



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.



Facultad de Químico-Farmacobiología.

**Biorestauración de un suelo contaminado con aceite residual automotriz al 7.5%
con solución mineral, abono verde y fitorremediación con sorgo.**

Tesis para obtener título de:

Químico Farmacobiólogo.

Presenta:

Iván Balderas León

Director de tesis:

DC. Juan Manuel Sánchez-Yáñez

Doctor en ciencias microbiología

Laboratorio de Microbiología Ambiental.

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas.

Morelia, Mich. Noviembre de 2013.

Esta investigación fue financiada por el proyecto 2.7 “Aislamiento y selección de microorganismos promotores de crecimiento vegetal de teocintle y leguminosas silvestres” (2013), con el apoyo de la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en el Laboratorio de Microbiología Ambiental, del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, bajo la dirección del DC. Juan Manuel Sánchez-Yáñez.

CONTENIDO

Pagina

Resumen.....	1
1. Introducción.....	3
2. Antecedentes.....	4
3. Hipótesis.....	6
4. Objetivo general.....	6
5. Material y Métodos.....	6
5.1 Descripción y montaje del experimento.....	6
5.2 Diseño experimental.....	8
5.3 Activación de <i>Bacillus cereus</i> y <i>Burkholderia</i> sp.	8
6. Resultados y discusión.....	9
6.1 Longitud de planta de sorgo a plántula.....	13
6.2 Longitud radical de sorgo a plántula.....	14
6.3 Peso fresco aéreo de sorgo a plántula.....	14
6.4 Peso fresco radical de sorgo a plántula.....	15
6.5 Peso seco aéreo de sorgo a plántula.....	15
6.6 Peso seco radical de sorgo a plántula.....	16
8.1 Longitud de planta de sorgo a floración.....	18
8.2 Longitud radical de sorgo a floración.....	18
8.3 Peso fresco aéreo de sorgo a floración.....	19
8.4Peso fresco radical de sorgo a floración.....	20
8.5 Peso seco aéreo de sorgo a floración.....	21
8.6 Peso seco radical de sorgo a floración.....	21
7. Conclusión.....	23
8. Perspectiva.....	23
9. Bibliografía.....	23

Cuadro 1. Diseño experimental para medir la biorremediación vía bioestimulación y fitorremediación de un suelo contaminado con aceite residual automotriz al 7.5%.	8
Cuadro 2. Efecto de la biorremediación en un suelo contaminado con aceite residual automotriz al 7.5% con solución mineral sobre su concentración después de 30 días.....	9
Cuadro 3. Efecto de la biorremediación de un suelo contaminado con aceite residual automotriz al 7.5% con solución mineral en los días a emergencia y porcentaje de germinación del frijol como abono verde con <i>Bacillus cereus</i> y <i>Burkholderia</i> sp sembrado en ese suelo.	9
Cuadro 4. Efecto de la biorremediación de un suelo contaminado con aceite residual automotriz al 7.5% con solución mineral y abono verde sobre su eliminación a 90 días del ensayo.	11
Cuadro 5. Efecto de la biorremediación y fitorremediación de un suelo con aceite residual automotriz al 7.5% en los días a emergencia y germinación de sorgo inoculado con <i>Bacillus cereus</i> y <i>Burkholderia</i> sp sembrado en ese suelo para su fitorremediación.	12
Cuadro 6. Efecto de la biorremediación de un suelo con aceite residual automotriz al 7.5% en el sorgo inoculado con <i>Bacillus cereus</i> y <i>Burkholderia</i> sp, a plántula en su fenotipia y biomasa, sembrado en ese suelo para su fitorremediación.....	13
Cuadro 7. Efecto de la biorremediación y fitorremediación de un suelo con aceite residual automotriz al 7.5% sobre su concentración a plántula, después de 5 meses del ensayo.	17
Cuadro 8. Efecto de la biorremediación de un suelo con aceite residual automotriz al 7.5% sobre sorgo con <i>Bacillus cereus</i> y/o <i>Burkholderia</i> sp, a floración en su fenotipia y biomasa, sembrado en ese suelo para su fitorremediación después de 6 meses del ensayo.	18
Cuadro 9. Efecto de la biorremediación y fitorremediación de un suelo con aceite residual automotriz al 7.5% sobre su concentración final después de 6 meses del ensayo.	22

TABA DE ACRÓNIMOS.

Acrónimo	Significado
AN:	Agar nutritivo
AP:	Altura planta
ARA:	Aceite residual automotriz
AV:	Abono verde
BA:	Bioaumentación
BPCV:	Bacterias promotores de crecimiento vegetal
BR:	Biorremediación
BS:	Bioestimulación
CA:	Control absoluto
CR:	Control relativo
CVP:	Cuenta viable en placa
FR:	Fitorremediación
GyA:	Grasas y aceites totales
HC:	Hidrocarburos
HCA:	Hidrocarburos alifáticos
HCP:	Hidrocarburos aromáticos
HTP:	Hidrocarburos totales del petróleo
LC:	Lombricomposta
LR:	Longitud radical
N:	Nitrógeno
PCAT:	<i>Pseudomona cepacia</i> acida azaleico y triptamina
PFA:	Peso fresco aéreo
PFR:	Peso fresco radical
PSA:	Peso seco aéreo
PSR:	Peso seco radical
SM:	Solución mineral

RESUMEN.

El suelo contaminado con aceite residual automotriz (ARA) al 7.5%, derivado de automotores, le causa pérdida de productividad, por su inadecuada disposición impacta cuando es vertido al suelo, al impedir el proceso aerobio de mineralización de la materia orgánica. Una estrategia de solución es la biorremediación (BR), que explota el potencial microbiano del suelo para eliminar contaminantes orgánicos como el ARA, la BR como bioestimulación (BS) con solución mineral (SM) y abono verde (AV) enriquece con elementos esenciales al suelo, que inducen a la microbiota del suelo a eliminar los hidrocarburos (HC) del ARA; y la fitorremediación (FR) que aprovecha la capacidad vegetal para eliminar el ARA sin y en asociación con bacterias promotores de crecimiento vegetal (BPCV) que mejoran la FR para acelerar y/o completar la eliminación del ARA en suelo. La hipótesis: es la posible biorestauración de un suelo contaminado a una concentración moderada de ARA en menor tiempo y mayor eficacia por BS con SM/AV y luego complementada mediante FR con sorgo; ambas acciones son secuenciales. El objetivo es la rápida y eficaz biorestauración de un suelo contaminado con ARA por BR y FR. Las variables para este experimento fueron: la fenotipia y la biomasa de sorgo a plántula y floración; y la concentración inicial y final de ARA en el suelo. Para ello se empleo suelo contaminado con ARA al 7.5%, se BR con SM, luego frijol inoculado con *Bacillus cereus* y *Burkholderia* sp se incorporo como AV y se uso la FR con sorgo inoculado con *B. cereus* y *Burkholderia* sp para concluir. El experimento se realizó con diseño experimental de 5 tratamientos con 6 repeticiones; los resultados se validaron por el método de Tukey. Los resultados indican que la BR vía BS con SM redujo la contaminación moderada de ARA en suelo de 7.5% hasta 3.25% en 30 días: al disminuir la concentración de ARA favoreció un 88% de germinación de frijol como AV coinoculado con *B. cereus* + *Burkholderia* sp e

incorporado como AV; logro que el ARA disminuyese hasta 1.01% después de 60 días. La FR con sorgo a plántula coinoculado con *B. cereus* + *Burkholderia* sp redujo la concentración del ARA hasta el 0.25%, cuyo remanente afecto negativamente su crecimiento en función de su fenotipia y biomasa comparado con el sorgo que se cultivó en suelo sin ARA, cuando el sorgo a floración inoculado con ambas BPCV redujo la concentración de ARA en suelo del 0.25% hasta 0.08% después de 6 meses del ensayo, se favoreció su fenotipia y biomasa a floración con valores estadísticamente diferentes comparados con el sorgo que se cultivó en suelo sin ARA. Se concluye que la BR como BS con SM/AV acelero la eliminación del ARA, y la FR con sorgo en asociación con las BPCV mejoro la biorecuperación del suelo.

