



Composición química y adaptación del pasto tropical *Leersia hexandra* Sw. expuesto a suelo con petróleo crudo



José Alberto Orocio-Carrillo ^{a*}

María del Carmen Rivera-Cruz ^a

Said Cadena-Villegas ^a

Consuelo del Carmen Bautista-Muñoz ^a

Antonio Juárez-Maldonado ^b

Karla Chávez-Álvarez ^a

^a Colegio de Postgraduados. Campus Tabasco. Programa de Doctorado en Ciencias Agrícolas en el Trópico, Laboratorio de Microbiología Agrícola Ambiental. Periférico Carlos A. Molina, Km 3.5. 86500, H. Cárdenas, Tabasco, México.

^b Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Departamento de Botánica. Coahuila, México.

* Autor de correspondencia: orocio.alberto@colpos.mx

Resumen:

El presente estudio se realizó para evaluar la composición química y el potencial de adaptación de *L. hexandra* bajo condiciones de estrés al petróleo crudo, a través de la población de rizobacterias, acumulación de proteína cruda, fibra detergente neutra, fibra detergente ácida y lignina en follaje de plantas jóvenes que emergen del macollo de la planta principal a diferente edad de crecimiento (día 180 y 360), así como la producción de plantas jóvenes en el macollo, materia seca aérea y radical. Los resultados mostraron que las concentraciones de petróleo crudo en el suelo afectaron significativamente la población de *Azotobacter* spp. (0.361*), sin embargo, se inhibió *Azospirillum* spp. y *Pseudomonas* spp., mientras tanto, con la extensión del tiempo se incrementó ambas poblaciones (0.778*,

0.767*). Así mismo, se vio incrementada la síntesis de proteína cruda (0.551**) y lignina en follaje (0.354*) y la producción de plantas jóvenes en el macollo (0.465**) y materia seca radical (0.362*), lo que indica una estrategia de *L. hexandra* para sobrevivir y adaptarse a la contaminación del suelo por petróleo crudo. Sin embargo, la composición química se vio afectada por la edad del pasto, en la que incrementó el porcentaje de fibra detergente neutra (0.832**), fibra detergente ácida (0.741**) y lignina (0.661**), mientras que la proteína cruda se redujo (-0.497**).

Palabras clave: Rizobacterias, Proteína cruda, Lignina, Fibra detergente neutra.

Recibido: 07/07/2024

Aceptado: 07/10/2024

Introducción

Los suelos contaminados con petróleo crudo han generado un ambiente tóxico para las plantas y la actividad microbiana en rizosfera de diversas especies vegetales^(1,2), esto debido a la naturaleza tóxica, mutagénica y cancerígena del petróleo⁽³⁾. La contaminación del suelo con petróleo crudo afecta negativamente la fertilidad porque el petróleo crudo disminuye la disponibilidad de nutrientes (nitrógeno, fósforo y potasio), pH, contenido de humedad y aumento de la conductividad eléctrica y del contenido de carbono orgánico del suelo⁽⁴⁾ afectando directamente el crecimiento y desarrollo de las plantas⁽⁵⁾. Además, el petróleo también forma una superficie hidrofóbica alrededor de las raíces, lo que limita la absorción de agua y nutrientes del suelo⁽⁶⁾. En suelo con petróleo, *Leersia hexandra* crece y produce forraje⁽⁷⁾. *L. hexandra* es un pasto perenne que habita áreas húmedas en regiones tropicales y subtropicales, se propaga vegetativamente por rizomas, invadiendo los humedales por la acumulación abundante de follaje y raíz sobre el suelo y el agua⁽⁸⁾ y es altamente consumida por los bovinos tanto en época seca como lluviosa⁽⁹⁾.

La rizosfera es la interfase suelo-raíz, es el volumen de suelo influenciado por la actividad de la raíz⁽¹⁰⁾. Los pastos tropicales se caracterizan por un sistema rizosférico extendido debido a la raíz fibrosa y abundante que le caracteriza, y han demostrado adaptación a las condiciones de estrés que se establecen en suelos contaminados con petróleo crudo⁽¹¹⁾. Los pastos tropicales que de manera natural han evolucionado bajo condiciones de estrés por la acumulación de carbono de origen biogénico y petrolífero en el suelo logran mitigar el estrés, al cambiar las condiciones químicas en la rizosfera y la proliferación de microorganismos heterótrofos específicos^(12,13). Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal son

heterótrofas y de vida libre asociadas a la raíz de la planta⁽¹⁴⁾, estimulan el crecimiento vegetal, provee tolerancia a la planta del estrés por diésel de petróleo⁽¹⁵⁾ e intervienen en los procesos de rizodegradación de alcanos, cicloalcanos e hidrocarburos policíclicos aromáticos⁽¹⁶⁾. Los géneros de bacterias *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Pseudomonas* toleran el estrés inducido por el petróleo crudo^(17,18). Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal que colonizan la rizosfera, mineralizan metabolitos intermedios de la descomposición del carbono orgánico del petróleo⁽¹⁹⁾, y las exoenzimas liberadas por ellas reducen y oxidan nitrógeno, fósforo y sulfato, pero también fijan biológicamente el nitrógeno⁽²⁰⁾. La adaptación de los pastos a suelo con petróleo crudo sugiere que posee una rizosfera con raíces que asimilan NO₃, H₂PO₄, SO₄ y son utilizados de manera esencial en el metabolismo primario en el interior de la planta⁽²¹⁾. Los pastos adaptados a la exposición a petróleo crudo posiblemente responden de manera similar a otras especies vegetales como: *Banksia seminuda* Rie. y *Hakea prostrata* R. Br.⁽²²⁾, *Secale cereale* L.⁽²³⁾ en donde el estrés abiótico modifica el desarrollo y la expresión de los genes implicados en la síntesis celular en raíz y follaje⁽²⁴⁾. La adaptación de los pastos al estrés por factores abióticos se basa en la respuesta positiva del crecimiento, producción y síntesis de metabolitos secundarios, al respecto, Orocio-Carrillo *et al*⁽¹³⁾ reportan que la raíz y el contenido de proteína en hojas de *L. hexandra* tiene respuesta hormética a dosis de hidrocarburos totales del petróleo en el suelo. Correa y Maranhão⁽²⁵⁾ indicaron que la longitud de tallo, biomasa de raíces y la densidad estomática aumenta en *Echinochloa polystachya* (Kunth) Hitchc. expuesta a suelo con petróleo; Habermann *et al*⁽²⁶⁾ indican que el estrés por déficit hídrico y calentamiento del suelo indujo aumento del contenido de fibra y lignina, y reduce la proteína foliar en *Panicum maximum* Jacq; otros autores^(27,28) reportan que altas temperaturas conducen a un alto contenido de fibra detergente y lignina en la pared celular, y disminución de la síntesis de proteína en pastos forrajeros. El objetivo del presente estudio fue determinar la población rizobacterias, acumulación de proteína cruda, fibra detergente neutro, fibra detergente ácido y lignina en follaje, así como la producción de plantas jóvenes en el macollo, materia seca aérea y radical de *L. hexandra*, que permita obtener un pasto adaptado a suelos contaminados con petróleo crudo para el trópico húmedo mexicano.

