

Simbiosis *Crotalaria-Rhizobium* como remediadoras de la contaminación por petróleo crudo

Crotalaria-Rhizobium symbiosis as remediators of crude petroleum oil pollution

Ana Guadalupe Ramírez-May^{1*} , María del Carmen Rivera-Cruz¹ , Consuelo Bautista-Muñoz¹ , Rocío Guadalupe Acosta-Pech¹ , María Remedios Mendoza-López²  y Antonio Trujillo-Narcía³ 

¹ Manejo y Conservación de los Recursos Naturales, Doctorado en Ciencias Agrícolas en el Trópico, Colegio de Postgraduados Campus Tabasco, Km 3.5 Periférico Carlos A. Molina, CP 86500 H. Cárdenas, Tabasco, México.

² Instituto de Química Aplicada, Universidad Veracruzana. CP 91190. Xalapa, Veracruz. México.

³ Cuerpo académico: Energía y Medio Ambiente. Universidad Popular de la Chontalpa, Carretera Cárdenas-Huimanguillo km 2, Ra. Paso y Playa, CP 86500 H. Cárdenas, Tabasco, México.

ABSTRACT

The objective of this research was to identify variables of growth, production and microbial symbiotic activity in *Crotalaria incana* and *Crotalaria pallida* that, in response to the stress caused by crude petroleum oil, manage to remove total petroleum hydrocarbons (TPH) from the soil and can be recommended as basic tools in biological technologies for the recovery of degraded soils in the Mexican humid tropics. *Crotalaria* species were subjected to induced crude petroleum oil contamination at doses of 3, 15, 30, and 45 g/kg in soil and a control treatment at 30 and 154 days of exposure. The results showed statistically significant differences (Duncan $p \leq 0.05$) in the growth of the two legumes, with both species being tolerant. The increase in petroleum doses caused negative effects on dry matter production of *C. incana* and *C. pallida*. Colonization by *Rhizobium* spp. was stimulated by crude oil in soil and rhizosphere in both species. However, at day 154, the highest rates of TPH removal were induced at doses of 30 and 45 g/kg, respectively.

Keywords: *Crotalaria* spp., Total petroleum hydrocarbons, *Rhizobium* spp., Rhizosphere, Bioremediation.

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue identificar variables de crecimiento, producción y actividad simbiótica microbiana en *Crotalaria incana* y *Crotalaria pallida* que, en respuesta al estrés provocado por el petróleo crudo, logren remover hidrocarburos totales del petróleo (HTP) del suelo y puedan ser recomendadas como herramientas básicas en tecnologías biológicas para recuperación de suelos degradados en el trópico húmedo mexicano. Las especies de *Crotalaria* fueron sometidas a contaminación inducida por petróleo crudo en dosis de 3, 15, 30 y 45 g/kg en suelo y un tratamiento testigo durante 30 y 154 días de exposición. Los resultados mostraron diferencias estadísticas significativas (Duncan $p \leq 0.05$) en el crecimiento de las dos leguminosas, al ser ambas especies tolerantes. El aumento de las dosis de petróleo provocó efectos negativos en la producción de materia seca de *C. incana* y *C. pallida*. La colonización por *Rhizobium* spp. fue estimulada por el petróleo crudo en suelo y rizosfera en

ambas especies. Sin embargo, al día 154, las mayores tasas de remoción de HTP fueron inducidas en dosis de 30 y 45 g/kg, respectivamente.

Palabras clave: *Crotalaria* spp., Hidrocarburos totales del petróleo, *Rhizobium* spp., Rizosfera, Biorremediación.

INTRODUCCIÓN

Las plantas al estar expuestas a diversas condiciones ambientales adversas han adquirido la capacidad de responder a estímulos que alteran negativamente su crecimiento y desarrollo, al ser el estrés abiótico quien genera mayor repercusión, por el impacto que el petróleo genera en el suelo, al ocasionar su compactación, la reducción en la capacidad de campo y repelencia al agua, conferida por el tipo y densidad del petróleo crudo, que causa deficiencia de nutrientes y mayor reducción en la producción agroalimentaria (Kang *et al.*, 2016; Marín-García *et al.*, 2016; Odukoya *et al.*, 2019; López-Aguilar *et al.*, 2020; Rai *et al.*, 2021). La contaminación del suelo, especialmente con hidrocarburos del petróleo, afecta directamente a plantas y microorganismos en la fijación de nitrógeno, que conlleva a la disminución del crecimiento vegetal y reduce la efectividad de la simbiosis planta-microorganismo en leguminosas (Riskuwa-Shehu *et al.*, 2017; Pourbabaee *et al.*, 2021).

Aproximadamente el 88 % de las especies de leguminosas a nivel mundial realizan simbiosis (Sprent *et al.*, 2017), exudando flavonoides de las raíces capaces de atraer rizobacterias, quienes reconocen estas moléculas y son estimuladas para producir moléculas del factor Nod que despolarizan las membranas celulares de las raíces y provocan cambios en los flujos de iones, principalmente calcio (Roy *et al.*, 2020). Lo anterior, desencadena la organogénesis asociada a la formación y desarrollo de nódulos donde ciertas rizobacterias se establecen para permitir la fijación biológica de nitrógeno en la planta para su óptimo crecimiento que reciben, a cambio, fuentes de carbono en forma de carbohidratos (Ferguson *et al.*, 2019). La exposición de las leguminosas al estrés desencadena la respuesta de fitohormonas como, el ácido abscísico (ABA) que cierra los estomas y, a largo plazo, favorece el crecimiento radicular para una óptima absorción de agua en

*Autor para correspondencia: Ana Guadalupe Ramírez-May
Correo-e: ramirez.ana@colpos.mx

Recibido: 21 de octubre de 2024

Aceptado: 31 de agosto de 2025

Publicado: 15 de octubre de 2025

condiciones de contaminación (Defez *et al.*, 2017). El género *Crotalaria* pertenece a la familia Fabaceae, subfamilia Papilionoideae y tribu Crotalariaeae, con alrededor de 600 - 700 especies conocidas y clasificadas, con amplia diversidad de hábitats, principalmente abundantes en zonas tropicales y subtropicales del mundo (Saboon *et al.*, 2015; Kusar *et al.*, 2024; Rech *et al.*, 2024). *Crotalaria* produce metabolitos secundarios en condiciones bióticas y abióticas, utilizados ampliamente en los distintos sectores industriales, económicos y, con gran potencial en el sector agrícola (Yaqub *et al.*, 2020; López *et al.*, 2022), como los flavonoides que tienen función antioxidante y protegen a estas especies en condiciones de estrés (Scupinari *et al.*, 2020). El microbioma rizosférico es variable en cuanto a su abundancia y composición con base en las propiedades del suelo, la fenología y fisiología de la planta, así como su estado nutricional (Neumann y Ludewig, 2023). Por lo tanto, bacterias del género *Rhizobium* ejercen efectos positivos en la nodulación de las leguminosas, al permitir la fijación biológica de nitrógeno para su mayor disponibilidad (Turan *et al.*, 2019). Estas bacterias de asociación simbiótica tienen la capacidad de sobrevivir a diferentes condiciones de estrés en el suelo por el aprovechamiento de las raíces de diferentes leguminosas que sirven de nicho para su crecimiento (Downie, 2010). El objetivo de esta investigación fue identificar variables de crecimiento, producción y actividad simbiótica microbiana en *Crotalaria incana* y *C. pallida* que, en respuesta al estrés provocado por el petróleo crudo, logren remover hidrocarburos totales del petróleo (HTP) del suelo y puedan ser recomendadas como herramientas básicas en tecnologías biológicas para recuperación de suelos degradados en el trópico húmedo mexicano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de suelo y cultivo de *Crotalaria*

Se utilizó un suelo sin contaminación del horizonte superficial (0 - 30 cm) del ejido Paso y Playa, ubicado en el km. 2 de la Carretera Federal Cárdenas-Huimanguillo (UTM 15 Q 0461719 1985998), en Cárdenas, Tabasco. El suelo fue secado bajo techo, se tamizó a través de malla (5 mm abertura) y se mezcló con diferentes concentraciones de petróleo crudo. El análisis de suelo se realizó en el Laboratorio de Microbiología Agrícola y Ambiental del Colegio de Postgraduados Campus Tabasco. Las propiedades físicas y químicas del suelo se determinaron con base en la NOM-021-RECNA-2000 (SEMARNAT, 2002), con una textura franco-arcillosa, 12 % de arena, 51 % de arcilla, 37 % de limo, 6.1 % de materia orgánica, 1.024 g/kg de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) en base seca, pH de 5.5, 0.5 dS/m de conductividad eléctrica, capacidad de intercambio catiónico de 34.3 cmol/kg, 55.5 ppm de N, 3.6 % de carbono orgánico, 30.1 ppm de P disponible, 3.7 meq/100 g Ca^{+2} , 2.2 meq/100 g de Mg^{+2} , 2.6 meq/100 g de Na^{+} , 0.4 meq/100 g de K^{+} , 1.7 $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$ meq/100 g, 0.18 $\text{K}^{+}/\text{Mg}^{+2}$ meq/100 g, 2.4 Cl^{-} meq/L y 7.6 % Na intercambiable (Rodríguez-Uribe *et al.*, 2021).