Palabras Clave: *microbios, alifáticos, rizósfera, equilibrio, suelo.*

1. INTRODUCCIÓN.

El ARA es generado durante el ciclo de lubricación de motores y mantenimiento de maquinaria, contiene una fracción de hidrocarburos (HC), alifáticos (HCA) y una fracción aromática (García-Hernández *et al.*, 2006), por su inadecuada disposición final el ARA causa un impacto ambiental negativo cuando es vertido en el ambiente. En el suelo el ARA derramado por su insolubilidad, forma una película en la superficie que impide el intercambio gaseoso e inhibe los ciclos biogeoquímicos aerobios que sustentan la vida y la producción agrícola (Pardo *et al.*, 2004).

La contaminación por HC como el ARA en suelo es discrecional, por lo que su biorestauración requiere una aplicación secuencial de métodos físico-químicos y biológicos. Los principales métodos físicos son: el lavado de suelo y la remoción mecánica, en este primer paso se elimina el excedente de HC. Eliminado el exceso de HC se aplica un método químico; los más comunes son las reacciones redox (Delgadillo-López *et al.*, 2011), con agentes como peróxido de hidrógeno y el permanganato de potasio que oxidan los HC a dióxido de carbono y agua (Hernández-Valencia y Mager., 2003). Una vez resuelto el exceso de HC por los métodos físico-químicos debe medirse la concentración del contaminante, para posteriormente aplicar la biorremediación (BR) y la selección adecuada de la especie vegetal para la subsecuente fitorremediación (FR) Sangabriel *et al.*, 2006. Los métodos biológicos como la BR, son la estrategia de restauración final de un suelo contaminado cuando la concentración de HC vade leve a moderada (Asquith *et al.*, 2012). La BR usa el potencial metabólico microbiano autóctono para recuperar suelo impactado con ARA, puede ser aplicada como bioestimulación (BS) que enriquece mediante solución mineral (SM) con elementos necesarios para que la microbiota nativa del suelo elimine la fracción de HCA del ARA (Vallejo *et al.*, 2005). Algunas variantes de la BR vía BS

como la incorporación de abono verde (AV) puede corregir el desequilibrio mineral del suelo contaminado para acelerar la remoción de ARA (Pasaye, 2011). La FR acelera y mejora la rehabilitación del suelo contaminado, se basa en la capacidad de la planta para eliminar HC del suelo. La FR asociada con bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) potencia el crecimiento de la planta y favorece su tolerancia al estrés del suelo contaminado con HC como el ARA (Ferrera-Cerrato *et al.*, 2007).

2. ANTECEDENTES.

Existen trabajos que demuestran que la BR vía BS y posterior FR son estrategias de solución eficaces para restaurar suelos contaminados por HC: Gómez *et al.*, 2009, restauraron un suelo contaminado con una mezcla de gasolina-diesel a una concentración de 2% mediante BR vía BS con una SM a bases de sales inorgánicas, y compararon con la eliminación de HC en un suelo naturalmente atenuado. Los resultados mostraron que en un periodo de 3 meses la BS eliminó un 64.92% de HC de la mezcla de diesel-gasolina en comparación a un 60.45% en el suelo vía atenuación natural. Vallejo *et al.*, 2005, recuperaron un suelo contaminado con 20% de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) de suelo durante 28 días con nutrientes (N y P) en forma de sales inorgánicas y un fertilizante inorgánico como SM y lo compararon con la eliminación de HC de un suelo contaminado sin BS (control). Los resultados mostraron que la BS con la SM eliminó un 41% de los HTP y en el suelo control un 39%. Fernández *et al.*, 2008, rehabilitaron un suelo contaminado por HC de petróleo crudo al 10% mediante BR vía BS con una SM y surfactante. El resultado mostró que la BR eliminó un 61 % de esos HC, comparado con el suelo control no BS donde hubo nula eliminación. Pasaye., 2011, analizó la BR de un suelo impactado con ARA al 1.2%, por BS con SM, AV y lombricomposta (LC). Los resultados mostraron que la BS especialmente con LC eliminó el 62% del ARA en 6 meses, en contraste con el suelo

contaminado con ARA sin BS usado como control donde la desaparición de HC fue nula.

Algunas formas de BR vía BS de suelo impactado con HC consiste en la incorporación de abonos orgánicos como el AV, que integra al suelo contaminado su biomasa fresca; aporta materia orgánica y corrige el desequilibrio mineral e induce a la microbiota del suelo impedida por los HC que aumentan la densidad microbiana oxidante de ARA (Guzmán y Alonso., 2008).

Asimismo, se han realizado trabajos en donde se demuestra que la FR es una estrategia eficaz de biorestauración de suelo contaminado con HC y el crecimiento de estas plantas después de usar la BR como BS en suelo contaminado disminuye la concentración del HC a tal nivel que les permite establecerse y crecer sin graves problemas de toxicidad por el contaminante; como lo demuestran Hernández-Valencia y Mager., 2003, quienes reportaron la FR de un suelo contaminado levemente con crudo ligero al 3%, sembrado con *Panicum máximum* y *Brachiaria brizantha*. Al término del ensayo (240 días), *P. maximum* redujo el contenido inicial de HC en un 63%, *B. brizantha* en un 55%, mientras que el suelo control presentó una reducción del 40%.

Larenas y Viana., 2005, analizaron la FR de suelo impactado artificialmente con ARA al 5.5% sembrado con *Tithonia tubaeformis*. Los resultados mostraron que la siembra de esta planta redujo en un 51% los HC del ARA después de 40 días del ensayo en contraste con el suelo sin FR con una eliminación nula. Sangabriel *et al.*, 2006, realizaron la FR de un suelo contaminado con 5% de combustóleo, sembrado con tres gramíneas: *B. híbrido*, *B. brizantha* y *P. maximum* y la leguminosa *Phaseolus coccineus*, a los 90 días disminuyeron cualitativamente concentración de HC de las fracciones del combustóleo. Ferrera-Cerrato, *et al.*, 2008, evaluó la FR con *P. coccineus* y BS orgánica e inorgánica un suelo contaminado en un 5% con combustóleo,

los resultados de la FR y la BS especialmente inorgánica eliminó cualitativamente parte de la fracción de HCA del combustóleo en la rizósfera 90 días posterior a la siembra.

La BS y FR son estrategias que se han aplicado para la restauración de suelo impactado con HC de forma independiente, sin embargo, de acuerdo con lo reportado en la literatura requieren un tiempo prolongado para lograr eliminar los HC. En el presente trabajo durante 6 meses se logro, mediante la BR y FR integral, la disminución de la concentración moderada de ARA en el suelo del 7.5% al 0.05%, de acuerdo al análisis de grasas y aceites se logro, una concentración inferior a los límites permisibles de la fracción ligera de HC en suelo agrícola por la NOM-EM-138-ECOL-2002, comparando los resultados de este trabajo, se evidencia que combinar dos estrategias de BS como aplicar SM e integrar AV al suelo y su secuencial FR con una gramínea es posible disminuir una concentración moderada de ARA en este caso 7.5%, hasta una concentración que el suelo puede ser usado con fines agrícolas.

