

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



RESPUESTA DE PLANTAS DE TOMATE A LA APLICACIÓN DE  
HIDROCARBUROS SIMULANDO UN  
EVENTO DE CONTAMINACIÓN

**Tesis**

Que presenta ISELA DÍAZ LÓPEZ  
Como requisito parcial para obtener el Grado de:  
MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

Saltillo, Coahuila

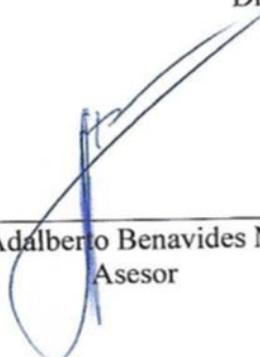
Noviembre 2019

RESPUESTA DE PLANTAS DE TOMATE A LA APLICACIÓN DE  
HIDROCARBUROS SIMULANDO UN EVENTO DE CONTAMINACIÓN

Tesis

Elaborada por **ISELA DÍAZ LÓPEZ** como requisito parcial para obtener el Grado de  
**MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA** con la supervisión y aprobación  
del Comité de Asesoría

Dra. Susana González Morales  
Asesor Principal



Dr. Adalberto Benavides Mendoza  
Asesor



Dr. Antonio Juárez Maldonado  
Asesor



Dra. América Berenice Morales Díaz  
Asesor



Dr. José Fernando Martel Valles  
Asesor



Dr. Marcelino Cabrera De la Fuente  
Subdirector de Postgrado

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo económico a través de la beca otorgada con el registro 860920.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por abrirme las puertas una vez más y seguir con mi formación académica.

A la Dra. Susana González Morales por sus enseñanzas, confianza y paciencia durante el trayecto del postgrado y en la revisión de esta tesis.

Al Dr. Adalberto Benavides Mendoza por su asesoría y apoyo en la realización de este proyecto.

Al Dr. José Fernando Martel Valles por su apoyo y por darme la oportunidad para formar parte de este proyecto de investigación.

Al Dr. Antonio Juárez Maldonado por su asesoría y revisión de esta tesis.

A la Dra. América Berenice Morales Díaz por su apoyo y revisión de esta tesis.

A los doctores Fabián, Mari Carmen y Julia Medrano por su asesoría y apoyo en los análisis de laboratorio.

A mis compañeras Eva y Clari por su amistad, compañía y los buenos ratos que compartimos durante este tiempo.

A todas las personas que de alguna manera ayudaron en la realización de este trabajo de investigación.

## DEDICATORIA

A mis padres (Josefa López López y Heraldo Díaz González) que han sido mi inspiración y mi fuerza en los días difíciles, gracias por todo lo que han dado por mí, por sus consejos, por su dedicación y porque siempre han creído en mi

A mis hermanas Anayeli y Elizabeth porque que a pesar de los momentos difíciles siempre tienen ese humor animarme y apoyarme incondicionalmente cuando más lo necesito, gracias a ustedes he aprendido mucho.

A toda mi familia ya que su apoyo moral siempre está presente cuando más lo necesito y por consentirme cuando estoy en casa.

A mi esposo Juan por creer en mí, gracias por darme ánimos, acompañarme y estar presente en los buenos y los malos momentos, por todo el amor, y porque me impulsas a seguir adelante y cumplir mis metas.  
¡Te amo!

## ÍNDICE GENERAL

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>III</b>
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>IV</b>
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	<b>VII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XI</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>3</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>3</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>3</b>
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	<b>4</b>
<b>HIDROCARBUROS</b> .....	<b>4</b>
<b>CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS HIDROCARBUROS DEL PETRÓLEO</b> .....	<b>4</b>
<b>COMPOSICIÓN DE LOS COMBUSTIBLES DERIVADOS DEL PETRÓLEO</b> .....	<b>5</b>
<b>CONTAMINACIÓN DE HIDROCARBUROS EN MÉXICO</b> .....	<b>8</b>
<b>BIODISPONIBILIDAD DE LOS HIDROCARBUROS</b> .....	<b>9</b>
<b>TECNOLOGÍAS PARA LA LIMPIEZA DE AMBIENTES CONTAMINADOS POR HIDROCARBUROS</b> .....	<b>10</b>
<b>EFFECTOS DE LOS HIDROCARBUROS EN LAS PLANTAS</b> .....	<b>10</b>
<b>MECANISMOS DE DEFENSA LAS PLANTAS FRENTE AL ESTRÉS ABIÓTICO</b> .....	<b>12</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>14</b>
<b>DESARROLLO DEL CULTIVO</b> .....	<b>14</b>
<b>APLICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS</b> .....	<b>14</b>
<b>VARIABLES AGRONÓMICAS</b> .....	<b>15</b>
<b>EVALUACIÓN DE CALIDAD DE FRUTOS</b> .....	<b>16</b>
<i>La acidez titulable (AT)</i> .....	<b>17</b>
<b>LICOPENO</b> .....	<b>17</b>
<b>CAPACIDAD ANTIOXIDANTE</b> .....	<b>18</b>
<b>MINERALES</b> .....	<b>18</b>
<b>ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES</b> .....	<b>19</b>
<i>Extracción de ARN por el método de Trizol</i> .....	<b>19</b>
<i>Cuantificación de ARN</i> .....	<b>20</b>
<i>Calidad del ARN</i> .....	<b>20</b>
<i>Tratamiento de muestras con DNAsa</i> .....	<b>21</b>
<i>Síntesis de c-DNA</i> .....	<b>21</b>
<i>Preparación de iniciadores</i> .....	<b>21</b>

<i>Solución de trabajo</i> .....	22
<i>Validación de genes</i> .....	22
<i>Cuantificación de la expresión de genes</i> .....	23
<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	<b>23</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>25</b>
<b>VARIABLES AGRONÓMICAS</b> .....	<b>25</b>
<b>CALIDAD DE FRUTOS</b> .....	<b>29</b>
<b>LICOPENO</b> .....	<b>29</b>
<b>CAPACIDAD ANTIOXIDANTE</b> .....	<b>30</b>
<b>MINERALES</b> .....	<b>32</b>
<b>ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES</b> .....	<b>39</b>
<i>Expresión del gen CAT</i> .....	40
<i>Expresión del gen SOD</i> .....	40
<i>Expresión del gen GPX</i> .....	40
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>44</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>45</b>

## LISTA DE CUADROS

<b>Tabla 1.</b> Hidrocarburos que se deben analizar en función del producto contaminante.....	7
<b>Tabla 2.</b> Fórmulas para calcular la concentración de ARN extraído de las muestras.....	20
<b>Tabla 3.</b> Secuencia de los iniciadores de los genes analizados.....	21
<b>Tabla 4.</b> Variables agronómicas de plantas de tomate en etapa de floración y fructificación.....	28
<b>Tabla 5.</b> Calidad de los frutos de plantas de tomate.....	30
<b>Tabla 6.</b> Capacidad antioxidante en hojas (etapa de floración y fructificación) y frutos de plantas de tomate.....	32
<b>Tabla 7.</b> Minerales en hojas de plantas de tomate en etapa de floración.....	36
<b>Tabla 8.</b> Minerales en hojas de tomate en etapa de fructificación.....	37
<b>Tabla 9.</b> Minerales en frutos de plantas de tomate.....	38

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cantidad de sitios contaminados por hidrocarburos en cada estado de México desde el año 2015 al 2019.....	8
<b>Figura 2.</b> Cantidad de sitios contaminados a nivel nacional causado por con hidrocarburos en el año 2018.....	9
<b>Figura 3.</b> Germinación de semillas de tomate y trasplante en macetas en el invernadero.....	14
<b>Figura 4.</b> Aplicación de los tratamientos en el sustrato de las plantas.....	15
<b>Figura 5.</b> Plantas de tomate en etapa de floración (a) y fructificación (b).....	16
<b>Figura 6.</b> Frutos recolectados para evaluación de los parámetros de calidad.....	16
<b>Figura 7.</b> Extracción de licopeno de los frutos por sonicación.....	17
<b>Figura 8.</b> Digestión de muestras para la determinación de minerales (a) y análisis por el método de micro Kjeldahl para nitrógeno (b).....	19
<b>Figura 9.</b> Expresión de genes de CAT (a), SOD (b) y GPX (c) en hojas de tomate.....	39
<b>Figura 10.</b> Expresión del gen CAT en hojas de tomate. Las barras representan el error estándar $\pm$ de la media y la línea de referencia representa el valor constante del testigo.....	42
<b>Figura 11.</b> Expresión del gen SOD en hojas de tomate. Las barras representan el error estándar $\pm$ de la media y la línea de referencia representa el valor constante del testigo.....	42
<b>Figura 12.</b> Expresión del gen GPX en hojas de tomate. Las barras representan el error estándar $\pm$ de la media.....	43

## **RESUMEN**

**RESPUESTA DE PLANTAS DE TOMATE A LA APLICACIÓN DE  
HIDROCARBUROS SIMULANDO UN EVENTO DE CONTAMINACIÓN**

**POR**

**I SELA DÍAZ LÓPEZ  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN HORTICULTURA**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DRA. SUSANA GONZÁLEZ MORALES – ASESOR**

Saltillo, Coahuila

Noviembre 2019

La contaminación del agua y suelo agrícola por hidrocarburos es un tema que ha ido ganado importancia, ya que como cualquier agente estresante estos generan daños en las plantas, es por eso que en este trabajo se estudiaron las respuesta de plantas de tomate bajo la contaminación de diferentes hidrocarburos como son la gasolina (80 y 90 mg L<sup>-1</sup>) el diésel (26 y 28 mg L<sup>-1</sup>) y una combinación de ambos (20 mg L<sup>-1</sup> cada uno), para evaluar parámetros agronómicos, bioquímicos y transcripcionales de las plantas de tomate, así como la calidad de los frutos. Se realizó la aplicación diaria de los tratamientos directo al sustrato de las plantas junto con el último riego del día. Los resultados mostraron un 12.5% de muertes en las plantas con la aplicación de diésel a 28 mg L<sup>-1</sup> y de 6.25% con gasolina a 90 mg L<sup>-1</sup>. La cantidad de los frutos disminuyó con la mayoría de los tratamientos, excepto con la gasolina y diésel a 20 mg L<sup>-1</sup>, mientras que el peso y calidad de los frutos no se vio afectada con los tratamientos aplicados. Las concentraciones de licopeno aumentaron significativamente con el tratamiento de gasolina y diésel a 20 mg L<sup>-1</sup> y con las dos concentraciones de diésel (26 y 28 mg L<sup>-1</sup>), siendo el diésel a 26 mg L<sup>-1</sup> donde se reflejó una mayor concentración de este metabolito. La capacidad antioxidante aumento en mayor cantidad con los tratamientos de gasolina en la etapa de floración mientras que en la de fructificación fue con los tratamientos de diésel. En cuanto al contenido mineral de las hojas en la etapa de floración se observó disminución en el Mn y Mo con los tratamientos de gasolina a 80 y 90 mg L<sup>-1</sup>. La gasolina a 90 mg L<sup>-1</sup> en la etapa de floración, aumentó el contenido de Na y el Se disminuyó en la etapa de fructificación. El diésel a 28 mg L<sup>-1</sup> aumentó el Mg y N en la etapa de floración, mientras que en la etapa de fructificación la concentración de N se vio disminuido. El diésel a 26 mg L<sup>-1</sup>, aumentó el contenido de Ca, Cu y Fe en las hojas de la etapa de floración, mientras que el K disminuyó. La gasolina y diésel a 20 mg L<sup>-1</sup> aumentaron el contenido del Cu en los frutos mientras que la gasolina a 90 mg L<sup>-1</sup> disminuyo el contenido de Se. El diésel a 26 mg L<sup>-1</sup> sobreexpresó considerablemente los genes CAT, GPX y SOD, seguido de la gasolina a 80 mg L<sup>-1</sup> donde también se obtuvo una sobreexpresión de estos genes.

### **Palabras clave**

Gasolina, diésel, capacidad antioxidante, calidad de frutos, expresión de genes.

ABSTRACT

TOMATO PLANTS RESPONSE TO THE APPLICATION OF HYDROCARBONS  
SIMULATING A POLLUTION EVENT

BY

ISELA DÍAZ LÓPEZ  
MASTER OF CIENCE IN HORTICULTURE

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DRA. SUSANA GONZÁLEZ MORALES – ADVISER

Saltillo, Coahuila

November 2019

The contamination of water and agricultural land by hydrocarbons is an issue that has gained importance, since like any stressful agent these generate damage to the plants, that is why in this work we studied the responses of tomato plants under the contamination of different hydrocarbons such as gasoline (80 and 90 mg L<sup>-1</sup>) diesel (26 and 28 mg L<sup>-1</sup>) and a combination of both (20 mg L<sup>-1</sup> each), to evaluate agronomic, biochemical and transcriptional parameters of Tomato plants, as well as fruit quality. The daily application of the treatments was carried out directly to the substrate of the plants along with the last irrigation of the day. The results showed 12.5% of deaths in plants with the application of diesel at 28 mg L<sup>-1</sup> and 6.25% with gasoline at 90 mg L<sup>-1</sup>. The amount of the fruits decreased with most treatments, except with gasoline and diesel at 20 mg L<sup>-1</sup>, while the weight and quality of the fruits was not affected with the treatments applied. Lycopene concentrations increased significantly with the treatment of gasoline and diesel to 20 mg L<sup>-1</sup> and with the two concentrations of diesel (26 and 28 mg L<sup>-1</sup>), with diesel being 26 mg L<sup>-1</sup> where a higher concentration of this metabolite. The antioxidant capacity increased in greater quantity with the gasoline treatments in the flowering stage while in the fruiting stage it was with the diesel treatments. Regarding the mineral content of the leaves in the flowering stage, a decrease in Mn and Mo was observed with gasoline treatments at 80 and 90 mg L<sup>-1</sup>. Gasoline at 90 mg L<sup>-1</sup> in the flowering stage, increased the Na content and the decreased in the fruiting stage. Diesel at 28 mg L<sup>-1</sup> increased Mg and N in the flowering stage, while in the fruiting stage the concentration of N was decreased. Diesel to 26 mg L<sup>-1</sup>, increased the content of Ca, Cu and Fe in the leaves of the flowering stage, while the K decreased. Gasoline and diesel at 20 mg L<sup>-1</sup> increased the content of Cu in fruits while gasoline at 90 mg L<sup>-1</sup> decreased the content of Se. Diesel at 26 mg L<sup>-1</sup> considerably overexpressed the CAT, GPX and SOD genes, followed by gasoline at 80 mg L<sup>-1</sup> where overexpression of these genes was also obtained.

### **Keywords**

Gasoline, diesel, antioxidant capacity, fruit quality, gene expression.

## INTRODUCCIÓN

La fuente humana más grande de emisión de gases de efecto invernadero a nivel mundial es la combustión de combustibles fósiles (IPCC 2014). Dentro de los principales productos derivados del petróleo son el diésel, gasolina, turbosina, kerosenos y gasóleo, siendo considerados como generadores fundamentales de energía (Herod *et al.*, 2007). Los efectos tóxicos de los hidrocarburos en el ecosistema están relacionados con su permanencia en sistemas como la atmósfera, el agua y el suelo (Huang *et al.*, 2005 a,b). Para el suelo y el agua las causas más frecuentes de contaminación son las fugas de tanques de almacenamiento subterráneos, las pérdidas durante la extracción, los derrames accidentales de petróleo y las pérdidas por la transportación (Khan *et al.*, 2016 a; Margesin *et al.*, 2007; Velásquez, 2017).

El aumento de la contaminación por el crudo y sus derivados (Iturbe *et al.*, 2007), a dado como resultado un entorno endurecido, condiciones hidrófobas y suelos infértiles, lo que se traduce a un menor crecimiento en plantas y microorganismos (Hutchinson *et al.*, 2001; Jain *et al.*, 2011). En el suelo afectan la fertilidad a través de varios mecanismos: toxicidad directa a los microorganismos, reducción en la retención de humedad y/o nutrientes, compactación, así como cambios en el pH y salinidad (Adams *et al.*, 2008). En las plantas, los hidrocarburos ejercen indirectamente efectos adversos, aportando minerales tóxicos en el suelo disponible para ser absorbidos, creando un deterioro de la estructura del suelo y causando la pérdida de nutrientes minerales del suelo, tales como K, Na, SO<sub>4</sub>, PO<sub>4</sub>, y NO<sub>3</sub>, además, el suelo se expone a la lixiviación y erosión (Serrano *et al.*, 2013). Los hidrocarburos al ser de origen natural, la naturaleza es capaz de reincorporar una fracción de los mismos hidrocarburos a los ciclos biogeoquímicos, mediante microorganismos con mecanismos fisiológicos y metabólicos con capacidad de degradarlos cuando éstos se encuentran en bajas concentraciones (Youssef *et al.* 2008). En el agua, los hidrocarburos con mayor número de carbonos tienden a flotar y están en forma libre y las moléculas más pequeñas tienden a formar emulsiones y son más difíciles de remover (Reeves, 2000). A medida que pasa el tiempo, los hidrocarburos se pueden adherir fuertemente a los sedimentos debido a su baja solubilidad en agua y a su carácter hidrofóbico (Ke *et al.*, 2002).

La presencia de los hidrocarburos y sus compuestos tóxicos en el suelo generan moléculas muy reactivas en las plantas llamadas especies reactivas del oxígeno (ROS) (Yadav, 2010). Para eliminarlas, las células activan los mecanismos de defensa antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Iriti y Faoro, 2008). El exceso de ROS puede provocar la oxidación y modificación de aminoácidos celulares, proteínas, lípidos de membrana y ADN, estos cambios conducen a lesiones oxidativas y reducen el crecimiento y el desarrollo de las plantas (Ogawa e Iwabuchi, 2001).

En la actualidad, el sector agrícola, ganadero y forestal enfrentan grandes retos en la alimentación de la creciente población humana y la demanda de agua para riego y uso doméstico (Rodríguez, 2007). Una alternativa de aprovechamiento son las fuentes de agua no convencionales, como ejemplo, las aguas congénitas o producidas que son un subproducto de la extracción de crudo y gas natural muy poco aprovechado debido a que se consideran tóxicas porque existen fuentes con altas concentraciones de sales, hidrocarburos y metales pesados pero cuando se encuentran en bajas concentraciones pueden ser consideradas para el uso agrícola (Fakhru'l-Razi *et al.*, 2009; Martel-Valles *et al.*, 2013 y 2014). Martel-Valles *et al.*, (2017a) reportaron que los frutos de plantas de tomate regadas con aguas congénitas que contenían hidrocarburos no absorbieron HFM, HFL ni BTEX. En México, la SEMANRAT en la NOM-001-ECOL-1996 establece un límite de 15 mg L<sup>-1</sup> diario y 25 mg L<sup>-1</sup> promedio mensual para grasas y aceites en agua de riego. Mientras que el límite máximo permisible de hidrocarburos para la descarga de agua congénita en cuerpos receptores de agua dulce es de 15 mg L<sup>-1</sup> (SEMARNAT, 1996) y en aguas costeras y zonas marinas es de 40 mg L<sup>-1</sup> según la NOM-143-SEMARNAT-2003 (SEMARNAT, 2003).

