

***Tagetes erecta* Y *Azotobacter vinelandii* INMOVILIZADAS PARA LA BIORREMEDIACIÓN DE DIÉSEL EN SUELOS AGRÍCOLAS**

Tagetes erecta and *Azotobacter vinelandii* immobilized for bioremediation of diesel in agricultural soils

Karina María MUÑOZ-DE LA CRUZ, Gloria Anaí VALENCIA-LUNA*,
Beatriz PÉREZ-ARMENDÁRIZ and Luis Daniel ORTEGA-MARTÍNEZ

Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla, 21 sur 1103, Barrio de Santiago, 72410 Puebla, Puebla, México.

*Autora para correspondencia: gloriaanai.valencia@upaep.mx

(Recibido: septiembre de 2022; aceptado: noviembre de 2023)

Palabras clave: suelos agrícolas, fitorremediación, bioaumentación, toxicidad.

RESUMEN

La creciente demanda energética del petróleo y sus derivados ha ocasionado una alta incidencia de eventos ambientales que afectan negativamente los agroecosistemas, por lo que el estudio de herramientas biotecnológicas que permitan la descontaminación promete ser una alternativa sostenible. El objetivo de esta investigación fue evaluar la biorremediación de suelos agrícolas contaminados con diésel utilizando tratamientos de fitorremediación con *Tagetes erecta* y bioaumentación con *Azotobacter vinelandii* (libre e inmovilizada) en condiciones de invernadero. El ensayo de biorremediación tuvo una duración de 50 días. Las variables de respuesta fueron: bacterias totales heterótrofas en unidades formadoras de colonias (UFC/g), variables morfológicas de las plantas e hidrocarburos totales del petróleo (mg/kg). La toxicidad de los suelos biorremediados se evaluó por ensayos de genotoxicidad y citotoxicidad utilizando células de *Allium sativum*. La biorremediación mostró remoción significativa en todos los tratamientos con *T. erecta*, logrando porcentajes de remoción de 31.92 a 55.96 %. Por otra parte, la asociación de *T. erecta* y *A. vinelandii* libre presentó el mayor incremento de microorganismos heterótrofos totales con 3.83×10^{10} UFC/g de suelo ($p = 0.00$). En los parámetros morfológicos de *Tagetes erecta* el índice de calidad de Dickson, mostró un valor óptimo para los tratamientos con plantas ($p = 0.02$). No obstante, se observó efecto citotóxico y genotóxico en todos los tratamientos (índice mitótico ≤ 50 %, $\chi^2 \geq 3.84$, respectivamente).

Key words: agricultural soils, phytoremediation, bioaugmentation, cytotoxicity, genotoxicity.

ABSTRACT

The growing energy demand for oil and its derivatives has caused a high incidence of environmental events that negatively affect agroecosystems, so the study of biotechnological tools allows the reduction in agrochemicals, and the decontamination of the soil has been increasing. This research aimed to bioremediate agricultural soil contaminated with diesel using phytoremediation treatments with *Tagetes erecta* and bioaugmentation with free and immobilized *Azotobacter vinelandii* under greenhouse conditions. The bioremediation test lasted 50 days; subsequently, the heterotrophic

microbial populations in colony-forming units (CFU/g) were quantified by serial dilution, plate count, and the residual concentration of hydrocarbons (mg/kg) by gravimetry. Finally, a genotoxicity and cytotoxicity assay using *Allium sativum* cells was performed. Bioremediation showed significant removal in all treatments with *T. erecta*, achieving removal percentages between 31.92 and 55.96 %. On the other hand, the association of *T. erecta* and free *A. vinelandii* presented the highest increase in total heterotrophic microorganisms with 3.83×10^{10} UFC/g in soil ($p = 0.00$). Similarly, the morphological parameters of *Tagetes erecta* were evaluated using the Dickson Quality Index, revealing an optimal value for treatments with plants without alginate beads ($p = 0.02$). However, a cytotoxic and genotoxic effect was observed in all treatments (Mitotic index ≤ 50 %, $\chi^2 \geq 3.84$, respectively), pointing out the importance of toxicity studies in bioremediation tests.

INTRODUCCIÓN

La constante generación de residuos peligrosos por las actividades propias de la industria petrolera y los derrames de hidrocarburos han ocasionado incidencias negativas en los ecosistemas, provocando escasez alimentaria y marginación, principalmente en poblaciones agrícolas expuestas a estos sinistros (Balseiro-Romero et al. 2018, Pérez-Muñoz et al. 2019). El daño ocasionado por los derrames de hidrocarburos depende del tipo de petróleo y su procedencia, siendo los productos livianos como la gasolina y el diésel más tóxicos que los crudos, ya que se evaporan a gran velocidad (Rivas-Trasancos et al. 2020). Estos combustibles contienen mezclas de diferentes moléculas químicas, clasificadas como hidrocarburos saturados, compuestos aromáticos, asfaltenos y resinas (Kim et al. 2013, Szewczyńska et al. 2017). En este sentido, la compleja estructura molecular de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), les confiere alta resistencia al tratamiento, tornándose potencialmente bioacumulables (Mezzanotte et al. 2015, Khan et al. 2018). Debido a su hidrofobicidad, estos compuestos son difícilmente extraíbles del ambiente, por lo que se encuentran biodisponibles para los receptores ecológicos (Hunt et al. 2019). Por ello se ha demostrado que tienen consecuencias mutagénicas y carcinogénicas en organismos expuestos a sitios contaminados (Ukalska et al. 2018).

Esta problemática ha generado la búsqueda de alternativas viables que permitan remediar agroecosistemas contaminados sin frenar su producción (Alegbeleye et al. 2017), siendo la fitorremediación y la bioaumentación tecnologías biológicas sostenibles para la restauración de suelos agrícolas contaminados (Ventorino et al. 2019, Ławniczak et al. 2020), ya que la degradación de xenobióticos por acción radicular y su asociación con la microbiota de la rizósfera son

los principales mecanismos en la eliminación de los HAP (Hussain et al. 2018, Hoang et al. 2021).

La bioaumentación permite la remoción de contaminantes mediante la inoculación de cepas microbianas con capacidad degradativa (Wu et al. 2020, Lipińska et al. 2021). La naturaleza de los suelos agrícolas exige la utilización de microorganismos que favorezcan la biodegradación del contaminante mientras promueven el crecimiento vegetal, disminuyendo el uso de agroquímicos costosos y dañinos para el ambiente (Prasad et al. 2017, Vejan et al. 2019). En este sentido, *Azotobacter vinelandii* es una bacteria diazótrofa cuya capacidad metabólica le permite degradar compuestos hidrocarbonados de origen petrogénico (Suryatmana et al. 2018, Chaudhary et al. 2019). Sin embargo, la viabilidad de microorganismos exógenos en sitios contaminados se compromete, por lo que se ha estudiado el uso de portadores o inmovilización, que mantienen su actividad, mejorando las tasas de degradación (Partovinia y Rasekh 2018).