Material y métodos

Colecta de suelo y rizomas

Se colectó suelo no contaminado (Gleysol) de la capa superficial (0-30 cm) ubicado en Ejido Blasillo 4ta Sección, Huimanguillo, Tabasco, México (18° 05' 08.4" N y 93° 56' 50" O). El suelo se secó bajo sombra, se molió y tamizó (malla de 5 mm). Las características físicas y químicas del suelo se muestran en el Cuadro 1. Los rizomas de *L. hexandra* se colectaron de un humedal afectado por derrame crónico de petróleo, ubicado a dos kilómetros al suroeste

del Complejo Procesador de Gas “La Venta”. El cultivo de plántulas *L. hexandra* fue similar al procedimiento utilizado por Orocio-Carrillo *et al*⁽¹³⁾.

Cuadro 1: Características físicas y químicas del suelo y petróleo

Características del suelo										
Textura	Arena	Limo	Arcilla	pH	MO	Nt	SO ₄ ²⁻	PO ₄ ⁻	CE	CIC
Franco arcilloso arenoso	45.2%	20.7%	34.1%	5.5	17.2%	0.66%	45 mg kg ⁻¹	85 mg kg ⁻¹	0.9 dS m ⁻¹	9.6 cmol kg ⁻¹
Características del petróleo^a										
Gravedad API	Azufre	Facciones								
32°	1.8%	Saturados	Aromáticos	Asfaltenos						
		61.2%	24.8%	Resinas	14%					

MO= materia orgánica; Nt= nitrógeno total; CE= conductividad eléctrica; CIC= capacidad de intercambio catiónico. ^aFracciones de hidrocarburos utilizando el método soxhlet y gravimetría.

Contaminación del suelo y diseño experimental

El petróleo crudo de 32° API se obtuvo de la Batería 2 Campo Ogarrío en Huimanguillo, Tabasco, México. El experimento se realizó con un diseño completamente al azar y arreglo factorial 4x2: cuatro concentraciones de PC [0 (testigo), 30, 60 y 90 g kg⁻¹ PS (peso seco)] y dos tiempos de exposición de *L. hexandra* al PC (día 180 y 360). Un total de ocho tratamientos con cuatro repeticiones mantenidas en lugares aleatorios en un microtúnel con temperatura promedio de 29 ± 6 °C y humedad a capacidad de campo 32 ± 5 %. La unidad experimental fue un contenedor de plástico con 4 kg de suelo seco y una planta de *L. hexandra*.

Población de rizobacterias

Se sembraron bacterias *Azospirillum* en un medio de cultivo agar rojo congo⁽²⁹⁾, bacterias *Azotobacter* en agar Asby⁽²⁹⁾, y bacterias *Pseudomonas* en medio de cultivo agar cetrimida + glicerol⁽³⁰⁾. Los cultivos se incubaron a 28 °C por 72 h y los recuentos se expresaron como unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de suelo.

Composición química de *L. hexandra*

Se realizaron muestreos destructivos de tejido vegetal (hojas y tallos) de plantas jóvenes que emergieron de la planta principal de *L. hexandra* que tenían 180 y 360 días de crecimiento,

se secaron en estufa de aire forzado a 60 °C durante 72 h y se molieron para el análisis de proteína cruda, fibra detergente neutro, fibra detergente ácido y lignina^(31,32).

Análisis de producción

La evaluación de plantas jóvenes en el macollo, materia seca aérea y materia seca radical fue similar al procedimiento utilizado por Orocio-Carrillo *et al*⁽³³⁾.

Análisis estadísticos

Los datos recopilados de todas las variables se sometieron al análisis de varianza y prueba de comparación múltiple de medias por el método de Tukey ($P \leq 0.05$) y correlación bivariada de Pearson mediante el uso del programa estadístico SAS v.9.4⁽³⁴⁾.

Resultados

Población de rizobacterias

En el Cuadro 2 se muestran los cambios en los valores medios de los tres grupos de rizobacterias por efecto del petróleo crudo en el suelo y tiempo de exposición. La mayor densidad de *Azotobacter* [438 y 132 x 10³ UFC g⁻¹ rizosfera seca (r.s.)], se encontró en suelo con 90 g kg⁻¹ de petróleo crudo, al día 180 y 360 respectivamente, 106.6 y 40.4 % superior al testigo. Sin embargo, las densidades de *Azospirillum* y *Pseudomonas* disminuyeron. En general el efecto de la contaminación con petróleo crudo aumenta en la población de *Azotobacter* (81.7 %) y disminuye en *Azospirillum* y *Pseudomonas* un 36 y 47.7 % respectivamente. Sin embargo, el efecto del tiempo de evaluación indujo una respuesta positiva en la densidad de *Azospirillum* y *Pseudomonas*, siendo 1.9 y 23.9 veces mayor al día 360 respecto al día 180.

Cuadro 2: Cambios en *Azospirillum*, *Azotobacter* y *Pseudomonas* en la rizosfera de *L. hexandra* expuesta a petróleo crudo al día 180 y 360

Tiempo/Petróleo crudo (g kg ⁻¹)	<i>Azospirillum</i> %	<i>Azotobacter</i> %		<i>Pseudomonas</i> %		
	10 ³ UFC g ⁻¹ r.s.			10 ¹ UFC g ⁻¹ r.s.		
<u>180 días</u>						
0	84 ^c		212 ^c		95 ^c	
30	67 ^d	-20.2	372 ^b	+75.5	58 ^c	-38.9
60	53 ^e	-36.9	482 ^a	+127.3	34 ^c	-64.2
90	21 ^f	-75.0	438 ^a	+106.6	74 ^c	-22.1
<u>360 días</u>						
0	144 ^a		94 ^e		2,427 ^a	
30	101 ^b	-29.9	85 ^e	-9.6	2,335 ^a	-3.8
60	102 ^b	-29.2	159 ^d	+69.1	572 ^{bc}	-76.4
90	95	-34.0	132 ^{de}	+40.4	889 ^b	-63.4
<u>Contaminación</u>						
Sin	114*		153		1,261*	
Con	73	-36	278*	+81.7	660	-47.7
<u>Tiempo (días)</u>						
180	56		376*		65	
360	110*		117		1,556*	

El símbolo % (+) representa un aumento y % (-) una disminución de *Azospirillum*, *Azotobacter* y *Pseudomonas* al día 180 y 360, respecto de los valores del tratamiento testigo (0 g kg⁻¹ de petróleo crudo).