Debido a que existe evidencia de daño y muerte de plantas al irrigarlas con agua que contiene hidrocarburos y los cambios que pueden ocurrir en el sistema antioxidante por el estrés abiótico que generan estos (Martel *et al.*, 2017b; Song *et al.*, 2011). El objetivo de este trabajo fue aplicar gasolina y diésel junto con el riego en diferentes concentraciones simulando un evento de contaminación para evaluar el impacto en el crecimiento y vigor en las plantas de tomate, la calidad en los frutos, capacidad antioxidante y expresión de los genes de enzimas antioxidantes, tomando como base las concentraciones utilizadas en los trabajos realizados por Martel *et al.* (2017b).

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar las respuestas de las plantas de tomate frente a diferentes concentraciones de hidrocarburos aplicadas en el sustrato junto con el agua de riego.

### **Objetivos específicos**

- Evaluar las variables agronómicas en la etapa de floración y fructificación en plantas de tomate con la aplicación de gasolina y diésel para determinar el efecto de los hidrocarburos.
- Determinar la capacidad antioxidante en etapa de floración y fructificación en plantas de tomate y frutos.
- Analizar el contenido mineral en etapa de floración y fructificación en plantas de tomate y frutos.
- Determinar la calidad nutraceútica de los frutos de plantas de tomate.
- Estudiar la expresión de genes (CAT, SOD y GPX) relacionados con el metabolismo antioxidante de plantas de tomate.

### **Hipótesis**

Las plantas de tomates expuestas a la contaminación por hidrocarburos a concentraciones superiores a la NOM-143-SEMARNAT-2003 alteran la producción y calidad de frutos, morfología y el metabolismo antioxidantes de las plantas.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### **Hidrocarburos**

La creciente utilización del petróleo y sus productos derivados como gasolina, diésel y aceites de motor, conducen a un marcado aumento en la contaminación reportado en diferentes partes del mundo, especialmente en países productores de petróleo (Houshmandfar y Asli, 2011). Estos combustibles fósiles son los principales contaminantes orgánicos de los suelos, aguas superficiales y acuíferos, la persistencia de estos en el medio ambiente depende de la biodegradabilidad intrínseca de los hidrocarburos constituyentes de los combustibles, de la presencia de microflora activa en las áreas contaminadas y de los factores ambientales locales (Marchal *et al.*, 2003). Las principales fuentes de contaminación incluyen pozos de petróleo y gas, refinerías de petróleo, sitios de producción de gas manufacturado, talleres mecánicos y estaciones de servicio, las causas más comunes son por fugas y derrames accidentales que son frecuentes durante la exploración, producción, refinación, transporte y almacenamiento del petróleo y sus productos derivados (Brassington *et al.*, 2010; Albanese y Breward, 2011; Hasanuzzaman *et al.*, 2007). Las propiedades físicas de los hidrocarburos juegan un papel clave en su comportamiento en los suelos, las fracciones de diésel son más livianas en comparación con la gasolina que son más volátiles en sistemas abiertos donde las fracciones pueden perderse en la atmósfera (Alrumman, 2015; Cermak *et al.*, 2010).

La solubilidad de las diferentes moléculas en el agua que pueden poner en peligro los acuíferos en contacto con zonas contaminadas, los residuos de gasolina y otros productos derivados del petróleo es un problema generalizado, con la mayor preocupación ambiental relacionada con la movilidad de los componentes tóxicos solubles, es decir, benceno, tolueno y xileno (BTX) (Nakhla, 2003; Auffret *et al.*, 2009).

### **Características generales de los hidrocarburos del petróleo**

El oxígeno, el hidrógeno, el nitrógeno y el azufre son los principales componentes de los hidrocarburos de petróleo. Los alcanos, compuestos aromáticos, compuestos de nitrógeno-azufre-oxígeno (NSO) y la fracción de asfaltenos son las cuatro grandes fracciones de hidrocarburos totales del petróleo (TPH). La fracción alcano, que varía de C1 (metano) a C40 o más, se presenta como compuestos de cadena lineal o ramificada

(Scullion, 2006). Los alcanos son principalmente hidrocarburos saturados y el queroseno, la gasolina, el combustible para calefacción y el combustible diésel son ejemplos de esta fracción. Los compuestos aromáticos contienen al menos un anillo de benceno. La fracción aromática varía de benceno a estructuras aromáticas policíclicas de múltiples anillos compuestas de derivados NSO de hidrocarburos. El benceno, el tolueno, el etilbenceno y el xileno (BTEX) son ejemplos familiares de compuestos aromáticos de un solo anillo (o mononucleares), y son componentes esenciales de la gasolina (Khan *et al.*, 2018). Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) están compuestos por anillos aromáticos múltiples y fusionados. La EPA de los EE. UU. ha enumerado muchos HAP (*e.g.* Naftaleno, criseno, fenantreno, benzo y pireno) y compuestos BTEX como contaminantes prioritarios debido a su ecotoxicidad inherente (ATSDR, 1995).

Los hidrocarburos de petróleo abarcan una mezcla de compuestos de hidrocarburos de cadena corta y larga. Los hidrocarburos alifáticos y aromáticos son dos componentes principales de los hidrocarburos del petróleo que se han informado que son recalcitrantes y perjudiciales para la salud. Los hidrocarburos alifáticos se degradan fácilmente por microorganismos, pero las grandes cadenas alifáticas ramificadas no se degradan fácilmente; por lo tanto, persisten en el medio ambiente (Douglas *et al.*, 2018). Asimismo, los hidrocarburos aromáticos son difíciles de degradar debido a sus estructuras complejas (Al-Hawash *et al.*, 2018).

Los hidrocarburos se pueden dividir en dos grupos químicos amplios que comprenden compuestos alifáticos y aromáticos. Los alifáticos incluyen todos los alcanos (rectos, ramificados y cíclicos), alquenos y alquinos, mientras que los compuestos aromáticos incluyen compuestos que contiene uno o más anillos de benceno aromáticos (Cermak *et al.*, 2010).

### **Composición de los combustibles derivados del petróleo**

El número de carbonos de los hidrocarburos de gasolina está entre 4 y 10. Su rango de destilación es de 180-200°C. En contraste, el número de carbonos de los hidrocarburos del petróleo diésel está entre 11 y 25, y el rango de destilación está entre 180 y 380°C. La gasolina y el diésel generalmente contienen bajas cantidades de alquenos. Ambos están compuestos por cuatro clases estructurales principales de hidrocarburos: n-alcanos o n-

parafinas (hidrocarburos lineales saturados), isoalcanos o isoparafinas (hidrocarburos saturados ramificados), cicloalcanos o naftenos (alcanos cíclicos saturados) y aromáticos (Marchal *et al.*, 2003).

Los compuestos aromáticos (incluidos los compuestos más livianos conocidos como BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno) constituyen del 10 al 59% de la gasolina (masa/masa), mientras que los hidrocarburos alifáticos representan del 41 al 62%. Los aromáticos suelen ser más tóxicos que los alifáticos con el mismo número de átomos de carbono y, por lo general, se encuentran en concentraciones más altas en el agua porque su solubilidad es de tres a cinco veces mayor (Lopes-Tiburtius *et al.*, 2004). Mientras que el combustible diésel, es una mezcla compleja que consiste básicamente en hidrocarburos parafínicos, olefínicos y aromáticos (HAP) y, en cantidades más pequeñas, moléculas que contienen azufre, nitrógeno, metales, oxígeno, etc. Los aceites diésel están compuestos de moléculas con 8–40 átomos de carbono y generalmente están más pesados, más viscosos y menos volátiles que la gasolina (Vieira *et al.*, 2007).

### **Normas Mexicanas**

NOM-143-SEMARNAT-2003. Establece las especificaciones ambientales para el manejo de agua congénita asociadas a hidrocarburos. Define el agua congénita o de formación, como agua salada que se encuentra dentro de la roca, asociada a la presencia de hidrocarburos. Contiene sales disueltas, como cloruros de calcio y sodio, carbonatos de sodio, cloruros de potasio, sulfatos de calcio o de bario, entre otros; puede incluso contener algunos metales. La concentración de estos componentes puede ocasionar impactos negativos al medio ambiente cuando su manejo y disposición no son adecuados. Esta norma establece el límite máximo permisible de hidrocarburos para la descarga de agua congénita en cuerpos receptores de agua dulce ( $15 \text{ mg L}^{-1}$ ), y en aguas costeras y zonas marinas ( $40 \text{ mg L}^{-1}$ ) (SEMARNAT, 2003).

NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012. Los hidrocarburos son compuestos químicos orgánicos, constituidos principalmente por átomos de carbono e hidrógeno. De acuerdo al número de átomos de carbono se dividen en:

- Hidrocarburos fracción ligera (HFL): mezcla de hidrocarburos cuyas moléculas contengan entre cinco y diez átomos de carbono (C5 a C10).

- Hidrocarburos fracción media (HFM): mezcla de hidrocarburos cuyas moléculas contengan entre diez y veintiocho átomos de carbono (C10 a C28).
- Hidrocarburos fracción pesada (HFP): mezcla de hidrocarburos cuyas moléculas contengan entre veintiocho y cuarenta átomos de carbono (C28 a C40).

Los límites máximos permisibles para fracciones de hidrocarburos en suelo agrícola para HFL, HFM e HFP es de 200, 1200, 3000 mg Kg<sup>-1</sup> base seca respectivamente (SEMARNAT, 2012). Los productos asociados a los derrames de hidrocarburos, para los que se establecen límites máximos permisibles de contaminación en suelos, se enlistan en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Hidrocarburos que se deben analizar en función del producto contaminante

PRODUCTO CONTAMINANTE	HIDROCARBUROS				
	HFP	HFM	HAP	HFL	BTEX
Mezcla de productos desconocidos derivados del petróleo	X	X	X	X	X
Petróleo crudo	X	X	X	X	X
Combustóleo	X		X		
Parafinas	X		X		
Petrolatos	X		X		
Aceites derivados del petróleo	X		X		
Gasóleo		X	X		
Diésel		X	X		
Turbosina		X	X		
Queroseno		X	X		
Creosota		X	X		
Gasavión				X	X
Gasolvente				X	X
Gasolinas				X	X
Gas nafta				X	X

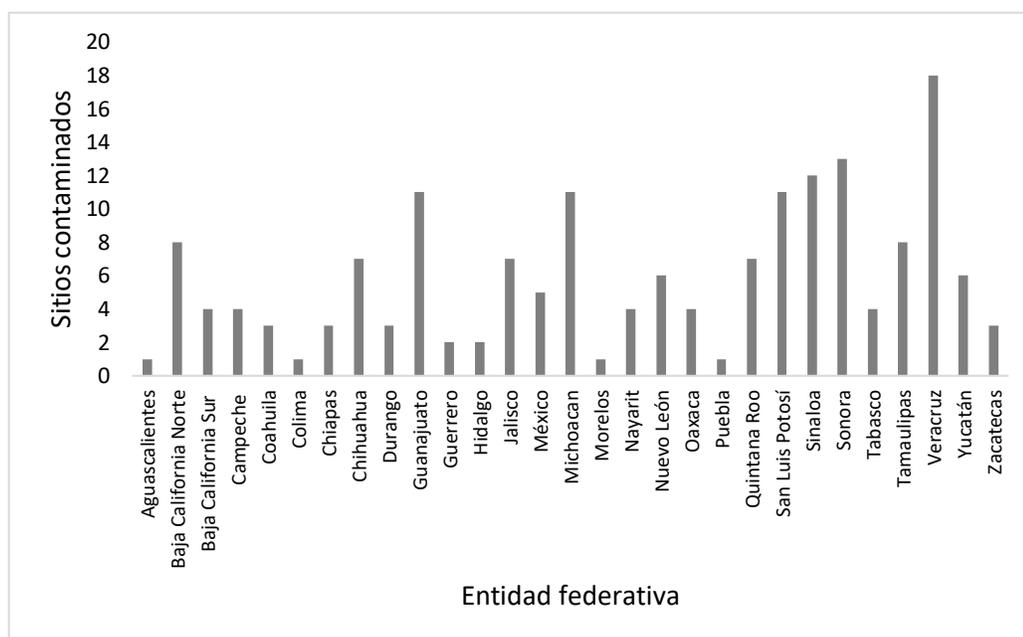
Fuente: SEMARNAT, 2003

NOM-001-ECOL-1996. Establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Esta norma establece los

máximos permisibles para contaminantes básicos en el agua. La concentración de grasas y aceites en el agua para el uso de riego agrícola debe estar en un límite de  $15 \text{ mg L}^{-1}$  diario y  $25 \text{ mg L}^{-1}$  promedio mensual (SEMARNAT, 1996).

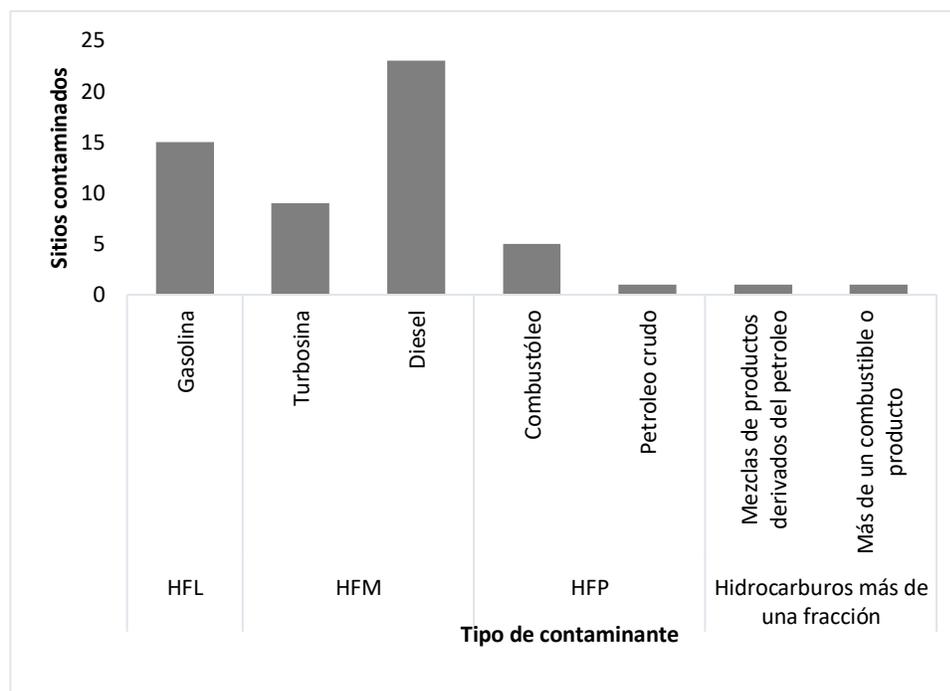
### Contaminación de hidrocarburos en México

La industria del petróleo en su conjunto ha tenido un impacto negativo en materia ambiental (Ortinez *et al.*, 2003). Existen extensas áreas de suelos contaminados por hidrocarburos, debido a las tareas de exploración, refinación, falta de mantenimiento de ductos y robo de combustible. La tendencia de este tipo de desastres acontece principalmente en las zonas rurales, teniendo mayor efecto en las poblaciones dedicadas a la agricultura (Dettmer, 2002). Además de dañar suelos agrícolas también provocan perjuicio económico y social debido a la inutilización de estos suelos para la producción de cultivos o ganadería (Cavazos-Arroyo *et al.*, 2014). Los estados con mayor número de sitios contaminados con hidrocarburos de fracción ligera, media y pesada registrados desde el año 2015 al 2019 se muestran en la Figura 1 (SEMARNAT, 2019).



**Figura 1.** Cantidad de sitios contaminados por hidrocarburos en cada estado de México desde el año 2015 al 2019.

Según la SEMARNAT (2019) la mayor cantidad de sitios contaminados en México en el año 2018 es por diésel seguido de la gasolina y la turbosina (Figura 2) considerándolos como sitios de emergencia ambientales propuestas para su evaluación por la Agencia Nacional de Seguridad Industrial y de Protección al Medio Ambiente del Sector Hidrocarburos (ASEA), de SEMARNAT.



**Figura 2.** Cantidad de sitios contaminados a nivel nacional causado por con hidrocarburos en el año 2018.

### **Biodisponibilidad de los hidrocarburos**

La biodisponibilidad se refiere a la porción de una sustancia química en el suelo, que puede ser absorbida o transformada por organismos vivos. La biodisponibilidad también se ha definido como la influencia de los factores físicos, químicos y microbiológicos en la extensión y tasa de biodegradación. El pH, la comunidad microbiana y el grado de deterioro del hidrocarburo pueden verse significativamente afectados por las restricciones sobre la biodisponibilidad de los hidrocarburos (Al-Hawash *et al.*, 2018). La parte biodisponible de los hidrocarburos es el área accesible a los microorganismos. Los hidrocarburos del petróleo tienen baja biodisponibilidad y se clasifican como contaminantes orgánicos hidrofóbicos. Esos productos químicos tienen poca solubilidad

en agua, lo que los hace resistentes a la descomposición fotolítica y químicos biológicos (Semple *et al.*, 2003).

### **Tecnologías para la limpieza de ambientes contaminados por hidrocarburos**

Durante décadas, el enfoque principal de los expertos ambientales ha sido adoptar enfoques de gestión basados en el riesgo para limpiar los sitios contaminados con hidrocarburos que presentan consecuencias ecológicas potencialmente destructivas. Este enfoque condujo al desarrollo de varias tecnologías físicas, químicas, térmicas y biológicas que son ampliamente implementables. Entre las opciones correctivas más comunes establecidas para el tratamiento de suelos contaminados están la incineración, conducción térmica, extracción con solvente/lavado de suelos, oxidación química, bioaugmentación, bioestimulación, fitorremediación, compostaje, biopilas y biorreactores. La integración de tecnologías fisicoquímicas y biológicas también se practica ampliamente para una mejor limpieza de los suelos contaminados con hidrocarburos. La remediación electrocinética y la remediación asistida por biocatalizador aún se encuentran en la etapa de desarrollo. Diversos autores también proponen el desarrollo de novedosos sistemas verdes y sostenibles multifuncionales como los mixtos, el cultivo celular, sistema enjuague de biosurfactantes, enfoques transgénicos y nanorremediación para superar las limitaciones tecnológicas existentes asociadas a contaminantes del suelo y microbianas para abordar los hidrocarburos de alto peso molecular (Kuppusamy *et al.*, 2016a,b,c).

