infante, 2005. "Assessment of tropical grasses and legumes for phytoremediation of petroleum-contaminated soils". *Water Air Soil Poll.*, **165**: 235-242.
- Mittler, R., 2002. "Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance". *Trends Plant Sci.*, **7**: 405-410.
- Moran, R., 1982. "Formulae for Determination of Chlorophyllous Pigments Extracted with N, N-Dimethylformamide". *Plant Physiol.*, **69**: 1376-1381.
- Moreno-Medina, U.C.; L.M. Breton-Deval, E. Rios-Leal, J. Barrera-Cortés, N. Rinderknecht-Seijas, y M. Poggi-Varaldo, 2011. "Incremento de la solubilización de percloroetileno con un

- tensocativo no iónico”. *Interciencia*, **36**: 224-228.
- Orozco-Soto, M.; M. Gutiérrez-Rojas, y M.R Peralta-Pérez, 2014. “Efecto de la composición de una mezcla de hidrocarburos en la respuesta fenotípica y la acumulación de azúcares por *Bouteloua curtipendula* Michx. Torr. En cultivo *in vitro*”. *Polibotánica*, **38**: 159-172.
- Page, A.L.; R.H. Miller, and D.R. Keeney, 1982. “Nitrogen total”. Page A.L., R.H Miller y D.R. Keeney (Eds). *Methods of Soil Analysis*. Part 2. Chemical and Microbiological Properties. 2nd. ed. ASA. SSSA. Madison, EU. pp. 595-629.
- Paria, S., 2008. “Surfactant-enhanced remediation of organic contaminated soil and water”. *Adv. Coll. Interf. Sci.*, **138**: 24-58.
- Peralta-Pérez, M.R.; y T.L. Volke-Sepúlveda, 2012. “La defensa antioxidante en las plantas: una herramienta clave para la fitorremediación”. *Rev. Mex. Ing. Qui.*, **11**: 75-88.
- Plascencia, J.R.; E.R. Quintero, y C.A.R. Quero, 2013. “Fijación de nitrógeno en gramíneas de pastizal”. Quero, C.A.R (Ed). *Gramíneas introducidas: Importancia e impacto en ecosistemas ganaderos*. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México, pp. 25-43.
- Olalekan, A., 2014. “The effect of palm kernel oil (PKO) biodiesel-contaminated soil on morphological and biochemical properties of *Zea mays*”. *J. Plant. Biochem. Physiol.*, **2**: 1-6.
- Plice, J.M., 1948. “Some effects of crude petroleum on soil fertility”. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, **13**: 413-416.
- Quiñones-Aguilar, E.E.; R. Ferrera-Cerrato, F. Gavi-Reyes, L. Fernández-Linares, R. Rodríguez-Vázquez, y A. Alarcón, 2003. “Emergence and growth of maize in a crude oil polluted soil”. *Agrociencia*, **37**: 585-594.
- Rivera-Cruz, M.C.; R. Ferrera-Cerrato, P. Sánchez-García, H. Volke-Haller, L. Fernández-Linares, y M. Rodríguez-Vázquez, 2004. “Descontaminación de suelos con petróleo crudo mediante microorganismos autóctonos y pasto alemán (*Echinochloa polystachya* [H.B.K.] Hitchc)”. *Agrociencia*, **38**: 1-12.
- Rivera-Cruz, M.C., y A. Trujillo-Narcía, 2004. “Estudio de toxicidad vegetal en suelos con petróleos nuevo e intemperizado”. *Interciencia*, **29**: 369-376.
- Rivera-Cruz, M.C., 2011a. “Bacterias y hongos en suelos contaminados con petróleo crudo en Tabasco”. Gamboa, A.M.; y Rojas H.R (Eds). *Recursos genéticos microbianos en la zona Golfo-Sureste de México*. Morevalladolid, S.A de C.V. Morelia, Michoacán, México, pp. 78-87.
- Rivera-Cruz, M.C., 2011b. “Flora y microflora rizosférica del pantano: indicadores de perturbación causada por petróleo e inundación”. *Agroregión*, **5**: 12-15.

- Rivera-Cruz, M.C.; y A. Trujillo-Narcía, 2013. "Dinámica de la biomasa vegetal y atenuación natural de los hidrocarburos del petróleo en un humedal del sureste de México". *Memoria XXXVIII Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo*. La Paz Baja California Sur, México. pp. 55-62.
- Rodríguez-Carrasquel, S., 1983. "Pasto alemán, para Caribe, Tannagrass, paja de agua, lamedora y Chi Guirera". *Revista de difusión de tecnología agrícola y pesquera del FONAIAP* núm.12. septiembre-octubre 1983. Instituto Nacional de investigaciones Agrícolas. Bolivia, Venezuela, 3 pp.
- Rhoades, J., 1982. "Cation Exchange Capacity". Page A.L., (Ed.). *Methods of Soil Analysis*. Part 2. Chemical and Microbiological Properties. 2nd ed. American Society of Agronomy/Soil Science Society of America, Madison, WI, USA. pp. 178-190.
- Salisbury, F.B., y C.W. Ross, 2000. *Fisiología de las plantas: Desarrollo de las plantas y fisiología ambiental*. Thomson editores. Madrid, España, 985 pp.
- Sang-Hwan, L.; L. Won-Seok, L. Chang-Ho, y K. Jeong-Gyu, 2007. "Degradation of phenanthrene and pyrene in rhizosphere of grasses and legumes". *J. Hazard Mater*, **141**: 519-525.
- SAS (Statistical Analysis Systems), 2005. "User's Guide", Versión 9.1.3. SAS Institute, Inc. Cary, NC., 664 pp.
- Shcherbakova, V.A.; Laurinavichius, K.S, y V.K. Akimenko, 1999. "Toxic effect of surfactants and probable products of their biodegradation on methanogenesis in an anaerobic microbial community". *Chemosphere*, **39**: 1861-1870.
- Tejo, M.R., 1978. "Efecto de la edad sobre el rendimiento del pasto lamedora (*Leersia hexandra* Swartz) de una sabana inundable". *Agron. Trop.*, **28**: 527-540.
- Trujillo-Narcía, A.M.; Rivera-Cruz. M.C, L.C. Lagunes-Espinoza, D.J. Palma-López, S. Soto-Sánchez, y G. Ramírez-Valverde, 2012. "Efecto de la restauración de un Fluvisol contaminado con petróleo crudo". *Rev. Int. Contam. Ambie.*, **28**: 361-374.
- Vegetti, A.C., 2002. "Caracterización de los sistemas de ramificación en especies de Oryzae (Poaceae)". *Candollea*, **57**: 251-260.
- Volkering, F.; A.M. Breure, y W.H. Rulkens, 1998. "Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation". *Biodegradation*, **8**: 401-417.
- Walkley, A.; I.A. Black, 1934. "An examination of degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method". *Soil Sci.*, **37**: 29-38.
- Wyszkowska, J., y S. Kucharki, 2000. "Biochemical properties of soil contaminated by petrol". *Polish J. Environ. Studies*, **9**: 479-485.

- Xue-Hong, Z.; L. Jie, H. Hai-Tao, C. Jun, Z. Yi-Nian, y W. Dun-Qiu, 2007. "Chromium accumulation by the hyperaccumulator plant *Leersia hexandra* Swartz". *Chemosphere*, **67**: 1138-1143.
- Zhuang, X.; J. Chen, H. Shim, y Z. Bai, 2007. "New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation". *Environ. Intern.*, **33**: 406-413.

Recibido: 4 de octubre de 2015. Aceptado: 23 de septiembre de 2016.