Además, el uso de plantas ornamentales con valor comercial ha sido ampliamente estudiado en procesos de fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, debido a que su uso impide la asimilación del contaminante o sus metabolitos a la cadena trófica, disminuyendo las consecuencias a la salud y promoviendo la generación de recursos económicos durante el proceso de descontaminación de agroecosistemas (Liu et al. 2018). En este sentido, *Tagetes erecta* ha sido ampliamente cultivada por su uso decorativo en jardinería, así como en diversos eventos sociales y religiosos (Gopi et al. 2012, Tandel y Kumari 2021), destacando su importancia comercial y económica; además, esta especie vegetal tiene la capacidad de tolerar concentraciones de hasta 90 g/kg de hidrocarburos (Prematuri et al. 2019).

En este contexto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el potencial de *Tagetes erecta* y *Azotobacter vinelandii* libre e inmovilizada, para la

biorremediación de suelos agrícolas contaminados con diésel en condiciones de invernadero (*ex situ*), así como determinar la genotoxicidad y citotoxicidad de los suelos para generar alternativas sostenibles en la recuperación de suelos agrícolas impactados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

Se recolectaron 20 kg de suelo contaminado en una zona agrícola impactada por derrame de diésel en la región de Acatzingo, Puebla, México (18° 58' 43.0" E, 97° 46' 49.7" O). Las características físicas y químicas del suelo lo clasifican como arenoso, con pH de 7.47, 9.25 % de materia orgánica, 0.39 % de nitrógeno total, 20.32 mg/kg de fósforo, densidad aparente de 1.29 g/ml, conductividad eléctrica de 0.214 dS/m y capacidad de campo de 35 %.

Propagación del material vegetal

La propagación de *Tagetes erecta* se realizó en el invernadero de investigación del Centro de Innovación Tecnológica en Agricultura Protegida de la Universidad Popular Autónoma de Puebla (CITAP-UPAEP), en Atlixco, Puebla, México. Se sembraron 100 semillas de *T. erecta* en almácigos con turba como sustrato, humedecidos diariamente con solución nutritiva Steiner (1961) por 30 días. Posteriormente se procedió al trasplante.

Propagación e inmovilización de *Azotobacter vinelandii*

Para el proceso de bioaumentación se utilizó la cepa ATCC 12837 *Azotobacter vinelandii* la cual fue cultivada en el siguiente medio (g/L): 1 extracto de levadura; 5 D-manitol; 0.7 K₂HPO₄; 0.1 KH₂PO₄; 1 MgSO₄ 7H₂O, ajustado a pH 7 ± 0.05. Para obtener la población bacteriana máxima se creció a 28 °C durante 72 h a 200 rpm (Conde-Ávila et al. 2022). Posteriormente se realizó la mezcla de 2 ml del inóculo en una solución estéril de alginato de sodio a una concentración final de 2% (p/v), y se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. Finalmente, para la obtención de las perlas de encapsulación, se adicionó por goteo una alícuota de la suspensión de alginato con *A. vinelandii* a una solución estéril de CaCl₂ 0.1 M (Reyes-Reyes et al. 2018).

Tratamientos del ensayo de biorremediación

El experimento se desarrolló en macetas plásticas de 1 kg de capacidad rellenas con 500 g de suelo contaminado con diésel, colocando 100 g de tezontle

en el fondo del recipiente para evitar fugas. Los tratamientos empleados fueron; T0: microbiota autóctona, T1: *Tagetes erecta*, T2: *Azotobacter vinelandii* libre, T3: *Tagetes erecta* + *Azotobacter vinelandii* libre, T4: *Azotobacter vinelandii* inmovilizada, T5: *Tagetes erecta* + *Azotobacter vinelandii* inmovilizada, T6: *Tagetes erecta* + perlas de alginato, T7: perlas de alginato. Cada tratamiento constó de cinco repeticiones, utilizando un diseño de cuadrado latino. Por último, se realizó la inoculación de 10⁸ UFC/ml de *A. vinelandii* para los tratamientos con la bacteria libre e inmovilizada, siete días antes del trasplante.

Ensayo de biorremediación

El experimento se llevó a cabo en las instalaciones del CITAP-UPAEP en condiciones de invernadero (humedad relativa de 39.3 ± 8.9 %, temperatura 31.4 ± 5.7 °C), humedeciendo cada maceta con agua diariamente, procurando capacidad de campo. En los días 0 y 50 se determinó la concentración de diésel residual (mg/kg), así como la población microbiana viable (UFC/g) en cada unidad experimental.

Cuantificación de población bacteriana

La cuantificación de microorganismos heterótrofos cultivables en el suelo inicial y final de cada tratamiento se realizó por dilución seriada en condiciones estériles a partir de 1 g de suelo y 9 ml de solución salina 0.09 % y hasta la dilución 10⁷, las cuales fueron sembradas por triplicado en agar nutritivo utilizando 0.2 ml de inóculo, e incubadas por 48 h a 28 °C (Orozco et al. 2016). La determinación de unidades formadoras de colonia por gramo de suelo (UFC/g), se obtuvo mediante el conteo de UFC en placa, multiplicado por la dilución utilizada y dividido entre el volumen inoculado.

Cuantificación de diésel residual

La concentración de diésel se determinó para cada tratamiento, para lo cual se utilizaron 3 g de suelo mezclado con 3 g de sulfato de sodio anhidro, con una adición de 15 ml de diclorometano-acetona 1:1, utilizando baño ultrasónico por 45 min con intervalos de 10 min. Posteriormente, las muestras se transfirieron a tubos falcón de 15 ml para centrifugarse por 10 min a 2000 rpm (Mnif et al. 2015, Bolotnik et al. 2019). Por último, se recuperó el sobrenadante en tubos, se dejó evaporar el disolvente en campana de extracción hasta sequedad y se realizó el análisis gravimétrico de acuerdo con el método EPA 9071 B (USEPA 1998).

$$HTP \text{ (mg/kg)} = (RB - RA) / (P) \times 1000$$

donde *HTP* es la concentración de hidrocarburos totales de petróleo, *RB* el peso (mg) del tubo con el extracto de hidrocarburos, *RA* el peso (mg) del tubo vacío a peso constante y *P* la cantidad de suelo utilizado (g).

Parámetros morfológicos de la planta

Se realizaron mediciones de altura de la planta (cm), longitud de raíz (cm), diámetro del peciolo (mm), peso húmedo (g) y peso seco (g) de la planta en cada unidad experimental. Posteriormente, se obtuvo el índice de calidad de Dickson (ICD), de acuerdo con Villalón-Mendoza (2016).