^{abcde} Dentro de columna letras minúsculas diferentes indican valores diferentes ($P \leq 0.05$, $n=4$).

*Estadísticamente mayor.

Composición química de *L. hexandra*

La Figura 1 muestra la tendencia en el contenido de proteína cruda en materia seca aérea de plantas jóvenes de *L. hexandra* por efecto de la dosis de petróleo crudo y tiempo de exposición. El mayor contenido de proteína cruda al día 180 (9.1 %) y 360 (8.4 %) se registró en la concentración de 90 g kg⁻¹ de petróleo crudo, se incrementó 1 y 1.5 % más con respecto

al testigo (Figura 1a). Por otro lado, el tiempo de evaluación redujo de un 8.4 a 7.5 % a medida que avanzó la edad de la planta de 180 a 360 días (Figura 1b).

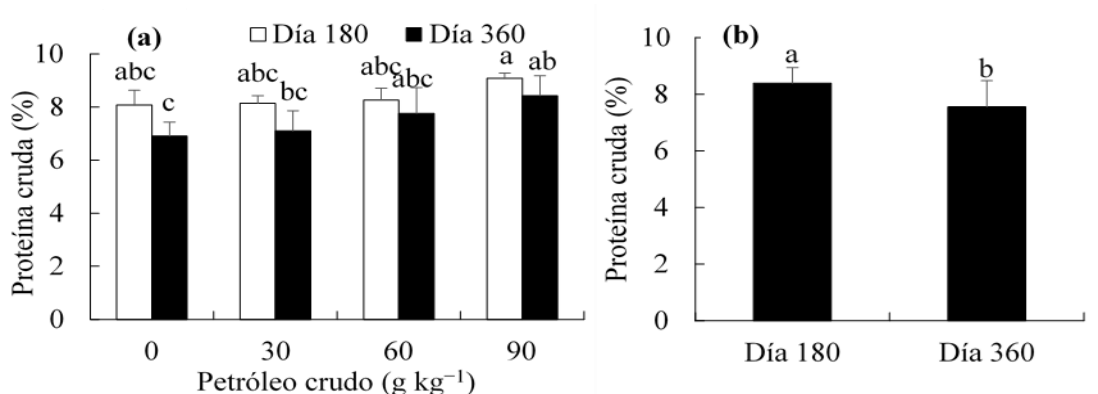
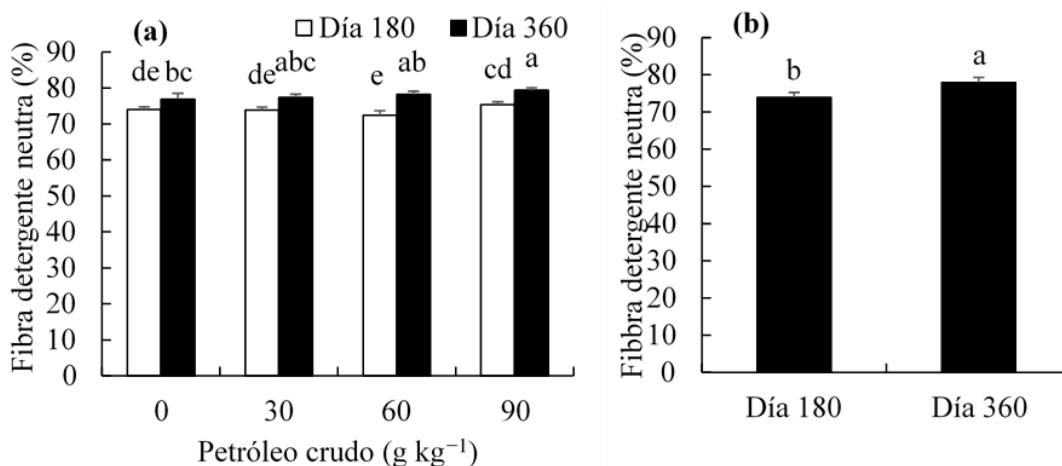


Figura 1: Efecto del petróleo crudo en el suelo (a) y tiempo de exposición (b) sobre el porcentaje de proteína cruda en *L. hexandra*
^{abc} Letras distintas indican valores diferentes ($P < 0.05$, $n=4$).

El comportamiento en fibra detergente neutra se muestra en la Figura 2. Se observaron diferencias significativas entre la dosis de petróleo y tiempo de evaluación ($P \leq 0.05$). La dosis de 90 g kg⁻¹ de petróleo crudo indujo el mayor contenido de fibra detergente neutra al día 180 (75.3 %) y 360 (79.3 %), alcanzando un incremento de 1.3 y 2.5 % más con respecto al testigo (Figura 2a). Con respecto al tiempo de evaluación se incrementó de 73.9 a 77.9 % a medida que aumentaba la madurez de la planta de 180 a 360 días (Figura 2b).

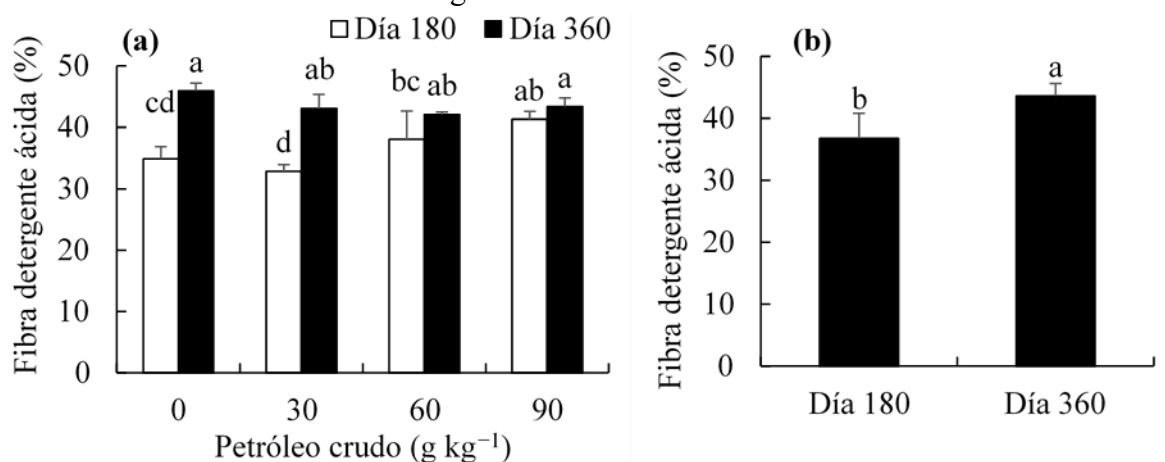
Figura 2: Efecto del petróleo crudo en el suelo (a) y tiempo de exposición sobre la fibra detergente neutra en *L. hexandra*



^{abcde} Letras distintas indican valores diferentes ($P \leq 0.05$, $n=4$).