3. HIPÓTESIS.

La BR de un suelo contaminado con ARA vía BS con SM y frijol como AV, reducen la concentración de ARA al 7.5% en menos tiempo, mientras la FR con sorgo inoculado con *B. cereus* y *Burkholderia* sp, acelera y completa la eliminación del ARA del suelo.

4. OBJETIVO GENERAL.

Es analizar la rápida y eficaz biorestauración de un suelo contaminado con una concentración moderada de ARA al 7.5% mediante su BR vía BS y luego FR con sorgo y medir la concentración de ARA después de la BS y al final de la FR.

5. MATERIAL Y MÉTODOS.

5.1 Descripción y montaje del experimento

La investigación se realizó en el laboratorio de Microbiología Ambiental del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH. El suelo agrícola pobre en

Nitrógeno (N) y materia orgánica laterítico (suelo de color rojizo, baja fertilidad, rico en óxidos de hierro y aluminio, de regiones con alto índice de humedad, Galantini, y Suñer., 2008) se solarizó y tamizó, artificialmente se contaminó con 70 mL de ARA recolectado de un taller mecánico automotriz, diluido en 30 mL de detergente (La Corona[®]) al 10% (p/v)/Kg de suelo, luego se colocó en jarras de Leonard. La BR vía BS del suelo con ARA mediante SM de composición química en (%): NH_4NO_3 18; P_2O_5 18; K_2O 18; MgO 0.5; S 0.8; solución microelementos (ppm) Fe 400; Zn 200; Mn 200; Mo 100; Cu 100; B 100; (Vallejo *et al.*, 2005) pH 6.8-7.0, aplicada c/3días/30días, en el suelo contaminado con ARA, suficiente para mantener la capacidad de campo (contenido de agua que es capaz de retener el suelo luego de saturación, Vallejo *et al.*, 2005) constante durante este periodo de tiempo (Pasaye, 2011). El frijol como AV sus semillas se inocularon 3.0 mL con *B. cereus* y *Burkholderia* sp, cuando la leguminosa alcanzo a plántula se barbecho e incorporo/30días, la humedad se mantuvo a capacidad de campo (Plata-Guzmán *et al.*, 2006; Guzmán y Alonso., 2008; Pasaye, 2011). Posteriormente se sembró el sorgo que se inoculo con *B. cereus* y *Burkholderia* sp para considerar: los estados fisiológico de la planta a germinación, plántula y floración mediante su fenotipia: altura de planta (AP) y longitud radical (LR) y biomasa: peso fresco aéreo (PFA) y peso fresco radical (PFR) y el peso seco aéreo (PSA) y peso seco radical (PSR) y la determinación de la concentración del ARA del suelo antes y después de la BR y FR por método Soxhlet, los datos experimentales fueron validados por Tukey al 0.05% (Hernández-Valencia y Mager, 2003; Ferrera-Cerrato *et al.*, 2008).

5.2 Diseño experimental

Cuadro 1. Diseño experimental para medir la biorremediación vía bioestimulación y fitorremediación de un suelo contaminado con aceite residual automotriz al 7.5%.

Suelo	Aceite residual automotriz	Solución mineral	Frijol como abono verde	Fitorremediación con sorgo
Control absoluto	-	-	+	+
Control relativo	-	100%	+	+
Control negativo	+	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	+	50%*	+	+
<i>Burkholderia sp</i>	+	50%	+	+
<i>B. cereus</i> + <i>Burkholderia sp</i>	+	50%	+	+

(+)=se agrego, (-)= no se agrego. *NH₄NO₃.

5.3 Activación de *Bacillus cereus* y *Burkholderia sp*.

En la colección de BPCV del Laboratorio de Microbiología Ambiental, del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, UMSNH, se obtuvo aislado de *B. cereus* activado en caldo nutritivo (Bioxon) con la siguiente formula g/L: peptona de caseína 5.0, extracto de carne 3.0; el pH se ajusto a 6.8 con ácido acético 2% v/v y *Burkholderia sp* activada en caldo *Pseudomona cepacia* ácido azaleico y triptamina (PCAT) con la siguiente formula g/L: MgSO₄ 0.1; ácido azaleico 2.0; triptamina 0.4; K₂HPO₄ 4.0; KH₂PO₄ 4.0; extracto de levadura 0.02; el pH se ajustó a 5.7 con ácido acético 2% (v/v); el caldo nutritivo y PCAT se incubaron a 30°C/24 h, cuando ambos géneros crecieron se realizó tinción Gram para verificar pureza (Sánchez-Yáñez., 2007) e inocularon en frijol como AV y sorgo de acuerdo al Cuadro 1 del diseño experimental.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Cuadro 2. Efecto de la biorremediación en un suelo contaminado con aceite residual automotriz al 7.5% con solución mineral sobre su concentración después de 30 días.

Suelo	Aceite residual automotriz remanente (%)		Por ciento de biorremediación (%)
	Inicial	Final bioestimulación/con solución mineral	
Control absoluto	0.0	0.0	-
Control negativo	7.50 ^a	7.50 ^b	-
Aceite residual automotriz + solución mineral	7.50 ^a	3.25 ^a †	56.60

† Letras distintas con diferencia estadística significativa al 0.05 % según Tukey.

El efecto de la BR mediante BS con SM de suelo con ARA durante los primeros 30 días del ensayo se muestra en el Cuadro 2. La concentración inicial de ARA en suelo fue 7.5%, al finalizar la BS mediante SM/30 días se registro una disminución hasta el 3.4% en promedio, equivalente al 56.60% de BR, mientras en el suelo usado como control negativo (CN) sin cambio en la concentración del ARA lo cual indica que los elementos de la SM, estimulo a la microbiota nativa del suelo especialmente la oxidante de HC del ARA, e infiere que indujo específicamente la mineralización de la fracción de HCA del ARA, este resultado análogo a lo reportado por Vallejo *et al.*, 2005, mediante la BS con SM de un suelo contaminado con 2% de HTP, reportaron un 41% de eliminación de HTP en suelo después de 28 días. Gómez *et al.*, 2009, quienes restauraron un suelo contaminado con 2% de una mezcla de diesel-gasolina mediante BS con SM y detergente, durante un periodo de 3 meses; disminuyo un 64.92% la proporción de HC alifáticos.

Cuadro 3. Efecto de la biorremediación de un suelo contaminado con aceite residual automotriz al 7.5% con solución mineral en los días a emergencia y porcentaje de germinación del frijol como abono verde con *Bacillus cereus* y *Burkholderia* sp sembrado en ese suelo.

Frijol como abono verde	Días a emergencia (días)	Porcentaje de germinación (%)
Control absoluto	4 ^{b†}	88 ^a
Control relativo	3 ^a	88 ^a
<i>Bacillus cereus</i>	3 ^a	83 ^{b†}
<i>Burkholderia</i> sp	4 ^b	71 ^c
<i>B. cereus</i> + <i>Burkholderia</i> sp	4^b	88^a

† Letras distintas con diferencia estadística significativa al 0.05 % según Tukey.

