

## **Efectos citotóxicos de límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos con Zea Mays l.**

PERALTA-CORDOVA-Lizbeth, HERNANDEZ-GUZMAN, Javier & ARIAS-TRINIDAD, Alfredo

L. Peralta, J. Hernández y A. Arias

Instituto Tecnológico Superior de Comalcalco, Tabasco, México.  
liiz.peralta@gmail.com

J. Tepetla, C. Pulido (eds.) *Educación Ambiental desde la Innovación, la Transdisciplinariedad e Interculturalidad*, Tópicos Selectos de Educación Ambiental-©ECORFAN-Veracruz, 2015.

## Introducción

En el sureste de México, extensas zonas han sido afectadas por derrames que ocurren durante la extracción, conducción y transporte del petróleo (Rivera-Cruz *et al.* 2005). Los efectos negativos aumentan debido al mal estado de los ductos y a la dispersión de los contaminantes (Vega *et al.* 2009) causado por las abundantes precipitaciones características de regiones tropicales (Rivera-Cruz y Trujillo-Narcía, 2004). Todos los eventos en los que se encuentran involucradas sustancias que implican algún riesgo para el ambiente o la población y que puedan generar la contaminación de suelos y cuerpos de agua, son conocidos como emergencias ambientales. De acuerdo con estadísticas de la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA), cada año se presentan en México un promedio de 550 emergencias ambientales asociadas con materiales y residuos peligrosos. Dentro de los compuestos peligrosos más comúnmente involucrados en emergencias ambientales, se encuentran el petróleo y sus derivados (gasolinas, combustóleo, diesel), agroquímicos, gas LP y natural, entre otros. Los derrames de hidrocarburos de petróleo son una de las principales fuentes de contaminación de suelos y aguas ya que ocasionan perturbaciones en los ecosistemas al afectar su estructura y bioprocesos. Este tipo de contingencias ambientales originan efectos directos sobre la biota, ya que el petróleo contiene compuestos químicos tóxicos que producen daños a las plantas, animales y humanos pero principalmente sobre las poblaciones de microorganismos, los cuales representan parte importante del ecosistema y son claves para los procesos biogeoquímicos (Vasudevan y Rajaram, 2001). Las estadísticas oficiales de las emergencias ambientales por derrames de petróleo durante el periodo de 1993 a 2009, registró 7998 emergencias ambientales, de las cuales 1315 (16.44 %) sucedieron en Tabasco. El 92.6 % de los derrames o fugas de petróleo se acumularon en el suelo debido principalmente a fugas de ductos (PROFEPA 2011).

El marco legal ambiental en México, en particular la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente, establece que los suelos contaminados con materiales peligrosos deben ser restaurados para que recuperen sus condiciones originales. La Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SA1-2008 (DOF 2010) se refiere a los procedimientos para el muestreo y las especificaciones para la caracterización y remediación del suelo contaminado por derrames de petróleo. Esta norma es de naturaleza geoquímica ya que sólo considera el cumplimiento de concentraciones máximas permisibles de las fracciones ligera, mediana, pesada; la fracción soluble benceno-tolueno-etilbenceno-xileno (BTEX) y los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP). Otra característica de esta NOM se refiere a especificaciones ambientales para la remediación del suelo. Una indica que no deben generarse mayores alteraciones ambientales que las producidas por el petróleo derramado, otra condiciona que el uso de formulaciones químicas no debe alterar las características y las propiedades del ecosistema. No obstante que estas especificaciones son de observancia obligatoria, persisten concentraciones altas de HTP en suelos del estado de Tabasco (López 2010). Por otro lado e incluso las propiedades físicas y químicas de fluvisoles, vertisoles y gleysoles restaurados permanecen alteradas en detrimento de los procesos ambientales, de la biodiversidad y de la fertilidad del suelo (Rivera 2001, Trujillo-Narcía y Rivera-Cruz 2006, Trujillo-Narcía *et al.* 2006, Dorantes *et al.* 2010, Jiménez *et al.* 2010, López 2010, López *et al.* 2010, Orozco *et al.* 2010, Ramírez *et al.* 2010, Salvador 2010, Rivera-Cruz *et al.* 2011, Trujillo-Narcía *et al.* 2011).

En otro contexto, los estudios citogenéticos permiten conocer y determinar los patrones cromosómicos que siguen los organismos como mecanismos de la diversidad genética, su evolución, así como para establecer posiciones taxonómicas de las especies y como base para programas de mejoramiento biotecnológico (Calasanz 2001, Sumner 2003). Además, con la técnica de citogenética se pueden identificar la morfología de los cromosomas en especies sanas y especies que han sido expuestas a sustancias tóxicas y comparar los efectos toxicológicos a través de los parámetros cariotípicos (Calasanz, Báez-Ramírez et al. 2004). Las pruebas ecotoxicológicas (bioensayos) son una buena herramienta para medir las respuestas biológicas que permiten estimar la presencia o concentración de las sustancias tóxicas. En éstas pruebas se utilizan diferentes organismos como microorganismos, animales o plantas, que cuando al modificarse las condiciones ambientales sus características fisiológicas y metabólicas se modifican, por lo que se les considera bioindicadores (Capó, 2002). El estudio intracelular en la especie *Zea mays* L. mediante la técnica de citogenética, proporcionará información de los efectos ocasionados por la presencia de Hidrocarburos Totales del Petróleo en el suelo, aún en fracciones menores. Dichos efectos se verán reflejados a nivel cromosómico, a nivel nuclear y a nivel celular