Un esquema típico de remediación de sitios contaminados involucra tres fases: (I) reconocimiento de sitios y evaluación de riesgos, (II) evaluación de opciones de recuperación y (III) remediación y monitoreo (Ashraf *et al.*, 2014).

### **Efectos de los hidrocarburos en las plantas**

El petróleo y sus productos derivados pueden contribuir a la inhibición del crecimiento y el desarrollo de las plantas. La absorción de hidrocarburos de bajo peso molecular por parte de la planta puede provocar el bloqueo de estomas y espacios intercelulares, lo que lleva a una tasa reducida de transpiración de la planta junto con daños en la membrana celular (Khan *et al.*, 2018).

La contaminación del suelo por estos compuestos dificulta la ingesta de agua y sales minerales del sustrato, también rompe la serie de procesos metabólicos y como resultado produce deficiencia de clorofila y nutrientes, las plantas afectadas por la contaminación por hidrocarburos modifican la morfología de raíces, brotes, hojas y flores, además, presentan numerosas clorosis y necrosis (Liste *et al.*, 2006). Muy a menudo los contaminantes contribuyen a alteraciones en el contenido de macro y microelementos en los órganos de las plantas, y también modifican el contenido de metales pesados en ellos (Rusin *et al.*, 2015). Entre los oligoelementos hay metales pesados como el cadmio, el plomo y el mercurio, que pueden ser tóxicos para las plantas cultivadas incluso a bajas concentraciones. Muchos de ellos tienen efectos cancerígenos y mutagénicos (Gospodarek y Nadgórska-socha, 2013). El cadmio, el plomo y el zinc son particularmente peligrosos ya que pueden causar la degradación de las estructuras del ADN y ARN. Los efectos implican el deterioro del crecimiento y la reproducción de las plantas. Además, a menudo son capaces de bioacumularse, y pueden permanecer en el medio ambiente durante un largo período y entrar en los niveles posteriores de la cadena trófica con los alimentos ingeridos tanto en animales como en humanos, los metales pesados causan principalmente cambios en la síntesis de proteínas y perturban la producción de ATP, lo que puede provocar graves efectos patológicos, incluidas las neoplasias (Morkunas *et al.*, 2018).

Además, en opinión de algunos autores, se observan efectos horméticos no solo para el crecimiento sino también durante el desarrollo, la reproducción, la supervivencia y la longevidad. Estos autores informaron que los efectos horméticos también pueden estar estrechamente relacionados con numerosas respuestas metabólicas y fisiológicas como la síntesis de metalotioneína, síntesis del ADN y ARN, mitosis, consumo de oxígeno, tasa de fotosíntesis, regeneración de tejidos, respuesta inmune, síntesis de proteínas de estrés, germinación de semillas, etc. La actividad hormética es una respuesta celular específica y, muy probablemente, una respuesta al estrés a niveles bajos pero nocivos de agentes tóxicos (Calabrese *et al.*, 1998; Damelin *et al.*, 2000).

El proceso a través del cual una planta actúa sobre un contaminante en particular depende del grado de contaminación, de las características fisicoquímicas del contaminante y del sitio contaminado, así como de las propiedades fenotípicas y genotípicas de cada especie

vegetal, tales como su grado de tolerancia y su capacidad para captar, absorber, acumular y/o degradar los contaminantes (Meagher 2000; Vangronsveld *et al.*, 2009).

### **Mecanismos de defensa las plantas frente al estrés abiótico**

Cuando las plantas están sometidas a tensiones ambientales como la salinidad, la sequía, temperaturas extremas, el tratamiento con herbicidas, agentes tóxicos y la deficiencia de minerales, el equilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la actividad de extinción de los antioxidantes se altera, lo que a menudo resulta en daño oxidativo. Las ROS están asociadas con varias formas de daño celular. Dado que las especies de oxígeno activado como el superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) pueden alterar seriamente el metabolismo normal a través del daño oxidativo a los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, las plantas poseen una serie de enzimas antioxidantes que las protegen de estos posibles efectos citotóxicos. El entorno celular está determinado por el sistema antioxidante, para controlar el nivel de las ROS y proteger las células en condiciones de estrés, los tejidos vegetales contienen varias enzimas y compuestos de bajo peso molecular para eliminar ROS (Li, 2009; Dolatabadian *et al.*, 2008; Kusvuran *et al.*, 2016; Noctor y Foyer 2002).

A pesar del daño oxidativo que causan las ROS, son segundos mensajeros bien descritos en una variedad de procesos celulares, incluido el otorgamiento de tolerancia a diversas tensiones ambientales, el daño oxidativo que pueden producir en los tejidos depende del delicado equilibrio entre la producción de ROS y su eliminación (Noctor y Foyer 2002; Sharma, 2012).

Los componentes enzimáticos del sistema de defensa antioxidante se componen de varias enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), peroxidasa de guaiacol (GPX), enzimas de ascorbato ciclo glutatión (AsA-GSH) ascorbato peroxidasa (APX), monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), deshidroascorbato reductasa (DHAR) y glutatión reductasa (GR) (Ighodaro & Akinloye, 2018). El papel y la eficacia de los antioxidantes de defensa de primera línea que básicamente incluyen superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX) es importante e indispensable en toda la estrategia de defensa de los antioxidantes, especialmente en referencia al radical anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) que se generan durante el metabolismo

normal, particularmente a través de la vía de producción de energía mitocondrial. La actividad de estos antioxidantes a menudo se determina en estudios sobre el estrés en plantas causadas por xenobióticos, principalmente metales pesados. Estas enzimas están involucradas en muchos procesos, pero sobre todo son un componente importante del sistema antioxidante en las plantas. Pueden indicar su utilidad como biomarcadores y también permitir una mejor comprensión de los mecanismos de defensa de las plantas expuestas al estrés oxidativo (Nadgórska-Socha *et al.*, 2013; Rusin *et al.*, 2015).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Desarrollo del cultivo

El material vegetal utilizado fue tomate tipo saladette híbrido 74-156 (Rijk Zwaan Zaadteelt en Zaadhandel B.V.) de crecimiento indeterminado. Las semillas se sembraron en charolas de poliestireno de 200 cavidades y fueron trasplantadas a los 31 días después de la siembra en macetas de polietileno con capacidad de 16 L (Figura 3). Como sustrato se utilizó una mezcla de peat moss: perlita (1:1 v/v). El riego se aplicó mediante un sistema de riego por goteo dirigido por estacas y para la nutrición se usó solución Steiner (Steiner, 1961) con un pH de 6-6.5, la concentración de la solución se fue ajustando dependiendo del estado fenológico de la planta.

Las plantas se establecieron en un invernadero del Departamento Forestal y los análisis de laboratorio se realizaron en el Laboratorio de Fisiología Vegetal del Departamento de Horticultura de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Saltillo, Coahuila, México.



**Figura 3.** Germinación de semillas de tomate y trasplante en macetas en el invernadero

### Aplicación de los tratamientos

Los tratamientos consistieron en la aplicación diaria de dos tipos de hidrocarburos marca PEMEX. El diésel, el cual contiene HFM y gasolina que contiene HFL (SEMARNAT 2003a). El inicio de la aplicación fue partir de los 15 días después del trasplante (DDT) hasta finalizar el experimento (115 DDT), antes de eso solo se regó con solución Steiner. La aplicación del diésel y la gasolina fue mediante una jeringa de 1 mL directamente al

sustrato junto con el último riego del día a una distancia aproximadamente de 10 cm del tallo de la planta (Figura 4). Las concentraciones se calcularon con base al volumen de cada riego que fue de 500 mL, el cual se mantuvo durante todo el ciclo. Se tuvieron un total de 6 tratamientos: un testigo absoluto (plantas regadas solo con solución Steiner), gasolina a una concentración de 90 mg L<sup>-1</sup>, gasolina a una concentración de 80 mg L<sup>-1</sup>, diésel a una concentración de 26 mg L<sup>-1</sup>, diésel a una concentración de 28 mg L<sup>-1</sup> y una mezcla de una concentración de 20 mg L<sup>-1</sup> de gasolina y diésel. Todas las concentraciones que se probaron rebasan el límite permisible (15 mg L<sup>-1</sup>) establecido en las normas oficiales mexicanas NOM-143-SEMARNAT-2003 y NOM-001-ECOL-1996 (SEMARNAT 2003, 1996).



**Figura 4.** Aplicación de los tratamientos en el sustrato de las plantas.

### **Variables agronómicas**

Para la evaluación de variables agronómicas se realizaron 2 muestreos uno en la etapa de floración (30 DDT) y otro en fructificación (115 DDT) (Figura 5). Para ambos muestreos se eligieron 5 plantas al azar por cada tratamiento, a las cuales se les midió la altura de la planta y largo de la raíz con un flexómetro; el diámetro de tallo se midió con un vernier digital y para calcular el peso seco de la biomasa, la planta fue secada en una estufa a 60°C por 72 horas. En el segundo muestreo (115 DDT), además de las variables mencionadas anteriormente, se pesó y contabilizó el número de frutos, en el cual se hizo una sumatoria de los frutos de cada racimo (se tomó en cuenta hasta el cuarto racimo) en 5 plantas de cada tratamiento elegidas al azar.



**Figura 5.** Plantas de tomate en etapa de floración (a) y fructificación (b).

### **Evaluación de calidad de frutos**

La colecta de los frutos se realizó a los 85 y 90 DDT para la evaluación de la calidad de frutos, se determinó la conductividad eléctrica (CE), los sólidos solubles totales (SST), pH, acidez titulable, Se eligieron frutos (del segundo racimo) de cinco plantas por tratamiento en la etapa de maduración rojo claro (Figura 6).

Para la evaluación de las variables mencionadas anteriormente se realizó una maceración de los frutos hasta formar una pulpa, se tomó una pequeña cantidad y se colocó en el sensor de los electrodos para tomar la lectura. El pH y la CE fueron medidos con la ayuda de los electrodos portátiles (marca HORIBA modelo LAQUA twien). Los SST expresados en °Brix fueron medidos con un refractómetro (marca Atago modelo Pal 1) colocando unas gotas en el sensor y dirigiéndolo hacia la luz para observar las medias en la escala del instrumento.



**Figura 6.** Frutos recolectados para evaluación de los parámetros de calidad.

### La acidez titulable (AT)

se determinó mediante la técnica colorimétrica de acuerdo con la metodología AOAC (1990) utilizando 10 mL de pulpa del fruto macerado, posteriormente se agregaron tres gotas de fenolftaleína (1%) y se tituló con NaOH (0.1 N). Los datos se expresaron en porcentaje de ácido cítrico.

### Licopeno

Los frutos colectados para la evaluación de licopeno fueron guardados en el ultracongelador a una temperatura de  $-76^{\circ}\text{C}$  después se liofilizaron las muestras en un liofilizador (marca LABCONCO, Modelo 79480, Kansas City, MO, EE. UU.) a una presión de vacío de  $133 \times 10^{-3}$  mBar y una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ . Las muestras se maceraron con mortero y pistilo y se pesaron 100 mg de la muestra en tubos de 2 mL, posteriormente se agregaron 1.5 mL de hexano, se mezcló en vortex por 30 seg, se sometió a sonicación por 5 min y se centrifugó a  $4^{\circ}\text{C}$  por 10 min a 10,000 rpm (Figura 7). Con una jeringa se extrajo el sobrenadante y se filtró por membrana de nylon de diámetro de poro de  $0.45 \mu\text{m}$ . Se hizo una dilución 1:10 (muestra/hexano) y se cuantificó con un espectrofotómetro (marca Thermo Genesys 10s) midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 472 nm. Se realizó una curva de calibración con estándar de licopeno (Bungheza *et al.*, 2011). Los resultados fueron expresados en g de licopeno kg de biomasa seca<sup>-1</sup>.



**Figura 7.** Extracción de licopeno de los frutos por sonicación.

### **Capacidad antioxidante**

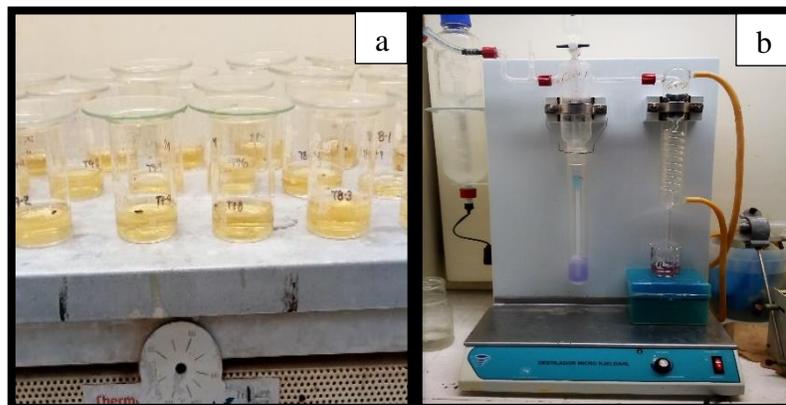
Para la evaluación de la capacidad antioxidantes en hojas en las etapas de floración y fructificación y en frutos, se realizó un muestro de hojas en la etapa de floración a los 30 DDT y a los 115 DDT en la etapa de fructificación y de frutos del segundo racimo.

Se empleó la técnica del radical DPPH (2,2 Diphenyl-1-picrylhydrazyl), la cual se adaptó para medir compuestos hidrofílicos de acuerdo con la metodología de Brand-Williams *et al.*, (1995) con modificaciones. Para la extracción se utilizaron 100 mg de muestra liofilizada previamente molida y se agregaron 1.5 mL de etanol, se agitaron en vórtex por 20 seg, luego se sonicaron por 10 minutos y centrifugaron a 12,000 rpm, se obtuvo el extracto y se filtró con filtros de nylon de diámetro de poro de 0.45  $\mu$ m. Se utilizó una solución madre a una concentración de 2.53 mM del radical DPPH utilizando metanol como solvente. La solución de Trolox (estándar) fue preparada a una concentración de 2.5 mM. La cuantificación se realizó en un lector de microplacas (BioTek, modelo ELx808, VT, EE.UU.) utilizando 50  $\mu$ L de la muestra y de la solución de DPPH, se dejó reposar por 15 min y se realizó la lectura a 530 nm.

### **Minerales**

Para la determinación de minerales se seleccionaron 5 plantas al azar por cada tratamiento y se hizo un análisis en hojas (etapa de floración y fructificación) y frutos, para esto se utilizó muestra seca que previamente fue deshidratada en una estufa con una temperatura de 60°C por 72 horas (Figura 8a). De las muestras secas se pesaron 0.5 g de muestra seca y se realizaron digestiones acidas por 4 horas hasta la desintegración de la materia orgánica. Cuando la solución estuvo completamente transparente se dejó enfriar se filtró utilizando papel filtro Whatman No. 42. Por último, se aforó en un matraz volumétrico de 50 mL con agua desionizada. Las muestras fueron analizadas en un Espectrómetro de Emisión de Plasma (Inductively Coupled Plasma (ICP), Termo Jarrel Ash Irish Advantage modelo 7400). El nitrógeno total se determinó por el método de micro Kjeldahl (AOAC 2005) utilizando 500 mg de tejido deshidratado que posteriormente se colocaron en matraces junto con 3 mL de solución digestora y se llevaron a una temperatura de 350°C por 45 min hasta que la muestra se desintegrara, se dejó enfriar luego se pasó al destilador micro Kjeldahl haciendo reaccionar con NaOH al 50%, el destilado se recogió en 30 ml

de una solución de ácido bórico al 22% hasta llegar a un volumen final de 60 mL (Figura 7b). El destilado recuperado se tituló con ácido sulfúrico a 0.025 N, los resultados se expresaron en % de nitrógeno.



**Figura 8.** Digestión de muestras para la determinación de minerales (a) y análisis por el método de micro Kjeldahl para nitrógeno (b).

### **Análisis de expresión de genes**

Para el análisis se llevó a cabo un muestreo de hojas jóvenes a los 30 DDT de cinco plantas por tratamiento, las hojas se colocaron en sobres de aluminio e inmediatamente después se sumergieron en N<sub>2</sub> líquido y se almacenaron a una temperatura de  $-76^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

#### **Extracción de ARN por el método de Trizol**

Las muestras se molieron en un mortero con pistilo agregando N<sub>2</sub> líquido para evitar que las muestras se descongelaran, posteriormente se pesaron 100 mg de la muestra y se colocó en un tubo de 2 mL e inmediatamente se agregó 1 mL de TRI reagent (MRC, Cat.: TR 118) se homogenizó suavemente y se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente, después se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de cloroformo y se agitó vigorosamente hasta un aspecto lechoso, se incubó a temperatura ambiente por 15 min y se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , se recuperó el sobrenadante y se colocó en un tubo nuevo adicionando 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol frío y se mezcló suavemente, se incubó por 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , se removió el sobrenadante y la pastilla de ARN formada fue lavada con 500  $\mu\text{L}$  de etanol frío (70%) haciendo ligeras inversiones del tubo, se removió el sobrenadante y la pastilla de ARN se dejó secar durante

15 min a temperatura ambiente, finalmente la pastilla se suspendió en 50  $\mu\text{L}$  de agua FORMAZOL® disolviéndola a 60°C, la solución final se almacenó a 4°C.

### Cuantificación de ARN

Se cuantificó el ARN extraído por medio del espectrofotómetro. Inicialmente se preparó un blanco que consistió en 2  $\mu\text{L}$  de FORMAZOL® y 198  $\mu\text{L}$  de agua DEPC, en tanto que las muestras se prepararon usando 2  $\mu\text{L}$  de ARN y 198  $\mu\text{L}$  de agua DEPC, se midió la absorbancia a 260 y 280 nm y se obtuvo el valor de R en espectrofotómetro. Para calcular la concentración de ARN extraído se usaron las fórmulas descritas en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Fórmulas para calcular la concentración de ARN extraído de las muestras

Absorbancias		R	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{L}$ totales (50 $\mu\text{L}$ )
260	280	A260/A280	A260*100*50	$\mu\text{g/mL} * 0.05$

### Calidad del ARN

La calidad fue determinada mediante electroforesis desnaturalizante, primeramente, se elaboró un gel de agarosa al 1.3% con 75 mL de agua DEPC, 24 mL de MOPS 5X y 21 mL de formaldehído. Dejándose solidificar durante 30 minutos, el gel se colocó en la cámara de electroforesis (Enduro Labnet International) y se agregó MOPS 1X hasta cubrirlo totalmente.