Las semillas de las especies *Crotalaria* se colectaron en la Ranchería Paso y Playa, Carretera Federal Cárdenas-Hui-

manguillo km. 2, Cárdenas, Tabasco, México. La germinación se llevó a cabo en bandejas con suelo sin contaminación y, una vez que las plántulas alcanzaron alturas de 3.5 ± 1.3 cm, fueron trasplantadas a macetas que contenían suelo con las concentraciones de petróleo para el bioensayo experimental. El petróleo utilizado fue crudo mediano con 29.5° API, 0.84 g/cm de gravedad específica, constituido por 56.4 % de fracción alifática, 23.7 % de aromáticos y 14 % de asfaltenos y resinas. El petróleo crudo fue obtenido del campo petrolero Cinco Presidentes ubicado en La Venta, Tabasco, México (18° 12' 11.8" N y 94° 08' 37.8" O) (Orocio-Carrillo *et al.*, 2019). Todos los tratamientos se establecieron en invernadero durante 154 días a una temperatura promedio de 34 °C y se mantuvo la humedad a capacidad de campo en 32 ± 5 %. Las concentraciones iniciales de petróleo crudo (PC) fueron 0, 3, 15, 30 y 45 g/kg de suelo, donde el tratamiento testigo consistió de suelo no contaminado. Dichas concentraciones se homogeneizaron manualmente en cada una de las macetas (14 cm alto $\times$ 18 cm diámetro) que se usaron para el crecimiento de *C. incana* y *C. pallida*.

En el experimento 1 (E1), se evaluó el crecimiento de *Crotalaria* bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial ($5 \times 2 \times 22$) con cinco concentraciones de petróleo (0, 3, 15, 30 y 45 g/kg de suelo), dos especies vegetales (*C. incana* y *C. pallida*) y 22 semanas de exposición (1 a 22 semanas después del trasplante). En el experimento 2 (E2) se evaluó la producción de biomasa vegetal, número y diámetro de nódulos, densidad de *Rhizobium* spp. y la remoción de HTP, con un diseño completamente al azar con arreglo factorial ($5 \times 2 \times 2$), con cinco concentraciones de HTP (0, 3, 15, 30 y 45 g/kg de suelo), dos especies vegetales (*C. incana* y *C. pallida*) y dos tiempos de evaluación (30 y 154 días). En ambos experimentos se usaron cuatro repeticiones. Durante las 22 semanas se midió el crecimiento, registrando la altura de planta, el diámetro de tallo y el número de hojas trifoliadas. La producción se evaluó con la materia seca aérea, materia seca de raíces, materia seca de nódulos, materia seca de frutos y materia seca de semillas. Se evaluaron el número de nódulos y el diámetro de nódulos. Se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) de *Rhizobium* spp. (en nódulos, en rizosfera y en suelo) en los dos períodos de evaluación. La remoción de HTP (%) se midió en suelo rizosférico de *C. incana* y *C. pallida* a los 30 y 154 días de exposición al petróleo crudo (PC).

Crecimiento y producción de plantas

La altura de planta se midió con regla graduada en cm, desde la base del tallo hasta el meristemo apical, el diámetro de tallo se midió con vernier digital (marca Steren), se registraron los datos en mm y el número de hojas trifoliadas se midió por conteo directo semanalmente. La materia seca aérea, materia seca de raíces, materia seca de nódulos, materia seca de frutos y materia seca de semillas se determinaron después de secarlos a 65 °C durante 72 h. La materia seca obtenida se pesó en una balanza semianalítica (marca Ohaus, Scout Pro SP202) con una legibilidad de 0.01 g.

Número y diámetro de nódulos

El número de nódulos se realizó por conteo directo para cada unidad experimental de todos los tratamientos en el experimento. El diámetro de nódulos se midió con vernier digital (marca Steren).

Densidad de *Rhizobium*

Se utilizó el método de cuenta viable por dilución seriada (Madigan, 2015). Se realizó en conteo de UFC g⁻¹ de nódulos, rizosfera y suelo seco, con el medio de cultivo Extracto de Levadura-Manitol-Agar-Rojo Congo (ELMARC) (CIAT, 1988).

Remoción de hidrocarburos totales del petróleo (HTP)

Se evaluó con base en el porcentaje de remoción de los HTP en suelo rizosférico de *C. incana* y *C. pallida*, por diferencia gravimétrica del contenido de HTP en cada tratamiento contaminado (3, 15, 30 y 45 g/kg PC) y el tratamiento testigo (1.024 g/kg origen biogénico). Se tomaron muestras de cada unidad experimental al tiempo inicial (día 1), así como a la semana 4 (30 días) y semana 22 (154 días). La extracción de HTP se realizó en equipo Soxhlet con diclorometano de grado analítico durante ocho horas (USEPA-3540C, 1996). La cantidad de HTP extraída se determinó gravimétricamente del tiempo inicial respecto a los datos obtenidos a las 4 y 22 semanas.

Análisis estadístico

Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) a las variables evaluadas con la prueba de Duncan para la comparación de medias ($p \leq 0.05$). Todas las pruebas estadísticas se realizaron con el programa SAS v.9.4 (SAS, 2005).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Crecimiento y producción de plantas

La altura de planta en *C. incana* y *C. pallida* comenzó con una fase de adaptación a las diferentes dosis de petróleo de la semana 1 a la 4 y, a partir de la semana 5 hubo un crecimiento constante que se mantuvo hasta la semana 22 (Figuras 1A y 1B). *C. incana* fue 1.2 veces más alta que la establecida en suelo testigo a las 22 semanas de exposición a 45 g/kg de PC. Para *C. pallida* el comportamiento fue inversamente proporcional frente a la concentración de petróleo expuesta, con valores de altura mayores en la planta establecida en suelo testigo comparado con las plantas expuestas a diferentes concentraciones de PC a partir de la semana 3 y manteniéndose así hasta la semana 19 ya que, a partir de la semana 20, hubo un ligero incremento en la altura de planta expuesta a PC en 3 g/kg, pero con reducción significativa en dosis mayores. Los resultados anteriores demuestran mayor tolerancia de *C. incana* a la contaminación por PC hasta 45 g/kg.

Concentraciones de petróleo superiores a 1 g/kg en suelo, inhiben el crecimiento de *Triticum vulgare* L. y *Pisum sativum*, así como disminución en la productividad del suelo (Kovaleva *et al.*, 2022). Merkl *et al.* (2005) realizaron un experimento en invernadero con tres especies de leguminosas forrajeras (p.ej. *Calopogonium mucunoides*, *Centrosema brasilia-*

num y *Stylosanthes capitata*) expuestas a suelo contaminado con 5 % de PC pesado, que provocó la muerte a las 8 semanas de exposición, considerándolas especies no aptas para pruebas de fitorremediación, a diferencia de las dos especies de *Crotalaria* en esta investigación, que demostraron su capacidad de crecimiento en condiciones de contaminación con PC, con 14 % de incremento en altura de *C. incana* mientras que en *C. pallida* hubo una disminución del 11 % en dosis de PC con 45 g/kg de suelo comparado con el tratamiento testigo. Lo anterior, posiblemente por la mayor adaptación de *C. incana* sobre *C. pallida* en suelos contaminados que les generan estrés abiótico e impiden la absorción de agua y nutrientes necesarios para su óptimo crecimiento. El PC puede alterar las propiedades fisicoquímicas del suelo, así como la germinación, el crecimiento y producción vegetal, que depende del tipo y cantidad de petróleo presente en el suelo (Uche y Dadrasnia, 2017). Ikeura *et al.* (2016) mencionan que *Mimosa pudica* inhibió su crecimiento al someterse a estrés por contaminación con diésel en dosis de 12 g/kg de suelo durante 180 días, por la formación de la capa hidrófoba, que evita la absorción de agua por las raíces, en comparación con *C. incana* que tuvo un crecimiento directamente proporcional con base en el incremento de PC hasta en 45 g/kg y, en *C. pallida* la altura fue estimulada en dosis de hasta 30 g/kg a los 154 d de exposición. Por lo tanto, pueden ser consideradas especies potencialmente idóneas en pruebas de fitorremediación de suelos contaminados por petróleo crudo.