El Cuadro 3, muestra el efecto de la BR por BS con SM en el suelo contaminado con ARA, sobre los días a emergencia () y el porcentaje de germinación () del frijol incorporado como AV al suelo con ARA. La disminución de la moderada concentración de ARA en suelo posterior a la BR vía BS con SM en suelo, permitió la germinación de frijol como AV sin embargo, el ARA recalcitrante afectó la máxima germinación esto puede deberse a la película hidrofóbica de ARA que impide la hidratación de la semilla y la difusión de oxígeno lo que provoca que la semilla muera o se retrase su germinación (Rivera-Cruz y Trujillo-Narcia., 2004). En el suelo contaminado con ARA, el frijol como AV coinoculado con *B. cereus* + *Burkholderia* sp germinó el 88% estadísticamente significativo, comparado al 83% del homólogo solo con *B. cereus* y al 71% en la misma leguminosa inoculada solo con *Burkholderia* sp, mientras que en suelo sin ARA la germinación fue mayor respecto a la semilla inoculada individualmente en el suelo contaminado, esto indica que la inoculación de frijol como AV con *B. cereus* y/o *Burkholderia* sp estimuló la conversión de los exudados producidos por la semilla para contrarrestar el impacto tóxico del ARA al producir fitohormonas que mejoraron su germinación (Pérez *et al.*, 2008, Maldonado-Chávez, 2010) y sugiere que el efecto individual de *Burkholderia* sp sobre el porcentaje de germinación de la semilla fue potenciado por la inoculación conjunta de la semilla con *B. cereus*, también indica que la BS realizada antes de la siembra de la semilla fue insuficiente durante 30 días, ya que fue evidente que las fracciones de ARA remanente limitó su germinación. El efecto negativo de los HC en suelo sobre el porcentaje de germinación en leguminosas ha sido

previamente demostrado por Sangabriel *et al.*, 2006, en semillas de *P. coccineus* usa concentración similar a la evaluada en este experimento.

Cuadro 4. Efecto de la biorremediación de un suelo contaminado con aceite residual automotriz al 7.5% con solución mineral y abono verde sobre su eliminación a 90 días del ensayo.

Suelo	Aceite residual automotriz remanente (%)		Por ciento de biorremediación (%)
	Posterior bioestimulación/ solución mineral	Final bioestimulación/ abono verde	
Control absoluto	0.0	0.0	0.0
Control negativo	7.50 ^b	7.50 ^d	0.0
Bioestimulación/abono verde y <i>Bacillus cereus</i>	3.25 ^a	2.04 ^b	72.00
Bioestimulación/abono verde y <i>Burkholderia</i> sp	3.25 ^a	2.10 ^c	72.80
Bioestimulación/abono verde y <i>B. cereus</i> + <i>Burkholderia</i> sp	3.25^a	1.01^{a†}	86.53

† Letras distintas con diferencia estadística significativa al 0.05 % según Tukey.

Así mismo el Cuadro 4 muestra el efecto de incorporar el frijol como AV secuencialmente a la BS con SM/30 días, este favoreció la disminución de la concentración del ARA desde 3.25% en promedio hasta el 1.01% en especial del frijol como AV con *B. cereus*+ *Burkholderia* sp después de 90 días y alcanzo el 86.53% de remoción de ARA en suelo mientras el frijol como AV con *B. cereus* logro una disminución del 3.25% hasta el 2.04% de ARA y el frijol usado como AV con *Burkholderia* sp de 3.25 al 2.10% de ARA en suelo, esto indica que el AV aumento la disponibilidad de N y mejoro la condición mineral del suelo con ARA, e indujo mayor actividad microbiana impedida por el ARA recalcitrante (Sangabriel *et al.*, 2006), especialmente de microorganismos oxidantes de la fracción de HCA del ARA (García-Hernández *et al.*, 2007), y sugiere una mayor actividad oxidante de *B. cereus* comparado con *Burkholderia* sp y se verifica que el efecto individual de *Burkholderia* sp fue potenciado por la inoculación conjunta de la semilla con *B. cereus* para mineralizar fracciones de HC del ARA.

Cuadro 5. Efecto de la biorremediación y fitorremediación de un suelo con aceite residual automotriz al 7.5% en los días a emergencia y germinación de sorgo inoculado con *Bacillus cereus* y *Burkholderia* sp sembrado en ese suelo para su fitorremediación.

Sorgo (fitorremediación)	Días a emergencia (días)	Porcentaje de germinación (%)
Control absoluto	5 ^{b†}	71 ^c
Control relativo	4 ^a	100 ^a
<i>Bacillus cereus</i>	4^a	100^a
<i>Burkholderia</i> sp	4 ^a	90 ^{b†}
<i>B. cereus</i> + <i>Burkholderia</i> sp	4^a	100^a

† Letras distintas indican diferencia estadística significativa al 0.05 % según Tukey.

El Cuadro 5 muestra el efecto positivo de la BR por BS con SM/AV/90 días del suelo contaminado con ARA en el porcentaje de germinación de la semilla de sorgo inoculado con *B. cereus* y *Burkholderia* sp para su FR. El sorgo con *B. cereus* alcanzo el 100%, la semilla de la misma gramínea con *Burkholderia* sp, un 90% y la semilla inoculada ambas BPCV el 100%, después de 4 días de la siembra en el suelo contaminado; estadísticamente significativo comparado al 71% registrado en su homologo de la misma gramínea usado como CA en suelo sin ARA, lo anterior sugiere que la BS con SM/AV indujo la microbiota a mineralizar especialmente la fracción alifática del ARA al compensar el desequilibrio de mineral del suelo (Guzmán y Alonso., 2008) lo que permitió la máxima germinación del sorgo en suelo contaminado, además la inoculación de sorgo con *B. cereus* y *Burkholderia* sp estimuló la conversión de los exudados de la semilla de sorgo para contrarrestar el impacto tóxico de la fracción aromática del ARA remanente al producir fitohormonas para mejorar su germinación (Pérez *et al.*, 2008; Maldonado-Chávez, 2010) y sugiere que ambos géneros bacterianos oxidaron algunos de los HC del ARA, (Arrieta *et al.*, 2012), análogo a lo reportado por Contreras *et al.*, 2010, que demostraron que en suelo impactado con petróleo la siembra de *Cynodon dactylon* inoculada con *Rhizobium* sp favoreció la eliminación de la fracción de HCA del petróleo y promovió la síntesis de fitohormonas que estimularon su germinación, de

acuerdo a los datos anteriores; sugiere que la BR requiere un periodo de tiempo mayor a 30 días y la combinación de otra estrategia de BS como la incorporación de abonos orgánicos como el AV para facilitar la disminución de los HC del ARA.

Cuadro 6. Efecto de la biorremediación de un suelo con aceite residual automotriz al 7.5% en el sorgo inoculado con *Bacillus cereus* y *Burkholderia* sp, a plántula en su fenotipia y biomasa, sembrado en ese suelo para su fitorremediación.

Sorgo (fitorremediación)	Altura de planta (cm)	Longitud radical (cm)	Peso fresco (g)		Peso seco (g)	
			Aéreo	Radical	Aéreo	Radical
Control absoluto	15.38 ^c	6.53 ^b	0.07 ^c	0.020 ^b	0.016 ^b	0.010 ^d
Control relativo	20.15^a	6.68 ^b	0.12^a	0.021 ^b	0.026^a	0.013 ^b
<i>Bacillus cereus</i>	15.70 ^c	8.95^a	0.07 ^c	0.022^a	0.017 ^b	0.013 ^b
<i>Burkholderia</i> sp	9.88 ^d	4.35 ^c	0.04 ^d	0.017 ^c	0.015 ^e	0.011 ^c
<i>B. cereus</i> + <i>Burkholderia</i> sp	18.78 ^{b†}	6.45 ^b	0.10 ^b	0.021 ^b	0.016 ^b	0.014^a

† Letras distintas indican diferencia significativa al 0.05 % según Tukey.