Se añadieron 2  $\mu\text{g}$  de ARN (calculados a partir de: 2  $\mu\text{g} * 50 \mu\text{l}/\mu\text{l}$  totales) en tubos de 0.6 mL y se aforó a 5  $\mu\text{L}$  con agua DEPC, se adicionaron 5  $\mu\text{L}$  de buffer de carga y se incubó a 60°C por 10 minutos, una vez que paso el tiempo se colocaron a 4°C.

Todo el contenido de cada muestra se cargó dentro de un pocillo del gel y se corrió la electroforesis a 70 volts por 80 minutos, transcurrido el tiempo, el gel se sacó de la cámara y se colocó en transiluminador (Benchtop UV transilluminator). La fotografía del gel se tomó con el software UVP y se observaron las bandas visibles.

### Tratamiento de muestras con DNasa

Se tomaron 8  $\mu$ L de muestras del ARN, posteriormente se añadió 1  $\mu$ L de buffer 10X y 1  $\mu$ L de DNasa I (Amplification grade 1 unit) y se mezcló cuidadosamente. Se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente y luego se agregó 1  $\mu$ L de la Solución Stop, después de esto se dejó incubar durante 10 min a una temperatura de 70°C, pasado el tiempo de incubación se colocó en hielo y se almaceno a -20 °C.

### Síntesis de c-DNA

Se utilizó el kit de síntesis de cDNA SensiFAST™ de Bioline (BIO- 65053). En un tubo de 200  $\mu$ L se colocaron 2  $\mu$ g de ARN, 4  $\mu$ L de 5X TransAmp buffer, 1  $\mu$ L de RT (Reverse Transcriptase) aforando a 20  $\mu$ L con agua grado biología molecular. Se mezcló para homogeneizar. Finalmente se colocaron en un termociclador (AXYGEN modelo Maxigene II) bajo las siguientes condiciones 25°C por 10 min, 42°C por 15 min, 48°C por 15 min, 85°C por 5 min y 4°C de HOLD. El cDNA obtenido se colocó en refrigeración.

### Preparación de iniciadores

Los iniciadores o primers correspondieron a un gen de control interno endógeno (actina) y tres genes de estudio (SOD, CAT, GPX) que se diseñaron utilizando el software Amplifix 1.7.0 (CNRS de Nicolas Jullien, Marsella, Francia), Oligoanalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies IDT, Coralville, EE. UU.) y Primers BLAST (Centro Nacional de Información Biotecnológica NCBI, Bethesda, EE. UU.), su secuencia se describe en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Secuencia de iniciadores de los genes analizados.

Genes	Forward Primer 5' - 3'	Reverse Primer 5' - 3'
<b>ACT</b>	CCCAGGCACACAGGTGTTAT	CAGGAGCAACTCGAAGCTCA
<b>CAT</b>	CCCTCTAAGTATCGCCCATCAA	TTGTACACAGGACCACCAGCAT
<b>GPX</b>	AGGAGCCTGGAAACATTGAAGA	CCATTCACGTCAACCTTGTC
<b>SOD</b>	TGATGGGCCAACTACGGTTAA	AAAATGGGCTCCTGTAGACATACAT

Para la preparación de los primer inicialmente se centrifugó el tubo madre en una microcentrifuga a máxima velocidad por 15 min, enseguida se añadió agua grado biología molecular de acuerdo a las especificaciones técnicas de cada primer obteniéndose la solución madre que se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **Solución de trabajo**

Se preparó una solución de trabajo a una concentración 15 pMol/mL a partir de la solución madre de primers utilizando la fórmula  $C1C2=V1V2$ , donde:

$C1$ = solución stock (100pMol)

$V1$ = volumen requerido

$C2$ = solución de trabajo (15pMol)

$V2$ = volumen deseado (50 $\mu\text{L}$ )

Por lo tanto:  $V1 = (15 \text{ pMol}) (50\mu\text{L}) / 100 \text{ pMol} = 7.5 \mu\text{L}$

Por lo tanto, en un tubo de 500  $\mu\text{L}$  se colocaron 7.5  $\mu\text{L}$  de la solución madre del primer y 42.5  $\mu\text{L}$  de agua DEPC y se homogenizó. La solución de trabajo se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **Validación de genes**

La validación de los genes se realizó para probar que los productos de PCR a medir (gen endógeno y genes problema) amplificaran con una eficiencia parecida. Para ello se llevaron a cabo amplificaciones con diferentes diluciones seriales de cDNA.

Preparación de estándares. Se prepararon cinco estándares en tubos de 250  $\mu\text{L}$ , se añadieron 32  $\mu\text{L}$  de agua grado BM encada tubo y en el primero se adicionaron 8  $\mu\text{L}$  de cDNA homogenizándose perfectamente. Finalmente se realizaron diluciones seriadas (1:5).

Preparación de coctel mix. Se preparó un volumen total considerando tres puntos para cada estándar además de tres controles negativos (NTC) por gen. Se preparó un mix para el gen endógeno y otro para el gen problema como a continuación se describe:

- Mix Actina: 10  $\mu\text{L}$  de SYBER® Select Master Mix (Applied Biosystems), 0.10  $\mu\text{L}$  de primer forward Actina (72 nM) y 0.08  $\mu\text{L}$  de primer reverse (60 nM) además se aforó a 20  $\mu\text{L}$  con agua grado biología molecular.

- Mix CAT: 10  $\mu\text{L}$  de SYBER® Select Master Mix (Applied Biosystems), 0.13  $\mu\text{L}$  de primer forward CAT (100 nM), 0.13  $\mu\text{L}$  de primer reverse CAT (100 nM) y 7.74  $\mu\text{L}$  de agua grado biología molecular.
- Mix GPX: 10  $\mu\text{L}$  de SYBER® Select Master Mix (Applied Biosystems), 0.13  $\mu\text{L}$  de primer forward GPX (100 nM), 0.13  $\mu\text{L}$  de primer reverse GPX (100 nM) y 7.74  $\mu\text{L}$  de agua grado biología molecular.
- Mix SOD: 10  $\mu\text{L}$  de SYBER® Select Master Mix (Applied Biosystems), 0.13  $\mu\text{L}$  de primer forward SOD (100 nM), 0.13  $\mu\text{L}$  de primer reverse SOD (100 nM) y 7.74  $\mu\text{L}$  de agua grado biología molecular.

Finalmente, en una tira de tubos de reacción rápida de 200  $\mu\text{l}$  se colocó el cDNA correspondiente a cada estándar y se adicionó el coctel mix, se incluyeron controles negativos que consistieron en agregar agua grado biología molecular y coctel mix. Se corrió la qPCR con las condiciones seleccionadas ( $T_M$  60°C) para cada gen en equipo StepOne qPCR system de Applied Biosystems.

### **Cuantificación de la expresión de genes**

Se seleccionó el método de cuantificación de curva relativa estándar para la cual se incluyó una curva estándar por gen para el análisis de cuantificación. Se siguió la misma metodología de la validación de genes con la diferencia de que para este apartado se añadieron las muestras de cDNA correspondientes a los diferentes tratamientos.

Una vez preparada la reacción la tira de tubos de reacción rápida fue colocada en la placa y se corrió la qPCR con el siguiente programa en el termociclador: hot start 95°C por 10 min, 40 ciclos: 95°C por 15 s, temperatura del iniciador ( $T_M$ ) 60°C por 1 m, 95°C por 15 s, Melting 60°C por 1 min y 95°C por 15 s.

### **Análisis estadístico**

La expresión de genes de interés SOD, CAT y GPX, se normalizó mediante la comparación con la expresión del gen de referencia interno (actina). El error estándar se calculó a partir de los valores del gen de referencia y los genes de interés. Para las demás variables, el diseño experimental fue completamente al azar con 6 tratamientos y 16

repeticiones por tratamiento, la unidad experimental fue una maceta con una planta. El análisis estadístico se realizó por medio de un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de medias según LSD Fisher ( $\alpha = 0.05$ ) con el paquete estadístico *InfoStat*, 2018.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Variables agronómicas

Etapa de floración. Las variables de longitud de raíz (LR) y altura de planta (AP) no se vieron afectada con la aplicación de los diferentes tratamientos, siendo estos iguales al testigo. Las variables diámetro de tallo (DT) y peso seco (PS), obtuvieron diferencias significativas comparándolos con el testigo, el tratamiento de diésel a  $26 \text{ mg L}^{-1}$  reporta un 18.98% de aumento en el diámetro del tallo, mientras que los tratamientos de diésel a  $28 \text{ mg L}^{-1}$  y gasolina a  $80 \text{ mg L}^{-1}$  disminuyeron en un 25% la biomasa seca de las plantas en ambos casos, y el tratamiento de gasolina y diésel a  $20 \text{ mg L}^{-1}$  disminuyó un 20.76 % (Tabla 4). Cabe señalar que en esta etapa se presentó un 12.5% de muerte de las plantas en el tratamiento de diésel con  $28 \text{ mg L}^{-1}$  y 6.25% con la gasolina a  $90 \text{ mg L}^{-1}$  en los primeros días de la aplicación de los tratamientos debido al daño en la parte basal de las plantas.

Etapa de fructificación. En esta etapa todas las variables evaluadas mostraron diferencias significativas respecto al testigo en los diferentes tratamientos (Tabla 4). En la variable de longitud de raíz (LR) se obtuvo una disminución significativa en las plantas con la aplicación de gasolina a  $90 \text{ mg L}^{-1}$  de un 50% con respecto al testigo. La gasolina en sus dos concentraciones ( $80$  y  $90 \text{ mg L}^{-1}$ ) aumentaron el diámetro del tallo en un 24.44 y 27.05% respectivamente, mientras que el tratamiento de gasolina y diésel a  $20 \text{ mg L}^{-1}$  aumentaron la altura de la planta en un 12.5 % y como consecuencia la biomasa seca también aumentó en un 29.76%. El número de frutos se vio disminuido en los tratamientos de gasolina a  $90 \text{ mg L}^{-1}$  en un 14.8%, diésel a  $26$  y  $28 \text{ mg L}^{-1}$  disminuyeron 12.80 y 17.35% respectivamente, y la combinación de gasolina y diésel a  $20 \text{ mg L}^{-1}$  fue de 19.83 % menos comparado con el testigo.

El tipo de hidrocarburo, la concentración y el tiempo de exposición, modificaron significativamente las variables agronómicas de las plantas de tomate. El efecto del diésel a concentración de  $28 \text{ mg L}^{-1}$  condujo a la muerte del 12.5% de las plantas, mientras que la concentración de gasolina a  $90 \text{ mg L}^{-1}$  fue de 6.25% debido al daño producido en la parte basal de la planta. Los compuestos nocivos como los HAP's son potencialmente tóxicos, es probable que se hayan causado efectos adversos en el suelo disminuyendo la

capacidad de absorción de agua y nutrientes (Kanaly y Harayama, 2000; Umeh *et al.*, 2018), en la planta estos compuestos pueden penetrar a través de las membranas celulares (Ma *et al.*, 2010; Chaineau *et al.*, 1997), e inhibir la actividad fotosintética y el transporte de electrones (Mallakin *et al.*, 2002). Ensayos sobre el riego de plantas de tomate con diferentes concentraciones de diésel y gasolina, mostraron que con la aplicación de 30 mg L<sup>-1</sup> de diésel y 15 mg L<sup>-1</sup> de gasolina, se causó la muerte del 55% de las plantas, mientras que con 30 mg L<sup>-1</sup> de gasolina no se ocasionaron daños a las variables morfológicas de la planta (Martel-Valles *et al.*, 2017). El largo de la raíz no se vio afectado en la etapa de floración, pero si en la etapa de fructificación el tratamiento de gasolina a 90 mg L<sup>-1</sup>. En estudios realizados en plantas de guisantes y maíz expuestos a la contaminación por hidrocarburos, afectó negativamente el potencial de crecimiento y morfología de las raíces en ambas especies debido a la presencia de los HAP (Kummerova *et al.*, 2013). Mientras que Merkl *et al.*, (2005) encontraron que plantas de *Brachiaria brizantha* y *Cyperus aggregatus* mostraron raíces más gruesas, pero con longitudes de menor tamaño en aquellas que crecieron en suelo contaminado con petróleo crudo en comparación con el control. En otros estudios realizados con plantas como *Sinapis alba*, *Triticum aestivum* y *Phaseolus vulgaris*, mostraron toxicidad aguda a concentraciones más altas de hidrocarburos causando disminución del peso seco y longitud de la raíz debido a la peroxidación lipídica generada por el estrés oxidativo (Pašková *et al.* 2006), estos estudios coinciden con nuestros resultados ya que la gasolina a 80 mg L<sup>-1</sup>, el diésel a 28 mg L<sup>-1</sup> y la gasolina y diésel a 20 mg L<sup>-1</sup>, disminuyeron el peso seco en la etapa de floración de las plantas, la gasolina a 80 mg L<sup>-1</sup> también llevó a la disminución de la altura de la planta esto debido a que el petróleo y sus productos derivados pueden contribuir a la inhibición del crecimiento y el desarrollo de las plantas debido a la absorción de hidrocarburos bajo peso molecular, puede provocar el bloqueo de estomas y espacios intercelulares, lo que lleva a una tasa reducida de transpiración de la planta junto con daños en la membrana celular (Khan *et al.*, 2018). En plántulas de *A. fruticosa* en suelo contaminado con petróleo afectó negativamente el crecimiento, lo que atribuyen a una tasa fotosintética reducida, especialmente durante el período de crecimiento vigoroso (Han *et al.*, 2016). Por el contrario, el tratamiento gasolina y diésel a 20 mg L<sup>-1</sup> aumento el peso seco y la altura de la planta en la etapa de fructificación. Los combustibles también estimularon a las plantas

aumentando el diámetro del tallo con las concentraciones de 26 mg L<sup>-1</sup> de diésel en la etapa de floración mientras que en la etapa de fructificación fueron la gasolina en sus dos concentraciones (80 y 90 mg L<sup>-1</sup>). Los hidrocarburos como el naftaleno, fenantreno y pireno que están presentes en los derivados del petróleo, en bajas concentraciones generan un aparente proceso de hormesis, en plántulas de *L. sativa* estimularon el crecimiento, este fenómeno de dosis-respuesta se caracteriza por el estímulo en el crecimiento de las plantas a bajas concentraciones y la inhibición de éste a altas dosis de compuestos tóxicos (Pernía *et al.*, 2018; Kirk *et al.*, 2002). Quiñones *et al.*, (2003) afirman que concentraciones altas de hidrocarburos impiden la absorción de agua y nutrientes debido a la formación de una capa hidrofóbica sobre las raíces, mientras que en concentraciones bajas permitieron un mejor crecimiento y desarrollo, con base en emergencia, altura de planta, longitud de raíz y pesos secos en plantas de maíz. Estos cambios también están relacionados con el proceso a través del cual una planta actúa sobre un contaminante en particular, depende del grado de contaminación, de las características fisicoquímicas del contaminante y del sitio contaminado, así como de las propiedades fenotípicas y genotípicas de cada especie vegetal, tales como su grado de tolerancia y su capacidad para captar, absorber, acumular y/o degradar los contaminantes (Meagher 2000; Vangronsveld *et al.*, 2009). El número de frutos se vio afectado en la mayoría de los tratamientos excepto para las plantas donde se aplicó gasolina a 80 mg L<sup>-1</sup>. Estudios similares al nuestro registraron que la contaminación por petróleo crudo a concentraciones tan bajas como 5000 mg kg<sup>-1</sup> de TPH (Hidrocarburos Totales del Petróleo) afectó el crecimiento, el rendimiento, la producción de fruto y la maduración de frutos en plantas de tomate Micro-Tom (Odukoya *et al.*, 2018 y 2019).

**Tabla 4.** Variables agronómicas de plantas de tomate en etapa de floración y fructificación.

<b>Etapa</b>	<b>Tratamientos</b> <b>(mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>LR</b> <b>(cm)</b>	<b>DT</b> <b>(mm)</b>	<b>AP</b> <b>(m)</b>	<b>PS</b> <b>(g)</b>	<b>NF</b>	<b>PF</b> <b>(Kg)</b>
<b>Floración</b>	<b>Gasolina 80</b>	15.60±3.84b	5.35±0.41b	40.80±2.77b	7.43±1.88b	nd	nd
	<b>Gasolina 90</b>	22±2.34a	4.86±0.25b	41.40±4.03ab	9.99±2.38a	nd	nd
	<b>Diésel 26</b>	22.50±4.41a	6.33±0.37a	42.80±4.49ab	8.61±1.68ab	nd	nd
	<b>Diésel 28</b>	21.40±4.97a	5.61±0.92ab	40.40±4.50b	7.43±0.84b	nd	nd
	<b>Gasolina y diésel 20</b>	17.80±1.64ab	5.15±0.89b	46.80±3.56a	7.86±1.69b	nd	nd
	<b>Testigo</b>	18.80±3.19ab	5.32±0.65b	44.80±3.63ab	9.92±1.41a	nd	nd
<b>Fructificación</b>	<b>Gasolina 80</b>	21±8.97bc	13.99±1.04a	2.13±0.13c	145.86±24.31ab	24±2.54a	2.7±0.32a
	<b>Gasolina 90</b>	13.40±5.02c	14.49±2.10a	2.24±0.22bc	145.74±28.39ab	20.60±3.36b	2.38±0.17ab
	<b>Diésel 26</b>	24.60±14.15abc	11.98±1.69b	2.48±0.20ab	132.96±27.98ab	21±1.22b	2.53±0.19ab
	<b>Diésel 28</b>	35.80±12.89a	11.19±1.29b	2.30±0.12bc	129.46±34.83ab	20±2.12b	2.43±0.29ab
	<b>Gasolina y diésel 20</b>	23±15.70abc	11.66±1.48b	2.65±0.32a	163.70±36.02a	19.40±2.3b	2.32±1.25b
	<b>Testigo</b>	26.8±14.72ab	10.57±0.59b	2.33±0.28bc	114.98±8.79b	24.20±2.68a	2.6±0.24ab

SD (±), LR: longitud de raíz, DT: diámetro de tallo, AP: altura de planta, BS: biomasa seca, NF: número de frutos. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (LSD Fisher,  $\alpha \leq 0.05$ ).