Análisis de citotoxicidad y genotoxicidad

La evaluación de citotoxicidad y genotoxicidad a los tratamientos se realizó utilizando *Allium sativum* como bioindicador, mediante la determinación del índice mitótico y el conteo de anomalías nucleares y micronúcleos (Fiskesjö 1985). Los bulbos de *A. sativum* fueron expuestos durante siete días al suelo inicial y residual de cada tratamiento; posteriormente se realizaron cortes de 1-3 mm de la zona del meristema apical de las raíces, los cuales se fijaron con una solución 1:3 de ácido acético y etanol. Posteriormente se realizó la hidrólisis de las muestras, colocándolas en una solución de ácido clorhídrico 1 N a 50 °C durante 5 min. La tinción de raíces se realizó en un portaobjetos con orceína al 2 % durante 2 min. Finalmente se realizó el aplastado celular (*squashing*) de cada muestra con ayuda de un cubreobjetos. Los preparados citológicos se manejaron en simple ciego

y se identificaron 1000 células meristemáticas para cada tratamiento. Las células se cuantificaron en cualquier fase de mitosis, al igual que las aberraciones cromosómicas, utilizando un microscopio óptico de fluorescencia Leica DM1000 LED. Por último, se calculó el índice mitótico (IM), y los resultados de anomalías nucleares obtenidos se sometieron a prueba de χ^2 para asociar la genotoxicidad presentada en células de *Allium sativum*.

Análisis estadístico

Para conocer las diferencias significativas entre tratamientos, las variables de respuesta fueron analizadas estadísticamente mediante la prueba T-student pareada, análisis de varianza (ANDEVA) de un factor y comparación de medias de Tukey, utilizando el programa estadístico Graphpad Prism 9 con un nivel de confianza del 95 %.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuantificación de la población bacteriana

El conteo inicial de microorganismos en suelo antes de los tratamientos fue de 9.17×10^7 UFC/g (**Cuadro I**). Por otro lado, la prueba de T-student mostró un aumento estadísticamente significativo de UFC/g de suelo en la mayoría de los tratamientos (**Fig. 1a**). Asimismo, el crecimiento bacteriano en los tratamientos con *Tagetes erecta* sugiere que una fracción de la microbiota rizosférica logró utilizar el diésel como fuente de carbono o energía (Díaz et

CUADRO I. REMOCIÓN DE DIÉSEL Y MICROBIOTA EN EL ENSAYO DE BIORREMEDIACIÓN.

Tratamiento	Diésel residual (mg/kg)	Remoción (%)	Microbiota (UFC/g)
Día 1			
Suelo contaminado inicial	8 710.15 ± 1 032.90	N/A	$9.17 \times 10^7 \pm 2.08 \times 10^7$
Día 50			
T0 (microbiota autóctona)	6 132.84 ± 255.13 ^{abc}	42.19 ± 5.92	$4.83 \times 10^8 \pm 1.44 \times 10^8$ ^b
T1 (<i>Tagetes erecta</i>)	6270.89 ± 1061.07 ^{abc}	41.63 ± 24.31	$5.33 \times 10^9 \pm 2.02 \times 10^9$ ^b
T2 (<i>Azotobacter vinelandii</i> libre)	7 121.06 ± 245.55 ^{abc}	25.86 ± 7.24	$5.17 \times 10^8 \pm 1.26 \times 10^8$ ^b
T3 (<i>Tagetes erecta</i> + <i>Azotobacter vinelandii</i> libre)	5 624.74 ± 24.63 ^{bc}	54.85 ± 0.68	$3.83 \times 10^{10} \pm 1.15 \times 10^{10}$ ^a
T4 (<i>Azotobacter vinelandii</i> inmovilizada)	7 229.85 ± 543.22 ^{ab}	25.60 ± 11.91	$3.67 \times 10^8 \pm 1.15 \times 10^8$ ^b
T5 (<i>Tagetes erecta</i> + <i>Azotobacter vinelandii</i> inmovilizada)	5 595.91 ± 298.00 ^c	55.96 ± 8.54	$8.00 \times 10^8 \pm 3.00 \times 10^8$ ^b
T6 (<i>Tagetes erecta</i> + perlas de alginato)	6 327.34 ± 171.79 ^{abc}	31.92 ± 3.74	$1.08 \times 10^9 \pm 1.76 \times 10^8$ ^b
T7 (perlas de alginato de sodio)	7281.72 ± 239.99 ^a	24.05 ± 8.42	$5.67 \times 10^8 \pm 1.04 \times 10^8$ ^b
Valor <i>p</i>	0.00		0.00

Medias que no comparten la misma letra son significativamente diferentes; nivel de significancia $\alpha = 0.05$.

N/A: no aplica, UFC: unidades formadoras de colonias.

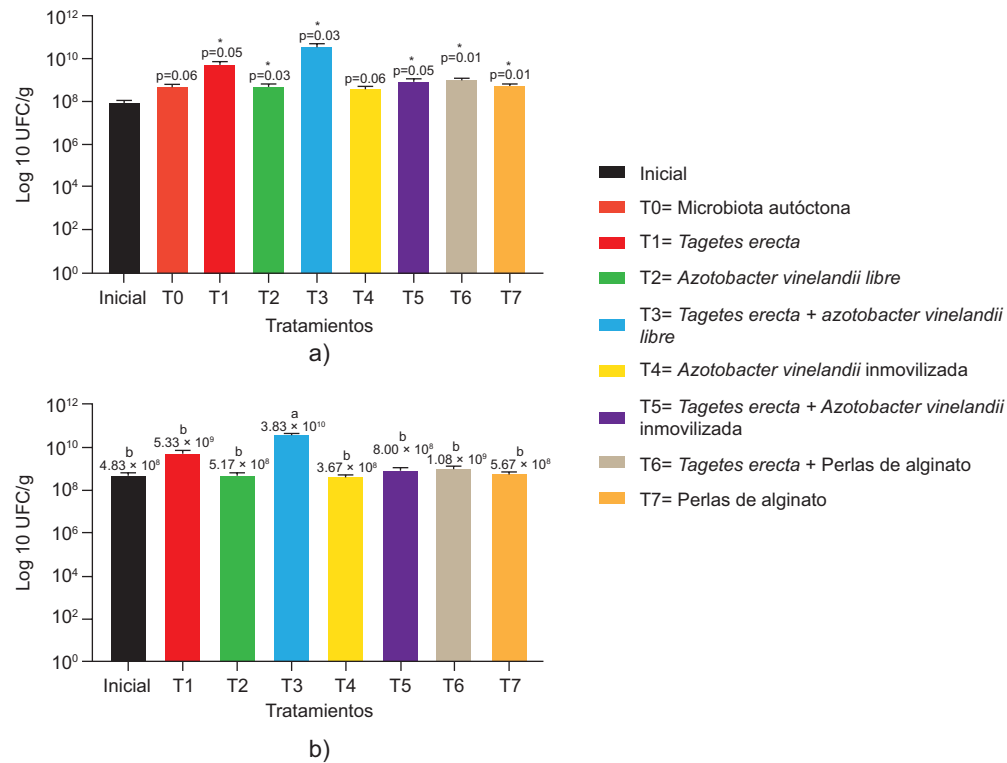


Fig. 1. Conteo de microorganismos heterótrofos en los distintos tratamientos. (a) Prueba T pareada respecto a la concentración de suelo inicial (*tratamientos estadísticamente significativos); (b) análisis de varianzas de una vía para comparar los diferentes tratamientos ($p = 0.05$). (UFC: unidades formadoras de colonias.)