6.1 Longitud de planta de sorgo a plántula.

El Cuadro 6, muestra el efecto de la BR por BS con SM/AV sobre sorgo a plántula sobre su fenotipia y biomasa en suelo impactado, el ARA remanente a la BS con SM/AV afecto al sorgo en su altura de planta (AP), su peso fresco aéreo (PFA) y peso seco aéreo (PSA) pero no su longitud radical (LR), peso fresco radical (PFR) y peso seco radical (PSR), el sorgo a nivel de plántula coinoculado con *B. cereus* + *Burkholderia* sp alcanzó una AP de 18.78cm, superior estadísticamente a la AP del sembrado en el mismo suelo con ARA pero inoculado individualmente con *B. cereus*, con 15.70cm, ambos fueron estadísticamente significativo al 15.38cm de AP generado por el sorgo usado como CA en suelo sin ARA. Este resultado sugiere que la BS con SM/AV fue suficiente para cubrir la demanda mineral del sorgo a plántula, lo que contrarrestó el impacto negativo del ARA remanente sobre la planta, y en sinergismo con la doble inoculación bacteriana la AP del sorgo tuvo un crecimiento superior que el usado como CA, y que sugiere que estas BPCV transformaron los exudados radicales del sorgo en fitohormonas. Mientras la gramínea inoculada con *Burkholderia* sp

adquirió 9.88cm de AP, lo que sugiere que el ARA remanente impidió su correcto crecimiento, sin embargo el efecto negativo de los HC en suelo sobre el crecimiento de gramíneas ha sido reportado por Hernández-Valencia y Mager., 2003, en un suelo contaminado a una concentración de HC al 3%, causó una reducción significativa en la AP de: *P. maximum* y *B. brizantha* del 1.2% y 11.4% respectivamente, comparado con el control. Quiñones-Aguilar *et al.*, 2003 reportan en maíz expuesto a concentración de HC similar a este trabajo, la longitud de planta y longitud radical disminuyo un 50 y 75% respectivamente cuando la germinación se dio a concentraciones de HC mayores al 3%.

6.2 Longitud radical de sorgo a plántula.

En el Cuadro 6 se reporta que en el suelo contaminado con ARA y BS con SM/AV el sorgo inoculado individualmente *B. cereus* sembrado en suelo con ARA genero una LR de 8.95cm, estadísticamente significativo comparado al 6.45cm de LR que obtuvo el sorgo inoculado con ambas BPCV y la LR de 6.68cm generada por el homologo usado como CR de la misma gramínea, en el suelo sin ARA ambos superior que la obtenida del sorgo inoculado con *Burkholderia* sp, con una LR de 4.35cm en suelo con ARA, al respecto se ha reportado que estas BPCV como *B. cereus* producen fitohormonas que aumentan la actividad de absorción mineral y mejora el crecimiento vegetal (Loredo-Osta *et al.*,2001), lo anterior sugiere un efecto positivo de la BS con SM/AV al aumentar la población microbiana heterótrofa oxidante del ARA y mejorar las propiedades físicas en el suelo (Hernández-Bejarano *et al.*, 2011), resultado análogo al reportado por Sangabriel *et al.*, 2006, en un suelo contaminado accidentalmente con combustóleo (5%) y FR con *P. máxima*, después de 90 días esta gramínea presentó un menor volumen radical que el sembrado en suelo libre de contaminante.

6.3 Peso fresco aéreo de sorgo a plántula.

En el Cuadro 6 se indica que en el suelo sin ARA sorgo usado como CR tuvo un PFA de 0.12g, mientras que en el sorgo coinoculado con *B. cereus* + *Burkholderia* sp en suelo con ARA y BS con SM/AV su PFA fue de 0.10g superior estadísticamente comparado al 0.07g de PFA del sorgo inoculado con *B. cereus* en el mismo suelo contaminado y PFA del homologo CA de la misma gramínea en suelo sin ARA, lo anterior demuestra que la BS con SM/AV cubrió la demanda mineral que el sorgo requiere y le permitió un crecimiento similar al adquirido del sorgo CA sembrado en suelo sin contaminante, se sugiere que la acción benéfica de las BPCV sobre el sorgo no fue inhibida por el contaminante.

6.4 Peso fresco radical de sorgo a plántula.

En este Cuadro 6 se reportó que en el suelo contaminado con ARA y BS con SM/AV, el sorgo inoculado con *B. cereus* ahí sembrado generó un PFR de 0.022g, superior estadísticamente comparado con el 0.021g de PFR obtenido por el sorgo coinoculado con *B. cereus* + *Burkholderia* sp en el mismo suelo con ARA y por el homologo usado como CR de 0.021g y de la misma gramínea CA de 0.020g de PFR en suelo sin ARA, lo anterior sugiere que la BS con SM/AV en el suelo contaminado minimizó el efecto tóxico del ARA y colateralmente le aportó los nutrientes que esta gramínea requiere para crecer sanamente. También se registró que en el suelo impactado con ARA el sorgo inoculado solo con *Burkholderia* sp mostró el menor PFR que fue de 0.017g, al respecto se ha reportado que los HC en la raíz puede provocar un daño a las membranas de las células lo que limita su crecimiento (Chaineau *et al.*, 1997).

6.5 Peso seco aéreo de sorgo a plántula.

En el Cuadro 6 se muestra el efecto negativo del ARA remanente a la BS con SM/AV en suelo, en el PSA de sorgo con *B. cereus*, con 0.017g, a nivel de plántula, estadísticamente significativo comparado con el sorgo coinoculado con ambos *B. cereus*

+ *Burkholderia* sp donde su PSA fue 0.016g en el mismo suelo con ARA, análogo a los 0.016g de PSA obtenido por su homólogo usado como CA de la misma gramínea en suelo sin ARA, lo que sugiere que la BS con SM/AV contrarrestó la fitotoxicidad de la fracción de HCA del ARA y favoreció la producción de biomasa aérea del sorgo, superior a la generada por sorgo usado como CA donde no había contaminante. Estos datos corroboran el efecto negativo de los HC en el crecimiento de plántulas de gramíneas evaluado por Sangabriel *et al.*, 2006, en *B. brizantha* y *P. maximum* obtuvo pesos secos aéreos de 0.30g y 0.04g respectivamente, sin embargo reporta que las gramíneas tienden a ser más tolerantes en suelo con HC comparado con las leguminosas.

6.6 Peso seco radical de sorgo a plántula.

El Cuadro 6, muestra un efecto positivo de la BS con SM/AV en suelo con ARA, en el PSR de sorgo coinoculado con *B. cereus* + *Burkholderia* sp, de 0.014g a plántula, asimismo se observa que en el sembrado en el mismo suelo contaminado con ARA sorgo con *B. cereus* su PSR fue de 0.013g análogo al obtenido por el sorgo usado como CR en suelo sin ARA, lo anterior sugiere que la BS con SM/AV y la acción individual de *B. cereus* y la conjunta inoculación de ambas BPCV, estimularon un crecimiento sano del sorgo en suelo con ARA, ya que su PSR fue superior que el obtenido en la gramínea usada como CR y CA establecida en suelo sin ARA. El menor PSR fue de la gramínea con *Burkholderia* sp, con un PSR de 0.011g estadísticamente significativo al 0.010g obtenido por el homólogo usado como CA en suelo sin ARA, este resultado indica un efecto fitotóxico especialmente por la fracción aromática del ARA sobre la gramínea al impedir el intercambio gaseoso y colateralmente una deficiencia mineral en esta gramínea, resultado análogo al reportado por Rivera-Cruz y Trujillo-Narcía., 2004, en un suelo contaminado con petróleo crudo intemperizado y FR con pasto alemán.

Cuadro 7. Efecto de la biorremediación y fitorremediación de un suelo con aceite residual automotriz al 7.5% sobre su concentración a plántula, después de 5 meses del ensayo.

Suelo	Aceite residual automotriz remanente (%)		Porcentaje de biorremediación (%)
	Final bioestimulación con solución mineral/abono verde	Fitorremediación sorgo (plántula)	
Control absoluto	0.0	0.0	0.0
Control negativo	7.50 ^d	7.50 ^d	0.0
<i>Bacillus cereus</i>	2.04 ^{b†}	1.03 ^b	86.26
<i>Burkholderia</i> sp	2.10 ^c	1.64 ^c	78.13
<i>B. cereus</i> + <i>Burkholderia</i> sp	1.01^a	0.25^a	96.66

† Letras distintas indican diferencia significativa al 0.05 % según Tukey.