La Figura 3 muestra el comportamiento en el contenido de fibra detergente ácida. Al día 180 se observa que la dosis de petróleo crudo estimula la fibra detergente ácida, siendo mayor (41.3 %) en suelo con 90 g kg⁻¹ de petróleo crudo, aumentándose 6.4 % con respecto al testigo (Figura 3a). Con respecto al día 360 las concentraciones de petróleo crudo presentaron respuesta estadísticamente similar al testigo. Con respecto al tiempo de evaluación se estimuló la fibra detergente ácida de 36.8 a 43.6 % al día 180 y 360 respectivamente (Figura 3b).

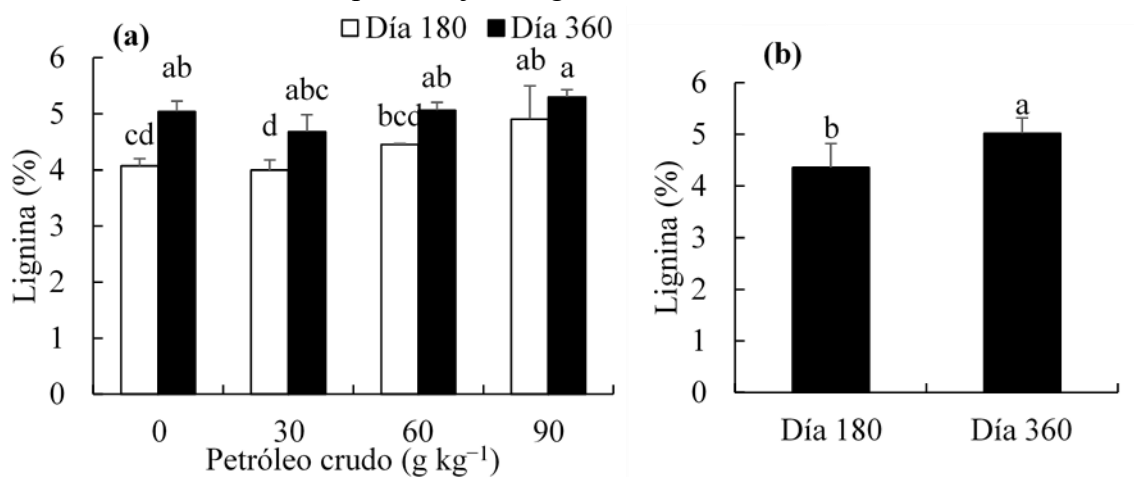
Figura 3: Efecto del petróleo crudo en el suelo (a) y tiempo de exposición (b) sobre la fibra detergente ácida en *L. hexandra*



^{abcd} Letras distintas indican valores diferentes ($P \leq 0.05$, $n=4$).

El efecto del petróleo crudo sobre en el contenido de lignina en *L. hexandra* cosechado a diferente edad mostraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) (Figura 4). Al día 180 se observa que altas concentraciones de petróleo estimula la lignina, siendo mayor (4.9 %) en suelo con 90 g kg⁻¹ de petróleo crudo, incrementándose 1 % con respecto al testigo (Figura 4a). Por otro lado, el efecto del tiempo de evaluación indujo una respuesta positiva, alcanzando un incremento de 4.3 a 5 % a medida que avanzó la edad de la planta (Figura 4b).

Figura 4: Efecto del petróleo crudo en el suelo (a) y tiempo de exposición (b) sobre el porcentaje de lignina en *L. hexandra*



^{abcd} Letras distintas indican valores diferentes ($P \leq 0.05$, $n=4$).

Producción de *L. hexandra*

Los efectos sobre las medias en plantas jóvenes en el macollo, materia seca aérea y materia seca radical de *L. hexandra* presentaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) por efecto de dosis de petróleo crudo como en tiempo de evaluación (Cuadro 3). La exposición a 90 g kg⁻¹ de petróleo crudo promovió un aumento de hasta 300 y 89.3 % de plantas jóvenes en el macollo comparación al suelo testigo al día 180 y 360 respectivamente. Los resultados de materia seca radical aumentaron hasta un 203.7 y 169.7 % al día 180 y 360 respectivamente en suelo más contaminado con respecto al suelo testigo. Sin embargo, la producción de materia seca aérea del pasto disminuyó hasta un 25.9 y 18.9 % al día 180 y 360 con la dosis más alta. En general, el efecto de la contaminación con petróleo crudo en plantas jóvenes en el macollo aumenta un 78.6 % y materia seca radical 135.1 %. Sin embargo, disminuye un 13.4 % en materia seca aérea, aunque esta reducción fue estadísticamente igual al suelo testigo. El efecto del tiempo de evaluación indujo una respuesta positiva en plantas jóvenes en el macollo, materia seca aérea y materia seca radical; siendo 210.8, 378.7 y 545 % mayor al día 360 respecto al día 180.

Cuadro 3: Cambios en plantas jóvenes en el macollo, materia seca aérea y materia seca radical de *L. hexandra* expuesta a petróleo crudo al día 180 y 360

Tiempo/ Petróleo crudo (g kg ⁻¹)	Plantas jóvenes en el macollo		Materia seca aérea (g)		Materia seca radical (g)	
		%		%		%
<u>180 días</u>						
0	27±2.4 ^f		43.5±2.3 ^d		2.7±0.2 ^d	
30	52±5.1 ^e	+92.6	42.2±2.5 ^d	-2.9	6.2±0.3 ^d	+129.6
60	71±12.1 ^e	+163	36.2±4.2 ^d	-16.8	7.0±1.4 ^d	+159.3
90	108±4.2 ^d	+300	32.2±5.3 ^d	-25.9	8.2±0.3 ^d	+203.7
<u>360 días</u>						
0	140±4.3 ^c		204.2±8.1 ^a		19.5±2.1 ^c	
30	191±6.9 ^b	+36.4	188.6±9.3 ^b	-7.6	39.2±3.8 ^b	+101
60	210±8.7 ^b	+50	178.7±4.9	-12.5	43.5±5.3 ^b	+123.1
90	265±17.8 ^a	+89.3	^{bc}	-18.9	52.6±2.8 ^a	+169.7
<u>Contaminación</u>			165.6±7.7 ^c			
Sin	84				11.1	
Con	150*	+78.6	123.9*	-13.4	26.1*	+135.1
<u>Tiempo (días)</u>			107.3*			
180	65				6.0	
360	202*	+210.8	38.5	+378.7	38.7*	+545
			184.3*			

El símbolo % (+) representa un aumento y % (-) una disminución de plantas jóvenes en el macollo materia seca aérea y materia seca radical al día 180 y 360, respecto de los valores del tratamiento testigo (0 g kg⁻¹ de petróleo crudo).