al. 2021). Resultados similares fueron obtenidos por Chuluun et al. (2014) con *Perennial ryegrass* (*Lolium perenne* L.), quienes observaron el aumento de microorganismos heterótrofos cultivables en todos los tratamientos con plantas en órdenes de 10^8 y 10^9 en un suelo contaminado de manera artificial con diésel a 50 g/kg, concluyendo que los exudados segregados por la planta pudieron servir como fuente de nutrientes y carbono para los microorganismos (Liu et al. 2014). Finalmente, el efecto de rizoestimulación pudo observarse en el tratamiento T3 (*Tagetes erecta* + *Azotobacter vinelandii* libre), cuya media de crecimiento bacteriano de 3.83×10^{10} UFC/g de suelo fue estadísticamente mayor a los otros tratamientos ($p = 0.00$) (**Fig. 1b**) debido a que plantas mejoran la porosidad del suelo y estimulan la actividad microbiana por medio de nutrientes y cosustratos exudados (Salim et al. 2020).

Cuantificación del diésel residual

La concentración inicial de hidrocarburos fue de 8710.15 mg/kg. Rodríguez et al. (2012) concluyen

que una concentración de 6270 mg/kg es considerada como el límite inferior de tolerancia de hidrocarburos para los microorganismos, por lo que pudo haber sido un factor limitante para la biodegradación de diésel; igualmente, el valor obtenido rebasa los 1200 mg/kg, límite máximo permitido de la fracción media en suelo agrícola de acuerdo con la NOM-138-SEMAR-NAT/SSA1-2012 (SSA 2013), lo cual incrementa la hidrofobicidad del suelo y afecta el crecimiento de las plantas y las actividades microbianas en suelo (Hewelke et al. 2018). Esto constituye un grave riesgo para la salud humana debido a su resistencia al tratamiento y a sus propiedades mutagénicas, teratogénicas y carcinogénicas (Rodríguez-Campos et al. 2019).

Por otro lado, la prueba de T pareada para concentración de diésel mostró diferencias significativas para el T0 (microbiota autóctona; $p = 0.03$), debido a que la microbiota autóctona estimulada por factores abióticos como la humedad, oxígeno y temperatura logra promover la degradación mediante el uso de hidrocarburos como fuente de energía

(Silva-Castro et al. 2015). Igualmente, los tratamientos T1 (*Tagetes erecta*; $p=0.00$), T3 (*Tagetes erecta* + *Azotobacter vinelandii*; $p=0.03$), T5 (*Tagetes erecta* + *Azotobacter vinelandii* inmovilizada; $p=0.02$) y T6 (*Tagetes erecta* + perlas de alginato; $p=0.04$) fueron estadísticamente significativos respecto al suelo inicial (**Fig. 1a**), fenómeno atribuido al sistema denso de raíces de la especie *Tagetes erecta*. Ésta permite el desarrollo de microorganismos asociados y promueve la biodegradación (Rajkumari et al. 2021) que, al ser bioestimulada por *A. vinelandii* (la cual posee distintos mecanismos para la remoción de hidrocarburos, como fijación de nitrógeno esencial para el crecimiento de raíces), incrementa la presencia de exudados que contribuyen a la degradación (Suryatmana et al. 2019). Igualmente, *A. vinelandii* tiene la capacidad de producir biosurfactantes que reducen la tensión superficial de los hidrocarburos y favorecen la interacción de los microorganismos con el contaminante (Suryatmana et al. 2018). Por otro lado, se sabe que la presencia de enzimas oxidativas y cometabolismo con otras bacterias degradadoras conducen a la disminución de diésel en suelo (Onwurah y Nwuke 2004, Chaudhary et al. 2019).

En este sentido, la bioaumentación con bacterias exógenas en procesos de descontaminación suele ser

relevante por su capacidad catalítica de compuestos hidrocarbonados (Laothamteep et al. 2022), lo cual se evidencia en el tratamiento T7 (perlas de alginato; **Fig. 2a**), en el cual no se empleó *Azotobacter vinelandii* y no presentó remoción significativa ($p=0.19$). Por otra parte, el propio alginato pudo haber disminuido la degradación por ser una fuente alterna más accesible de carbono para los microorganismos (Goma-Tchimbakala et al. 2022). No obstante, los tratamientos T2 (*Azotobacter vinelandii*) y T4 (*Azotobacter vinelandii* inmovilizada) no presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto al suelo inicial ($p=0.09$ y $p=0.08$, respectivamente), lo cual pudiera estar relacionado con que la bacteria fue cultivada en un medio óptimo, impidiendo aclimatación al contaminante. Esto, sumado a los factores bióticos y abióticos que perjudicaron su crecimiento y, por tanto, el proceso de biodegradación (Innemanová et al. 2018).

Al realizar el ANDEVA de una vía (**Fig. 2b**) se observan diferencias estadísticas significativas entre las concentraciones de diésel residual en los tratamientos (**Cuadro I**); sin embargo, no se logra establecer un factor común que determine el tratamiento con mayor eficacia en la remoción de hidrocarburos, dado que los tratamientos comparten grupos estadísticos