El diámetro de tallo en *C. incana* fue mayor en la semana 22 con una estimulación del 2 % en dosis de 3 g/kg comparado con el suelo testigo, mientras que las dosis de 15, 30 y 45 g/kg de petróleo registraron inhibición en el grosor de tallo en 9, 1 y 9 %, respectivamente. En *C. pallida* se observó una etapa de adaptación a las condiciones de contaminación de la semana 1 a la 6 y, a partir de la semana 7 hasta la semana 22 el incremento en las concentraciones de petróleo afectó el grosor del tallo con reducciones de 12, 29, 40 y 62 % en dosis de 3, 15, 30 y 45 g/kg, respectivamente (Figuras 1C y 1D). El número de hojas trifoliadas mostró un incremento en ambas especies vegetales durante las 22 semanas del experimento; en *C. incana* se registró un ligero incremento en el suelo con 3 g/kg desde la semana 18 y hasta la semana 22 con un 2 % comparado con el tratamiento sin contaminación. Por el contrario, dosis de 15, 30 y 45 g/kg provocaron la defoliación de *C. incana* en 12, 24 y 40 % respectivamente, mientras que *C. pallida* tuvo mayor número de hojas en suelo testigo, con un claro decremento del 6, 2, 17 y 61 %, que mostró mayor efecto tóxico conforme incrementaron las dosis de PC hasta en 45 g/kg durante 22 semanas de exposición (Figura 1E y 1F). Estos resultados son similares a los obtenidos por Kekere *et al.* (2011) en *Vigna unguiculata* donde la caída y eventual colapso de las hojas se registró desde las dos primeras semanas al estar expuestas a dosis de hasta 16 % de PC, afectando también la coloración de los tallos, que generaron mortalidad en las plantas, excepto aquellas que crecieron en suelo testigo y en suelo con 2 % de PC, que fue la dosis máxima que pudieron tolerar.

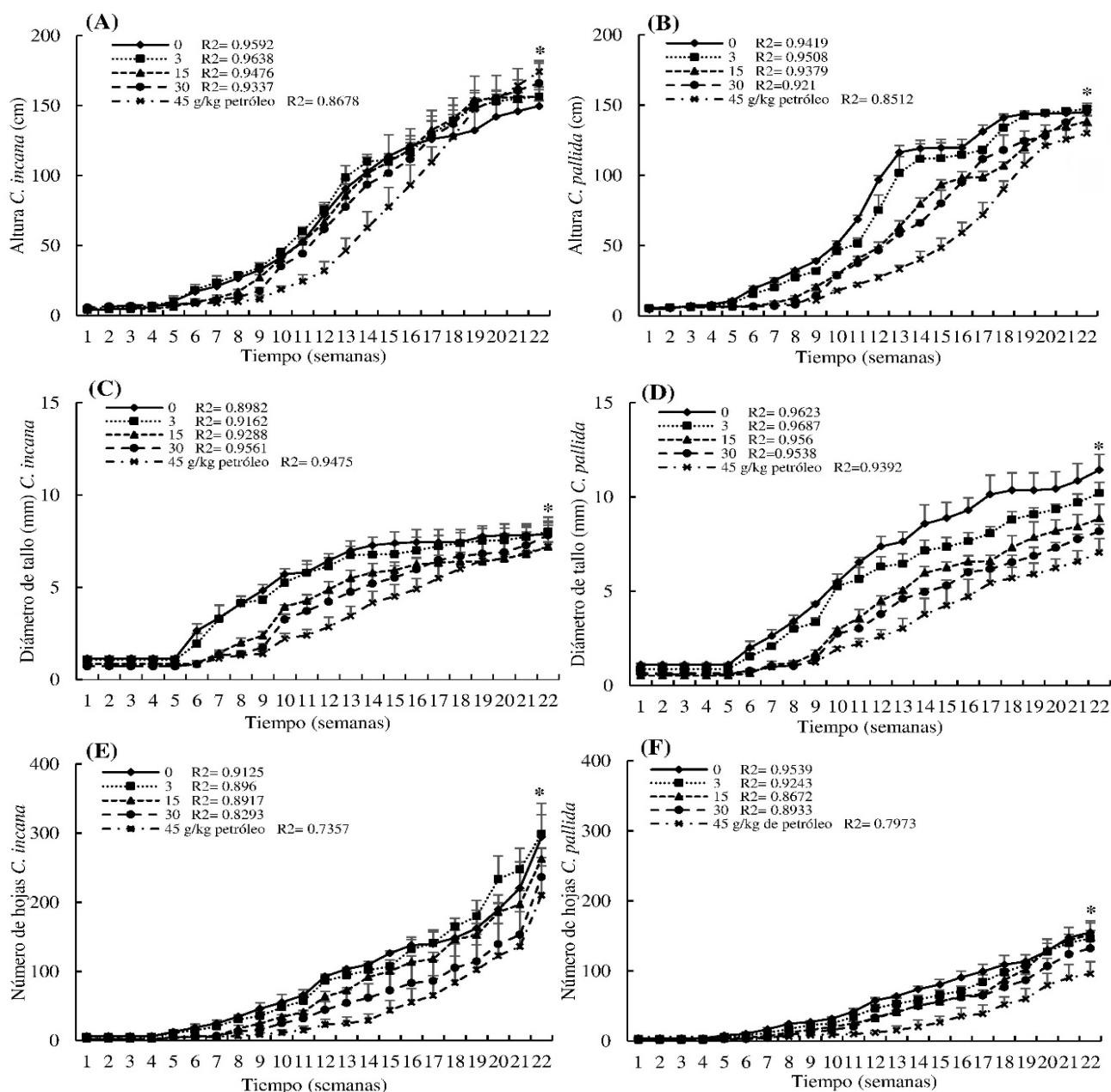


Figura 1. Efecto del petróleo crudo sobre altura de planta (A, B), diámetro de tallo (C, D) y número de hojas trifoliadas (E, F) en *C. incana* y *C. pallida* después de 22 semanas de exposición. *Medias de tratamientos con diferencias estadísticas significativas (Duncan, $p \leq 0.05$, $n = 4$).

Figure 1. Effect of crude petroleum oil on plant height (A, B), stem diameter (C, D) and number of trifoliate leaves (E, F) in *C. incana* and *C. pallida* after 22 weeks of exposure. *Means of treatments with statistically significant differences (Duncan, $p \leq 0.05$, $n = 4$).