### **Calidad de frutos**

En la calidad de los frutos de plantas de tomates se tuvieron diferencias significativas para la mayoría de las variables excepto en pH en donde todos los tratamientos fueron similares al testigo (Tabla 5). El tratamiento de gasolina a  $80 \text{ mg L}^{-1}$  aumentó los sólidos solubles totales (SST) en un 10.34% más que el testigo. La conductividad eléctrica (CE) se vio disminuida en un 23.88% en el tratamiento de diésel a  $26 \text{ mg L}^{-1}$ , mientras que con el tratamiento de gasolina a  $90 \text{ mg L}^{-1}$  disminuyó 18.65% comparado con el testigo. La acidez titulable (AT) también se vio disminuida con el tratamiento de diésel a  $26 \text{ mg L}^{-1}$  con un 33.33% menos que el testigo y siendo el más bajo de todos los tratamientos, seguido del tratamiento de gasolina a  $80 \text{ mg L}^{-1}$  con un 21.21% de disminución. Resultados obtenidos por Odukoya *et al.*, (2018), describen que los frutos de tomate que crecieron en presencia de hidrocarburos no tuvieron un efecto significativo sobre el color de los frutos, tampoco afectaron la concentración de azúcares (azúcar total, fructosa, glucosa y sacarosa), estos parámetros están relacionados con los sólidos solubles totales (SST) y los niveles de licopeno. Las plantas pueden llevar a una regulación ascendente de las enzimas de movilización de sacarosa y la respiración de los frutos de tomate produciendo aumentos en los SST (Baxter *et al.*, 2005), esto se vio reflejado con el tratamiento de gasolina a  $80 \text{ mg L}^{-1}$ , que como factor abiótico pudo inducir al aumento de los SST de los frutos. Pero también se registró una disminución de AT y SST en los frutos con diésel a  $26 \text{ mg L}^{-1}$ , al respecto Martel *et al.*, (2017) reportaron resultados en la calidad de frutos con tratamientos de gasolina a 30 y diésel a  $15 \text{ mg L}^{-1}$  donde aumentó la CE, mientras que con la gasolina a  $15 \text{ mg L}^{-1}$  la disminuyó, los SST disminuyeron con la gasolina a  $30 \text{ mg L}^{-1}$ .

### **Licopeno**

En la variable licopeno todos los tratamientos obtuvieron valores superiores al testigo, el tratamiento de diésel a  $26 \text{ mg L}^{-1}$  obtuvo la mayor concentración de este metabolito aumentando un 58.88% más que el testigo, seguido del tratamiento de diésel a  $28 \text{ mg L}^{-1}$  y del tratamiento de diésel y gasolina a  $20 \text{ mg L}^{-1}$  con un 39.59 y 38.46% respectivamente. El licopeno es el pigmento carotenoide responsable del color rojo de los tomates que se produce en mayor concentración cuando hay tensiones ambientales, actuando como

neutralizador de radicales libres generado por el estrés abiótico (Ronen et al., 1999). Los hidrocarburos son contaminantes que causan estrés abiótico en las plantas (Ramanarao et al., 2012). Las concentraciones de diésel aumentaron considerablemente el contenido de licopeno en los frutos, al respecto la literatura menciona que las tensiones abióticas, que incluyen contaminantes ambientales (como los derivados del petróleo) (Zhang et al., 2007) desempeñan un papel importante en la determinación del valor/calidad nutricional de las frutas y verduras, como respuesta a estos factores externos (Odukoya et al., 2019). Los derivados de petróleo como contaminantes ambientales generaron estrés en las plantas de tomate estimulando a la producción de licopeno, este resultado se pudo observar en mayor concentración en los tratamientos de diésel al aumentar significativamente este metabolito en los frutos.

**Tabla 5.** Calidad de los frutos de plantas de tomate.

<b>Tratamientos</b> <b>(mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>SST</b> <b>(°Brix)</b>	<b>pH</b>	<b>C.E</b> <b>(mS cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>AT</b> <b>(% ácido</b> <b>cítrico)</b>	<b>Licopeno</b> <b>(g kg<sup>-1</sup> PS)</b>
<b>Gasolina 80</b>	4.64±0.51a	4.69±0.08ab	2.50±0.37abc	0.26±0.06bc	0.99±0.15bc
<b>Gasolina 90</b>	4.48±0.46ab	4.77±0.11a	2.04±0.33c	0.31±0.06ab	1.10±0.48bc
<b>Diésel 26</b>	4.08±0.22c	4.73±0.07a	2.18±0.37bc	0.22±0.04c	1.67±0.40a
<b>Diésel 28</b>	4.44±0.16abc	4.56±0.11bc	2.52±0.27ab	0.29±0.02ab	1.19±0.31b
<b>Gasolina y diésel 20</b>	4.32±0.22abc	4.54±0.17c	2.37±0.30abc	0.28±0.02abc	1.17±0.23b
<b>Testigo</b>	4.16±0.19bc	4.64±0.13abc	2.68±0.49a	0.33±0.03a	0.72±0.29c

SD (±), SST: sólidos solubles totales, pH: potencial de hidrógeno, CE: conductividad eléctrica, AT: acidez titulable y PS: peso seco. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (LSD Fisher,  $\alpha \leq 0.05$ ).

### Capacidad antioxidante

En el análisis de la capacidad antioxidante por DPPH medido en hojas (etapa de floración y fructificación) y frutos de tomate se pueden notar diferencias significativas en las hojas de las dos etapas, mientras que en los frutos, los diferentes tratamientos no modificaron la capacidad antioxidante al ser significativamente iguales con respecto al testigo (Tabla 6). En las hojas en etapa de floración, el tratamiento de gasolina en sus dos concentraciones (80 y 90 mg L<sup>-1</sup>) mostraron mayor capacidad antioxidante con un 71.46 y 67.60 % respectivamente, seguido del tratamiento de diésel a 26 mg L<sup>-1</sup> con un aumento del 60.66

%. Mientras que, en hojas de la etapa de fructificación, los tratamientos de diésel fueron los que presentaron mayor capacidad antioxidante, el tratamiento de diésel a  $26 \text{ mg L}^{-1}$  presentó un 10.55% más que el testigo mientras que en concentración de  $28 \text{ mg L}^{-1}$  fue de 11.65%.

Los antioxidantes hidrofílicos están involucrados en el sistema de defensa contra el estrés oxidativo (El-Baky et al., 2009). El ácido ascórbico (AA) y el glutatión reducido (GSH) son antioxidantes no enzimáticos de mayor abundancia y con alto poder reductor de las especies reactivas del oxígeno (ROS) en las células vegetales (Blokhina et al., 2000). La contaminación por combustibles diésel y gasolina modificaron la capacidad antioxidante en las plantas, la gasolina en sus dos concentraciones y el diésel a  $26 \text{ mg L}^{-1}$  aumentó significativamente la capacidad antioxidante, esto se traduce como una reducción de los radicales libres por los antioxidantes presentes en los tejidos de la planta. Pawlak-Sprada *et al.*, (2011) mencionan que los productos derivados del petróleo, y sobre todo los metales pesados que contienen, también pueden causar estrés oxidativo en las plantas como resultado de una producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) y una falta de neutralización respectiva. La capacidad antioxidante en las hojas de la etapa de fructificación se vio con mayor aumento con los tratamientos de diésel ( $26$  y  $28 \text{ mg L}^{-1}$ ). En estudios realizados por Rusin *et al.*, (2018) encontraron que las plantas de Vicia faba que crecen en suelos contaminados con combustible diésel se caracterizaron por una menor actividad de antioxidantes. Esta variable también la podemos relacionar con la muerte de las plantas con diésel a  $28 \text{ mg L}^{-1}$  y con la gasolina a  $90 \text{ mg L}^{-1}$ .

Los tomates contienen diferentes clases de sustancias con propiedades antioxidantes como carotenoides, vitamina C, fenólicos y tocoferoles (Lenucci *et al.*, 2006). La capacidad antioxidante hidrofílica de los frutos se atribuye mayormente a biomoléculas como la vitamina C, flavonoides totales y fenólicos hidrofílicos (Gómez *et al.*, 2001). Las aplicaciones de la gasolina y diésel a  $20 \text{ mg L}^{-1}$  no modificaron la capacidad antioxidante en las hojas y frutos, esto pudo haber sido a que la actividad de los sistemas de defensa antioxidantes, pueden estar involucrada en la resistencia de las plantas a muchos tipos de estrés (Tofiño *et al.*, 2017). Las plantas tienen un mecanismo que determina el grado de tolerancia a un contaminante activando una red de defensa antioxidante que elimina el exceso de ROS (Peralta-Pérez y Volke-Sepúlveda, 2012). Las ROS pudieron haber

afectado el balance antioxidante de las plantas y provocar su muerte con los hidrocarburos de mayor concentración.

**Tabla 6.** Capacidad antioxidante en hojas (etapa de floración y fructificación) y frutos de plantas de tomate.

Tratamientos (mg L <sup>-1</sup> )	DPPH TEAC (mM g <sup>-1</sup> PS)		
	Hojas		Frutos
	Etapa de floración	Etapa de fructificación	
<b>Gasolina 80</b>	4.03±0.05a	1.24±0.37b	4.42±0.02a
<b>Gasolina 90</b>	3.55±0.85a	1.44±0.11ab	4.35±0.01bc
<b>Diésel 26</b>	2.88±0.68b	1.61±0.22a	4.33±0.06c
<b>Diésel 28</b>	1.69±0.42c	1.63±0.09a	4.40±0.010a
<b>Gasolina y diésel</b>	1.30±0.13c	1.60±0.32ab	4.39±0.03ab
<b>Testigo</b>	1.15±0.20c	1.44±0.363b	4.37±0.04abc

SD (±), DPPH: 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl, TEAC: actividad antioxidante equivalente a trolox. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (LSD Fisher,  $\alpha \leq 0.05$ ).

## Minerales

En el análisis de concentración de minerales en hojas (etapa de floración y fructificación) y frutos en plantas de tomate se obtuvieron resultados significativos con la aplicación de los diferentes tratamientos (Tabla 7, 8 y 9).

Hojas de la etapa de floración. En la tabla 7 se muestran los resultados del contenido mineral en hojas de tomate en la etapa de floración, en donde se observan que los tratamientos de gasolina a 80 y 90 mg L<sup>-1</sup> y la combinación de gasolina y diésel a 20 mg L<sup>-1</sup> no modificaron el contenido mineral comparado con el testigo siendo estos significativamente iguales, mientras que con los tratamientos de diésel de 26 y 28 mg L<sup>-1</sup> si se mostraron diferencias significancias. El tratamiento de diésel a 26 mg L<sup>-1</sup> modificó el contenido de Ca, K, Cu y Fe, aumentando las concentraciones de Ca en un 14.73 %, Cu en 7.40 % y Fe un 21.47 %, mientras que K disminuyo un 12.37 % respecto al testigo. El tratamiento de diésel a 28 mg L<sup>-1</sup> aumentó un 16.56 % de N y un 2.57 % el Mg comparado con el testigo.

Hojas en la etapa de fructificación. En esta etapa, los tratamientos de diésel a 26 mg L<sup>-1</sup> y de gasolina y diésel a 20 mg L<sup>-1</sup> no modificaron el contenido de los minerales en las hojas de las plantas siendo significativamente iguales al testigo, mientras que la gasolina a 80 mg L<sup>-1</sup> disminuyó la concentración de Mn y Mo en un 28.85% para cada elemento, el tratamiento de gasolina a 90 mg L<sup>-1</sup> aumentó la concentración de Na en un 26.66%, en el caso de Mn y Mo disminuyó en un 29.75% respectivamente. El tratamiento de diésel a 28 mg L<sup>-1</sup> disminuyó el contenido de N en un 22.05 % en comparación con el testigo (Tabla 8).

Frutos. El contenido mineral en frutos fue similar al testigo en los tratamientos de gasolina a 80 mg L<sup>-1</sup>, diésel a 26 y 28 mg L<sup>-1</sup> (Tabla 9). En el tratamiento de gasolina a 90 mg L<sup>-1</sup> se obtuvo un cambio significativo para Se con una disminución en su concentración en un 47.41% comparado con el testigo, mientras que para el tratamiento de gasolina y diésel a 20 mg L<sup>-1</sup> solo presentó cambio el Cu, encontrándose en mayor concentración con 26.77% más que el testigo.

El petróleo crudo y sus derivados consisten principalmente en carbono, hidrógeno, azufre, nitrógeno y oxígeno, sin embargo, la contaminación con estos productos puede causar una disminución en los niveles de nitrógeno y fósforo en el suelo ya que estos elementos son usados en el proceso de biodegradación natural de los xenobióticos (Okonokhua *et al.*, 2007).

Estos contaminantes también causan un decremento en el pH, asociado con una mayor producción de ácidos orgánicos como resultado del metabolismo microbiano del suelo (Osuji y Nwoye, 2007).

En estudios realizados por Rusin *et al.*, (2017) encontraron que las aplicaciones del combustible diésel resultaron en una disminución significativa en el contenido de K y N en las hojas, por otro lado, indujeron un aumento en el contenido de Mg en las hojas y brotes de las plantas de frijol. En análisis de hojas de las dos etapas (floración y fructificación) presentaron cambios en el contenido mineral con el diésel, las concentraciones de a 28 mg L<sup>-1</sup> aumentó el Mg y N de las hojas en la etapa de floración, mientras que en la etapa de fructificación la concentración de N se vio disminuido, el diésel a 26 mg L<sup>-1</sup> aumentó el contenido de Ca, Cu y Fe en las hojas de la etapa de floración, mientras que K disminuyo. Al respecto Redondo-Gómez *et al.*, (2014),

encontraron que al aplicar diésel a *Spartina argentinensis* no afectó el estado nutricional, por el contrario, favoreció la asimilación de nutrimentos. Por otra parte, estudios realizados en plantas de lechugas y camotes que fueron expuestos a diferentes rangos de concentración de diésel no mostraron variación en la absorción de nutrientes minerales (Fatokun y Zharare, 2015).

En estudios de contaminación del suelo con derivados del petróleo se demostró que reduce la capacidad de intercambio de Ca, Mg, y K mientras que también disminuye la disponibilidad de estos macronutrientes, estos contaminantes aumentan la densidad del suelo, lo que hace que los poros del suelo se obstruyan y, en consecuencia, alteran las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo y perturban la absorción de agua y nutrientes por las plantas (Agbogidi *et al.*, 2007; Wyszowski y Ziolkowska 2008). En plantas de trigo de invierno, la presencia de combustibles como la gasolina en el suelo, provocó una disminución en los niveles de Mg y un aumento en los niveles de Ca en las partes aéreas de la planta (Rusin *et al.*, 2018). Con los tratamientos de gasolina (80 y 90 mg L<sup>-1</sup>) se observó una disminución del Mn y Mo, mientras que concentración de 90 mg L<sup>-1</sup> en la etapa de floración, aumento el contenido de Na. En estudios similares reportan cambios en el contenido mineral con la contaminación de gasolina, conduciendo a un nivel elevado de nitrógeno en las hojas y brotes de frijol ancho, pero también redujo el nivel de Ca en estos órganos (Rusin *et al.*, 2017). Martel-Valles *et al.*, (2014 y 2017) reportan que las concentraciones de hidrocarburos presentes en el agua de riego causaron un desbalance nutricional provocando una disminución en la concentración de los minerales N, P, K, Mg, pero cuando se encontraban en bajas concentraciones estimuló a la absorción y translocación de nutrientes en el fruto de las plantas de tomate.

Algunos autores también han demostrado que los productos derivados del petróleo provocan un aumento de los niveles de algunos metales pesados en el suelo como el Cd, Pb, Cu y Mn y que podrían ser absorbidos por las plantas (Okonkhua *et al.*, 2007; Ujowundu *et al.*, 2011; Wyszowski y Sivitskaya, 2012) en nuestro estudio el Cu estuvo presente en los frutos, pero en bajas concentraciones por lo que no generó un impacto negativo en el desarrollo de la planta, y las concentraciones no superan el límite de toxicidad.

Aparte de los macro y micronutrientes esenciales en las plantas se analizaron el Si y el Se, ya desempeñan papeles en conferir tolerancia al estrés oxidativo al mejorar el sistema de defensa antioxidante en las plantas (Hasanuzzaman *et al.*, 2014). Especialmente para aquellos en ambientes estresados por metales pesados (Wu *et al.*, 2017). La disponibilidad del Se en los frutos se vio afectado con el tratamiento de gasolina a  $90 \text{ mg L}^{-1}$ , mientras que en las hojas los tratamientos no afectaron la concentración de Se y Si. Obire y Nwabueka, (2002) afirman que la presencia de productos derivados del petróleo modifica el contenido mineral en los diferentes órganos de las plantas como hojas y frutos, debido a que afectan la estructura química del suelo. Las plantas cultivadas muestran diversos grados de susceptibilidad a la presencia de gasolina y diésel, el impacto resultante tiene relación con numerosos factores, tales como: tipo y dosis de sustancias aplicadas, propiedades del suelo, humedad y pH del suelo, contenido de oxígeno y materia orgánica, fertilización aplicada y especies de plantas (Wyszkowski y Ziółkowska 2009). Uno de los factores importantes fue utilización de solución nutritiva ya que ayudo a que la presencia de los hidrocarburos no causaran efectos adversos de gran magnitud en el contenido de macro y micronutrientes en las plantas de tomate.