^{abcde} Dentro de cada columna letras minúsculas distintas son diferentes ($P \leq 0.05$, $n=4$). *Estadísticamente mayor.

En el Cuadro 4 se presentan las correlaciones de las variables.

Discusión

Población de rizobacterias

Reportes indican que la rizosfera de los pastos usados para la eliminación de hidrocarburos totales del petróleo en suelos contaminados con petróleo crudo hospeda una intensa actividad microbiana, incluidas las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal^(35,36). El aumento significativo de la población de *Azotobacter* (0.361*) (Cuadro 2 y 4) en la rizosfera de *L. hexandra* es similar a lo informado en otros estudios, evaluando al mismo pasto expuesto

entre 60-180 g kg⁻¹ de hidrocarburos totales del petróleo⁽²⁰⁾ y *Echinochloa polystachya* K. expuesta a 65.89 g kg⁻¹ de hidrocarburos totales del petróleo⁽³⁷⁾. El aumento de la población de *Azotobacter* podría deberse a la adaptación de la bacteria mediante la secreción de enzimas extracelulares esenciales para la degradación inicial de sustratos de alto peso molecular⁽³⁸⁾ como los hidrocarburos del petróleo. De igual forma, puede ser una adaptación a una reducción en la disponibilidad de nutrientes esenciales como el nitrógeno, debido a las propiedades del petróleo crudo, que tiende a hacer aglomeraciones en el suelo^(4;5). Además, se ha demostrado que en condiciones de estrés las plantas aumentan la exudación de las raíces⁽³⁹⁾, que se convierten en una fuente de nutrientes y sustancias estimulantes para el crecimiento de microorganismos⁽⁴⁰⁾. No obstante, no todos los microorganismos pueden adaptarse de manera rápida, probablemente a causa de los hidrocarburos tóxicos del petróleo crudo, que dificultan el crecimiento y la supervivencia de algunas especies microbianas⁽⁴¹⁾. Además, la presencia de petróleo puede modificar las propiedades fisicoquímicas del suelo⁽⁴⁾, generando condiciones poco favorables para los microorganismos⁽⁴²⁾. En contraste, el estudio actual reveló que la población de *Azospirillum* y *Pseudomonas* disminuyeron por aumento del petróleo crudo, lo que demuestra los efectos negativos de este contaminante, mientras tanto, con la extensión del tiempo, se promovió la estimulación de ambas poblaciones (0.778**, 0.767**), lo que indica que las bacterias necesitan algún tiempo para aclimatarse y lograr un crecimiento significativo. Resultados similares fueron reportados en otras investigaciones^(1,7), donde encontraron un aumento significativo de rizobacterias conforme el transcurso del tiempo, en la rizosfera de *L. hexandra* y *Urochloa brizantha* Hochst respectivamente expuestas a petróleo.

Composición química de *L. hexandra*

El presente estudio mostró aumentos en el contenido de proteína cruda en los brotes de *L. hexandra* plantada en suelo con petróleo crudo (0.551**) en relación al testigo. Al día 180 y 360 en dosis de 60 y 90 g kg⁻¹ de petróleo crudo, la tendencia es a incrementar con respecto al testigo, mientras que a dosis de 30 g kg⁻¹ no hubo diferencia estadística (Figura 1a). Efecto similar fue reportado por Orocio-Carrillo *et al*⁽¹³⁾, al encontrar un incremento de proteína cruda en *L. hexandra* expuesto a 102 g kg⁻¹ de petróleo crudo. Así mismo, se informa^(43,44) aumento de proteína en *Simmondsia chinensis* L. y *Vigna unguiculata* L. respectivamente por efecto del petróleo crudo en suelo. Roa *et al*⁽⁴⁵⁾ reportan un aumento en la concentración de proteína en *Triticum aestivum* L. por efecto de la fertilización con azufre. Por lo tanto, el aumento de proteína en este estudio podría deberse al contenido de nitrógeno y azufre presentes en el petróleo crudo⁽⁴⁶⁾. Por otro lado, la proteína cruda se diluye a medida que aumenta la edad del pasto (-0.497**). Se menciona⁽⁴⁷⁾ que, el incremento en la edad de los pastos, resulta en la disminución de proteína, al aumentar la producción de materia seca. Al respecto, en este estudio se encontró relación negativa y altamente significativa entre proteína

cruda y materia seca aérea (-0.564^{**}). A medida que aumenta el estado de madurez de las gramíneas crece el contenido de los carbohidratos estructurales y lignina, mientras que el contenido de proteína disminuye⁽⁴⁸⁾.

El presente estudio muestra que la fibra detergente neutra al día 180 no se presentaron cambios en suelos contaminados con respecto al testigo, sin embargo, al día 360, la tendencia fue a incrementar muy ligeramente en dosis altas de petróleo crudo (60 y 90 g kg⁻¹), pero a 30 g kg⁻¹ no hubo diferencia estadística en relación al testigo. Por otro lado, la fibra detergente neutra aumentó por efecto del tiempo de evaluación (0.832^{**}). Tendencias similares fueron reportados por otros investigadores^(49,50), quienes evaluaron los porcentajes de fibra detergente neutro del pasto maralfalfa a diferentes edades de cosecha y observaron un incremento del 5.5 y 17.9 % respectivamente en su concentración entre el día 30 y 167 . También se ha mencionado⁽⁵¹⁾ que conforme aumenta la maduración del forraje aumenta las concentraciones de fibra detergente neutro en tallos y hojas, disminuyendo el consumo voluntario de los forrajes.

La concentración de fibra detergente ácido realizado en este estudio muestra que al día 180 se incrementó en dosis alta de petróleo (60 y 90 g kg⁻¹) respecto al testigo, pero a dosis de 30 g kg⁻¹ la respuesta no fue estadísticamente diferente al testigo. Al día 360, la tendencia fue a reducir en dosis de 60 y 90 g kg⁻¹, mientras que a dosis de 30 g kg⁻¹ no hubo diferencias estadísticas en relación al testigo. Por otro lado, la concentración de fibra detergente ácido aumentó conforme la edad del pasto (0.741^{**}). Al respecto, valores similares fueron reportado por Schnellmann *et al*⁽⁵²⁾ al evaluar la calidad nutricional de *Megathyrus maximus* Jacq, registraron valores de 29.3 % al día 90 y 34.4 % al día 180 . De igual manera, investigadores⁽⁵⁰⁾ encontraron un incremento 40.36 % al día 33 y 58.5 % al día 180 al evaluar composición química de pasto *Cenchrus* sp. Se reporta que la fibra detergente ácido es un componente importante que regula la calidad del forraje, y se relaciona positivamente con la edad o etapa de desarrollo del cultivo, declinando la calidad del forraje porque la fibra se convierte en un componente predominante⁽⁵³⁾.