### **Objetivo**

El objetivo del presente trabajo es evaluar los efectos citotóxicos en raíces de *Zea mays*, de suelos con límites máximos permisibles de hidrocarburos.

### **Metodología**

#### **Área de estudio y bioensayo de HTP**

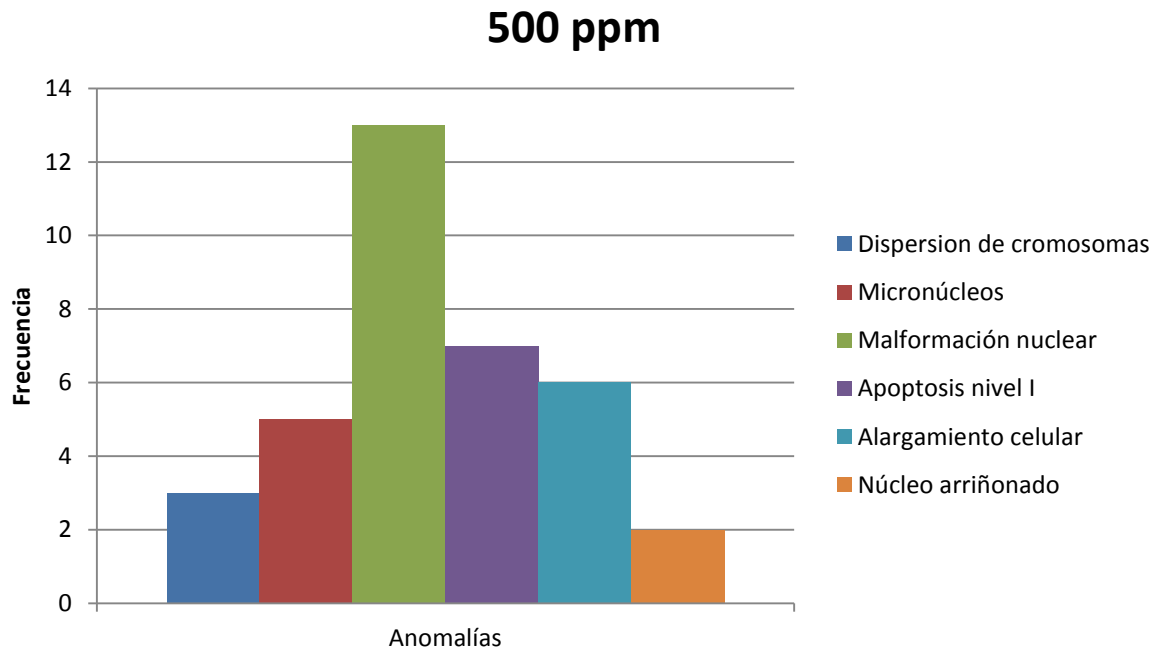
El estudio se realizó en las instalaciones del Instituto Tecnológico Superior de Comalcalco (ITSC), ubicado en el municipio de Comalcalco, Tabasco, México. El experimento constó de un bioensayo que se realizó bajo condiciones de un invernadero (Luz natural). La colecta del suelo se llevó a cabo en las instalaciones del ITSC, ubicado en las coordenadas: 18°17'41.76" N y 93°13'8.76" O. El tratamiento del suelo (secado, molienda y tamizado) y el desarrollo de los bioensayos, se realizó en base a las especificaciones de la OECD 208 (OECD, 2003). En cada bioensayo, se diseñaron cuatro tratamientos con concentraciones de 0 (Tratamiento testigo), 500, 1000, 3000 y 6000 mg kg<sup>-1</sup> de Hidrocarburos totales del petróleo (HTP), con cinco unidades experimentales (U.E.) por tratamiento. Se utilizaron frascos de cristal con una capacidad de 1000 g; y se agregó 750 g de suelo por unidad. Para alcanzar las concentraciones de 500, 1000, 3000 y 6000 mg kg<sup>-1</sup> HTP, se adicionó 247 ml de agua destilada, para alcanzar la capacidad de campo en cada U.E. En el estudio se utilizó *Zea mays* como especie bioindicadora en el bioensayo. En cada unidad experimental se sembró cinco semillas de *Z. mays*, las cuales se regaron cada dos días para mantener la capacidad de campo. Para la medición de variables fisiológicas, se colocaron las unidades experimentales bajo las condiciones de cada bioensayo y se observó el porcentaje de germinación de las semillas de tratamiento, cuando el tratamiento testigo (T.T.) alcanzó un porcentaje del 90% se procedió a medir la altura de las plantas de cada U.E. con una regla a los 7, 9, 11, 13, 15 y 17 dds. La cosecha de las plantas, se realizó a los 18 dds. Posteriormente, se extrajeron las plantas de cada tratamiento, se cortaron y se colocaron en bolsas de papel la parte foliar (hojas y tallo) y la radical (raíz) de las plantas. La biomasa seca foliar y radical se calculó a colocar la materia vegetal (parte foliar y radical) en un horno a 70°C por 48 h.