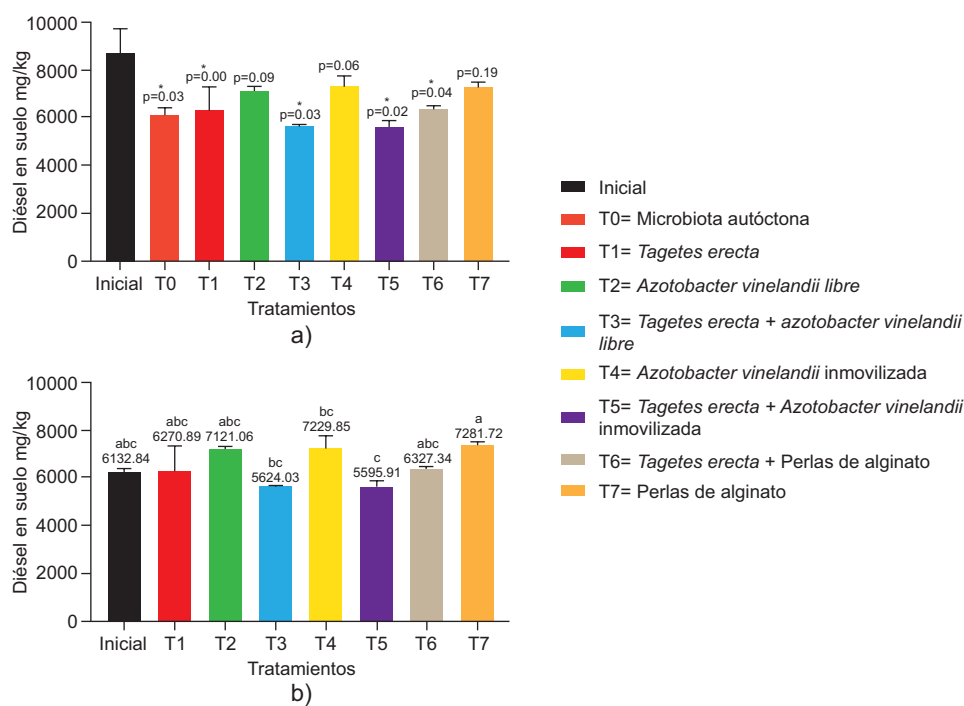


Fig. 2. Remoción de diésel en los diferentes tratamientos. (a) Prueba T pareada respecto a la concentración de suelo inicial (*tratamientos estadísticamente significativos); (b) análisis de varianza de una vía para comparar los diferentes tratamientos ($p=0.05$).

iguales. No obstante, se observa que los tratamientos T3 (*Tagetes erecta* + *A. vinelandii*) y T5 (*Tagetes erecta* + *A. vinelandii* inmovilizada) son estadísticamente diferentes al tratamiento T7 (perlas de alginato), que en la prueba t-Student resultó no ser significativo para la remoción de diésel respecto al suelo inicial. Esto acentúa la influencia de la planta en la mejora del proceso de biodegradación del contaminante, la cual se refleja en las tasas de remoción debido a que se promueve la aireación del suelo, esencial para los procesos aeróbicos de remoción de hidrocarburos (McIntosh et al. 2017). Además, cuando la rizorremediación es asistida por microorganismos provoca cambios en la microbiota autóctona, que favorecen la degradación (Pandey et al. 2021).

Parámetros morfológicos de *Tagetes erecta*

Los tratamientos T1 y T3 presentaron un ICD óptimo (0.9857 ± 0.3067 y 0.8907 ± 0.0568 , respectivamente; **Cuadro II**) pese a la compactación, la escasa retención de humedad y la alta concentración de hidrocarburos en suelo; no obstante, estos factores pudieron haber disminuido el desarrollo y crecimiento morfológico vegetal adecuado en todos los tratamientos con planta (Hajabbasi 2016). Por otra parte, los tratamientos T5 y T6 (ICD= 1.4568 ± 0.6365 y 3.8809 ± 1.9705 , respectivamente) mostraron que la presencia de alginato impacta negativamente la calidad de la planta, posiblemente porque obstaculiza la interacción de los exudados de la planta con los microorganismos (Pino et al. 2016).

Análisis de citotoxicidad y genotoxicidad

Los ensayos de toxicidad indicaron citotoxicidad con índices mitóticos ≤ 50 % (**Cuadro III**). Igualmente, se presentaron anomalías nucleares y micronúcleos en todos los tratamientos (**Fig. 3**). Algunos estudios indican que las células de organismos expuestas a suelos contaminados con diésel presentan normalmente aberraciones cromosómicas a causa de la formación de puentes, rupturas y reordenamientos cromosomales que originan ADN excedente que se heterocromatiniza y posteriormente es expulsado del núcleo en forma de yemas y/o micronúcleos (Cruz et al. 2019, Alavi et al. 2022). Sin embargo, otros autores concluyen que la toxicidad no logra correlacionarse con la concentración de diésel en suelo, por lo que se infiere la influencia de otros factores (Leme y Marín-Morales 2008), tales como la formación de intermediarios de hidrocarburos aromáticos homocíclicos y heterocíclicos azufrado. Esto se debe a la degradación incompleta que ocurre en procesos

CUADRO II. PARÁMETROS MORFOLÓGICOS DE *Tagetes erecta* EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS.

Tratamiento	Longitud aérea (cm)	Longitud de raíz (cm)	Diámetro del peciolo (mm)	Peso húmedo total (g)	Peso seco total (g)	Peso seco aéreo (g)	Peso seco raíz (g)	ICD
T1 (<i>Tagetes erecta</i>)	6.4000 ± 0.5568^a	4.7333 ± 1.2097^a	2.1000 ± 0.2000^{ab}	0.7957 ± 0.2065^a	0.1241 ± 0.0299^a	0.0581 ± 0.0085^a	0.0661 ± 0.0250^a	0.9857 ± 0.3067^b
T2 (<i>Tagetes erecta</i> + <i>Azotobacter vinelandii</i>)	6.3000 ± 2.8688^a	6.9000 ± 3.9230^a	2.3333 ± 0.3215^a	0.8406 ± 0.1332^a	0.1303 ± 0.0264^a	0.0596 ± 0.0139^a	0.0707 ± 0.0129^a	0.8907 ± 0.0568^b
T5 (<i>Tagetes erecta</i> + <i>Azotobacter vinelandii</i> inmovilizada)	4.8333 ± 1.3051^a	6.4667 ± 1.4844^a	2.0333 ± 0.9018^{ab}	0.7539 ± 0.4687^{ab}	0.1217 ± 0.0403^a	0.0676 ± 0.0268^a	0.0541 ± 0.0229^{ab}	1.4568 ± 0.6365^a
T6 (<i>Tagetes erecta</i> + perlas de alginato)	3.4333 ± 0.2082^a	2.3000 ± 0.2646^a	0.8667 ± 0.0577^b	0.1231 ± 0.0501^b	0.0557 ± 0.0186^a	0.0419 ± 0.0104^a	0.0138 ± 0.0102^b	3.8809 ± 1.9705^a
Valor p	0.15	0.11	0.02	0.03	0.04	0.34	0.02	0.02

Medias que no comparten la misma letra son significativamente diferentes, nivel de significancia $\alpha = 0.05$. ICD: índice de calidad de Dickson.

CUADRO III. PARÁMETROS CELULARES Y GENÉTICOS EN *Allium sativum*.