En el presente estudio, una explicación al incremento en dosis altas de petróleo crudo, puede ser el mecanismo del ajuste osmótico que propicia la acumulación de solutos compatibles, que son compuestos orgánicos que no interfieren en el metabolismo celular, incluso en altas concentraciones, y pueden actuar como antioxidantes para minimizar el impacto del estrés abiótico en planta⁽²⁴⁾. Existen diversas investigaciones que muestran que la lignina se ve incrementada en respuesta a diversos estreses ambientales^(26,27), desempeñando una función en la adaptación de las plantas a su entorno⁽⁵⁴⁾. Por otro lado, a medida que aumenta la edad de madurez de la planta se estimula el contenido de lignina (0.661^{**}). Rosales y Pinzón⁽⁴⁸⁾ mencionan que, al aumentar el estado de madurez del pasto, crece la proporción de los

componentes de la pared celular entre los que se encuentra la lignina, disminuyendo la digestibilidad del pasto.

Producción de *L. hexandra*

En los pastos, se ha informado que la adición de petróleo crudo al suelo induce una disminución significativa de la materia seca vegetal⁽⁵⁵⁾. Se destaca que al día 180, la producción de materia seca aérea solo se redujo un 2.9 % a una concentración de 30 g kg⁻¹ de petróleo crudo, respecto al testigo, demostrando la gran tolerancia del pasto en estas condiciones, sin embargo, conforme aumenta la dosis de petróleo crudo en el suelo (60 y 90 g kg⁻¹) aumenta el porcentaje de reducción tanto al día 180 y 360, respecto al testigo. El impacto negativo del petróleo crudo en materia seca aérea de *L. hexandra* también ha sido reportado^(13,56). El petróleo crudo conduce a cambios negativos en las propiedades del suelo como es la reducción de la capacidad de absorber y retener humedad, repelencia al agua y aireación insuficiente del suelo^(57,58), lo que en consecuencia dificulta aún más el crecimiento de las plantas. Por otro lado, la producción plantas jóvenes en el macollo y materia seca radical se estimularon (0.465**, 0.362*). Este comportamiento también fue mencionado en otras investigaciones^(13,56). El aumento de estas variables podría indicar una estrategia de *L. hexandra* para sobrevivir y adaptarse a la contaminación del suelo por petróleo crudo. El incremento de plantas jóvenes en el macollo y materia seca radical en suelos con petróleo podría explicarse por el aumento en el contenido de carbono orgánico en el suelo producto de la degradación del petróleo crudo⁽¹⁸⁾. Así mismo, el incremento de raíces podría deberse a una respuesta de reforzar los tejidos radiculares para limitar el estrés por deficiencia de nutrientes del suelo inducidos por el petróleo crudo⁽⁵⁾. Estudios han reportado incremento de la biomasa de raíces en suelos tratados con hidrocarburos del petróleo⁽²²⁾.

Conclusiones e implicaciones

El efecto de altas dosis de petróleo crudo en suelo induce en la rizosfera de *L. hexandra* alta poblaciones de bacterias del grupo *Azotobacter*, sin embargo, ocasionó la inhibición de *Azospirillum* y *Pseudomonas*. Por otro lado, el petróleo crudo se encuentra correlacionado positivamente con la síntesis de proteína cruda y lignina, desempeñando una función en la adaptación del pasto a su entorno. Así mismo, altas dosis de petróleo crudo inducen una respuesta positiva en la producción de plantas jóvenes en el macollo y materia seca radical, lo que indica una estrategia desarrollada por el pasto para sobrevivir y adaptarse a la contaminación por petróleo. Sin embargo, la composición química del pasto se vio afectada por la edad de cosecha, en la que se incrementaron el porcentaje de fibra detergente neutro, fibra detergente ácido y lignina, mientras que la proteína cruda se redujo en su concentración. Por lo tanto, aunque el pasto logra adaptarse al estrés inducido por el petróleo crudo, su

contenido de proteína y, por ende, su valor nutricional se ven afectados, lo que puede perjudicar a los ganaderos y causar un deterioro a largo plazo del predio afectado.

Agradecimientos

José Alberto Orocio Carrillo agradece al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) de México por la beca No. 813712 otorgada para realizar sus estudios de Doctorado en Ciencias Agrícolas en el Trópico.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de interés.

Literatura citada:

1. Alarcón A, García-Díaz M, Hernández-Cuevas LV, Esquivel-Cote R, Ferrera-Cerrato R, Almaraz-Suarez JJ, *et al.* Impact of crude oil on functional groups of culturable bacteria and colonization of symbiotic microorganisms in the *Clitoria-Brachiaria* rhizosphere grown in mesocosms. *Acta Biol Colomb* 2019;24(2):343-353.
2. Zawierucha I, Malina G, Herman B, Rychter P, Biczak R, Pawlowska B, *et al.* Ecotoxicity and bioremediation potential assessment of soil from oil refinery station area. *J Environ Health Sci Eng* 2022;20:337-346.
3. Sattar S, Hussain R, Shah SM, Bibi S, Ahmad SR, Shahzad A, *et al.* Composition, impacts, and removal of liquid petroleum waste through bioremediation as an alternative clean-up technology: A review. *Heliyon* 2022;8:e11101.
4. Devatha CO, Vishnu VA, Chandra RJP. Investigation of physical and chemical characteristics on soil due to crude oil contamination and its remediation. *Appl Water Sci* 2019;9:89.
5. Correa HS, Blum CT, Galvão F, Maranhão LT. Effects of oil contamination on plant growth and development: a review. *Environ Sci Pollut Res Int* 2022;29:43501-43515.
6. Adams RH, Zavala-Cruz J, Morales-García F. Concentración residual de hidrocarburos en suelo del trópico. II: Afectación a la fertilidad y su recuperación. *Interciencia* 2008;33(7):483-489.
7. Rivera-Cruz MC, Trujillo-Narcía A, Trujillo-Rivera EA, Arias-Trinidad A, Remedios Mendoza-López MR. Natural attenuation of weathered oil using aquatic plants in a farm in Southeast Mexico. *Int J Phytoremediation* 2016;18(9):877-884.