La materia seca aérea fue la variable de mayor producción en ambas especies vegetales al final del experimento, con comportamientos irregulares en *C. incana*, con una baja producción de biomasa en las primeras cuatro semanas de exposición al PC, que redujo 1.3, 4.1, 10.5 y 33.3 veces la biomasa en plantas expuestas a dosis de 3, 15, 30 y 45 g/kg comparados con el suelo testigo, contrario a lo registrado a las 22 semanas de exposición, donde se observó un incremento en la biomasa con 0.8, 0.9 y 0.9 veces en 3, 15 y 30 g/kg de petróleo crudo en suelo, a excepción del tratamiento con 45 g/kg, donde la reducción de biomasa fue de 1.1 veces. Las reducciones en *C. pallida* fueron evidentes en los dos

períodos de evaluación respecto al testigo, con 1.1, 1.2, 1.4 y 1.9 veces menor en dosis de 3, 15, 30 y 45 g/kg de PC, respectivamente, a las 22 semanas de exposición, siendo la especie más sensible en producción de biomasa aérea con base en el incremento de contaminación. La MSA se redujo en especies de *Faba bona Medic*, *Medicago lupulina* L. y *Trifolium pratense* L. a los 30 días de exposición con PC en dosis de 50 g/kg (Terek *et al.*, 2015), similar a lo reportado en *C. incana* y *C. pallida* al estar expuestas durante 154 días a dosis de hasta 45 g/kg de PC (Tabla 1). Asimismo, la materia seca de raíces mostró las mayores diferencias estadísticas a las 22 semanas, con inhibición radicular en *C. incana* de 1.2, 1 y 2.1 veces en dosis

Tabla 1. Efecto del petróleo crudo sobre la producción de materia seca en *C. incana* y *C. pallida*, después de 30 y 154 días de exposición al contaminante. **Table 1.** Effect of crude petroleum oil on dry matter production in *C. incana* and *C. pallida*, after 30 and 154 days of exposure to the pollutant.

<i>Crotalaria</i> / día	PC (g/kg)	MSA (g)	EP (%)	MSR (g)	EP (%)	MSN (g)	EP (%)	MSF (g)	EP (%)	MSS (g)	EP (%)
<i>C. incana</i> 30	0	3.568 ^h		0.940 ^f		0.877 ^f		0 ^f		0 ^f	
	3	2.831 ^h	-26	0.778 ^f	-21	1.213 ^f	+28	0 ^f	0	0 ^f	0
	15	0.871 ^h	-310	0.087 ^f	-980	0.846 ^f	-4	0 ^f	0	0 ^f	0
	30	0.340 ^h	-949	0.037 ^f	-2440	0.382 ^f	-129	0 ^f	0	0 ^f	0
	45	0.107 ^h	-3234	0.015 ^f	-6167	0.147 ^f	-496	0 ^f	0	0 ^f	0
<i>C. pallida</i> 30	0	2.967 ^h		0.780 ^f		0.528 ^f		0 ^f		0 ^f	
	3	2.071 ^h	-43	0.431 ^f	-81	0.375 ^f	-41	0 ^f	0	0 ^f	0
	15	0.493 ^h	-502	0.071 ^f	-998	0.391 ^f	-35	0 ^f	0	0 ^f	0
	30	0.193 ^h	-1437	0.021 ^f	-36	0.173 ^f	-205	0 ^f	0	0 ^f	0
	45	0.077 ^h	-3753	0.009 ^f	-8567	0.079 ^f	-568	0 ^f	0	0 ^f	0
<i>C. incana</i> 154	0	26.422 ^{ef}		3.895 ^{cde}		12.052 ^a		14.412 ^a		7.025 ^a	
	3	32.387 ^{bcd}	+18	3.982 ^{cde}	+2	11.025 ^{ab}	-9	13.067 ^a	-10	6.877 ^a	-2
	15	28.027 ^{def}	+6	3.335 ^e	-17	9.612 ^{bc}	-25	13.330 ^a	-8	6.970 ^a	-1
	30	28.712 ^{cde}	+8	3.810 ^{de}	-2	9.325 ^{bcd}	-29	6.562 ^c	-120	3.120 ^c	-125
	45	23.317 ^{fg}	-13	1.867 ^e	-36	7.595 ^d	-59	3.455 ^{de}	-317	1.660 ^{de}	-323
<i>C. pallida</i> 154	0	39.317 ^a		8.360 ^a		11.937 ^a		8.565 ^b		4.280 ^b	
	3	34.760 ^{ab}	-13	6.872 ^b	-22	7.987 ^{cd}	-49	4.955 ^{cd}	-73	2.497 ^{cd}	-71
	15	33.517 ^{bc}	-17	5.280 ^c	-58	5.587 ^e	-114	4.375 ^{de}	-96	1.950 ^{de}	-119
	30	28.002 ^{def}	-40	5.175 ^{cd}	-61	3.992 ^e	-199	2.917 ^e	-194	1.407 ^e	-204
	45	20.860 ^g	-88	3.207 ^e	-161	5.717 ^e	-109	0.727 ^f	-1078	0.168 ^f	-2448

PC: petróleo crudo; MSA: materia seca aérea; MSR: materia seca de raíces; MSN: materia seca de nódulos; MSF: materia seca de frutos; MSS: materia seca de semillas; EP: efecto del petróleo crudo. ^aLetras diferentes en cada columna indican diferencias estadísticas significativas (Duncan, $p \leq 0.05$, $n = 4$).

PC: crude petroleum oil; MSA: aerial dry matter; MSR: root dry matter; MSN: nodules dry matter; MSF: fruits dry matter; MSS: seeds dry matter; EP: crude petroleum oil effect. ^aDifferent letters within each column indicate statistically significant differences (Duncan, $p \leq 0.05$, $n = 4$).

de 15, 30 y 45 g/kg, a excepción de la dosis de 3 g/kg donde se registró un ligero incremento de biomasa radicular comparado con el suelo testigo, mientras que *C. pallida* presentó reducciones que fueron desde 1.2 veces en 3 g/kg, hasta 2.6 veces en dosis de 45 g/kg. Por lo tanto, las raíces de *C. pallida* se consideran como una de las variables de mayor significancia por su baja tasa de producción comparadas con aquellas que crecieron en suelo sin contaminación, a diferencia de lo registrado por Inckot *et al.* (2011) quienes encontraron que *Mimosa pilulifera*, al estar expuesta al petróleo en dosis de 13.6 g/kg, no sufrió alteraciones en la biomasa radicular después de 90 días de exposición. Cuando las plantas se someten a estrés por falta de nutrientes, la biomasa se desplaza principalmente al sistema radicular, y genera aumento de este órgano (Allito *et al.*, 2021). Sin embargo, en este estudio, el estrés ocasionado por la contaminación del PC en dosis de hasta 45 g/kg pudo haber afectado la capacidad de absorción de las raíces para obtener nutrientes e incrementar su biomasa.

La materia seca de nódulos mostró diferencias significativas a los 154 días de exposición al PC, con reducciones en 1.1, 1.2, 1.3 y 1.6 veces en dosis de 3, 15, 30 y 45 g/kg de petróleo en suelo de *C. incana* y, para *C. pallida* la producción de nódulos se redujo en 1.5, 2.1, 3 y 2.1 veces, siendo esta última especie la que mostró más sensibilidad en la producción de nódulos frente a la exposición al PC. La materia seca de frutos y materia seca de semillas fueron las variables con menor producción en las 22 semanas de exposición a las diferentes dosis de PC, al registrar efectos del petróleo altamente nega-

tivos, con reducciones de 1.1, 1.1, 2.2 y 4.2 veces en los frutos de *C. incana*. Asimismo, las semillas tuvieron reducciones en 1, 1, 2.2 y 4.2 veces en suelos contaminados con dosis de 3, 15, 30 y 45 g/kg en comparación con el suelo testigo, por otro lado, *C. pallida* presentó las mayores reducciones, de 1.7, 1.9, 2.9 y 11.8 veces para frutos y, en semillas de 1.7, 2.2, 3 y 25.5 veces menos en suelos con 3, 15, 30 y 45 g/kg de PC, respectivamente, lo que generó en ambas especies vegetales efectos tóxicos en concentraciones de petróleo en hasta 45 g/kg en suelo. *Vicia faba* registró valores superiores en número y biomasa de hojas, de raíces, de frutos y de semillas al estar expuesta a suelo contaminado con petróleo en comparación con el suelo testigo, sin mostrar efectos negativos significativos, posiblemente por la evaporación de los compuestos volátiles presentes en el suelo, que permiten el crecimiento de las plantas (Rusin *et al.*, 2015), efecto similar a lo presentado en este estudio.