Tratamientos	Índice mitótico con relación al testigo (%)	Anormalidades nucleares	Micronúcleos	χ^2
Testigo	19 ± 0.6	2.33 ± 0.58	0.67 ± 0.58	-
Suelo inicial	9.33 ± 0.55**	18.33 ± 1.16	4.33 ± 1.00	14.22*
T0 (microbiota autóctona)	9.27 ± 0.85**	15 ± 3.61	4.0 ± 1.53	10.86*
T1 (<i>Tagetes erecta</i>)	9.60 ± 0.78	19.67 ± 7.77	3.67 ± 1.00	15.38*
T2 (<i>Azotobacter vinelandii</i>)	12.10 ± 1.1	14 ± 5.20	3.0 ± 0.58	9.78*
T3 (<i>Tagetes erecta</i> + <i>Azotobacter vinelandii</i>)	11.77 ± 1.08	17.67 ± 8.96	3.0 ± 2.08	13.09*
T4 (<i>Azotobacter vinelandii</i> inmovilizada)	10 ± 0.92	17.33 ± 5.51	2.66 ± 1.73	10.86*
T5 (<i>Tagetes erecta</i> + <i>Azotobacter vinelandii</i> inmovilizada)	9.60 ± 0.62	14.33 ± 3.51	2.67 ± 1.16	9.78*
T6 (<i>Tagetes erecta</i> + perlas de alginato)	11.03 ± 1.10	12 ± 1.00	2.33 ± 0.58	7.68*
T7 (perlas de alginato de sodio)	11.40 ± 1.04	17 ± 7.81	1.67 ± 1.16	13.09*

** = Daño citotóxico (Índice mitótico ≤ 50 % del testigo)

* = Daño genotóxico ($\chi^2 = 3.84$)

χ^2 = Chi cuadrada

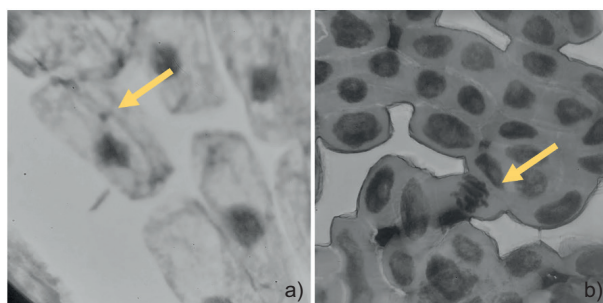


Fig. 3. Aberraciones cromosómicas y anomalías nucleares en células de *Allium sativum* expuestas a diésel. (a) Micronúcleo, (b) pegajosidad cromosómica.

de degradación bacteriana, los cuales suelen ser más tóxicos que sus precursores e impactan de manera importante en los sistemas biológicos (Mazzeo et al. 2018, Idowu et al. 2019).

CONCLUSIÓN

Se ha demostrado que las técnicas de biorremediación como la fitorremediación y la bioaumentación en las que se utilizan *Tagetes erecta* y *Azotobacter vinelandii*, son de fácil aplicación y asequibles, tienen capacidad degradativa y enfatizan el papel de la rizoestimulación en el proceso de biodegradación.

Este estudio sugiere que el uso de matrices de inmovilización como el alginato de sodio en procesos de rizoestímulo, no mejora de manera significativa las tasas de remoción de diésel en suelos agrícolas en condiciones de invernadero; por el contrario, afecta el crecimiento óptimo de la planta en ambientes de estrés. Sin embargo, el uso de microorganismos exó-

genos preadaptados al contaminante podría mejorar los procesos de bioaumentación y rizoestimulación.

La remoción significativa de hidrocarburos no garantiza la ausencia de toxicidad en el suelo, ya que el diésel residual ocasionó daño genotóxico y citotóxico en todos los tratamientos debido a las características mutagénicas, teratogénicas y carcinogénicas de estos xenobióticos. Se sugiere evaluar la toxicidad de suelos contaminados y biorremediados como estudio complementario en procesos de remoción biológica de contaminantes en suelos agrícolas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla (UPAEP), así como al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por el apoyo brindado a la realización de este trabajo (CVU 1076688 y CVU 858507).

REFERENCIAS

- Alavi E., Tajadod G. y Arbabian S. (2022). *Vicia faba* seed: A bioindicator of phytotoxicity, genotoxicity, and cytotoxicity of light crude oil. *Environmental Science and Pollution* 30 (27), 21043-21051. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1423421/v1>
- Alegbeleye O.O., Opeolu B.O. y Jackson V.A. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbons: A critical review of environmental occurrence and bioremediation. *Environmental Management* 60 (4), 758-783. <https://doi.org/10.1007/s00267-017-0896-2>
- Balseiro-Romero M., Monterroso C. y Casares J.J. (2018). Environmental fate of petroleum hydrocarbons in soil: Review of multiphase transport, mass transfer, and natural attenuation processes. *Pedosphere* 28 (6), 833-847. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(18\)60046-3](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(18)60046-3)
- Bolotnik T.A., Timchenko Yu. V., Plyushchenko I.V., Levkina V.V., Pirogov A.V., Smolenkov A.D., Popik M.V. y Shpigun O.A. (2019). Use of chemometric methods of data analysis for the identification and typification of petroleum and petroleum products. *Journal of Analytical Chemistry* 74 (13), 1336-1340. <https://doi.org/10.1134/s1061934819130045>
- Chaudhary D.K., Bajagain R., Jeong S.W. y Kim J. (2019). Development of a bacterial consortium comprising oil-degraders and diazotrophic bacteria for elimination of exogenous nitrogen requirement in bioremediation of diesel-contaminated soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 35 (7), 1-11. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2674-1>
- Chuluun B., Shah S.H. y Rhee J.S. (2014). Bioaugmented phytoremediation: A strategy for reclamation of diesel oil-contaminated soils. *International Journal of Agriculture and Biology* 16, 624-628.
- Conde-Ávila V., Ortega-Martínez L.D., Loera O., Pérez-Armendáriz B. y Martínez-Valenzuela C. (2022). Encapsulation of *Azotobacter vinelandii* ATCC 12837 in alginate-Na beads as a tomato seedling inoculant. *Current Microbiology* 79 (4), 112. <https://doi.org/10.1007/s00284-022-02797-6>
- Cruz J.M., Corroqué N.A., Montagnoli R.N., Matos Lopes P.R., Marín Morales M.A. y Bidoia E.D. (2019). Comparative study of phytotoxicity and genotoxicity of soil contaminated with biodiesel, diesel fuel and petroleum. *Ecotoxicology* 28 (4), 449-456. <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02037-x>
- Díaz S.A., San Martín Y.B., León H.T., García Y.C. y Jiménez K.A. (2021). Evaluación de la capacidad hidrocarburoclástica de un consorcio bacteriano aislado de zonas costeras de Cuba. *Revista CENIC Ciencias Químicas* 52 (2), 79-88.
- Fiskesjö G. (1985). The allium test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas* 102 (1), 99-112. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x>
- Goma-Tchimbakala E.J.C.D.A., Pietrini I., Dal Bello F., Goma-Tchimbakala J., Lo Russo S. y Corgnati S.P. (2022). Great abilities of *Shinella zoogloeoides* strain from a landfarming soil for crude oil degradation and a synergy model for alginate-bead-entrapped consortium efficiency. *Microorganisms* 10 (7), 1361. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071361>
- Gopi G., Elumalai A. y Jayasri P. (2012). A concise review on *Tagetes erecta*. *International Journal of Phytopharmacy Research* 3 (1), 16-19.
- Hajabbasi M.A. (2016). Importance of soil physical characteristics for petroleum hydrocarbons phytoremediation: A review. *African Journal of Environmental Science and Technology* 10 (11), 394-405. <https://doi.org/10.5897/AJEST2016.2169>
- Hewelke E., Szatylowicz J., Hewelke P., Gnatowski T. y Aghalarov R. (2018). The impact of diesel oil pollution on the hydrophobicity and CO₂ efflux of forest soils. *Water, Air and Soil Pollution* 229 (2), 1-11. <https://doi.org/10.1007/s11270-018-3720-6>
- Hoang S.A., Lamb D., Seshadri B., Sarkar B., Choppala G., Kirkham M.B. y Bolan N.S. (2021). Rhizoremediation as a green technology for the remediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials* 401, 123282. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123282>
- Hunt L.J., Duca D., Dan T. y Knopper L.D. (2019). Petroleum hydrocarbon (PHC) uptake in plants: A literature review. *Environmental Pollution* 245, 472-484. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.012>
- Hussain F., Hussain I., Khan A.H.A., Muhammad Y.S., Iqbal M., Soja G., Reichenauer T.G., Zeshan y Yousaf S. (2018). Combined application of biochar, compost, and bacterial consortia with Italian ryegrass enhanced phytoremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil. *Environmental and Experimental Botany* 153, 80-88. <https://doi.org/10.1016/j.envex-pbot.2018.05.012>
- Idowu O., Semple K.T., Ramadass K., O'Connor W., Hansbro P. y Thavamani P. (2019). Beyond the obvious: Environmental health implications of polar polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environment International* 123, 543-557. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.12.051>
- Innemanová P., Filipová A., Michalíková K., Wimmerová L. y Cajthaml T. (2018). Bioaugmentation of PAH-contaminated soils: A novel procedure for introduction of bacterial degraders into contaminated soil. *Ecological Engineering* 118, 93-96. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2018.04.014>