**Tabla 7.** Minerales en hojas de plantas de tomate en etapa de floración.

Minerales	Tratamientos					
	Gasolina 80 mg L <sup>-1</sup>	Gasolina 90 mg L <sup>-1</sup>	Diésel 26 mg L <sup>-1</sup>	Diésel 28 mg L <sup>-1</sup>	Gasolina y diésel 20 mg L <sup>-1</sup>	Testigo
<b>N (mg g<sup>-1</sup> PS)</b>	24.08±2.08c	29.67±2.19ab	27.20±6.28bc	33.32±2.90a	27.80±3.19bc	28.41±2.74bc
<b>Ca (mg g<sup>-1</sup> PS)</b>	33.59±4.13ab	34.30±5.40ab	37.36±5.89a	35.90±3.94ab	36.84±2.33ab	31.52±4.12b
<b>K (mg g<sup>-1</sup> PS)</b>	38.75±4.43bc	41.92±7.46abc	36.67±3.43c	46.93±6.26a	41.85±6.05abc	44.92±3.42ab
<b>Mg (mg g<sup>-1</sup> PS)</b>	9.28±1.07b	10.06±1.36ab	10.06±0.75ab	10.48±0.60a	10.21±0.76ab	9.35±0.94b
<b>Na (mg g<sup>-1</sup> PS)</b>	0.80±0.18ab	0.92±0.88a	0.92±0.14a	0.76±0.036ab	0.67±0.085b	0.78±0.20ab
<b>P (mg g<sup>-1</sup> PS)</b>	10.62±2.33a	10.84±1.37a	11.34±1.71a	11.29±0.60a	12.52±0.78a	10.69±1.52a
<b>S (mg g<sup>-1</sup> PS)</b>	14.6±1.31a	15.85±2.47a	15.1±3.13a	16.83±1.92a	15.37±2.97a	15±3.04a
<b>B (µg g<sup>-1</sup> PS)</b>	109.22±83.55a	71.54±48.16a	112.92±58.75a	72.90±22.12a	63.38±15.23a	61.03±24.64a
<b>Cu (µg g<sup>-1</sup> PS)</b>	1.46±0.18ab	1.58±0.10ab	1.62±0.37a	1.32±0.21b	1.50±0.17ab	1.30±0.30b
<b>Fe (µg g<sup>-1</sup> PS)</b>	56.06±8.80b	55.02±7.33ab	68.08±15.22a	59.62±11.42ab	53.46±3.29b	50.42±9.70b
<b>Mn (µg g<sup>-1</sup> PS)</b>	50.24±15.93a	55.42±17.79a	49.20±19.36a	43.22±8.66a	41.68±9.25a	41.08±2.37a
<b>Mo (µg g<sup>-1</sup> PS)</b>	50.24±15.93a	55.42±17.79a	49.20±19.36a	43.22±8.66a	41.68±9.25a	41.08±2.37a
<b>Se (µg g<sup>-1</sup> PS)</b>	3.32±2.68a	3.14±1.56a	3.38±3.08a	3.98±3.60a	3.94±2.16a	2±0a
<b>Si (µg g<sup>-1</sup> PS)</b>	74.30±9.14a	72.52±13.68a	67.42±8.04a	61.88±10.11a	62.84±6.48a	65.22±11.93a
<b>Zn (µg g<sup>-1</sup> PS)</b>	11.18±2.53a	11.10±1.84a	14.08±3.15a	12.46±2.73a	13.72±3.03a	12.5±1.75a
<b>Ni (µg g<sup>-1</sup> PS)</b>	≤ 2±0a	≤ 2±0a	≤ 2±0a	≤ 2±0a	≤ 2±0a	≤ 2±0a

SD (±), PS: peso seco. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (LSD Fisher,  $\alpha \leq 0.05$ ).

**Tabla 8.** Minerales en hojas de tomate en etapa de fructificación.

Minerales	Tratamientos					
	Gasolina 80 mg L <sup>-1</sup>	Gasolina 90 mg L <sup>-1</sup>	Diésel 26 mg L <sup>-1</sup>	Diésel 28 mg L <sup>-1</sup>	Gasolina y diésel 20 mg L <sup>-1</sup>	Testigo
<b>N (mg g<sup>-1</sup> PS)</b>	26.24±2.18ab	26.53±4.03ab	23.94±1.15ab	22.16±8.20b	26.84±2.06ab	28.43±1.65a
<b>Ca (mg g<sup>-1</sup> PS)</b>	61.1±3.21b	66.82±3.63ab	78.55±7.86a	62.93±4.54b	76.64±5.02a	66.38±3.64ab
<b>K (mg g<sup>-1</sup> PS)</b>	43.99±4.54a	39.21±3.67ab	34.35±1.43b	36.76±3.94ab	39.54±1.28ab	39.53±5.75ab
<b>Mg (mg g<sup>-1</sup> PS)</b>	7.40±0.83a	8.36±1.23a	7.74±0.74a	7.21±0.40a	9.51±1.20a	7.67±0.99a
<b>Na (mg g<sup>-1</sup> PS)</b>	0.65±0.04b	0.90±0.14a	0.62±0.03b	0.65±0.05b	0.79±0.08ab	0.66±0.10b
<b>P (mg g<sup>-1</sup> PS)</b>	16.44±2.52a	17.21±2.36a	20.64±2.49a	17.68±1.64a	19.64±1.87a	17.61±2.08a
<b>S (mg g<sup>-1</sup> PS)</b>	18.98±1.25ab	22.18±2.0ab	22.45±3.08ab	17.24±2.76b	22.88±1.23a	22.17±1.18ab
<b>B (µg g<sup>-1</sup> PS)</b>	50±0a	50±0a	50±0a	50.18±a	52.86±6.40a	50.02±0.04a
<b>Cu (µg g<sup>-1</sup> PS)</b>	2.62±0.96a	2.34±0.82a	2.56±1.35a	2.62±0.92a	2.54±0.77a	3.02±1.71a
<b>Fe (µg g<sup>-1</sup> PS)</b>	45.58±8.54a	47.58±16.82a	57.74±18.57a	61.94±7.77a	48.36±8.37a	48.18±6.88a
<b>Mn (µg g<sup>-1</sup> PS)</b>	122.74±26.21b	121.18±20.40b	189.84±66.36a	160.04±25.71ab	165.52±21.11ab	172.52±18.54a
<b>Mo (µg g<sup>-1</sup> PS)</b>	122.74±26.21b	121.18±20.40b	189.84±66.36a	160.04±25.71ab	165.52±21.11ab	172.52±18.54a
<b>Se (µg g<sup>-1</sup> PS)</b>	2±0a	2.54±1.21a	2.90±2.01a	3.86±0.10a	2.08±0.18a	2±0a
<b>Si (µg g<sup>-1</sup> PS)</b>	85.80±26.97a	105.02±46.08a	102.80±38.19a	68.60±6.94a	92.56±32.63a	76.28±25.71a
<b>Zn (µg g<sup>-1</sup> PS)</b>	13.28±7.71a	19.36±20.70a	20.28±21.53a	57.04±10.16a	12.80±4.31a	16.16±12.04a
<b>Ni (µg g<sup>-1</sup> PS)</b>	≤ 2±0a	≤ 2±0a	≤ 2±0a	≤ 2±0a	≤ 2±0a	≤ 2±0a

SD (±), PS: peso seco. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (LSD Fisher,  $\alpha \leq 0.05$ ).

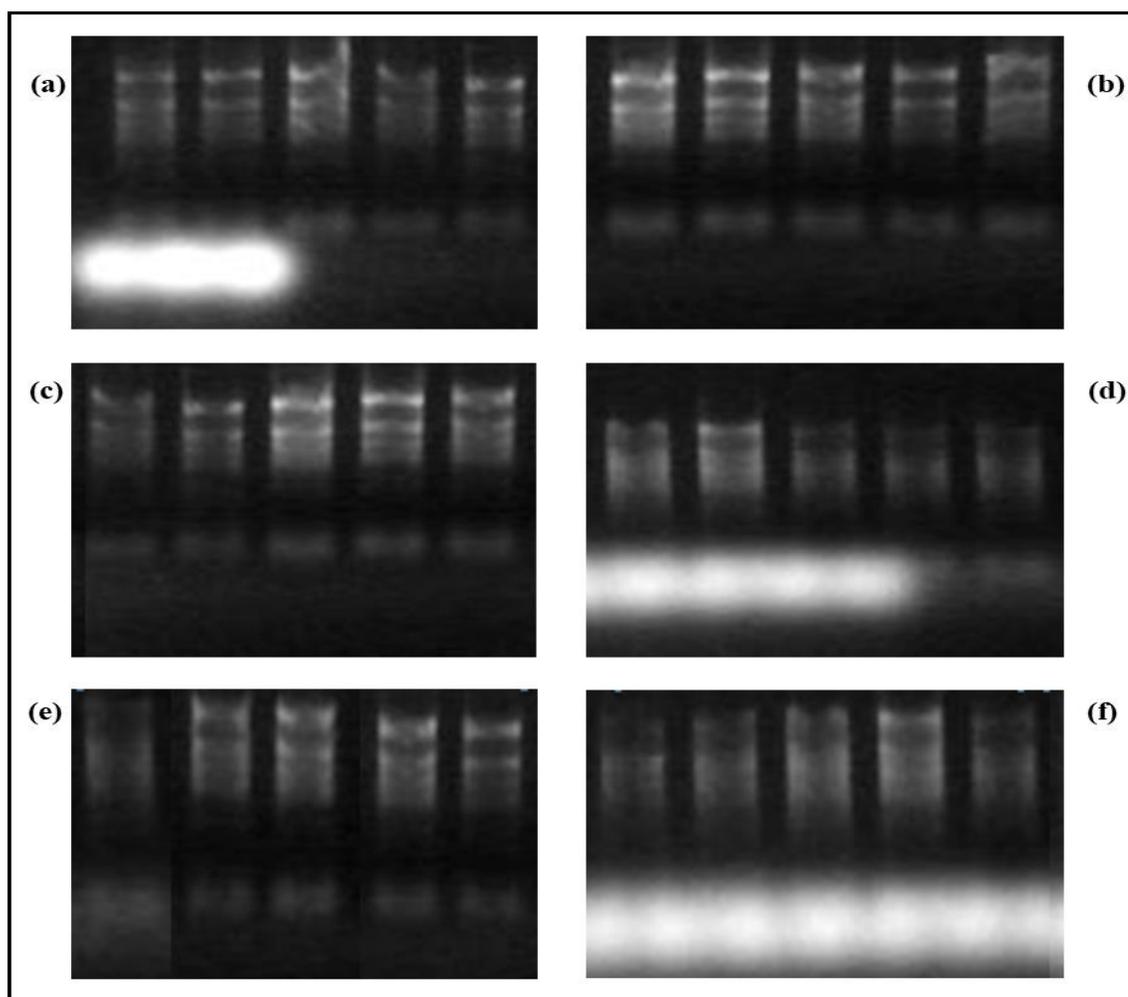
**Tabla 9.** Minerales en frutos de plantas de tomate.

	<b>Tratamientos</b>					
	<b>Gasolina 80 mg L<sup>-1</sup></b>	<b>Gasolina 90 mg L<sup>-1</sup></b>	<b>Diésel 26 mg L<sup>-1</sup></b>	<b>Diésel 28 mg L<sup>-1</sup></b>	<b>Gasolina y diésel 20 mg L<sup>-1</sup></b>	<b>Testigo</b>
<b>Minerales</b>						
<b>N (mg g<sup>-1</sup> PS)</b>	17.67±1.10b	18.45±1.53ab	20.22±2.43a	19.31±2.00ab	19.61±1.78ab	18.96±0.92ab
<b>Ca (mg g<sup>-1</sup> PS)</b>	2.83±0.31a	2.32±0.25a	2.49±0.30a	2.25±0.18a	2.45±0.39a	2.52±0.28a
<b>K (mg g<sup>-1</sup> PS)</b>	31.78±1.67a	30.83±1.03a	33±1.09a	31.04±1.08a	31.12±3.89a	35.07±3.37a
<b>Mg (mg g<sup>-1</sup> PS)</b>	1.24±0.07a	1.36±0.09a	1.54±0.12a	1.34±0.11a	1.47±0.18a	1.5±0.18a
<b>Na (mg g<sup>-1</sup> PS)</b>	0.39±0.04a	0.29±0.03b	0.32±0.02ab	0.35±0.02ab	0.31±0.01b	0.31±0.03ab
<b>P (mg g<sup>-1</sup> PS)</b>	4.86±0.24a	5.06±0.26a	5.73±0.18a	5.09±0.19a	5.77±0.69a	5.37±0.45a
<b>S (mg g<sup>-1</sup> PS)</b>	2.07±0.11a	2.19±0.08a	2.38±0.14a	2.22±0.12a	2.41±0.29a	2.27±0.17a
<b>B (µg g<sup>-1</sup> PS)</b>	50±0a	50±0a	50±0a	50.18±a	52.86±6.40a	50.02±0.04a
<b>Cu (µg g<sup>-1</sup> PS)</b>	1.94±0.49bc	1.62±0.24c	2.18±0.21b	1.84±0.32c	2.54±0.27a	1.86±0.45bc
<b>Fe (µg g<sup>-1</sup> PS)</b>	39.64±10.44a	38.14±4.13ab	42.84±9.23a	27.66±9.24b	32.20±8.99ab	36.96±5.51ab
<b>Mn (µg g<sup>-1</sup> PS)</b>	9±1.65a	8.02±0.99a	9.48±2.04a	8.54±2.44a	8.60±2.35a	8.12±1.59a
<b>Mo (µg g<sup>-1</sup> PS)</b>	9±1.65a	8.02±0.99a	9.48±2.04a	8.54±2.44a	8.60±2.35a	8.12±1.59a
<b>Se (µg g<sup>-1</sup> PS)</b>	3.22±1.59ab	2.24±0.53b	3.66±1.60ab	3.34±1.93ab	2.98±1.14ab	4.26±1.57a
<b>Si (µg g<sup>-1</sup> PS)</b>	32.70±5.77a	28.54±2.75ab	27.18±1.70ab	23.60±5.36b	28±8.31ab	28.98±5.25ab
<b>Zn (µg g<sup>-1</sup> PS)</b>	11.92±3.02ab	11±1.66b	12±1.18ab	11.20±1.57b	14.32±3.34a	11.78±1.54ab
<b>Ni (µg g<sup>-1</sup> PS)</b>	≤ 2±0a	≤ 2±0a	≤ 2±0a	≤ 2±0a	≤ 2±0a	≤ 2±0a

SD (±), PS: peso seco. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (LSD Fisher,  $\alpha \leq 0.05$ ).

### Análisis de expresión de genes

Calidad del ARN por electroforesis horizontal en un gel de agarosa. El análisis por electroforesis de las muestras mostró que el ARN presentó buena calidad en la mayoría de las muestras de cada tratamiento. Las bandas intensas que están presentes en la parte superior corresponden a las subunidades de ARN ribosomal y su presencia es signo de un ARN no degradado, mientras que las bandas indefinidas, denotan degradación parcial del ARN (Díaz-Alonso *et al.*, 2013). Por lo que el ARN extraído fue considerado viable para la síntesis de cDNA y la cuantificación de los genes (Figura 9).



**Figura 9.** Calidad del ARN mediante electroforesis desnaturizante en hojas de tomate. Gasolina 80 mg L<sup>-1</sup> (a), gasolina 90 mg L<sup>-1</sup> (b), diésel 26 mg L<sup>-1</sup> (c), diésel 28 mg L<sup>-1</sup> (d), gasolina y diésel 20 mg L<sup>-1</sup> (e) y testigo (f).

El estudio de la cuantificación de la expresión de los genes antioxidantes (CAT, GPX y CAT) en tejidos de hojas de tomate se llevó a cabo a los 30 DDT y 15 días después de la aplicación de los tratamientos.

### **Expresión del gen CAT**

El gen CAT (Figura 2) se vio sobreexpresado mayormente en las plantas con la aplicación del tratamiento de diésel a 26 mg L<sup>-1</sup> con 3 veces más que el testigo, el tratamiento de gasolina a 80 mg L<sup>-1</sup> y gasolina y diésel a 20 mg L<sup>-1</sup> tuvieron una ligera sobreexpresión de este gen con 0.40 y 0.37 veces más respectivamente, mientras que los tratamientos de gasolina a 90 mg L<sup>-1</sup> y diésel a 28 mg L<sup>-1</sup> reprimieron su expresión con 0.41 y 0.37 veces respectivamente, comparados con el testigo.

### **Expresión del gen SOD**

Para el gen SOD (Figura 3) también se obtuvo los resultados más altos con tratamiento diésel a 26 mg L<sup>-1</sup> sobreexpresando el gen 9.802 veces más que el testigo, seguido del tratamiento de gasolina a 80 mg L<sup>-1</sup> que tuvo una ligera sobreexpresión de 1.9 veces más que el testigo, los tratamientos gasolina a 90 mg L<sup>-1</sup>, diésel con 28 mg L<sup>-1</sup> y la combinación de gasolina y diésel a 20 mg L<sup>-1</sup> reprimieron este gen con 0.01 y 0.30 respectivamente comparado con el testigo.

### **Expresión del gen GPX**

El gen GPX (Figura 4) mostró una sobreexpresión de 895 veces más con respecto al testigo con la aplicación de diésel a 26 mg L<sup>-1</sup> seguido del tratamiento de gasolina a 80 mg L<sup>-1</sup> con 130 veces más, gasolina a 90 mg L<sup>-1</sup> con 3.5 veces más que el testigo y la combinación de gasolina y diésel a 20 mg L<sup>-1</sup> mostró resultados similares que el testigo.

Se sabe que las ROS influyen en la expresión de varios genes y contribuyen a muchos procesos en las respuestas de estrés abiótico. Las enzimas SOD, CAT y GPX juegan un papel importante en mantener las células sanas bajo estrés ambiental al eliminar los radicales libres (Gill y tuteja, 2010). En reportes sobre estudios de plantas de tomate bajo estrés por salinidad se reporta una disminución de la expresión de los genes SOD y GPX (Alharby *et al.*, 2016).

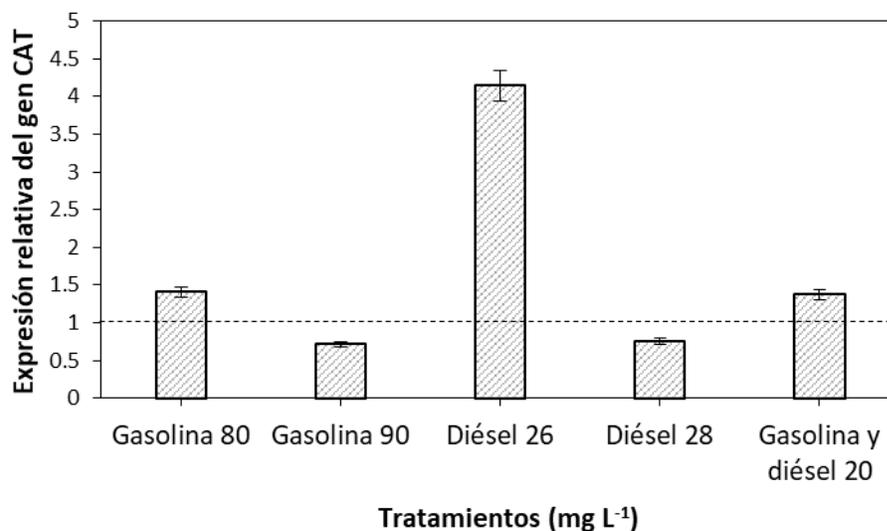
Bayoumi *et al.*, (2008), indicaron que las plantas sensibles expuestas a condiciones de estrés abiótico exhiben con frecuencia un conjunto característico de respuestas celulares y metabólicas que incluyen una disminución o un aumento en la síntesis de proteínas.