Número y diámetro de nódulos

Los nódulos presentaron diferencias estadísticas significativas en número y diámetro en los dos períodos de evaluación por exposición a las diferentes dosis de PC, siendo en el suelo testigo para ambas especies vegetales donde se registró la mayor producción a las 4 semanas de experimentación. A las 22 semanas, se registró incremento en número de nódulos de *C. incana* con una tendencia directamente proporcional a la dosis de PC, que tuvo su mayor cantidad en 45 g/kg con 174 nódulos más en promedio que en las plantas que crecieron en el suelo sin contaminación, a diferencia de *C. pallida*,

que tuvo una gran reducción en todas las dosis de PC, con 216 nódulos menos en la dosis de 45 g/kg comparado con el tratamiento testigo, demostró mayor sensibilidad y toxicidad a exposiciones prolongadas de petróleo, que inhibió la formación de nódulos. El diámetro de nódulos mostró comportamientos irregulares a las 4 semanas de exposición al PC en ambas especies vegetales, pero a las 22 semanas, se observó un comportamiento similar en todas las dosis para ambas plantas, siendo *C. incana* la que mostró efectos positivos frente a la exposición de PC en dosis de 3 y 30 g/kg de suelo, con 0.9 veces más grosor en comparación con el suelo testigo y, la dosis de 45 g/kg fue estadísticamente igual al suelo testigo. A las 22 semanas el diámetro de nódulos en *C. pallida* no mostró diferencias significativas (Tabla 2) por efecto del petróleo, con el menor diámetro promedio en dosis con 30 g/kg de petróleo en suelo, al ser 1.1 veces menor que el suelo testigo. Estos resultados muestran tolerancia al petróleo crudo en dosis altas para ambas especies de leguminosas en formación y desarrollo de nódulos. La nodulación se puede promover por acción de hormonas peptídicas sobre las raíces de leguminosas que tengan deficiencia de nitrógeno (Gautrat *et al.*, 2021), garantizando que la organogénesis mantenga un equilibrio con las señales internas (vías de señalización hormonal) y ambientales (deficiencia o exceso de agua, toxicidad, deficiencia de minerales) que puedan afectar el desarrollo óptimo de los nódulos (Lin *et al.*, 2020), como la exposición al PC durante prolongados períodos de tiempo.

Densidad de *Rhizobium* spp.

La mayor población de *Rhizobium* spp. en nódulos se registró en *C. pallida* a los 30 días de exposición al petróleo en dosis de hasta 45 g/kg en suelo, con un 9.3 veces mayor población microbiana por encima del tratamiento testigo, contrario a lo reportado en *C. incana* donde hubo una reducción de 2.3 veces de *Rhizobium* spp. en comparación con el testigo. Sin embargo, a los 154 días, ambas especies de leguminosas mostraron efectos negativos a las diferentes dosis de PC, con mayor reducción en dosis de 45 g/kg con 3.3 y 34.5 veces menores poblaciones de *Rhizobium* spp. para *C. incana* y *C. pallida*, respectivamente. Para que la organogénesis de los nódulos sea eficaz se requiere la colonización de bacterias de asociación simbiótica como *Rhizobium* spp., así como la autorregulación de la nodulación para que este órgano se forme y sea visible en las raíces (Chaulagain y Frugoli, 2021). Por lo tanto, la contaminación por petróleo pudo haber provocado déficit en la organogénesis nodular al inhibir la colonización de *Rhizobium* spp.

La rizosfera y suelo en ambas especies para los dos tiempos de exposición, mostraron efectos altamente significativos del PC sobre el crecimiento de *Rhizobium* spp. (Tabla 3), con incrementos de 11.9 y 4.6 veces en dosis de petróleo con 45 g/kg en rizosfera de *C. incana* comparados con el testigo en la semana 4 y semana 22 de exposición y, en suelo los incrementos fueron en 2.3 y 1.7 veces al día 154 de exposición al PC en suelo. En *C. pallida* los incrementos fueron de 9 y 8.2 veces en las poblaciones de *Rhizobium* spp. en rizosfera

Tabla 2. Efecto del petróleo crudo sobre el número y diámetro de nódulos en *Crotalaria* al día 30 y 154 de exposición al contaminante.

Table 2. Effect of crude petroleum oil on the number and diameter of nodules in *Crotalaria* at day 30 and 154 of exposure to the pollutant.

<i>Crotalaria</i> / día	PC (g/kg)	NN	EP (%)	DN	EP (%)
<i>C. incana</i> 30	0	193 ^{efg}		2.902 ^g	
	3	188 ^{efg}	-3	3.707 ^{fg}	+22
	15	199 ^{efg}	+3	5.800 ^d	+50
	30	106 ^{ghi}	-82	4.455 ^{ef}	+35
	45	45 ⁱ	-329	3.147 ^g	+8
<i>C. pallida</i> 30	0	191 ^{efg}		3.082 ^g	
	3	151 ^{fgh}	-26	3.415 ^{fg}	+10
	15	74 ^{hi}	-158	5.200 ^{de}	+41
	30	33 ⁱ	-479	3.810 ^{fg}	+19
	45	15 ⁱ	-1173	2.807 ^g	-10
<i>C. incana</i> 154	0	528 ^{bc}		8.937 ^{bc}	
	3	336 ^d	-57	9.367 ^{abc}	+4
	15	434 ^c	-22	8.085 ^c	-10
	30	614 ^{ab}	+14	9.637 ^{ab}	+7
	45	702 ^a	+25	8.940 ^{bc}	0
<i>C. pallida</i> 154	0	470 ^c		10.315 ^a	
	3	262 ^{de}	-79	9.787 ^{ab}	-5
	15	212 ^{ef}	-122	9.320 ^{abc}	-11
	30	205 ^{efg}	-129	9.220 ^{abc}	-12
	45	254 ^{def}	-85	9.580 ^{ab}	-8

PC: petróleo crudo; NN: número de nódulos; DN: diámetro de nódulos; EP: efecto del petróleo crudo. ^aLetras diferentes en cada columna indican diferencias estadísticas significativas (Duncan, $p \leq 0.05$, $n = 4$).

PC: crude petroleum oil; NN: number of nodules; DN: diameter of nodules; EP: crude petroleum oil effect. ^aDifferent letters within each column indicate statistically significant differences (Duncan, $p \leq 0.05$, $n = 4$).

Tabla 3. Efecto del petróleo crudo sobre la densidad de *Rhizobium* spp. asociado a *C. incana* y *C. pallida* en dos tiempos de exposición.**Table 3.** Effect of crude petroleum oil on the density of *Rhizobium* spp. associated with *C. incana* and *C. pallida* at two exposure times.

<i>Crotalaria</i> / día	PC (g/kg)	UFC g ⁻¹ <i>Rhizobium</i> spp.(10 ³)			Efecto del petróleo (%)		
		Nódulos	Rizosfera	Suelo	Nódulos	Rizosfera	Suelo
<i>C. incana</i> 30	0	77 ^a	126 ⁱ	161 ^{hi}			
	3	15 ^a	182 ^j	199 ^h	-413	+31	+19
	15	109 ^a	1442 ^{gh}	213 ^h	+29	+91	+24
	30	32 ^a	1436 ^{gh}	208 ^h	-141	+91	+22
	45	34 ^a	1504 ^{gh}	377 ^g	-126	+92	+57
<i>C. pallida</i> 30	0	28 ^a	82 ⁱ	12 ⁱ			
	3	34 ^a	795 ^{hi}	159 ^{hi}	+18	+90	+92
	15	58 ^a	894 ^{hi}	180 ^{hi}	+52	+91	+93
	30	222 ^a	108 ^j	167 ^{hi}	+87	+24	+93
	45	262 ^a	737 ^{hi}	18 ⁱ	+89	+89	+33
<i>C. incana</i> 154	0	9160 ^a	2820 ^e	1170 ^f			
	3	6200 ^b	2179 ^{ef}	1272 ^{ef}	-48	-29	+8
	15	4390 ^d	10343 ^c	1429 ^d	-109	+73	+18
	30	2750 ^e	11097 ^c	1932 ^b	-233	+74	+39
	45	2770 ^e	13011 ^b	2008 ^b	-231	+78	+42
<i>C. pallida</i> 154	0	5800 ^c	2177 ^{ef}	1128 ^f			
	3	2190 ^f	1379 ^{gh}	1401 ^{de}	-165	-58	+19
	15	333 ^a	1956 ^{efg}	1611 ^c	-1642	-11	+30
	30	263 ^g	7729 ^d	2008 ^b	-2105	+72	+44
	45	168 ^g	17926 ^a	2350 ^a	-3352	+88	+52