- Khan M.A.I., Biswas B., Smith E., Naidu R. y Megharaj M. (2018). Toxicity assessment of fresh and weathered petroleum hydrocarbons in contaminated soil – A review. *Chemosphere* 212, 755-767. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.08.094>
- Kim K.H., Jahan S.A., Kabir E. y Brown R.J.C. (2013). A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environment International* 60, 71-80. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.07.019>
- Laothamteep N., Naloka K. y Pinyakong O. (2022). Bioaugmentation with zeolite-immobilized bacterial consortium OPK results in a bacterial community shift and enhances the bioremediation of crude oil-polluted marine sandy soil microcosms. *Environmental Pollution* 292 (Part A), 118309. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118309>
- Ławniczak Ł., Woźniak-Karczewska M., Loibner A.P., Heipieper H.J. y Chrzanowski Ł. (2020). Microbial degradation of hydrocarbons-basic principles for bioremediation: A review. *Molecules* 25 (4), 856. <https://doi.org/10.3390/molecules25040856>
- Leme D.M. y Marín-Morales M.A. (2008). Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water – A case study. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 650 (1), 80-86. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.10.006>
- Lipińska A., Wyszowska J. y Kucharski J. (2021). Microbiological and biochemical activity in soil contaminated with pyrene subjected to bioaugmentation. *Water, Air, and Soil Pollution* 232 (2), 1-18. <https://doi.org/10.1007/s11270-020-04950-y>
- Liu J., Xin X. y Zhou Q. (2018). Phytoremediation of contaminated soils using ornamental plants. *Environmental Reviews* 26 (1), 43-54. <https://doi.org/10.1139/er-2017-0022>
- Liu R., Xiao N., Wei S., Zhao L. y An J. (2014). Rhizosphere effects of PAH-contaminated soil phytoremediation using a special plant named Fire Phoenix. *Science of The Total Environment* 473-474, 350-358. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.027>
- Mazzeo D.E.C., Roberto M.M., Sommaggio L.R.D. y Marín-Morales M.A. (2018). Bioassays used to assess the efficacy of biodegradation. En: *Toxicity and biodegradation testing: Methods pharmacology and toxicology* (Bidoia E. y Montagnolli R., Eds.). Human Press, Nueva York, EUA, 215-239. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7425-2_11
- McIntosh P., Schulthess C.P., Kuzovkina Y.A. y Guillard K. (2017). Bioremediation and phytoremediation of total petroleum hydrocarbons (TPH) under various conditions. *International Journal of Phytoremediation* 19 (8), 755-764. <https://doi.org/10.1080/15226514.2017.1284753>
- Mezzanotte V., Anzano M., Collina E., Marazzi F. A. y Lasagni M. (2015). Distribution and removal of polycyclic aromatic hydrocarbons in two Italian municipal wastewater treatment plants in 2011-2013. *Polycyclic Aromatic Compounds* 36 (3), 213-228. <https://doi.org/10.1080/10406638.2014.957409>
- Mnif I., Mnif S., Sahnoun R., Maktouf S., Ayedi Y., Ellouze-Chaabouni S. y Ghribi D. (2015). Biodegradation of diesel oil by a novel microbial consortium: Comparison between co-inoculation with biosurfactant-producing strain and exogenously added biosurfactants. *Environmental Science and Pollution Research* 22 (19), 14852-14861. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4488-5>
- Onwurah I.N.E. y Nwuke C. (2004). Enhanced bioremediation of crude oil-contaminated soil by a *Pseudomonas* species and mutually associated adapted *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 79 (5), 491-498. <https://doi.org/10.1002/jctb.1009>
- Orozco Corral A.L., Valverde Flores M.I., Martínez Téllez R., Chávez Bustillos C. y Benavides Hernández R. (2016). Propiedades físicas, químicas y biológicas de un suelo con biofertilización cultivado con manzano. *Terra Latinoamericana* 34 (4), 441-456.
- Pandey P., Kapley A. y Brar S.K. (2021). Biodegradation of high molecular weight polyaromatic hydrocarbons in different environments. *Frontiers in Microbiology* 12, 2020-2022. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.704897>
- Partovinia A. y Rasekh B. (2018). Review of the immobilized microbial cell systems for bioremediation of petroleum hydrocarbons polluted environments. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 48 (1), 1-38. <https://doi.org/10.1080/10643389.2018.1439652>
- Pérez-Muñoz Y., López-Martínez S., Rodríguez-Luna A.R. y Ramos-Arcos S.A. (2019). Evaluación de impacto socioambiental, por derrame de petróleo de un ducto en Comalcalco, Tabasco. *Journal of Basic Sciences* 5 (15), 134-152. <https://doi.org/10.19136/jobs.a5n15.3574>
- Pino N.J., Muñera L.M.M. y Peñuela G.A. (2016). *Bioaugmentation with immobilized microorganisms to enhance phytoremediation of PCB-contaminated soil. Soil and Sediment Contamination: An International Journal* 25 (4), 419-430. <https://doi.org/10.1080/15320383.2016.1148010>
- Prasad H., Sajwan P., Kumari M. y Solanki S.P.S. (2017). Effect of organic manures and biofertilizer on plant growth, yield and quality of horticultural crop: A review. *International Journal of Chemical Studies* 5 (1), 217-221