## Técnica de citogenética vegetal

Se empleó el método de citogenética para raíces (Hernández-Guzmán, 2011, 2014 modificado) para ello, se seleccionaron las raíces de acuerdo a cada tratamiento: 500, 1000, 3000 y 6000 ppm de HTP respectivamente. Se maceraron las raíces en un mortero con agua destilada, disgregando todo el tejido para posteriormente verterlos en tubos de ensayo de 14 ml (2 tubos de ensayo por cada tratamiento). Enseguida se le realizó un tratamiento de choque hipotónico, el cual está conformado de  $Na_3C_6H_5O_7$  (Citrato de Sodio) y agua destilada (2.0%), dejando reposar durante 1 hora para hacer reacción. A continuación, se preparó una solución fijadora, compuesta por  $CH_4O$  (metanol) y  $C_2H_4O_2$  (ácido acético) en una proporción de 4:1 dejando reposar por 30 min. Una vez implementado este tratamiento, se dejó reposar por 72 horas a temperatura de 4 °C. Pasado el tiempo necesario, se procedió a la centrifugación de las muestras a 7000 rpm durante 10 minutos; para ello se agregó 0.5 ml de la muestra en micro tubos de 2.0 ml. Una vez centrifugada la muestra, se agregó 0.5 ml de solución fijadora; este proceso tuvo 3 repeticiones para un posterior reposo de 24 horas. Tras las horas de reposo, se realizaron goteos en portaobjetos desde una altura aproximada de 1.5 m, fijando a las células a través de un mechero y dejándolas secar a temperatura ambiente. Luego, las muestras fueron teñidas la tinción con un colorante biológico Giemsa al 10%, preparado con buffer de fosfatos a 7.0 de pH para posteriormente observar en microscopio en 40x y para la toma de fotografías de las dispersiones nucleares y cromosómicas con objetivo de 100x.