PC: petróleo crudo; UFC: unidades formadoras de colonias. ^aLetras diferentes en cada columna indican diferencias estadísticas significativas (Duncan, $p \leq 0.05$, $n = 4$). PC: crude petroleum oil; UFC: colony forming units. ^aDifferent letters within each column indicate statistically significant differences (Duncan, $p \leq 0.05$, $n = 4$).

a los 30 y 154 días expuestas a dosis de petróleo en 45 g/kg, respectivamente, comparados con el tratamiento testigo; de forma similar, en suelo plantado con *C. pallida*, *Rhizobium* spp. tuvo incrementos poblacionales que fueron de 1.5 hasta 2.1 veces del día 30 al día 154 en la mayor dosis utilizada en el experimento. Los resultados obtenidos indican una relación positiva entre el incremento en la población de *Rhizobium* spp. y la degradación de los hidrocarburos del petróleo, lo que sugiere su uso como bacterias degradadoras de PC en dosis de hasta 45 g/kg de petróleo en suelo y rizosfera de *C. incana* y *C. pallida*, posiblemente por la interacción entre las raíces y el PC que apunta a una estimulación en la población microbiana degradadora de hidrocarburos del petróleo en suelo (Xie *et al.*, 2018). La importancia de *Rhizobium* spp. a nivel agrícola y ambiental radica, además de la simbiosis con las leguminosas para fijar en nitrógeno atmosférico en el suelo, por su potencial para la biorremediación de los hidrocarburos del petróleo (Zhang *et al.*, 2012). Por lo tanto, el efecto positivo del petróleo sobre la población microbiana de *Rhizobium* spp. en la rizosfera y suelo puede deberse a los exudados de las raíces (p.ej. aminoácidos, mucílagos, polisacáridos, ácidos orgánicos, factores de crecimiento) que son secretados (Neumann y Ludewing, 2023) y pueden cambiar tanto propiedades fisicoquímicas como microbiológicas de la rizosfera, como pH, capacidad de intercambio catiónico (CIC) del suelo, así como el incremento de la actividad microbiana en suelo y rizosfera por la liberación de nutrientes en el suelo, lo cual podría haber promovido la degradación de los contaminantes orgánicos en el suelo (He *et al.*, 2022) en

respuesta a las condiciones de estrés que el petróleo induce en las dos especies de *Crotalaria*.

Remoción de HTP

Los efectos acumulativos para remover HTP hasta los 154 días de exposición al PC muestran evidencia que *C. incana* logró eliminar el 68, 70, 72 y 77 % en las dosis de 3, 15, 30 y 45 g/kg en suelo. Por otro lado, en *C. pallida* la remoción fue del 54, 64, 74 y 65 % en las mismas dosis de PC al final del experimento (Figura 2). Para la eficiencia en la remoción de los hidrocarburos del petróleo, los microorganismos realizan el catabolismo para utilizarlos como fuente de energía y/o integrarlos en la biomasa celular (Ahmed *et al.*, 2024). La activación de las vías metabólicas por parte de las bacterias permite la degradación de diversos tipos de hidrocarburos, así como su descomposición por acción de exudados radicales en productos intermedios no tóxicos que conformen la materia orgánica del suelo y estimulen el crecimiento vegetal en suelos contaminados por hidrocarburos del petróleo (Balasubramaniyam, 2015; Brzeszcz *et al.*, 2024). Se considera, además, que la simbiosis con *Rhizobium* spp. les permitió a ambas especies vegetales la asimilación de nitrógeno y otros nutrientes esenciales como fósforo y potasio para su crecimiento y producción, al ser especies tolerantes a la contaminación y con alto potencial para ser utilizadas en la limpieza de suelos contaminados con hidrocarburos del PC. Zuzolo *et al.* (2021) mencionan que especies como *Medicago sativa* L. y *Lotus corniculatus* L. se consideran idóneas en la rehabilitación de suelos impactados por contaminación del

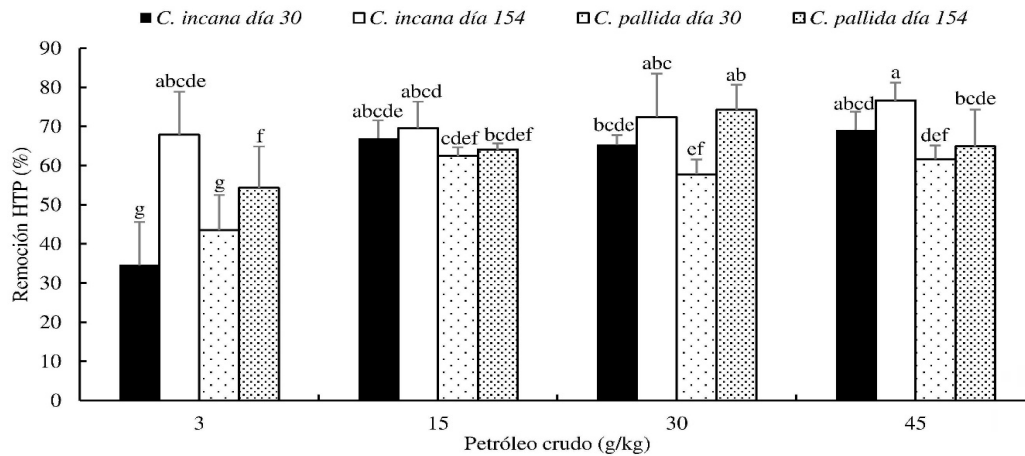


Figura 2. Porcentaje de remoción de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) en suelo con *C. incana* y *C. pallida* expuestas al contaminante durante 30 y 154 días. *Letras diferentes en cada columna indican diferencias estadísticas significativas (Duncan, $p \leq 0.05$, $n = 4$).

Figure 2. Total petroleum hydrocarbons (TPH) removal (%) in soil with *C. incana* and *C. pallida* exposed to the pollutant for 30 and 154 days. *Different letters within each column indicate statistically significant differences (Duncan, $p \leq 0.05$, $n = 4$).

petróleo, al poseer sistemas radicales extensos que producen exudados importantes para la producción y simbiosis microbiana que logre de forma eficiente la fijación de nitrógeno y el concomitante incremento en la productividad del suelo. Muestran, además, evidencia del 89% de remoción de HTP en dosis de hasta 3.4 g/kg de suelo durante 270 días de exposición, dato que se compara favorablemente con los obtenidos en esta investigación, donde las leguminosas del género *Crotalaria* en estudio tuvieron altas tasas de remoción del PC en función del tiempo de exposición. Este efecto sugiere que, posiblemente, la exposición de *Rhizobium* spp. a los HTP es capaz de conferirles versatilidad y amplia capacidad degradativa por la inducción de actividad genética catabólica necesaria para la expresión y síntesis de enzimas para la degradación de hidrocarburos (Osadebe y Chukwu, 2023).

Interacción de HTP con las especies de *Crotalaria* y los tiempos de exposición

Se observaron diferencias significativas por efecto de planta para la mayoría de las variables en estudio, a excepción del diámetro de nódulos y *Rhizobium* spp. en suelo (Tabla 4). El efecto dosis y tiempo fueron significativos para todas las variables. Las interacciones fueron significativas para la mayoría de las variables, a excepción del número de hojas trifoliadas y diámetro de nódulos. Estudios realizados por Rahayu *et al.* (2018) y Osadebe y Chukwu (2023) demostraron la capacidad de *Rhizobium* spp. para degradar hidrocarburos totales del petróleo crudo, gasolina, diésel y queroseno, lo que sugiere que *Crotalaria* tiene la capacidad de atraer y activar a *Rhizobium* spp. a través de la exudación de flavonoides (Mathesius, 2022) que se liberan en la rizosfera (Ancona *et al.*, 2022) y, a

Tabla 4. ANOVA de tres factores (planta, dosis y tiempo de exposición) para todas las variables estudiadas en *C. incana* y *C. pallida*.

Table 4. Three-way ANOVA (plant, dose, and exposure time) for all variables studied in *C. incana* and *C. pallida*.