Las ROS y el estrés oxidativo juegan un papel importante en la respuesta a los hidrocarburos. En estudios realizados por Liu *et al.*, (2014) plantearon una hipótesis de que la respuesta proteómica en *Arabidopsis thaliana* con fenantreno, un modelo de HAP, incluiría una fuerte firma de estrés oxidativo y proporcionaría pistas a posibles moléculas de señalización involucradas, dando como resultados la identificación de 30 niveles de proteínas que se alteraron significativamente, incluidas catalasas (CAT), ascorbato peroxidasa (APX), peroxiredoxinas (POD), glutatión-S-transferasa y glutatión reductasa.

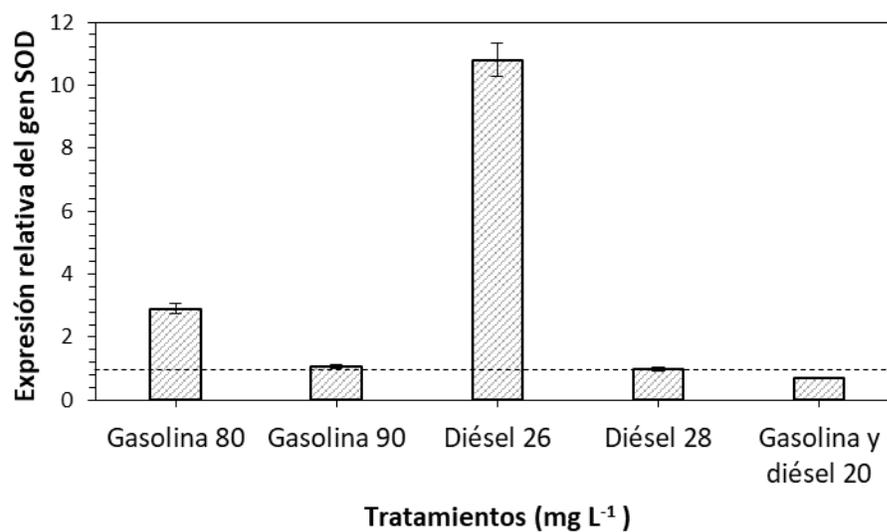
Liu *et al.*, (2009) observaron cambios en las actividades de las enzimas antioxidantes de una manera dependiente de la dosis, y también detectaron cambios rápidos en los niveles de ARNm de catalasa (CAT) y ascorbato peroxidasa (APX) después del tratamiento con fenantreno. También se observaron aumentos en el malondialdehído (MDA) que indica la oxidación de los lípidos.

La contaminación de aceite lubricante en las plántulas de *Bruguiera gymnorrhiza* presentó un estrés de oxidación reflejado por los aumentos en la actividad de una enzima antioxidante (SOD) y el contenido de radicales libres y MDA (Zhang *et al.*, 2007).

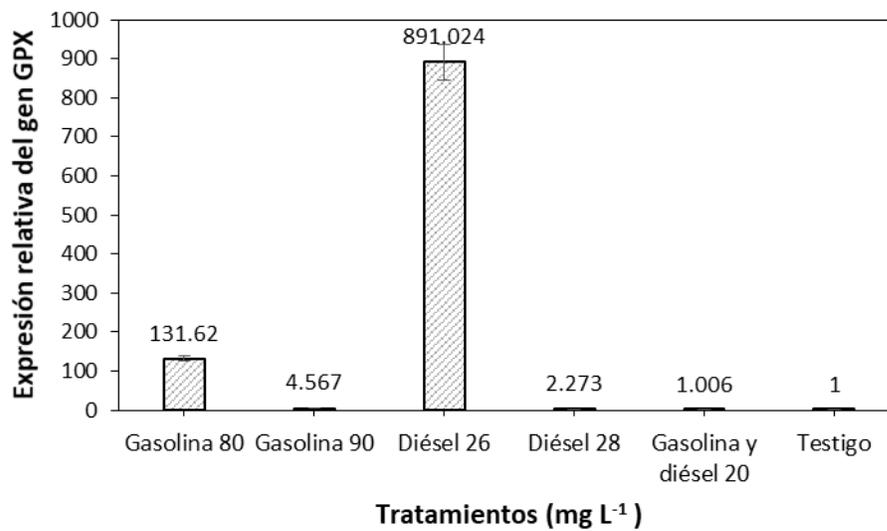
En otros estudios las actividades de las enzimas antioxidantes, incluidas la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPX), mostraron una tendencia decreciente con el aumento de la concentración del fenantreno (PHE). Los resultados indicaron que el PHE podría ejercer daños oxidativos en la etapa temprana de desarrollo del trigo y la nocividad se produjo principalmente en muestras con concentraciones más altas de PHE (Wei *et al.*, 2014).



**Figura 10.** Expresión del gen CAT en hojas de tomate. Las barras representan el error estándar  $\pm$  de la media y la línea de referencia representa el valor constante del testigo.



**Figura 11.** Expresión del gen SOD en hojas de tomate. Las barras representan el error estándar  $\pm$  de la media y la línea de referencia representa el valor constante del testigo.



**Figura 12.** Expresión del gen GPX en hojas de tomate. Las barras representan el error estándar  $\pm$  de la media.

## CONCLUSIONES

La contaminación por hidrocarburos causo efectos significativos en las plantas de tomate al disminuir la producción de los frutos con la mayoría de los tratamientos pero no el peso ni la calidad de estos

El contenido mineral de las plantas se vio modificado con la mayoría de los tratamientos, pero sin afectar gravemente su estado nutricional.

Las concentraciones más altas diésel y la gasolina a 28 y 90 mg L<sup>-1</sup> respectivamente, causaron la muerte del 6.25 y 12.5 % las plantas en sus primeras etapas de desarrollo, mientras que la combinación de ambos combustibles (gasolina y diésel a 20 mg L<sup>-1</sup>) no generó grandes cambios comportándose de manera similar al testigo en la mayoría de las variables evaluadas.

Las plantas donde se aplicaron las concentraciones más bajas (diésel a 26 y gasolina a 80 mg L<sup>-1</sup>) muestran rasgos de tolerancia al estrés al aumentar la capacidad antioxidante en las hojas, estimular de producción de licopeno en los frutos y sobreexpresar los genes de enzimas antioxidantes que ayudan a neutralizar a los radicales libres generados por el estrés abiótico que causan los hidrocarburos.

Las dosis de hidrocarburos utilizadas en este trabajo (por arriba de la NOM-143) permiten tener una referencia de los efectos que estos producen al encontrarse en el agua y la posibilidad de utilizarse para uso agrícola.

## REFERENCIAS

- Adams, R. H., Zavala-Cruz J., Morales-García F. (2008). Concentración residual de hidrocarburos en suelo del trópico.II: afectación a la fertilidad y su recuperación. *Interciencia*. 33(7): 483-489.
- Agbogidi, O. M., Eshgebeyi, O. F. (2006). Rendimiento de semillas y plántulas de *Dacryodes edulis* (Don. G. Lam HJ) en un suelo contaminado con petróleo crudo. *J Sustain Forest* 22 (3-4): 1–13
- Albanese, S., Breward, N. (2011). Sources of anthropogenic contaminants in the urban environment. In: Christopher, C.J., Alecos-Demetriades, Locutura-Ottesen, J.R.T. (Eds.). *Mapping the Chemical Environment of Urban Areas*. First Edition. Wiley-Blackwell, Oxford, pp. 116-127 <https://doi.org/10.1002/9780470670071.ch8>
- Alharby, H. F., Metwali, E. M. R., Fuller, M. P., & Aldhebiani, A. Y. (2016). The alteration of mRNA expression of SOD and GPX genes, and proteins in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) under stress of NaCl and / or ZnO nanoparticles. *Saudi Journal of Biological Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.04.012>
- Al-Hawash, A. B., Dragh, M. A., Li, S., Alhujaily, A., Abbood, H. A., Zhang, X., & Ma, F. (2018). Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 44(2), 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2018.06.001>
- Alrumman, S. A., Standing, D. B., & Paton, G. I. (2015). Effects of hydrocarbon contamination on soil microbial community and enzyme activity. *Journal of King Saud University - Science*, 27(1), 31–41. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2014.10.001>
- AOAC (1990). *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists, 15th ed. Arlington, Virginia, USA. Pp.384.
- AOAC (2005). *Association of official analytical chemist official methods of analysis of association of official analytical chemist 18th ed.*
- Ashraf, M. A., Maah, M. J., Yusoff, I. (2014). Soil Contamination, Risk Assessment and Remediation. *Environmental Risk Assessment of Soil Contamination*. InTech, Croatia, pp. 2-47. <http://dx.doi.org/10.5772/57287>
- ATSDR (1995). Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Disponible en línea: [https://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es\\_tfacts69.html](https://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts69.html)
- Auffret, M., Labbé, D., Thouand, G., Greer, C. W., & Fayolle-Guichard, F. (2009). Degradation of a mixture of hydrocarbons, gasoline, and diesel oil additives by

- Rhodococcus aetherivorans and Rhodococcus wratislaviensis. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(24), 7774–7782. <https://doi.org/10.1128/AEM.01117-09>
- Baxter, C. J., Sabar, M., Quick, W. P., & Sweetlove, L. J. (2005). Comparison of changes in fruit gene expression in tomato introgression lines provides evidence of genome-wide transcriptional changes and reveals links to mapped QTLs and described traits. *Journal of Experimental Botany*, 56(416), 1591–1604. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri154>
- Bayoumi, T. E., Manal, E. Metwali (2008). Aplicación de índices fisiológicos y bioquímicos como técnica de detección de tolerancia a la sequía en genotipos de trigo. *Afr. J. Biotechnol.* (7) 2341 – 2352
- Blokhina, O.B., Virolainen, E., Fagerstedt, K. V., Hoikkala, A., Wähälä, K., Chirkova, T. V., 2000. Antioxidant status of anoxia-tolerant and -intolerant plant species under anoxia and reaeration. *Physiol. Plant.* 109, 396–403. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2000.100405.x>
- Brand-Williams, Cuvelier W. M. E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Brassington, K. J., Pollard, S. J. T., Coulon, F. (2010). Weathered Hydrocarbon Biotransformation: Implications for Bioremediation, Analysis, and Risk Assessment. In: Timmis K.N. (Eds) *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer, Berlin, Heidelberg pp.2487-2499 <http://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4>
- Bungheza, I. R., Radulyb, M., Donceaa, S., Aksahinc, B., Iona, R. (2011). Lycopene determination in tomatoes by different spectral techniques (uv-vis, ftir and hplc). *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*. 6: 3, 1349-1356.
- Calabrese E. J., Baldwin L. A. (1998) Can the concept of hormesis be generalized to carcinogenesis? *Regul. Toxicol. Pharmacol.* ; 28:230–241. [doi:10.1006/rtph.1998.1267](https://doi.org/10.1006/rtph.1998.1267)
- Cavazos-Arroyo, J., Pérez-Armendáris, B., & Mauricio-Gutiérrez. (2014). Afectaciones y consecuencias de los derrames de hidrocarburos en suelos agrícolas de Acatzingo, Puebla, México. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*, 11(4), 539–550.
- Cermak, J. H., Stephenson, G. L., Birkholz, D., Wang, Z., & Dixon, D. G. (2010). Toxicity of petroleum hydrocarbon distillates to soil organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(12), 2685–2694. <https://doi.org/10.1002/etc.352>
- Chaîneau, C. H., Morel, J. L., & Oudot, J. (1997). Phytotoxicity and plant uptake of fuel oil hydrocarbons. *Journal of Environmental Quality*, 26(6), 1478–1483. <https://doi.org/10.2134/jeq1997.00472425002600060005x>

- Damelin, L. H., Vokes, S., Whitcutt, J. M., Damelin, S. B., Alexander, J. J. (2000). Hormesis: A stress response in cells exposed to low levels of heavy metals. *Hum. Exp. Toxicol*; 19:420–430. doi: 10.1191/096032700678816133
- Demirbas, A. (2008). Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. *Energy Conversion and Management*, 49, 2106–2116.
- Dettmer, G. J. (2002). Educación y desastres : reflexiones sobre el caso de México. *Revista Latinoamericana de Estudios*, 32(2), 43–72.
- Díaz-alonso, L. C., Garrote-santana, D. H., Amor-vigil, D. C. A. M., Suárez-gonzález, L. Y., & Romero, L. R. G. (2013). Cuantificación de ácido ribonucleico para la realización de la técnica de RT- PCR Ribonucleic acid quantification for the performance of RT- PCR technique, 29(3), 298–303.
- Dolatabadian, A., Sanavy, S. A. M. M., & Chashmi, N. A. (2008). The Effects of Foliar Application of Ascorbic Acid (Vitamin C) on Antioxidant Enzymes Activities, Lipid Peroxidation and Proline Accumulation of Canola (*Brassica napus* L.) under Conditions of Salt Stress, 194, 206–213. <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2008.00301.x>
- Douglas, R. K., Nawar, S., Alamar, M. C., Mouazen, A. M., & Coulon, F. (2018). Science of the Total Environment Rapid prediction of total petroleum hydrocarbons concentration in contaminated soil using vis-NIR spectroscopy and regression techniques. *Science of the Total Environment*, 616–617, 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.323>
- El-Baky, Abd H., H., El Baz, F.K., El-Baroty, G.S., 2009. Enhancement of antioxidant production in *Spirulina platensis* under oxidative stress. *Acta Physiol. Plant.* 31, 623–631. <https://doi.org/10.1007/s11738-009-0273-8>
- Fakhru'l-Razi, A., Pendashteh, A., Abdullah, L.C., Biak, D.R.A., Madaeni, S.S., Abidin, Z.Z., 2009. Review of technologies for oil and gas produced water treatment. *J. Hazard. Mater.* 170, 530–551. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.05.044>
- Fatokun, K., Zharare, G. E. (2015). Influence of diesel contamination in soil on growth and dry matter partitioning of *Lactuca sativa* and *Ipomoea batatas* J. *Environ. Biol.*, 36 pp. 1205-121.3
- Gill, S. S., Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 909–930.
- Gómez, R., Costa, J., Amo, M., Alvarruiz, A., Picazo, M., Pardo, J.E., 2001. Physicochemical and colorimetric evaluation of local varieties of tomato grown in SE Spain. *J. Sci. Food Agric.* 81, 1101–1105. <https://doi.org/10.1002/jsfa.915>

- Gospodarek, J., & Nadgórska-socha, A. (2013). Effect of soil contamination with heavy metal mixtures on iron content in broad bean (*vicia faba* l.) pods and seeds. *Proceedings of Ecopole*, 7(2), 10–13. [https://doi.org/10.2429/proc.2013.7\(2\)063](https://doi.org/10.2429/proc.2013.7(2)063)
- Han, G., Cui, B. X., Zhang, X. X., & Li, K. R. (2016). The effects of petroleum-contaminated soil on photosynthesis of *Amorpha fruticosa* seedlings. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 13(10), 2383–2392. <https://doi.org/10.1007/s13762-016-1071-7>
- Hasanuzzaman, M., Ueno, A., Ito, H., Ito, Y., Yamamoto, Y., Yumoto, I., & Okuyama, H. (2007). Degradation of long-chain n-alkanes (C36 and C40) by *Pseudomonas aeruginosa* strain WatG. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 59(1), 40–43. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.07.010>
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Fujita, M., 2014. Silicon and Selenium: Two Vital Trace Elements that Confer Abiotic Stress Tolerance to Plants, in: *Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance - Volume 1*. Elsevier Inc., pp. 377–422. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800876-8.00016-3>
- Herod A. A., Bartle K. D., Kandiyoti, R. (2007). Characterization of heavy hydrocarbons by chromatographic and mass spectrometric methods: An overview. *Energ. Fuel*. 21(4), 2176-2203
- Houshmandfar, A., & Asli, D. E. (2011). ORIGINAL ARTICLE Response of Seed Germination and Seedling Growth of Safflower and Corn to Gasoline. *Advances in Environmental Biology*, 5(1), 81–86.
- Huang, X. D., El-Alawi, Y., Gurska, J., Glick, B. R., Greenberg, B. M. (2005a). A multiprocess phytoremediation system for decontamination of persistent total petroleum hydrocarbons (TPHs) from soils. *Microchem. J.* 81, 139–147.
- Huang, X. D., El-Alawi, Y., Gurska, J., Glick, B. R., Greenberg, B. M. (2005b). A multiprocess phytoremediation system for decontamination of persistent total petroleum hydrocarbons (TPHs) from soils. *Microchem. J.* 81, 139–147.
- Hutchinson, S. L., Banks, M. K., Schwab, A. P. (2001). Phytoremediation of aged petroleum sludge. *J. Environ. Qual.* 30, 395–403.
- Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>

- IPCC (2014). Summary for policymakers, in: Edenhofer O., Pichs-Madruga R., Sokona Y et al (Eds.), *Climate Change 2014: Mitigation of climate change. Contribution of Working Group III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, and New York.
- Iriti, M., Faoro, F. (2008). Oxidative Stress, the Paradigm of Ozone Toxicity in Plants and Animals. *Water Air Soil Pollut* 187, 285–301. <https://doi.org/10.1007/s11270-007-9517-7>
- Iturbe, F. R., Castro, C., Torres, G. L. (2007). Sub-soil contamination due to oil spills in zones surrounding oil pipeline-pump stations and oil pipeline right-of-ways in Southwest-Mexico. *Environmental Monitoring Assess*, Vol. 133, 2007
- Jain, P. K., Gupta, V. K., Gaur, R. K., Lowry, M., Jaroli, D. P., Chauhan, U. K. (2011). Bioremediation of petroleum oil contaminated soil and water. *Res. J. Environ. Toxicol.* 5, 1–26.
- Kanaly, R. A., & Harayama, S. (2000). Biodegradation of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria MINIREVIEW Biodegradation of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 182(8). <https://doi.org/10.1128/JB.182.8.2059-2067.2000>.Updated
- Ke, L., Wong, T., Wong, Y., Tam, N. (2002). Fate of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contamination in a mangrove swamp in Hong Kong following an oil spill. *Mar. Pollut. Bull.*45: 339–347.
- Khan, A. H., Tanveer, S., Anees, M., Muhammad, Y. S., Iqbal, M., Yousaf, S. (2016a). Role of nutrients and illuminance in predicting the fate of fungal mediated petroleum hydrocarbon degradation and biomass production. *J. Environ. Manage.* 176, 54–60.
- Khan, M. A. I., Biswas, B., Smith, E., Naidu, R., & Megharaj, M. (2018). Toxicity assessment of fresh and weathered petroleum hydrocarbons in contaminated soil- a review. *Chemosphere*, 212, 755–767. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.08.094>
- Khodary, (2004). S.E.A. Khodary Effect of NaCl salinity on improvement of nitrogen metabolism and some ions uptake in lupine plants subjected to gamma irradiation. *Int. J. Agric. Biol.*, 6 (2004), pp. 1-4
- Kirk, J. L., Klironomos, J. N., Lee, H., & Trevors, J. T. (2002). Phytotoxicity assay to assess plant species for phytoremediation of petroleum-contaminated soil. *Bioremediation Journal*, 6(1), 57–63. <https://doi.org/10.1080/10889860290777477>
- Kummerová, M., Zezulka, Š., Babula, P., & Váňová, L. (2013). Root response in *Pisum sativum* and *Zea mays* under fluoranthene stress: Morphological and anatomical