El Cuadro 7, muestra el efecto de la BR con SM y AV y posterior FR con sorgo inoculado con *B. cereus* y *Burkholderia* sp sobre la concentración de ARA en ese suelo a plántula después de 5 meses del ensayo. La BS con SM/AV elimino una fracción del ARA al aportar la condición mineral favorable para que la población microbiana autóctona oxidara los HC del ARA mientras la FR especialmente con sorgo coinoculado con *B. cereus*+ *Burkholderia* sp acelero la eliminación del ARA haciendo que disminuyese del 1.01% al 0.25%.Asimismo hubo una disminución de ARA en el suelo FR con sorgo inoculado individualmente con *B. cereus*, logro que disminuyese del 2.04% al 1.03%, mientras en el suelo FR con sorgo con *Burkholderia* sp se reporto una disminución de 2.10 hasta 1.64% de ARA, este resultado demuestra que la BS con SM/AV previo a la FR redujo la concentración de ARA, mineralizo especialmente la fracción de HCA, pero se observo un efecto fitotóxico de la fracción de HC aromáticos más difícil de eliminar en el crecimiento del sorgo, sin embargo la BR vía BS aportó la condición mineral adecuada para el crecimiento de la gramínea y la FR con las BPCV ayudo en el crecimiento de la gramínea y aceleró la eliminación de ARA, al respecto se ha reportado que la rizósfera de las gramíneas mejora las propiedades del suelo contaminado al permitir una mejor aireación consecuencia de la penetración radicular (Ferrera-Cerrato *et al.*, 2008) y simultáneamente enriquece el suelo con exudados

radiculares que fomentan la actividad oxidante de las comunidades microbianas para eliminar los HC (Pasaye., 2011).

Cuadro 8. Efecto de la biorremediación de un suelo con aceite residual automotriz al 7.5% sobre sorgo con *Bacillus cereus* y/o *Burkholderia* sp, a floración en su fenotipia y biomasa, sembrado en ese suelo para su fitorremediación después de 6 meses del ensayo.

Sorgo (fitorremediación)	Altura de planta (cm)	Longitud radical (cm)	Peso fresco (g)		Peso seco (g)	
			Aéreo	Radical	Aéreo	Radical
Control absoluto	41,98 ^d	20,53 ^b	5,85 ^b	1,46 ^c	2,62 ^b	0,60 ^d
Control relativo	53,98 ^c	20,03 ^b	5,94 ^b	1,46 ^c	2,73 ^b	0,75 ^c
<i>Bacillus cereus</i>*	63,48^a	20,88 ^b	6,10^a	1,83 ^b	3,62^a	1,09^a
<i>Burkholderia</i> sp*	56,20 ^{b†}	19,83 ^b	5,31 ^c	1,10 ^d	1,29 ^d	0,50 ^e
<i>B. cereus</i> + <i>Burkholderia</i> sp*	56,98 ^b	23,70^a	5,71 ^b	1,99^a	1,90 ^c	0,82 ^b

† Letras distintas indican diferencia significativa al 0.05 % según Tukey

8.1 Longitud de planta de sorgo a floración.

En el Cuadro 8 se muestra el efecto de la BR vía BS con SM/AV y secuencial FR del suelo con ARA, sobre el sorgo a floración inoculado con *B. cereus* que alcanzó una AP de 63.48 cm, estadísticamente significativo a la gramínea coinculada con *B. cereus* + *Burkholderia* sp y el homologo con *Burkholderia* sp en suelo con ARA con una AP de 56.98 y 56.20 cm respectivamente, y superior estadísticamente a la AP de 53.98 cm del homologo usado como CR de la misma gramínea, este resultado sugiere que la BS con SM/AV cubrió la demanda nutricional que el sorgo requiere para un crecimiento sano y colateralmente *B. cereus* y *Burkholderia* sp promovieron la síntesis de fitohormonas que lograron en esta gramínea un crecimiento superior que la usada como CR, asimismo la BS con SM/AV a redujo la toxicidad del ARA al estimular a la población microbiana autóctona heterotrófica a mineralizar estos HC de la fracción aromática remanente (Pasaye., 2011).

8.2 Longitud radical de sorgo a floración.

El Cuadro 8 reportó que en suelo contaminado con ARA y BS con SM/AV el sorgo coinoculado con *B. cereus* +*Burkholderia* sp generó una LR de 23.7 cm, superior estadísticamente a la LR mostrada en el mismo suelo contaminado en el sorgo con *B. cereus* fue de 20.88 cm y *Burkholderia* sp de 19.83 cm, y estas LR sin diferencia estadística a la obtenida en suelo sin ARA donde la LR fue de 20.53 cm obtenida por el homólogo CA; al respecto se ha reportado que *B. cereus* y *Burkholderia* sp transforman los exudados radicales de las gramíneas en fitohormonas que estimulan la elongación de los pelos radicales que les confiere una mayor disponibilidad mineral y de agua a la planta (Loredo-Osti *et al.*, 2004), lo que contrarrestó la fitotoxicidad del ARA, este resultado sugiere que la BS con SM/AV ha contrarrestado la toxicidad del ARA remanente permitiéndole al sorgo un crecimiento igual al de la gramínea sembrada en suelo libre de contaminación.

8.3 Peso fresco aéreo de sorgo a floración.

En el Cuadro 8 se encontró que en el suelo impactado con ARA la BS con SM/AV indujo un efecto positivo en el PFA del sorgo a floración inoculado con *B. cereus*, con un PFA de 6.10g, en tanto que en el obtenido en el mismo suelo contaminado coinoculado con *B. cereus* +*Burkholderia* sp, generó un PSA de 5.71g, este resultado no mostró una diferencia estadística al reportado en el suelo libre de contaminante del sorgo usado como CR que generó un PFA de 5.94g; lo que sugiere que la BS con SM/AV contrarrestó la fitotoxicidad del ARA y favoreció la producción de biomasa aérea del sorgo. Al respecto se ha reportado que la concentraciones de HC al oxidarse puede aumentar la concentración de la materia orgánica del suelo y mejorar el crecimiento de la población rizosférica microbiana (Maldonado-Chávez *et al.*, 2010), lo que colateralmente favorece el crecimiento de la planta dado que la BS en sinergismo con la actividad de *B. cereus* y *Burkholderia* sp al transformar los exudados del sorgo

en fitohormonas mejoró el crecimiento de esta gramínea al generar un PFA superior o análogo al generado en el usado como CR. En contraste se mostró que en el suelo impactado con ARA, el sorgo inoculado con *Burkholderia* sp generó un PFA de 5.31g. Este resultado sugiere un efecto fitotóxico del ARA remanente sobre el crecimiento del sorgo, al limitar el intercambio gaseoso y disponibilidad de agua para esta gramínea.