Variable	Planta (P)	Dosis (D)	Tiempo (T)	Interacción (P*D*T)
AP	***	*	***	***
DT	***	***	***	***
NH	***	***	***	NS
MSA	*	***	***	**
MSR	***	***	***	*
MSN	***	***	***	*
MSF	***	***	***	***
MSS	***	***	***	***
NN	***	***	***	***
DN	NS	**	***	NS
RhiN	***	***	***	***
RhiR	***	***	***	***
RhiS	NS	***	***	***
REM	**	***	***	*

AP: altura de planta; DT: diámetro de tallo; NH: número de hojas trifoliadas; MSA: materia seca aérea; MSR: materia seca de raíces; MSN: materia seca de nódulos; MSF: materia seca de frutos; MSS: materia seca de semillas; NN: número de nódulos; DN: diámetro de nódulos; RhiN: *Rhizobium* spp. en nódulos; RhiR: *Rhizobium* spp. en rizosfera; RhiS: *Rhizobium* spp. en suelo; REM: remoción HTP. * significativo, ** muy significativo, *** altamente significativo, NS no significativo (Duncan, $p \leq 0.05$, $n = 4$).

su vez ser estimuladas por la presencia del PC que utilizan como fuente de carbono al migrar de las raíces de las leguminosas hasta las hojas y otros órganos vegetales, para ser modificados por reacciones de conjugación, hidroxilación y actividades enzimáticas (Bellout *et al.*, 2016).

CONCLUSIÓN

La interacción entre las dosis de petróleo crudo, los tiempos de exposición y las especies de *Crotalaria* provocaron efectos significativos, siendo *C. incana* la más tolerante a las condiciones de contaminación, con mayores tasas de crecimiento y producción de biomasa aérea y de raíces en comparación con *C. pallida*. Sin embargo, la biomasa de nódulos, frutos y semillas fue altamente inhibida conforme incrementó la dosis de contaminación en ambas especies de leguminosas, no obstante, el diámetro de nódulos fue similar en todos los tratamientos de *C. incana*, con excepción de *C. pallida* que fue la especie más sensible a la contaminación por petróleo crudo; por lo tanto, *Rhizobium* spp., tuvo menor colonización en nódulos, pero, en suelo y rizosfera, registró las mayores poblaciones, lo que puede asociarse con altas tasas de remoción en todos los tratamientos, con mayores porcentajes en dosis de 45 g/kg para *C. incana* y de 30 g/kg para *C. pallida*, lo que sugiere una actividad alta de *Rhizobium* spp. para remover el petróleo crudo del suelo, que permita el crecimiento y producción de las leguminosas, y sean consideradas como potenciales inhibidoras de la contaminación. Estos resultados apoyan la recomendación de su uso en tecnologías básicas de limpieza de suelos impactados por la actividad petrolera en el sureste de México.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada (816117) al primer autor. Al Colegio de Postgraduados Campus Tabasco por el apoyo financiero para el desarrollo de la investigación durante los estudios de Doctorado en Ciencias Agrícolas en el Trópico.

CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Ahmed, S., Kumari, K. y Singh, D. 2024. Different strategies and bio-removal mechanisms of petroleum hydrocarbons from contaminated sites. *Arab Gulf Journal of Scientific Research*, 42(2), 342-358. <https://doi.org/10.1108/AGJSR-09-2022-0172>
- Allito, B.B., Ewusi-Mensah, N., Logah, V. y Hunegnaw, D.K. 2021. Legume-rhizobium specificity effect on nodulation, biomass production and partitioning of faba bean (*Vicia faba* L.). *Scientific Reports*, 11, 3678. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83235-8>
- Ancona, V., Rascio, I., Aimola, G., Caracciolo, A.B., Grenni, P., Uricchio, V.F. y Borello, D. 2022. Plant-assisted bioremediation: Soil recovery and energy from biomass. In: Pandey V.C. (Ed.). *Assisted Phytoremediation* (pp. 25-47). *Elsevier*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822893-7.00012-4>
- Balasubramaniam, A. 2015. The influence of plants in the remediation of petroleum hydrocarbon-contaminated sites. *Pharmaceutical Analytical Chemistry: Open Access*, 1, 105. <http://dx.doi.org/10.4172/paco.1000105>
- Bellout, Y., Khelif, L., Guivarch, A., Haouche, L., Djebbar, R., Carol, P. y Abrous, B.O. 2016. Impact of edaphic hydrocarbon pollution on the morphology and physiology of pea roots (*Pisum sativum* L.). *Applied Ecology And Environmental Research*, 14(2), 511-525. http://dx.doi.org/10.15666/aer/1402_511525
- Brzeszcz, J., Steliga, T., Ryszka, P., Kaszycki, P. y Kapusta, P. 2024. Bacteria degrading both *n*-alkanes and aromatic hydrocarbons are prevalent in soils. *Environmental Science and Pollution Research*, 31, 5668-5683. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-31405-8>
- Chaulagain, D. y Frugoli, J. 2021. The regulation of nodule number in legumes is a balance of three signal transduction pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 1117. <https://doi.org/10.3390/ijms22031117>
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). (1988). *Simbiosis Leguminosa-Rizobio; manual de métodos de evaluación, selección y manejo agronómico*. Ed. rev. Proyecto CIAT-UNDP de evaluación, selección y manejo de la simbiosis leguminosa-rizobio para aumentar la fijación de nitrógeno. Sección de Microbiología de suelos del programa de Frijol (comps.). Cali, Colombia. 178 p.
- Defez, R., Andreozzi, A., Dickinson, M., Charlton, A., Tadini, L., Pesaresi, P. y Bianco, C. 2017. Improved drought stress response in alfalfa plants nodulated by an IAA over-producing *Rhizobium* strain. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2466. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02466>
- Downie, J.A. 2010. The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiology Reviews*, 34, 150-170. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00205.x>
- Ferguson, B.J., Mens, C., Hastwell, A.H., Zhang, M., Su, H., Jones, C.H., Chu, X. y Gresshoff, P.M. 2019. Legume nodulation: The host controls the party. *Plant, Cell & Environment*, 42, 41-51. <https://doi.org/10.1111/pce.13348>
- Gautrat, P., Laffont, C., Frugier, F. y Ruffel, S. 2021. Nitrogen systemic signaling: from symbiotic nodulation to root acquisition. *Trends in Plant Science*, 26(4), 392-406. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.11.009>
- He, M., Li, Z. y Mei, P. 2022. Root exudate glycine synergistically promotes phytoremediation of petroleum-contaminated soil. *Frontiers in Environmental Science*, 10, 1033989. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2022.1033989>
- Ikeura, H., Kawasaki, Y., Kaimi, E., Nishiwaki, J., Noborio, K. y Tamaki, M. 2016. Screening of plants for phytoremediation of oil contaminated soil. *International Journal of Phytoremediation*, 18(5), 460-466. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2022.1033989>
- Inckot, R.C., Santos, G. de O., de Souza, L.A. y Bona, C. 2011. Germination and development of *Mimosa pilulifera* in petroleum-contaminated soil and bioremediated soil. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 206(3), 261-266. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2010.09.005>
- Kang, Y., Li, M., Sinharoy, S. y Verdier, J. 2016. A snapshot of functional genetic studies in *Medicago truncatula*. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1175. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01175>