8. Vegetti AC. Caracterización de los sistemas de ramificación en especies de *Oryzae* (Poaceae). *Candollea* 2002;57(2):251-260.
9. Aparicio R, González-Ronquillo M, Torres R, Astudillo L, Córdova L, Carrasquel J. Degradabilidad de los pastos lambedora (*Leersia hexandra*) y paja de agua (*Hymenachne amplexicaulis*) en cuatro épocas del año de una sabana inundable del estado Apure, Venezuela. *Zootec Tropic* 2007;25(3):225-228.
10. Neumann G, Römheld V. Rhizosphere chemistry in relation to plant nutrition. In: Marschner P editor. *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. 3rd ed. San Diego: Academic Press; 2012:347-368.
11. Panchenko L, Muratova A, Dubrovskaya E, Golubev S, Turkovskaya O. Dynamics of natural revegetation of hydrocarbon-contaminated soil and remediation potential of indigenous plant species in the steppe zone of the southern Volga Uplands. *Environ Sci Pollut Res* 2018;25:3260-3274.
12. Correa-García S, Pande P, Séguin A, St-Arnaud M, Yergeau E. Rhizoremediation of petroleum hydrocarbons: a model system for plant microbiome manipulation. *Microb Biotechnol* 2018;11:819-832.
13. Orocio-Carrillo JA, Rivera-Cruz MC, Aranda-Ibañez EM, Trujillo-Narcía A, Hernández-Galvez G, Mendoza-López MR. Hormesis under oil-induced stress in *Leersia hexandra* Sw. used as phytoremediator in clay soils of the Mexican humid tropic. *Ecotoxicology* 2019;28:1063-1074.
14. Minuț M, Diaconu M, Roșca M, Cozma P, Bulgariu L, Gavrilesco M. Screening of *Azotobacter*, *Bacillus* and *Pseudomonas* species as plant growth-promoting bacteria. *Processes* 2022;11:80.
15. Graj W, Lisiecki P, Szulc A, Chrzanowski Ł, Wojtera-Kwiczor J. Bioaugmentation with petroleum-degrading consortia has a selective growth-promoting impact on crop plants germinated in diesel oil-contaminated soil. *Water Air Soil Pollut* 2013;224:1676.
16. Kuiper I, Lagendijk EL, Bloemberg GV, Lugtenberg BJJ. Rhizoremediation: A beneficial plant-microbe interaction. *Mol Plant Microbe Interact* 2004;17(1):6-15.
17. Arias-Trinidad A, Rivera-Cruz MC, Roldán-Garrigós A, Aceves-Navarro LA, Quintero-Lizaola R, Hernández-Guzmán J. Uso de *Leersia hexandra* (Poaceae) en la fitorremediación de suelos contaminados con petróleo fresco e intemperizado. *Rev Biol Trop* 2017;65(1):21-30.

18. Chávez-Álvarez K, Rivera-Cruz MC, Aceves-Navarro LA, Trujillo-Narcía A, García-de la Cruz R, Vega-López A. Physiological and microbiological hormesis in sedge *Eleocharis palustris* induced by crude oil in phytoremediation of flooded clay soil. *Ecotoxicology* 2022;31(8):1241-1253.
19. Khan S, Afzal M, Iqbal S, Khan QM. Plant-bacteria partnerships for the remediation of hydrocarbon contaminated soils. In: *Chemosphere*. Elsevier Ltd. 2013;1317-1332.
20. Silva PVC, Plucani AF, Ané JM, Stacey G. Diazotrophic bacteria and their mechanisms to interact and benefit cereals. *Curr Rev* 2021;34(5):491-498.
21. Kochhar SL, Kaur GS. *Plant physiology: Theory and applications*. 2nd ed. Cambridge University Press; 2020.
22. Hoang SA, Lamb D, Seshadri B, Sarkar B, Cheng Y, Wang L, *et al*. Petroleum hydrocarbon rhizoremediation and soil microbial activity improvement via cluster root formation by wild proteaceae plant species. *Chemosphere* 2021;275:130135.
23. Skrypnik L, Maslennikov P, Novikova A, Kozhikin M. Effect of crude oil on growth, oxidative stress and response of antioxidative system of two rye (*Secale cereale* L.) varieties. *Plants* 2021;10(1):157.
24. Shinozaki K, Uemura M, Bailey-Serres J, Bray AE, Weretilnyk E. Responses to abiotic stress. In: Buchanan B, *et al*, editors. *Biochemistry and molecular biology of plants*. 2nd ed. Wiley and Blackwell, Chichester; 2015:1051-1100.
25. Correa HS, Maranhão LT. The potential association of *Echinochloa polystachya* (Kunth) Hitchc. with bacterial consortium for petroleum degradation in contaminated soil. *Appl Sci* 2021;3:80.
26. Habermann E, Dias OEA, Contin DR, Delvecchio G, Viciado DO, de Moraes MA, *et al*. Warming and water deficit impact leaf photosynthesis and decrease forage quality and digestibility of a C4 tropical grass. *Physiol Plant* 2019;165(2):383-402.
27. Lee MA, Davis AP, Chagunda MGG, Manning P. Forage quality declines with rising temperatures, with implications for livestock production and methane emissions. *Biogeosciences* 2017;14:1403-1417.
28. Dumont B, Andueza D, Niderkorn V, Lüscher A, Porqueddu C, Picon-Cochard C. A meta-analysis of climate change effects on forage quality in grasslands: specificities of mountain and Mediterranean areas. *Grass Forage Sci* 2015;70:239-254.
29. Döbereiner J, Marriell IE, Nery M. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Can J Microbiol* 1966;22:1464-1473.

30. Garrity GM, Bell JA, Lilburn T. Order IX. Pseudomonadales Orla-Jensen 1921, 270AL. In: Brenner DJ, *et al.* editors. 2nd ed. Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology. Boston, Springer; 2005:323-442.
31. AOAC. Official methods of analysis. 15th ed. Arlington, VA, USA: Association of Official Analytical Chemists. 1990.
32. Van Soest JP. Nitrogen metabolism. Nutritional ecology of the ruminant. 2nd ed. Cornell University Press: Ithaca, NY: Comstock Publishing Associates; 1994.
33. Orocio-Carrillo JA, Rivera-Cruz MC, Juárez-Maldonado A, Bautista-Muñoz CC, Trujillo-Narcía A, González-García Y, *et al.* Crude oil induces plant growth and antioxidant production in *Leersia hexandra* Sw. Plant Soil Environ 2024;70(2):72-83.
34. SAS. Institute. SAS. Statistic User's guides Statics. SAS Inst. Inc 2016.
35. Rodríguez-Rodríguez N, Rivera-Cruz MC, Trujillo-Narcía A, Almaráz-Suárez JJ, Salgado-García S. Spatial distribution of oil and biostimulation through the rhizosphere of *Leersia hexandra* in degraded soil. Water Air Soil Pollut 2016;227(9):319.
36. Uribe M, Peñuela GA, Pino NJ. *Megathyrus maximus* and *Brachiaria decumbens* improve soil characteristics and select promising rhizobacteria during rhizoremediation of petroleum hydrocarbons. Rhizosphere 2022;22:100517.
37. Rivera-Cruz MC. Flora y microflora rizosférica del pantano: indicadores de perturbación causada por petróleo e inundación. Agroteología 2011;5:12-15.
38. Badalucco L, Kuikman PJ. Mineralization and Immobilization in the Rhizosphere. In: Pinton R, *et al.*, editors. The rhizosphere. Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface. United States of America: Marcel Dekker AG; 2001:159-196.
39. Xie X, Weiss DJ, Weng B, Liu J, Lu H, Yan C. The short-term effect of cadmium on low molecular weight organic acid and amino acid exudation from mangrove (*Kandelia obovata* (S., L.) Yong) roots. Environ Sci Pollut Res 2013;20:997-1008.
40. Zhao M, Zhao J, Yuan J, Hale L, Wen T, Huang Q, *et al.* Root exudates drive soil-microbe-nutrient feedbacks in response to plant growth. Plant Cell Environ 2021;44(2):613-628.
41. Huang L, Ye J, Jiang K, Wang Y, Li Y. Oil contamination drives the transformation of soil microbial communities: Co-occurrence pattern, metabolic enzymes and culturable hydrocarbon-degrading bacteria. Ecotoxicol Environ Saf 2021;225:112740.