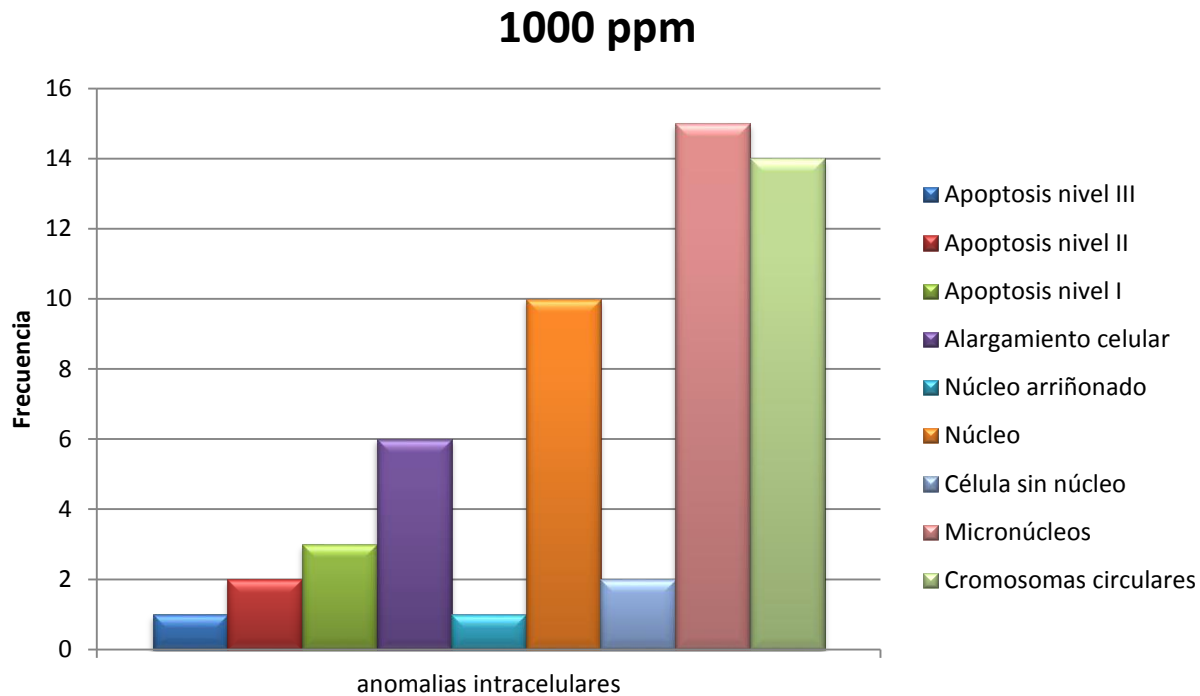
## Resultados

Los efectos producidos a nivel intracelular en la especie *Z. mays L* con respecto a la presencia de hidrocarburos, están relacionadas con la concentración y exposición del contaminante. Las anomalías más representativas identificadas en las células de raíces fueron las siguientes: dispersiones cromosómicas con ausencia y exceso de cromosomas con relación a su número modal diploide, tres niveles diferentes de apoptosis, la presencia de micronúcleos y el duplicado de núcleos dentro de una célula, datos que causan mutaciones en la especie y al vez, muestran los niveles de adaptación de la misma. En el primer tratamiento, donde la concentración de HTP's fue de 500 mg kg<sup>-1</sup> b.s. se observaron la presencia de seis anomalías, de las cuáles la más significativa fue la malformación nuclear (Gráfica 1) con un porcentaje de 36%, seguida del inicio de apoptosis nivel I, al distinguir como inicia el encogimiento de la célula y la separación de los organelos para el empaquetamiento, entre otros rasgos que son parte del proceso, esta anomalía alcanzó un porcentaje de 17%. El alargamiento celular se presenta al cambio de forma que recibe la célula a causa del HTP con un rango de 17% así como la presencia de micronúcleos, fenómeno que empieza a ser visible mediante la separación del núcleo y el porcentaje obtenido es de 14%. Finalmente las anomalías menos frecuentes fueron las dispersiones cromosómicas y los núcleos en forma arriñonada; la primera con un 8%, manteniendo el juego básico de 10 cromosomas (2n=20) y la segunda, con un porcentaje de 6%, evidenciando la presencia del hidrocarburo, que aún en proporciones menores, se observaron los cambios significativos y los daños intracelulares que recibió la especie a la exposición de éste.

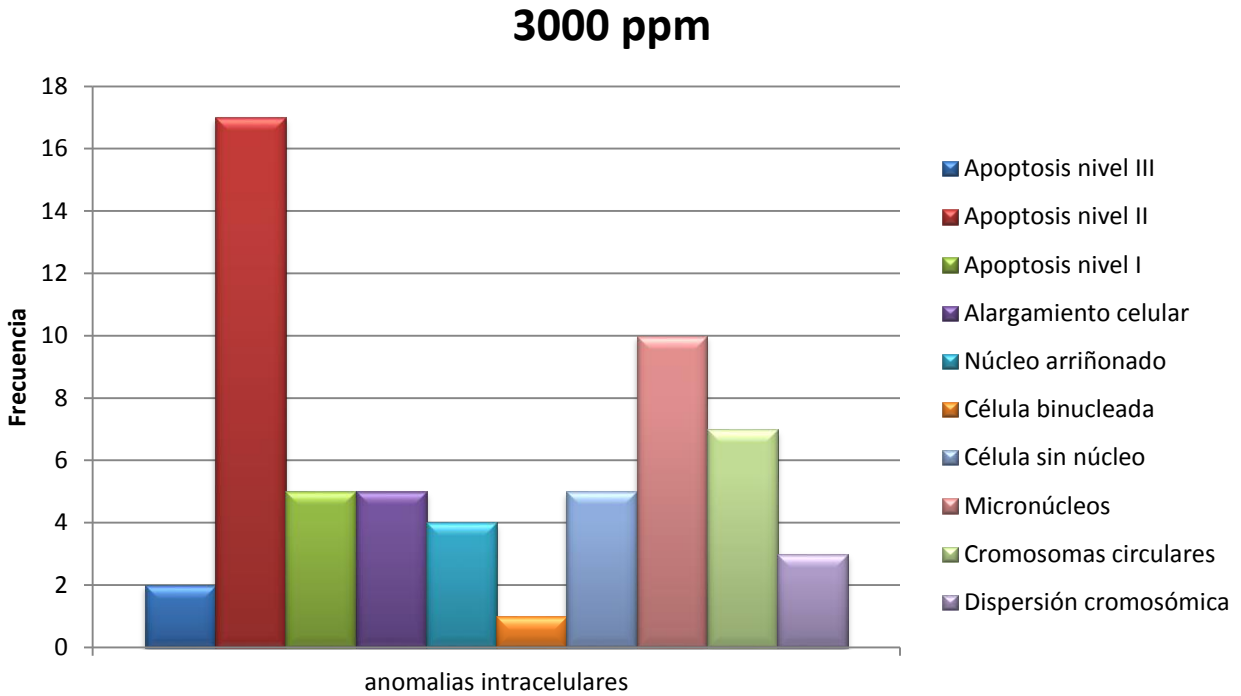
**Gráfico 1** Anomalías a nivel intracelular en 500 ppm de HTP's de petróleo