- Kekere, O., Ikhaijagbe, B. y Apela, B.R. 2011. Effects of crude petroleum oil on the germination, growth and yield of *Vigna unguiculata* Walp L. *Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 2(6), 158-165.
- Kovaleva, E.I., Trofimov, S.Y. y Shoba, S.A. 2022. The response of higher plants to the oil contamination of soils in a pot experiment. *Moscow University Soil Science Bulletin*, 77(3), 178-187. <https://doi.org/10.3103/S0147687422030073>
- Kusar, S., Saddiqe, Z., Ali, F., Bashir, S. y Zubairi, T. 2024. GCMS and HPLC profiling, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Crotalaria medicaginea* Lamk. *South African Journal of Botany*, 168, 196-208. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2024.03.014>
- Lin, J., Frank, M. y Reid, D. 2020. No home without hormones: How plant hormones control legume nodule organogenesis. *Plant Communications*, 1, 100104. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2020.100104>
- López-Aguilar, S., Adams, R.H., Domínguez-Rodríguez, V.I., Gaspar-Génico, J.A., Zavala-Cruz, J. y Hernández-Natarén, E. 2020. Soil odor as an extra-official criterion for qualifying remediation projects of crude oil-contaminated soil. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(9), 3213. <https://doi.org/10.3390/ijerph17093213>
- López, L.H., Beltrán, B.M., Ochoa, F.Y.M., Castro, A.F., Cerna, C.E. y Delgado, O.J.C. 2022. Potencial agroecológico de *Crotalaria* spp. como extracto vegetal en la agricultura. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 121(2), 1-16. <https://doi.org/10.24215/16699513e112>
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, D.H. y Stahl, D.A. 2015. Brock Biología de los microorganismos. 14ª edición. Pearson Educación. Madrid, España. 1099 p.
- Marín-García, D.C., Adams, R.H. y Hernández-Barajas, R. 2016. Effect of crude petroleum on water repellency in a clayey alluvial soil. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 13, 55-64. <https://doi.org/10.1007/s13762-015-0838-6>
- Mathesius, U. 2022. Are legumes different? Origins and consequences of evolving nitrogen fixing symbioses. *Journal of Plant Physiology*, 276, 153765. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2022.153765>
- Merkel, N., Schultze-Kraft, R. y Infante, C. 2005. Assessment of tropical grasses and legumes for phytoremediation of petroleum-contaminated soils. *Water, Air, and Soil Pollution*, 165, 195-209. <https://doi.org/10.1007/s11270-005-4979-y>
- Neumann, G. y Ludewig, U. 2023. Rhizosphere chemistry influencing plant nutrition. In: Rengel, Z., Cakmak, I. and White, P.J. (Eds.). *Marschner's Mineral Nutrition of Plants*. Fourth Edition. United Kingdom. (pp. 545-585). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819773-8.00013-7>
- Odukoya, J., Lambert, R. y Sakrabani, R. 2019. Understanding the impacts of crude oil and its induced abiotic stresses on agrifood production: a review. *Horticulturae*, 5(2), 47. <https://doi.org/10.3390/horticulturae5020047>
- Orocio-Carrillo, J.A., Rivera-Cruz, M. del C., Aranda-Ibañez, E.M., Trujillo-Narcía, A., Hernández-Galvez, G. y Mendoza-López, M.R. 2019. Hormesis under oil-induced stress in *Leersia hexandra* Sw. used as phytoremediator in clay soils of the Mexican humid tropic. *Ecotoxicology*, 28, 1063-1074. <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02106-1>
- Osadebe, A.U. y Chukwu, C.B. 2023. Degradation properties of *Rhizobium petrolearium* on different concentrations of crude oil and its derivative fuels. *Environmental and Experimental Biology*, 21, 83-92. <https://doi.org/10.22364/eeb.21.10>
- Pourbabae, A.A., Khazaei, M., Alikhani, H.A. y Emami, S. 2021. Root nodulation of alfalfa by *Ensifer meliloti* in petroleum contaminated soil. *Rhizosphere*, 17, 100305. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100305>
- Rahayu, Y.S., Yuliani, Y., Trimulyono, G., Ratnasari, E. y Dewi, S.K. 2018. Role of nitrogen and phosphate dynamics to increase plant survival grown on oil contaminated soil. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 434, 012122. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/434/1/012122>
- Rai, K.K., Pandey, N., Meena, R.P. y Rai, S.P. 2021. Biotechnological strategies for enhancing heavy metal tolerance in neglected and underutilized legume crops: A comprehensive review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, 111750. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111750>
- Rech, C., Ribeiro, L.P., Bento, J.M.S., Pott, C.A. y Nardi, C. 2024. Monocrotaline presence in the *Crotalaria* (Fabaceae) plant genus and its influence on arthropods in agroecosystems. *Brazilian Journal of Biology*, 84, e256916. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.256916>
- Riskuwa-Shehu, M.L., Ijah, U.J.J., Manga, S.B. y Bilbis, L.S. 2017. Evaluation of the use of legumes for biodegradation of petroleum hydrocarbons in soil. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 14, 2205-2214. <https://doi.org/10.1007/s13762-017-1303-5>
- Rodríguez-Urbe, M.L., Peña-Cabriales, J.J., Rivera-Cruz, M. del C. y Délano-Frier, J.P. 2021. Native bacteria isolated from weathered petroleum oil-contaminated soils in Tabasco, Mexico, accelerate the degradation petroleum hydrocarbons in saline soil microcosms. *Environmental Technology & Innovation*, 23, 101781. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101781>
- Roy, S., Liu, W., Nandety, R.S., Crook, A., Mysore, K.S., Pislariu, C.I., Frugoli, J., Dickstein, R. y Udvardi, M.K. 2020. Celebrating 20 years of genetic discoveries in legume nodulation and symbiotic nitrogen fixation. *The Plant Cell*, 32, 15-41. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00279>
- Rusin, M., Gospodarek, J. y Nadgórska-Socha, A. 2015. The effect of petroleum-derived substances on the growth and chemical composition of *Vicia faba* L. *Polish Journal of Environmental Studies*, 24(5), 2157-2166. <https://doi.org/10.15244/pjoes/41378>
- Saboon, Bibi, Y., Arshad, M., Ahmad, N., Riaz, I. y Chaudhari, S.K. 2015. An insight into medicinal and ethnopharmacological potential of *Crotalaria burhia*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5(7), 511-514. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(15\)60826-X](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(15)60826-X)
- SAS (Statistical Analysis Systems). (2005). User's guide, versión 9.1.3. SAS Institute, Inc. Cary, NC. 664 p.
- Scupinari, T., Mannocho, R.H., Sabino, F.A.B., da Silva, B.V., Pereira, D.W., de Oliveira, N.E., Hoffman-Campo, C.B. y Zeraik, M.L. 2020. *Crotalaria spectabilis* as a source of pyrrolizidine alkaloids and phenolic compounds: HPLC-MS/MS dereplication and monocrotaline quantification of seed and leaf extracts. *Phytochemical Analysis*, 31, 747-755. <https://doi.org/10.1002/pca.2938>
- SEMARNAT (Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales). (2002). Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000, Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelo. Estudio, muestreo y análisis. Martes 31 de diciembre de 2002. México. 85 p.

- Sprent, J.I., Ardley, J. y James, E.K. 2017. Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. *New Phytologist*, 215, 40-56. <https://doi.org/10.1111/nph.14474>
- Terek, O., Lapshyna, O., Velychko, O., Bunyo, L. y Dovgaiuk-Semeniuk, M. 2015. Crude oil contamination and plants. *Journal of Central European Green Innovation*, 3(2), 175-184. <https://doi.org/10.22004/ag.econ.206656>
- Turan, V., Schröder, P., Bilen, S., Insam, H. y Fernández-Delgado, J.M. 2019. Co-inoculation effect of *Rhizobium* and *Achillea millefolium* L. oil extracts on growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and soil microbial-chemical properties. *Scientific Reports*, 9, 15178. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51587-x>
- Uche, E.C. y Dadrasnia, A. 2017. HC-0B-06: Biodegradation of hydrocarbons. In: Heimann K., Karthikeyan O.P. and Muthu S.S. (Eds.). Biodegradation and bioconversion of hydrocarbons (pp. 105-135). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-0201-4>
- USEPA-3540C. 1996. Soxhlet extraction organics. SW-846 test methods for evaluating solid waste physical/chemical methods. <http://www.epa.gov/wastes/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3540c.pdf>
- Xie, W., Li, R., Li, X., Liu, P., Yang, H., Wu, T. y Zhang, Y. 2018. Different responses to soil petroleum contamination in monocultured and mixed plant systems. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 161, 763-768. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.06.053>
- Yaqub, M.S., Basher, B. y Aslam, R. 2020. Secondary metabolites of the genus *Crotalaria* (rattlepods) and their medicinal importance-A review. *Journal of Horticultural Science and Technology*, 3(1), 1-7. <https://doi.org/10.46653/jhst20030101>
- Zhang, X., Li, B., Wang, H., Sui, X., Ma, X., Hong, Q. y Jiang, R. 2012. *Rhizobium petrolearium* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62, 1871-1876. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.026880-0>
- Zuzolo, D., Guarino, C., Tartaglia, M. y Sciarrillo, R. 2021. Plant-soil-microbiota combination for the removal of total petroleum hydrocarbons (TPH): An in-field experiment. *Frontiers in Microbiology*, 11, 621581. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.621581>