42. Bidja AMT, Chen G, Chen Z, Zheng X, Li S, Li T, *et al.* Microbial diversity changes and enrichment of potential petroleum hydrocarbon degraders in crude oil-, diesel-, and gasoline-contaminated soil. *Biotech* 2020;10(2):42.
43. Al-Hawas GHS, Shukry WM, Azzoz MM, Al-Moaik RMS. The effect of sublethal concentrations of crude oil on the metabolism of Jojoba (*Simmondsia chinensis*) seedlings. *Int Res J Plant Sci* 2012;3(4):54-62.
44. Achuba FI, Ja-anni MO. Effect of abattoir waste water on metabolic and antioxidant profiles of cowpea seedlings grown in crude oil contaminated soil. *Int J Recycl Waste Agric* 2018;7:59-66.
45. Roa GA, Quintana-Obregón EA, González-Renteria M, Diaz DAR. Increasing wheat protein and yield through sulfur fertilization and its relationship with nitrogen. *Nitrogen* 2024;5(3):553-571.
46. Tissot BP, Welte DH. Petroleum formation and occurrence: composition of crude oils. 2nd ed. Berlin Heidelberg, New York: Springer-Verlag; 1984.
47. Juárez J, Bolaños ED, Vargas LM, Medina S, Martínez-Hernández PA. Curvas de dilución de la proteína en genotipos del pasto *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick. *Rev Cub Cien Agric* 2011;45(3):321-331.
48. Rosales RB, Pinzón SS. Limitaciones físicas y químicas de la digestibilidad de pastos tropicales y estrategias para aumentarla. *Rev Corp* 2005;6(1):69-82.
49. Palacios-Díaz MP, Mendoza-Grimón V, Fernández-Vera JR, Hernández-Moreno JM. Effects of defoliation and nitrogen uptake on forage nutritive values of *Pennisetum* sp. *J Anim Plant Sci* 2013;23(2):566-574.
50. Álvarez-Vázquez P, Mendoza-Pedroza SI, Cadena-Villegas S, Calzada-Marín JM, Ortega-Jiménez E, Vaquera-Huerta H, *et al.* Cambios en el rendimiento y composición química del pasto Maralfalfa (*Cenchrus* sp) a diferente edad. *Rev Fitotec Mex* 2021;44(4):729-736.
51. Grev AM, Wells MS, Catalano DN, Martinson KL, Jungers JM, Sheaffer CC. Stem and leaf forage nutritive value and morphology of reduced lignin alfalfa. *Agron J* 2020;112:406-417.
52. Schnellmann LP, Verdoljak JJO, Bernardis A, Martínez-González JC, Castillo-Rodríguez SP, Limas-Martínez AG. Cutting frequency and height on the quality of *Megathyrsus maximus* (cv. Gattón panic). *Cien Tecnol Agropecu* 2020;21(3):e1402.
53. Horrocks RD, Vallentine JF. Field-Harvesting hay. *Harvest Forag* 1999;245-277.

54. Han X, Zhao Y, Chen Y, Xu J, Jiang C, Wang X, *et al.* Lignin biosynthesis and accumulation in response to abiotic stresses in woody plants. *J Forestry Res* 2022;2:9.
55. Wei Y, Wang Y, Duan M, Han J, Li G. Growth tolerance and remediation potential of six plants in oil-polluted soil. *J Soil Sediment* 2019;19(11):3773-3785.
56. González-Moscoso M, Rivera-Cruz MC, Delgadillo-Martínez J, Lagunes-Espinosa LC. Growth analysis and plant production of *Leersia hexandra* Swartz in tropic wet Mexican in function on petroleum and surfactant. *Polibotánica* 2017;43:177-196.
57. Marín-García DC, Adams RH, Hernández-Barajas R. Effect of crude petroleum on water repellency in a clayey alluvial soil. *Int J Environ Sci Technol* 2016;13:55-64.
58. Stepanova AY, Gladkov EA, Osipova ES, Gladkova OV, Tereshonok DV. Bioremediation of soil from petroleum contamination. *Processes* 2022;10(6):1224.

Cuadro 4: Correlación de variables

Parámetro	Tiempo	PJM	MSA	MSR	PrC	FDN	FDA	Lignina	AZP	AZT	PSE
PC	NS	0.465**	NS	0.362*	0.551**	NS	NS	0.354*	-0.558**	0.361*	-0.372*
Tiempo		0.872**	0.987**	0.876**	-0.497**	0.832**	0.741**	0.661**	0.778**	-0.857**	0.767**
PJM			0.798**	0.966**	NS	0.860**	0.690**	0.739**	0.416*	-0.614**	0.485**
MSA				0.802**	-0.564**	0.789**	0.737**	0.632**	0.826**	-0.879**	0.829**
MSR					NS	0.828**	0.581**	0.656**	0.474**	-0.678**	0.454**
PrC						NS	NS	NS	-0.627**	0.519**	-0.641**
FDN							0.646**	0.668**	0.520**	-0.740**	0.576**
FDA								0.635**	0.466**	-0.530**	0.667**
Lignina									NS	-0.475**	0.369*
AZP										-0.861**	0.743**
AZT											-0.745**

PC= petróleo crudo; PJM= plantas jóvenes en el macollo; MSA= materia seca aérea; MSR= materia seca radical; PrC= proteína cruda; FDN= fibra detergente neutra; FDA= fibra detergente ácida; AZP= *Azospirillum*; AZT= *Azotobacter*; PSE= *Pseudomonas*.

* Significativo en los niveles $P \leq 0.05$. ** Altamente significativo en los niveles de $p \leq 0.01$. NS= no significativa.