Si la presencia de HTP's del petróleo es de  $1000 \text{ mg kg}^{-1}$  b.s. la anomalía más significativa es la presencia de micronúcleos con frecuencia de 15, lo que representa el 28% e indica modificaciones en la secuencia de nucleótidos como la alteración estructural de bases, su delección o adición de manera incorrecta, así como cambios en la estructura de los cromosomas producto de rompimientos monocatenarios o bicatenarios, y la formación de entrecruzamientos DNA-proteína, representando daño al material genético los cuales se representan visualmente en la presencia de los micronúcleos. Los niveles de apoptosis encontrados fueron I, II y III; siendo el más representativo el nivel I el cuál se observa mediante el encogimiento de la célula, el citoplasma se vuelve más denso y orgánulos más empaquetados, así como la condensación de la cromatina. El nivel de apoptosis depende del daño a la célula, representado en el aumento de cuerpos apoptóticos visibles, además del rompimiento de las estructuras celulares (citoplasma, membrana, núcleo), en este estudio se trabaja de I a III. Además la presencia de cromosomas circulares, no muy comunes en la especie estudiada, con una frecuencia de 26%. Las anomalías menos significativas se encuentran en la gráfica siguiente (Gráfica 2).

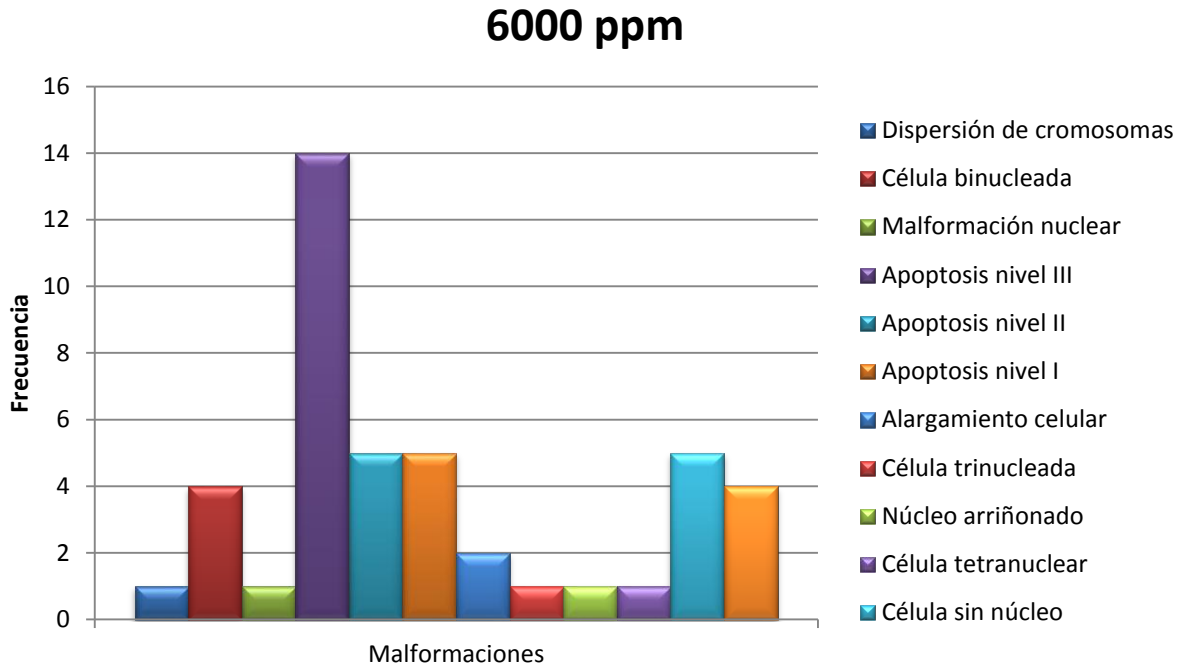
**Gráfico 2** Anomalías a nivel intracelular en 1000 ppm de HTP's de petróleo.