8.4 Peso fresco radical de sorgo a floración.

En el Cuadro 8 también se señala el efecto positivo de la BS con SM/AV sobre el PFR del sorgo coinoculado con *B. cereus* +*Burkholderia* sp con 1.99g a floración, superior al obtenido en el mismo suelo del sorgo inoculado con *B. cereus*, la gramínea alcanzó 1.83g de PFR, en ambos casos se muestra diferencia significativa al obtenido en suelo libre de ARA donde la gramínea usada como CA y CR tuvo un PFR de 1.46g, este resultado sugiere una transformación microbiana de los exudados radicales del sorgo en fitohormonas, lo que promovió la elongación de los pelos radicales para aportar una mayor disponibilidad de nutrientes a esta gramínea (Ferrera-Cerrato *et al.*, 2008), asimismo se muestra que la BS mediante SM/AV a esta fue adecuada para cubrir la demanda mineral de esta gramínea y contrarrestar la toxicidad del ARA para su crecimiento sano (Guzmán y Alonso, 2008; Asquith *et al.*, 2012), este resultado sugiere que la BS en sinergismo con la inoculación de sorgo con ambas BPCV oxidaron los HC del ARA de forma suficiente para que su LR fuese igual que la generada en donde no había contaminante y superior que la obtenida en el en suelo libre de ARA del sorgo usado como CR y en el correspondiente al CR, donde se generó un PFR de 1.46g. El menor PFR se observó en el sorgo sembrado en suelo impactado con ARA e inoculado con *Burkholderia* sp, con 5.31g, lo que sugiere un efecto tóxico del ARA sobre la planta y un déficit mineral, que en conjunto limitó el crecimiento de la LR del sorgo.

8.5 Peso seco aéreo de sorgo a floración.

En el Cuadro 8 se muestra un efecto positivos de la BR vía BS con SM/AV en el PSA de sorgo inoculado con *B. cereus*, con 3.62g a floración, se observa que en el sembrado en suelo sin ARA usado como CR el PSA fue de 2.73g, lo anterior sugiere que la aplicación de SM/AV y la acción conjunta de la inoculación, estimularon un crecimiento sano del sorgo, ya que su PSA fue superior que el obtenido en la gramínea usada como CR, resultado análogo a lo reportado por Ferrera-Cerrato *et al.*, 2008, donde demostró que *P. coccineus* sembrado en suelo enmendado con LC tuvo un PSA sin diferencia estadística significativa al enmendado con un fertilizante inorgánico.

8.6 Peso seco radical de sorgo a floración.

En este Cuadro 8 se reporta además que el mayor PSR de sorgo se alcanzó en el suelo contaminado con ARA y BS con SM/AV, a nivel de floración de sorgo inoculado con *B. cereus*, con 1.09g, y en el sembrado en el mismo suelo el PSR del sorgo coinoculado con *B. cereus* +*Burkholderia* sp fue de 0.82g, lo que sugiere que la BS con SM/AV en conjunto con la inoculación bacteriana de *B. cereus* y/o *Burkholderia* sp en el sorgo contrarrestó el efecto negativo del ARA y le permitió un crecimiento superior al del sorgo reportado en el suelo sin ARA usado como CR que mostró un PSR de 0.75g.

El menor PSR se generó en el suelo contaminado con ARA en el sorgo inoculado con *Burkholderia* sp, con un PSR de 0.50g, este resultado muestra un efecto fitotóxico del ARA remanente sobre el sorgo al impedir el intercambio gaseoso y colateralmente una deficiencia mineral en esta gramínea.

Cuadro 9. Efecto de la biorremediación y fitorremediación de un suelo con aceite residual automotriz al 7.5% sobre su concentración final después de 6 meses del ensayo.

Suelo	Aceite residual automotriz remanente (%)		Porcentaje de biorremediación (%)
	Fitorremediación sorgo (plántula)	Fitorremediación sorgo (floración)	
Control absoluto	0.0	0.0	0.0
Control negativo	7.50 ^d	7.50 ^d	0.0
Sorgo con <i>B. cereus</i>	1.03 ^b †	0.57 ^b	92.4
Sorgo con <i>Burkholderia</i> sp	1.64 ^c	0.83 ^c	88.94
Sorgo con <i>B. cereus</i> + <i>Burkholderia</i> sp	0.25^a	0.08^a	98.94

† Letras distintas indican diferencia significativa al 0.05 % según Tukey

En el Cuadro 9 se reportó que la FR especialmente con sorgo coinoculado con *B. cereus* +*Burkholderia* sp disminuyó la concentración de ARA a floración de 0.25% a 0.08% o 98.94% de BR, estadísticamente significativo comparado con la disminución de 1.03% a 0.57% del ARA con sorgo inoculado con *B. cereus*, en tanto que el mismo suelo FR con sorgo inoculado con *Burkholderia* sp la disminución de ARA fue de 1.64% a 0.83%, esto sugiere que la BR vía BS con SM/AV elimino especialmente la fracción de HCA del ARA al aportar la condición mineral favorable para que la población microbiana autóctona oxidara los HCA. Este resultado demuestra que la BS con SM y AV previo a la siembra aportó la condición mineral adecuada para un correcto crecimiento de la gramínea y que la FR aceleró la oxidación de ambas fracciones del ARA, al respecto se ha reportado que la rizósfera de las gramíneas mejora las propiedades del suelo contaminado al permitir una mejor aireación consecuencia de la penetración radicular (Pérez-Armendáriz *et al.*, 2011) y simultáneamente enriquece el suelo con exudados radiculares que fomentan la actividad oxidante de las comunidades microbianas para eliminarlas fracciones de HC de ARA (Pasaye, 2011); investigaciones

como la realizada por Muñoz *et al.*, 2010 demuestran que los exudados radicales del sorgo contienen azúcares y aminoácidos, ácidos orgánicos, y algunas proteínas que son transformadas por la población microbiana autóctona en fitohormonas, que mejora su condición fisiológica de la gramínea y colateralmente aceleran la FR del suelo.

7. CONCLUSIÓN.

La BR vía BS mediante SM y frijol como AV es una opción para reducir la concentración de ARA y facilitó la FR del suelo, especialmente cuando se sembró con sorgo cuya capacidad para eliminar el ARA se mejoró con la inoculación de *B. cereus* y *Burkholderia* sp.

8. PERSPECTIVA.

Las alternativas de BR por BS y FR de suelos contaminación por HC como el ARA requiere una mayor investigación, es importante en posteriores trabajos analizar la BS y FR como un proceso integral de restauración de suelos con HC derivados del petróleo para acelerar la eliminación de estos y no de forma independiente; asimismo es importante explorar la FR con gramíneas similares al sorgo, ya que la mayor parte de la literatura reportan investigaciones para eliminar HC realizadas con gramíneas y en este trabajo se demostró que esta gramínea en asociación con BPCV pueden acelerar la remoción de los HC del suelo.

9. BIBLIOGRAFÍA.

1. Asquith E., Geary M., Nolan A., Evans C. 2012. Comparative Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Soil by Biostimulation, Bioaugmentation and Surfactant Addition. *Journal of Environmental Science and Engineering*: 637-650.
2. Chaîneau, C. H., J. L. Morel y J. Oudot. 1997. Phytotoxicity and plant uptake of fuel oil hydrocarbons. *J. Environ. Qual.* 26:1478-1483
3. Contreras A., Rodríguez M., Villafán S. 2010. Evaluación de la promoción del crecimiento de *Cynodon dactylon* por rizobacterias productoras de fitohormonas