- traits. *Chemosphere*, 90(2), 665–673.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.09.047>
- Kuppusamy, S., Palanisami, T., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., Naidu, R., (2016a). Insitu remediation approaches for the management of contaminated sites: a comprehensive overview. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 236, 1-115.  
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-20013-2>
- Kuppusamy, S., Palanisami, T., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., Naidu, R., (2016b). ExSitu remediation technologies for environmental pollutants: a critical perspective. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 236, 117-192 <https://doi.org/10.1007/978-3-319-20013-2>
- Kuppusamy, S., Thavamani, P., & Venkateswarlu, K. (2016c). *Chemosphere Remediation approaches for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soils : Technological constraints, emerging trends and future directions.* *Chemosphere.* <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.115>
- Kusvuran, S., Kiran, S., & Ellialtioglu, S. S. (2016). Antioxidant Enzyme Activities and Abiotic Stress Tolerance Relationship in Vegetable Crops. *Abiotic and biotic stress in plants.* (C. S. Shanker, Ed.). Chapter 21. Rijeka, Croatia. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/62235>
- Lenucci, M.S., Cadinu, D., Taurino, M., Piro, G., Dalessandro, G., 2006. Antioxidant composition in cherry and high-pigment tomato cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 54, 2606–2613. <https://doi.org/10.1021/jf052920c>
- Li, Y. (2009). Physiological Responses of Tomato Seedlings (*Lycopersicon Esculentum*) to Salt Stress, 171–176.
- Liste, H., & Felgentreu, D. (2006). Crop growth, culturable bacteria, and degradation of petrol hydrocarbons (PHCs) in a long-term contaminated field soil. *Applied Soil Ecology*, 31, 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2005.04.006>
- Liu, H., Weisman, D., Tang, L., Tan, L., Zhang, W. ke, Wang, Z. hua, Colón-Carmona, A. (2014). Stress signaling in response to polycyclic aromatic hydrocarbon exposure in *Arabidopsis thaliana* involves a nucleoside diphosphate kinase, NDPK-3. *Planta*, 241(1), 95–107. <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2161-8>
- Liu, H., Weisman, D., Ye, Y., Cui, B., Huang, Y., Colo ´n-Carmona, A., Wang, Z. (2009). An oxidative stress response to polycyclic aromatic hydrocarbon exposure is rapid and complex in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* 176:375–382.
- Lopes Tiburtius, E. R., Peralta-Zamora, P., & Leal, E. S. (2004). Contaminação de águas por BTEX e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. *Química Nova*, 27(3), 441–446.

- Ma, B., He, Y., Chen, H. hai, Xu, J. ming, & Rengel, Z. (2010). Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the rhizosphere: Synthesis through meta-analysis. *Environmental Pollution*, 158(3), 855–861. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.09.024>
- Mallakin, A., Babu, T. S., Dixon, D. G., & Greenberg, B. M. (2002). Sites of Toxicity of Specific Photooxidation Products of Anthracene to Higher Plants: Inhibition of Photosynthetic Activity and Electron Transport in *Lemna gibba* L. G-3 (Duckweed). *Environ Toxicol*, 3, 462–471. <https://doi.org/10.1002/tox.10080>
- Marchal, R., Penet, S., Solano-Serena, F., & Vandecasteele, J. P. (2003). Biodégradation de l'essence et du gazole. *Oil and Gas Science and Technology*, 58(4), 441–448. <https://doi.org/10.2516/ogst:2003027>
- Margesin, R., Hämmerle, M., Tscherko, D. (2007). Microbial activity and community composition during bioremediation of diesel-oil-contaminated soil: effects of hydrocarbon concentration fertilizers, and incubation time. *Microb. Ecol.* 53, 259–269.
- Martel-valles, J.F., Benavides-mendoza, A., Valdez-aguilar, L.A., (2013). Effect of the Application of Produced Water on the Growth, the Concentration of Minerals and Toxic Compounds in Tomato under Greenhouse. *J. Environ. Prot. (Irvine. Calif)*. 4, 138–146. <https://doi.org/10.4236/jep.2013.47A016>
- Martel-Valles, J.F., Benavides-Mendoza, A., Mendoza-Villarreal, R., Zermeño-Gonzalez, A., Juárez-Maldonado, A. (2014). Agronomic use of produced water in tomato plants (*Lycopersicon Esculentum* L.) under greenhouse conditions. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 30: 365-377.
- Martel-Valles, J.F., Benavides-Mendoza, A., Valdez-Aguilar, L.A., (2017a). Mineral composition and growth responses of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants to irrigation with produced waters from the oil industry. *J. Plant Nutr.* 40, 1743–1754. <https://doi.org/10.1080/01904167.2016.1201503>
- Martel Valles, José Fernando, Martel Valles, Jose Fernando, Cuevas González, E., Benavides Mendoza, A., Valdez Aguilar, L.A., Foroughbakchk Pournavab, R., (2017b). Distribución mineral de plantas de tomate irrigadas con agua contaminada con benceno, diésel y gasolina. *Ecosistemas y Recur. Agropecu.* 4, 21–30. <https://doi.org/10.19136/era.a4n10.811>
- Meagher, R. B. (2000). Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Current Opinion in Plant Biology* 3, 153-162.
- Meagher, R. B. (2000). Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Current Opinion in Plant Biology*, 3, 153–162.

- Merkl, N., Schultze-Kraft, R., & Infante, C. (2005). Phytoremediation in the tropics - Influence of heavy crude oil on root morphological characteristics of graminoids. *Environmental Pollution*, 138(1), 86–91. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.02.023>
- Morkunas, I., Woźniak, A., Mai, V. C., Rucińska-Sobkowiak, R., & Jeandet, P. (2018). The Role of Heavy Metals in Plant Response to Biotic Stress. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(9), 2320. doi:10.3390/molecules23092320
- Nadgórska-Socha, A., Ptasiński, B., Kita, A. (2013). Heavy metal bioaccumulation and antioxidative responses in *Cardaminopsis arenosa* and *Plantago lanceolata* leaves from metalliferous and non-metalliferous sites: a field study. *Ecotoxicology* 22:1422–1434
- Nakhla, G. (2003). Biokinetic modeling of in situ bioremediation of BTX compounds - Impact of process variables and scaleup implications. *Water Research*, 37(6), 1296–1307. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00491-8](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00491-8)
- Noctor, G., & Foyer, C. H. (2002). ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49(1), 249–279. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.249>
- Obire, O., Nwabueta, O. (2002). Effects of refined petroleum hydrocarbon on soil physico-chemical and bacteriological characteristics. *J Appl Sci Environ Manag.* 6(1):39–44.
- Odukoya, J., Lambert, R., & Sakrabani, R. (2018). Influence of sub-lethal concentrations of crude oil on tomato yield and quality. *South Asian J. Food Technol. Environ*, 4(2), 722–733.
- Odukoya, J., Lambert, R., & Sakrabani, R. (2019). Understanding the impacts of crude oil and its induced abiotic stresses on agrifood production: A review. *Horticulturae*, 5(2), 1–27. <https://doi.org/10.3390/horticulturae5020047>
- Ogawa, K., Iwabuchi, M., 2001. A Mechanism for Promoting the Germination of *Zinnia elegans* Seeds by Hydrogen Peroxide. *Plan Cell Physiol* 42, 286–291. <https://doi.org/10.1093 / pcp / pce032>
- Okonokhua, B. O., Ikhajiagbe, B., Anoliefo, G. O., Emende T. O. (2007) Los efectos del aceite de motor gastado en las propiedades del suelo y el crecimiento del maíz (*Zea mays* L.). *J Appl Sci Environ Manage* 11 (3): 147–152
- Ortinez B. O., Ize I., Gavilan A. (2003). La restauración de suelos contaminados con hidrocarburos en México. *Gaseta Ecológica*, 69, 83–92.

- Osuji, L. C., Nwoye, I., Harcourt, P., & Harcourt, C. P. (2007). An appraisal of the impact of petroleum hydrocarbons on soil fertility : the Owaza experience. *African Journal of Agricultural Research*, 2(7), 318–324.
- Pašková, V., Hilscherová, K., Feldmannová, M., & Bláha, L. (2006). Toxic effects and oxidative stress in higher plants exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons and their N-heterocyclic derivatives. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(12), 3238–3245. <https://doi.org/10.1897/06-162R.1>
- Pawlak-Sprada, S., Stobiecki, M., Deckert, J. (2011). Activation of phenyl-propanoid pathway in legume plants expose to heavy metals: Part II. Profiling of isoflavonoids and their glycoconjugates induced in roots of lupine (*Lupinus luteus*) seedlings treated with cadmium and lead. *Acta Biochim Pol* 58: 217–223.
- Pentreath, V., González, E., Barquín, M., Ríos, S., Perales, S. (2015). Bioensayo de toxicidad aguda con plantas nativas para evaluar un derrame de petróleo. *Rev. Salud y ambiente*. 15(1):13-20.
- Peralta-Pérez MR, Volke-Sepúlveda TL. (2012). La defensa antioxidante en las plantas: una herramienta clave para la fitorremediación. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 11, 75–88.
- Pernía, B., Rojas-Tortolero, D., Sena, L., De Sisto, A., Inojosa, Y., & Naranjo, L. (2018). Fitotoxicidad de hap, crudos extra pesados y sus fracciones en *Lactuca sativa*: Una interpretación integral utilizando un índice de toxicidad modificado. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 34(1), 79–91. <https://doi.org/10.20937/RICA.2018.34.01.07>
- Quiñones A. E. E., Ferrera C. R., Gavi R. F., Fernández L. L., Rodríguez, V. R. y Alarcón A. (2003). Emergencia y crecimiento de maíz en un suelo contaminado con petróleo crudo. *Agrociencia* 37, 585-594
- Ramanarao, M.V., Weindorf, D., Breitenbeck, G., Baisakh, N., 2012. Differential expression of the transcripts of *Spartina alterniflora* Loisel (smooth cordgrass) induced in response to petroleum hydrocarbon. *Mol. Biotechnol.* 51, 18–26. <https://doi.org/10.1007/s12033-011-9436-0>
- Redondo-gómez, S., Petenello M. C., Feldman S.R. (2014). Growth, nutrient status, and photosynthetic response to diesel-contaminated soil of a cordgrass, *Spartina argentinensis*, 79, 34–38.
- Reeves G. (2000). Understanding and monitoring hydrocarbons in water. Oakville, Ontario, Canada: Arjay Engineering LTD.

- Rodríguez V. A. (2007). Cambio climático, agua y agricultura. Dirección de Desarrollo Rural Sostenible-IICA. Desarrollo Rural Sostenible. Edición N° 1, II Etapa, enero-abril, 2007, 13–23.
- Ronen, G., Cohen, M., Zamir, D. and Hirschberg, J. (1999). Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant Delta. *Plant Journal*, 17(4): 341-351.
- Rusin, M., Gospodarek, J., & Nadgórska-socha, A. (2015). The Effect of Petroleum-Derived Substances on the Growth and Chemical Composition of *Vicia faba* L. *Pol. J. Environ. Stud*, 24(5), 2157–2166. <https://doi.org/10.15244/pjoes/41378>
- Rusin, M., Gospodarek, J., Nadgórska-socha, A., & Barczyk, G. (2018). Effect of petroleum-derived substances on life history traits of bird cherry-oat aphid (*Rhopalosiphum padi* L.) and on the growth and chemical composition of winter wheat.
- Rusin, M., Gospodarek, J., Nadgórska-Socha, A., Barczyk, G. (2017) .Effect of petroleum-derived substances on life history traits of black bean aphid (*Aphis fabae* Scop.) and on the growth and chemical composition of broad bean. *Ecotoxicology* 26:308–319
- Scullion, J. (2006). Remediating polluted soils. *Naturwissenschaften*, 93, 51–65. <https://doi.org/10.1007/s00114-005-0079-5>
- SEMARNAT (1996). Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y viene nacionales. Secretaria de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. Diario Oficial de la Federación, 1996.
- SEMARNAT (2003). Norma Oficial Mexicana NOM-143-SEMARNAT-2003. Que establece las especificaciones ambientales para el manejo de agua congénita asociada a hidrocarburos. Secretaría de Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca. Diario Oficial de la Federación el 3 de marzo de 2005.
- SEMARNAT (2012). Norma Oficial Mexicana, NOM-138-SERMANAT/SSA1-2012. Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación. Secretaria de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. Diario Oficial de la Federación. 10 de septiembre de 2013.
- SEMARNAT (2019). Agencia Nacional de Seguridad Industrial y de Protección al Medio Ambiente del Sector Hidrocarburos, Abril, 2019. Disponible en línea: [http://dgeiawf.semarnat.gob.mx:8080/ibi\\_apps/WFServlet?IBIF\\_ex=D3\\_SITIOS02](http://dgeiawf.semarnat.gob.mx:8080/ibi_apps/WFServlet?IBIF_ex=D3_SITIOS02)

\_07&IBIC\_user=dgeia\_mce&IBIC\_pass=dgeia\_mce&NOMBREENTIDAD=\* &NOMBREANIO=\*

- Semple, K.T., Morriss, A., Paton, G.I. (2003). Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: fundamental concepts and techniques for analysis. *European Journal of Soil Science*, 54 (4), 809–818. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2389.2003.00564.x>
- Serrano, M. F., Torrado, L. M., Pérez, D. D. (2013). Impacto de los derrames de crudo en las propiedades mecánicas de suelos arenosos. *Ciencia y Tecnología*. 11, 233-244.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. (2012). Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*, 2012, 1–26. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>
- Song, H., Wang, Y., Sun, C., Wu, M., Peng, Y., Deng, C., Li, Q.P., 2011. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons exposure on antioxidant system activities and proline content in *Kandelia candel*. *Int. J. Oceanogr. Hydrobiol.* 40, 8–18. <https://doi.org/10.2478/s13545-011-0024-5>
- Steiner, A. A. (1961). A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. *Plant Soil*. 15(2): 134-154.
- Tofiño, A., Mauricio, H., Ceballos, H. (2007). Efecto del estrés abiótico sobre la síntesis y degradación de almidón. Una revisión Effect of abiotic stress on starch synthesis and degradation. A review, 25(2), 245–254.
- Ujowundu, C. O., Kalu, F. N., Nwaoguikpe, R.N., Kalu, O. I., Ihejirika, C. E., Nwosunjoku, E. C., Okechukwu, R. I. (2011). Biochemical and physical characterization of diesel petroleum contaminated soil in southeastern Nigeria. *Res J Chem Sci* 1(8):57–62
- Umeh, A. C., Vázquez-Cuevas, G. M., & Semple, K. T. (2018). Mineralisation of 14C-phenanthrene in PAH-diésel contaminated soil: Impact of *Sorghum bicolor* and *Medicago sativa* mono- or mixed culture. *Applied Soil Ecology*, 125(March), 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.12.010>
- Vangronsveld, J., Herzig, R., Weyens, N., Boulet, J., Adriaensen, K., Ruttens, A., Thewys, T., Vassilev, A., Meers, E., Nehnevajova, E., van der Lelie, D. y Mench, M. (2009). Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environmental Science and Pollution Research* (16), 765-794.
- Velásquez, A. J. A. (2017). Contaminación de suelos y aguas por hidrocarburos en Colombia. Análisis de la fitorremediación como estrategia biotecnológica de recuperación. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 8(1), 151–168.

- Vieira, P. A., Vieira, R. B., de França, F. P., & Cardoso, V. L. (2007). Biodegradation of effluent contaminated with diesel fuel and gasoline. *Journal of Hazardous Materials*, 140(1–2), 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.06.048>
- Wei, H., Song, S., Tian, H., Liu, T. (2014). *Comptes Rendus Biologies* Effects of phenanthrene on seed germination and some physiological activities of wheat seedling. *Comptes rendus - Biol.* 337, 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2013.11.005>
- Wu, Z., Liu, S., Zhao, J., Wang, F., Du, Y. (2017). Comparative responses to silicon and selenium in relation to antioxidant enzyme system and the glutathione-ascorbate cycle in flowering Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *utilis*) under cadmium stress. *Environ. Exp. Bot.* 133, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.09.005>
- Wyszowski, M., Sivitskaya, V. (2012). Changes in the content of organic carbon and available forms of macronutrients in soil under the influence of soil contamination with fuel oil and application of different substances. *J Elem* 17(1):139–148
- Wyszowski, M., Ziółkowska, A. (2008). Efecto de la gasolina y el gasóleo sobre el contenido de carbono orgánico y componentes minerales en el suelo. *Am-Eurasia J Sustain Agric* 2 (1): 54–60
- Wyszowski, M., Ziółkowska, A. (2009a). Efecto del compost, bentonita y óxido de calcio en el concentrado de algunos macroelementos en plantas de suelos contaminados por petróleo y gasóleo. *J Elementol* 14 (2): 405–418
- Yadav, S.K. (2010). Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African J. Bot.* 76, 167–179. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2009.10.007>
- Youssef, N. H., Elshahed, M. S. (2008). Diversity rankings among bacterial lineages in soil. *The ISME Jornal*, 3(3), 305-313.
- Zhang, C. G., Leung, K. K., Wong, Y. S., & Tam, N. F. Y. (2007). Germination, growth and physiological responses of mangrove plant (*Bruguiera gymnorrhiza*) to lubricating oil pollution. *Environmental and Experimental Botany*, 60(1), 127–136. <https://doi.org/10.1016/J.ENVEXPBOT.2006.09.002>