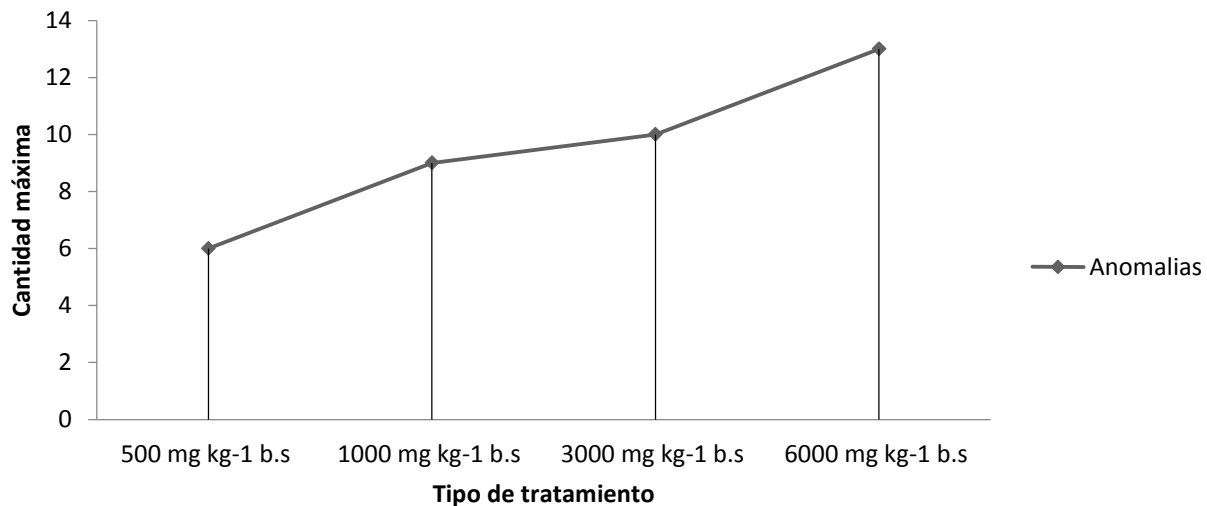
Quando los HTP's se encuentran en una concentración de  $3000 \text{ mg kg}^{-1}$  b.s (Gráfica 3), la modificación intracelular más representativa es el nivel de apoptosis tipo II con un porcentaje de 29%, el cual se aprecia mediante un aumento de cuerpos apoptóticos, indicio de la fragmentación de la membrana celular. De la misma manera, la presencia de micronúcleos sigue siendo muy significativa, representada en un 17%, así como la ausencia de núcleos en las células de la especie lo que indica que el contaminante inhibió la información genética de la célula en forma de ADN y aunque en menor proporción (1%), se observaron células binucleadas, es decir células con la presencia de dos núcleos, duplicando la información genética. De la misma manera, se encontraron núcleos con malformaciones, representados mediante forma arriñonada y la presencia de cromosomas circulares, presentes en 7% y 12%, respectivamente. Los alargamientos celulares fueron las anomalías más visibles y en esta concentración se identificó en 8%.

**Gráfico 3** Anomalías a nivel intracelular en 3000 ppm de HTP's de petróleo

La última concentración de HTP's estudiada corresponde a 6000 mg kg<sup>-1</sup> b.s en la cual se observó un ligero aumento de anomalías, siendo la más significativa el aumento de cuerpos apoptóticos indicadas en la presencia de apoptosis nivel III, alcanzando un porcentaje de 30%, de mismo modo, aumentó el número de núcleos dentro de las células hasta cuatro veces, encontrando células binucleadas, trinucleadas y tetranucleadas, en un porcentaje de 9%, 2% y 2%, respectivamente. Las malformaciones nucleares aumentaron ligeramente en 2% lo que representa, modificaciones del material genético; así como la ausencia de núcleos dentro de las células, representadas en 11% dando lugar a la inhibición del material genético correspondiente. Las anomalías se encuentran comparadas de acuerdo a la frecuencia en que se observaron en la gráfica 4, mostrada a continuación.

**Gráfico 4** Anomalías a nivel intracelular en 6000 ppm de HTP's de petróleo

Al cuantificar los diferentes tipos de anomalías intracelulares presentes causados por cada tipo de tratamiento explicado con anterioridad, se puede observar un ligero aumento paralelo al aumento de concentración de HTP presente en el suelo. Este fenómeno se puede observar en la gráfica 5 mostrada a continuación.

**Gráfico 5** Aumento de anomalías de acuerdo a la concentración de HTP's



## Discusión

El maíz (*Zea mays* L.) es una de las especies que han recibido más atención en lo que se refiere a los estudios citogenéticos; es una de las pocas especies diploides de cultivos alimenticios y tiene un juego básico de diez cromosomas, diploides con  $2n = 20$  (Ripusudan *et al.* 2001). Sin embargo de acuerdo al presente estudio, el nivel de ploidía de la especie presentó modificaciones de acuerdo al tipo de tratamiento al que fue expuesta la especie; este fenómeno fue observado a partir de la concentración de  $1000 \text{ mg kg}^{-1}$  b.s. de HTP en el suelo donde el número modal de ploidía se encontró en  $2n=15$ , mostrando una disminución de cromosomas significativa. Al aumentar la concentración de hidrocarburos presentes a  $3000 \text{ mg kg}^{-1}$  b.s. el número modal de ploidía disminuyó a  $2n=12$  cromosomas, mientras que al encontrarse la especie a una exposición de  $6000 \text{ mg kg}^{-1}$  b.s. el nivel de ploidía aumentó considerablemente, siendo el mínimo  $2n=20$  y el nivel máximo de ploidía  $2n=60$ , esto explica la respuesta de la especie y la capacidad de ésta, al intentar recuperar el nivel de ploidía normal, revirtiendo mediante algún mecanismo propio los efectos del contaminante. Los niveles de adaptación de *Zea mays* L. han sido uno de los factores determinantes para emplearla como bioindicadora en este estudio, es por ello el interés y los múltiples estudios realizados. En una hibridación entre las especies con  $2n=20$ , *Zea mays* y *Zea mexicana* fueron las más estables cromosómicamente y las que tenían mayor fertilidad (Molina 2011), este es un claro ejemplo de adaptación de la especie y una explicación clara del desarrollo y crecimiento en suelos con hidrocarburos.