- Prematuri R., Mardatin N.F., Irdiastuti R., Turjaman M., Wagatsuma T. y Tawaraya K. (2019). Petroleum hydrocarbons degradation in contaminated soil using the plants of the Aster family. *Environmental Science and Pollution Research* 27 (4), 4460-4467. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-07097-4>
- Rajkumari J., Choudhury Y., Bhattacharjee K. y Pandey P. (2021). Rhizodegradation of pyrene by a non-pathogenic *Klebsiella pneumoniae* isolate applied with *Tagetes erecta* L. and changes in the rhizobacterial community. *Frontiers in Microbiology* 12 (23), 145-63. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.593023>
- Reyes-Reyes M.A., Puentes Cala E.A., Casanova Montes E.L., López Deluque F., Panqueva Álvarez J.H. y Castillo Villamizar G.A. (2018). Inmovilización de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo crudo en matrices orgánicas naturales y sintéticas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 34 (4), 597-609. <https://doi.org/10.20937/rica.2018.34.04.04>
- Rivas-Trasancos L., Navarro-Sosa Y., Romero-Silva R., Díaz-Díaz M.A., Fernández-Rangel D., Cañete-Pérez C.C., Salazar-Alemán D. y Hernández-Hernández D. (2020). Evaluación en campo de material absorbente para recogida de hidrocarburos del petróleo en agua. *Revista CENIC Ciencias Químicas* 51 (1), 18-34.
- Rodríguez N.J.P., Acevedo S.C., Gallo A. y Mesa G.P. (2012). Comparación entre bioestimulación y bioaumentación para la recuperación de suelos contaminados con diésel. *Producción + Limpia* 7 (1), 101-108.
- Rodríguez-Campos J., Perales-García A., Hernández-Carballo J., Martínez-Rabelo F., Hernández-Castellanos B., Barois I. y Contreras-Ramos S.M. (2019). Bioremediation of soil contaminated by hydrocarbons with the combination of three technologies: Bioaugmentation, phytoremediation, and vermiremediation. *Journal of Soils and Sediments* 19 (4), 1981-1994. <https://doi.org/10.1007/s11368-018-2213-y>
- Salim F., Setiadi Y., Sopandie D. y Yani M. (2020). Adaptation selection of plants for utilization in phytoremediation of soil contaminated by crude oil. *HAYATI Journal of Biosciences* 27 (1), 45-56. <https://doi.org/10.4308/hjb.27.1.45>
- Silva-Castro G.A., Uad I., Rodríguez-Calvo A., González-López J. y Calvo C. (2015). Response of autochthonous microbiota of diesel polluted soils to land-farming treatments. *Environmental Research* 137, 49-58. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.11.009>
- SSA (2013). Norma Oficial Mexicana-138-SEMARNAT/SSA1-2012. Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación. Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. Diario Oficial de la Federación, México, 10 de septiembre.
- Steiner A.A. (1961). Universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. *Plant and Soil* 15 (2), 134-154. <https://doi.org/10.1007/BF01347224>
- Suryatmana P., Zannatan A.M, Sylvia A.R., Setiawati M.R., Asri P., Wulandari A.P. y Riztama A. (2018). Bioremediation of petroleum contaminated soil using oyster mushroom log waste (OMLW), *Azotobacter vinelandii*, and a petrophylic consortium. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences* 20, 158-168
- Suryatmana P., Setiawati M.R., Nursyabani D.D. y Kamaluddin N.N. (2019). Potential of *Boehmia nivea* as phytoremediator for petroleum-contaminated soil following nitrogen-fixing bacteria inoculation. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 393 (1), 12095-12100. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/393/1/012095>
- Szewczyńska M., Dąbrowska J. y Pyrżyńska K. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbons in the particles emitted from the diesel and gasoline engines. *Polish Journal of Environmental Studies* 26 (2), 801-807. <https://doi.org/10.15244/pjoes/64914>
- Tandel S.P. y Kumari K. (2021). Influence of different levels of fertilizers and plant growth regulators on growth and yield characters of African marigold (*Tagetes erecta* L.). *International Journal of Chemical Studies* 9 (1), 3614-3617. <https://doi.org/10.22271/chemi.2021.v9.i1ay.11792>
- Ukalska-Jaruga A., Smreczak B. y Klimkowicz-Pawlas A. (2018). Soil organic matter composition as a factor affecting the accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Soils and Sediments* 19 (4), 1890-1900. <https://doi.org/10.1007/s11368-018-2214-x>
- USEPA (1998). SW 846 Test Method 9071B. N-hexane extractable material (HEM) for sludge, sediment, and solid samples. United States Environmental Protection Agency. Manual. Washington, D.C., EUA, 13 pp.
- Vejan P., Khadiran T., Abdullah R., Ismail S. y Dadrassnia A. (2019). Encapsulation of plant growth promoting Rhizobacteria-prospects and potential in agricultural sector: A review. *Journal of Plant Nutrition* 42 (19), 2600-2623. <https://doi.org/10.1080/01904167.2019.1659330>
- Ventorino V., Pascale A., Fagnano M., Adamo P., Faraco V., Rocco, C., Fiorentino N. y Pepe O. (2019). Soil tillage and compost amendment promote bioremediation and biofertility of polluted area. *Journal of Cleaner Production* 239, 118087-118087. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.118087>

- Villalón-Mendoza H. (2016). Indicadores de calidad de la planta de *Quercus canby* Trel. (encino) en vivero forestal. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales* 12 (1), 46-52.
- Wu M., Guo X., Wu J. y Chen K. (2020). Effect of compost amendment and bioaugmentation on PAH degradation and microbial community shifting in petroleum-contaminated soil. *Chemosphere* 256, 126998-126998. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126998>