En otro contexto más amplio y significativo del estudio, la Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 (DOF, 2013) establece los Límites Máximos Permisibles (LMP) de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación. Sin embargo, solo considera aspectos físicos y no toma en cuenta parámetros careológicos y citogenéticos que tiene la misma importancia, que de acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio son muy relevantes y significativos para cada especie que se encuentra en constantes exposición a algún tipo de hidrocarburo, en especial, al petróleo crudo. Esta NOM señala como LMP de HTP en el suelo,  $500 \text{ mg kg}^{-1}$  base seca, en el sector industrial, es decir, el tratamiento uno de este estudio corresponde a este LMP establecido, y de acuerdo a los resultados obtenidos y al análisis realizado, se puede determinar que la concentración de hidrocarburos aún en cantidades mínimas puede afectar de manera significativa citogenéticamente a las especies expuestas a dichos contaminantes, en este caso, la especie *Zea mays* L. Las afectaciones comienzan en pequeños cambios intracelulares (alargamiento celular, presencia de micronúcleos, dispersiones, diferentes niveles de ploidía, entre otras) hasta alcanzar niveles de apoptosis altos (Nivel III) donde resulta difícil identificar cada uno de los componentes de una célula y por ende, llevar una cuantificación de los cromosomas. La facilidad de adaptación de *Zea mays* L. no garantiza una buena calidad de cosecha pero abre un amplio campo de estudios por realizar, debido que hoy en día no existen investigaciones anteriores de la relación de las concentraciones de HTP's con parámetros careológicos y citogenéticos de *Zea mays* L. Por otro lado, en el presente año se han estado desarrollando dichos estudios en otros grupos taxonómicos nativos del estado de Tabasco, donde Bucio-Luna (2015) reporta todas las alteraciones intracelulares en especies de animales como el pez tropical *Thorichthys helleri*, las cuales se distribuye en ecosistemas acuáticos que se encuentran actualmente expuestas a diversas concentraciones de contaminantes de petróleo, al igual de evidencia de otro tipo de contaminante como son los metales pesados, siendo este el primer estudio en su tipo para la región de la Chontalpa en el estado de Tabasco, México.

En este contexto, análisis citogenéticos y cariotípicos de Arias-Rodríguez *et al.* (2009), Indy *et al.* (2010) y Hernández-Guzmán *et al.* (2011, 2014) indican la presencia de malformaciones intracelulares y evidencias de composiciones particulares en las células, como la presencia de microcromosomas tipo “B”, en diversos números por células. Además, las evidencias del impacto cada vez más frecuente de la exposición de las especies a sus ambientes son irrefutables, ya sea de forma natural por agentes genotóxicos o por actividades antropogénicas, (Hernández-Guzmán & Islas-Jesús 2014, García-Guzmán & Hernández-Guzmán 2015).

## Conclusión

La especie *Zea mays L.* crece normalmente en suelos con presencia de hidrocarburos porque sus condiciones de reproducción lo permiten, más sin embargo, entre mayor sea la concentración de hidrocarburos presentes en el suelo, mayor es el daño celular, alterando sus funciones y su calidad, que resulta inaceptable para la integridad de ejemplares de segunda generación. La escases de estudios en especies de plantas de la región no permite una comparación aceptable, sin embargo, se genera nueva información de este tipo de investigación para la región tabasqueña, donde la historia indica un constante de “accidentes” petrolíferos que se liberan en el ambiente. También, es necesario que los estudios biológicos y citotóxicos de este orden, sean anexados en la normatividad mexicana para evaluar el grado de impacto ambiental bajo los criterios citogenéticos.

## Referencias

- Arias-Rodríguez, L., Páramo-Delgadillo, S., Contreras-Sánchez, W.M. & Álvarez-González, C.A. (2009). Cariotipo del pejelagarto tropical *Atractosteus tropicus* (Lepisosteiformes: Lepisosteidae) y variación cromosómica en sus larvas y adultos. *Revista de Biología Tropical*. 57(3): 529-539.
- Bucio-Luna, A. (2015). Estudio intracelular en *Thorichthys helleri*, bioindicador de toxicidad en un ecosistema lagunar de Paraíso, Tabasco. Tesis de Ingeniería Ambiental. Instituto Tecnológico Superior de Comalcalco.
- DOF (2013). Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SAI-2012, Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo y la remediación. D.F., México. [http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5313544&fecha=10/09/2013](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5313544&fecha=10/09/2013). [Accesado el día 14 de Agosto del 2014]
- García-Guzmán, N.C. & Hernández-Guzmán, J. (2015). Occurrence of tropical squierrels in coconut palm plantation from Paraiso, Tabasco, Mexico. *The Biologist*. 13(1): 35-39.
- Hernández-Guzmán, J. & Islas-Jesús, R.E. (2014). Malformation in tadpoles and presence of helminths in the frog *Lithobates vaillanti* (Anura: Ranidae) from Tabasco, Mexico. *The Biologist*. 12(2): 407-4011.
- Hernández-Guzmán, J., Arias-Rodríguez, L. & Indy, J.R. (2011). Los cromosomas meióticos de la rana arborícola *Smilisca baudinii* (Anura: Hylidae). *Revista de Biología Tropical*. 59(1): 355-363.
- Hernández-Guzmán, J., Indy, J.R., Yasui, G.S. & Arias-Rodríguez, L. (2014). Los cromosomas de las tortugas tropicales: *Kinosternon leucostomum*, *Trachemys scripta* y *Staurotypus triporcatus* (Testudines: Kinosternidae/Emydidae). *Revista de Biología Tropical*. 62(2): 671-688.

- Indy, J.R., Arias-Rodríguez, L., Páramo-Delgadillo, S., Hernández-Vidal, U., Álvarez-González, C.A. & Contreras-Sánchez, W.M. (2010). Mitotic Karyotype of the tropical freshwater crayfish *Procambarus (Austrocambarus) llamasi* (Decapoda: Cambaridae). *Revista de Biología Tropical*. 58(2): 655-662.
- López de la F.J.C. (2010). Evaluación de los contenidos de petróleo crudo en suelo restaurado en Cunduacán, Tabasco. Tesis Químico Fármaco Biólogo. Universidad Popular de la Chontalpa. H. Cárdenas, Tabasco, México. 43 p.
- Molina, M. (2011). Estudios citogenéticos evolutivos del género *Zea*. Tesis doctoral. Valencia, Departamento de Biología Vegetal, Universidad Politécnica-Valencia.
- OECD (Organization for Economic Co-operation and Development). 2006. OECD Guideline for testing of Chemicals No. 208. Terrestrial Plants, Growth Test. Paris, France. 21 p.
- Orozco H.J.A., Rivera-Cruz M.C. y Trujillo-Narcía A. (2010). Estudio de bacterias solubilizadoras de fósforo en suelo restaurado por fuga de petróleo crudo en Cunduacán, Tabasco. En: Memoria XXII Reunión Científica-Tecnológica, Forestal y Agropecuaria Tabasco 2010. Villahermosa, Tabasco. pp. 253-260.
- Ramírez M.A.G., Rivera-Cruz M.C. y Trujillo-Narcía A. (2010). Estudio de bacterias fijadoras de nitrógeno en suelo restaurado por fuga de petróleo crudo en Cunduacán, Tabasco. En: Memoria XXII Reunión Científica- Tecnológica, Forestal y Agropecuaria Tabasco 2010. Villahermosa, Tabasco. pp. 260-269.
- Ripusudan L., (2001) El maíz en los trópicos: mejoramiento y reproducción. Investigación. Italia, Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación- Roma.
- Rivera-Cruz M.C., Trujillo-Narcía A., Miranda C.M.A. & Maldonado C.E. (2005). Evaluación toxicológica de suelos contaminados con petróleo nuevo e intemperizado mediante ensayos con leguminosas. *Interciencia* 30, 326-331.
- Rivera-Cruz, M.C. & Trujillo-Narcía A. (2004). Estudio de toxicidad vegetal en suelos contaminados con petróleos nuevo e intemperizado. *Interciencia* 29, 369-376.
- Rivera C.M.C. (2001). Microorganismos rizosféricos de los pastos alemán [*Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchc.] y cabezón (*Paspalum virgatum* L.) en la degradación del petróleo crudo y el benzo(a)pireno. Tesis Doctor en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillos, Texcoco, edo. de México. 348 p.
- Trujillo-Narcía A. y Rivera-Cruz M.C. (2006). Planta de girasol (*Helianthus annuus*) bioindicadora de la descontaminación de suelos contaminados con petróleo crudo en el estado de Tabasco. En: Memoria XIX Reunión Científica-Tecnológica Forestal y Agropecuaria Tabasco 2006. Villahermosa, Tabasco, México. p. 242-244.
- Trujillo-Narcía A., Rivera-Cruz M.C. y Maldonado C.E. (2006). Efecto de la restauración de suelos contaminados con petróleo en el suelo y en la vegetación en Tabasco, México. En: Medio Ambiente en Iberoamérica. Visión desde la Física y la Química en los albores del Siglo XXI. Tomo III (L.J.F. Gallardo Ed. y Coord.). Badajoz, España. pp. 353-361

Vasudevan, N. y P. Rajaram. 2001. Bioremediation of soil sludge-contaminated soil. *Environment International* 26: 409-411.

Vega A.F., Covelo F.E., Reigosa J.M. & Andrade M.L. (2009). Degradation of fuel oil in salt marsh soils affected by the Prestige oil spill. *J. Hazard. Mater.* 166, 1020-1029.