- aisladas de un suelo contaminado con hidrocarburos derivados del petróleo. *Polibotánica* 29: 131-147.
4. Delgadillo-López, A. E., González-Ramírez, C. A., Prieto-García, F., Villagómez-Ibarra, J. R., Acevedo-Sandoval, O., 2011. Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*; 14: 597-612
 5. Fernández C., Llobregat M., Jiménez B., Altomare V., Labrador H., 2008. Biodegradación de asfalto y resinas por microorganismos presentes en suelo contaminado con hidrocarburo. *Rev. de la Facultad de Ingeniería U.C.V*; 4: 7–15.
 6. Ferrera-Cerrato R., Rojas-Avelizapa G., Alarcón A., Cañizares-Villanueva R. 2006. Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 48: 179-187.
 7. Ferrera-Cerrato R., Alarcón A., Trejo-Aguilar D., Sangabriel W., Mendoza-López M., Cruz-Sánchez J., López-Ortiz C. y Delgadillo-Martínez J. 2008. Fitorremediación de un suelo contaminado con combustóleo utilizando *Phaseolus coccineus* y fertilización orgánica e inorgánica. *Agrociencia* 41: 817-826.
 8. Ferrera-Cerrato R., Alarcón A. 2004. Papel de los microorganismos rizosféricos en la fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Agrociencia* 4: 89-109.
 9. Galantini, J.A. y L. Suñer. 2008. Las fracciones orgánicas del suelo: análisis en los suelos de la Argentina. *Agriscientia* 25: 41-55.
 10. García-Hernández D., Sosa-Aguirre C.R., Sánchez-Yáñez J.M. 2007. Biorremediación de agua doméstica contaminada con aceite residual automotriz por bioestimulación. *Ingeniería Hidráulica en México* 22: 113-118.
 11. Gómez W., Gaviria J., Cardona S. 2009. Evaluación de la bioestimulación frente a la atenuación natural y la bioaumentación en un suelo contaminado con una mezcla de gasolina-diesel. *Dyna* 160: 83-93.
 12. Guzmán G. y Alonso A. 2008. Uso de Abonos Verdes. Ministerio de medio ambiente y medio rural y marino. Buenas Prácticas en Producción Ecológica.
 13. Hernández-Bejarano A., Rodríguez A., Barrios M., Rodríguez A. y Guerrero A. 2011. Análisis de la diversidad microbiana de la rizósfera de tres especies vegetales de un suelo contaminado con hidrocarburos del petróleo y su potencial rizoremediador. *Latinoam Biotechnol Amb Algal* 2:1-17
 14. Hernández-Valencia L. y Mager D. 2003. Uso de *Panicum maximun* y *Brachiaria brizantha* para fitorremediar suelos contaminados con un crudo de petróleo liviano. *Bioagro* 15: 149-155.
 15. Larenas P. y De Viana L. 2005. Germinación y supervivencia del pasto cubano *Tithonia tubaeformis* en suelos contaminados con Hidrocarburos de petróleo. *Ecología austral* 15: 177-181.

16. Loredó-Ostí C., López-Reyes L., Espinosa-Victoria D. 2004. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas. Revista: Terra Americana 22: 65-72.
17. Maldonado-Chávez E., Rivera-Cruz M., Izquierdo-Reyes F., Palma-López D. 2010. Efectos de rizósfera, microorganismos y fertilización en la biorremediación y fitorremediación de suelos con petróleo crudo nuevo e intemperizado. Universidad y Ciencia 26: 121-136.
18. Muñoz L. N., Nevárez C. V., Peralta M. R. 2010. Fitorremediación como una alternativa para el tratamiento de suelos contaminados. Revista internacional de ciencia y tecnología biomédica 1:3.
19. Pardo C.J.L., Perdomo R. MC., L. Benavides J. 2004. Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo. NOVA, 2: 40-49.
20. Pasaye A.L., 2011. Biorremediación de un suelo impactado con aceite residual automotriz. Tesis Maestría. UMSNH. (Inédita). Disponible en línea en http://scholar.google.com.mx/scholar?q=Biorremediaci%C3%B3n+de+un+suelo+impactado+con+aceite+residual+automotriz&btnG=&hl=es&as_sdt=0
21. Pérez A., Céspedes C., & Núñez P. 2008. Caracterización física-química y biológica de enmiendas orgánicas aplicadas en la producción de cultivos en República Dominicana. J. Soil Science. Plant Nutrition. 8 : 10-29
22. Pérez-Armendáriz B., Castañeda-Antonio D., Jiménez-Salgado G., Tapia-Hernández A. y Martínez-Carrera D. 2011. Efecto del antraceno en la estimulación del crecimiento en maíz y frijol. Terra 29: 95-102.
23. Plata-Guzmán D., Sánchez-Yáñez J.M., Farías-Rodríguez R., Cárdenas-Navarro R. 2006. Respuesta de maíz (*Zea mays*) a la inoculación con rizobacterias de teocinte. Disponible: <http://www.monografias.com/trabajos33/inoculacion-maiz/inoculacion-maiz.shtml>.
24. Quiñones-Aguilar, Ferrera-Cerrato R., Gavi-Reyes F., Fernández-Linares L. 2003. Emergencia y crecimiento de maíz en un suelo contaminado con petróleo crudo. Agrociencia 37: 585-594.
25. Rivera-Cruz y Trujillo-Narcia. 2004. Estudio de toxicidad vegetal en suelo con petróleo nuevo e intemperizado. Interciencia 20: 369-376.
26. Sánchez-Yáñez J.M., 2007. Breve Tratado de Microbiología Agrícola, teoría y práctica, Ed. UMSNH, UDEM. pp: 130-133, 136-138, 153-155. ISBN: 978-970-95424-1-7.
27. Sangabriel W., Ferrera-Cerrato R., Trejo-Aguilar D., Mendoza-López M. R., Cruz-Sánchez J. S., López-Ortiz C., Delgadillo-Martínez J., y Alarcón A. 2006. Tolerancia y fitorremediación de suelo contaminado con combustóleo por seis especies vegetales. Revista internacional de contaminación ambiental 22: 63-73.
28. Vallejo V., Salgado L., Roldán F. 2005. Evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de TPHs en suelos contaminados con petróleo. Biotecnología. 7: 67-78.

ANEXOS

1. Determinación de grasas y aceites totales

Esta determinación se llevó a cabo por el método de extracción de Soxhlet. Este método no mide una sustancia específica sino un grupo de sustancias con las mismas características fisicoquímicas (solubilidad) y se basa en la adsorción de grasas y aceites en tierra de diatomeas, las cuales son extraídas en un Soxhlet empleando hexano como disolvente. Una vez terminada la extracción se evapora el hexano y se pesa el residuo que ha quedado en el recipiente, siendo este valor el contenido de grasas y aceites. El procedimiento es el siguiente:

- 1) Medir el pH de las muestras el cual debe ser menor de 2, si no tiene este valor acidificar con ácido clorhídrico 1:1 ó ácido sulfúrico 1:1.
- 2) Para muestras con un pH menor de 8 unidades es suficiente adicionar 5 mL de ácido clorhídrico 1:1 ó 2 mL de ácido sulfúrico 1:1.
- 3) Preparar los matraces de extracción introduciéndolos a la estufa a una temperatura entre 103 °C y 105 °C, enfriar en desecador y pesarlos, repetir el procedimiento hasta obtener el peso constante de cada uno de los matraces.
- 4) Preparar el material filtrante colocando un papel filtro en el embudo Büchner y éste en un matraz Kitazato, y agregar 100 mL de la suspensión de tierra de diatomeas-sílice sobre el filtro, aplicar vacío y lavar con 100 mL de agua.
- 5) Transferir el total de la muestra acidificada al embudo Büchner preparado aplicando vacío hasta que cese el paso de agua. Medir el volumen de la muestra.
- 6) Con ayuda de unas pinzas, transferir el material filtrante a un cartucho de extracción. Limpiar las paredes internas del embudo y el frasco contenedor de la muestra, así como la parte interna de la tapa del frasco con trozos de papel filtro previamente impregnados de disolvente (hexano), tener cuidado en remover la película de grasa y los sólidos impregnados sobre las paredes; colocar los trozos de papel en el mismo cartucho.
- 7) Secar el cartucho en una estufa entre 103 °C y 105 °C por un período de 30 min. Transcurrido este tiempo colocar en el equipo Soxhlet.
- 8) Adicionar el volumen adecuado de hexano al matraz de extracción previamente puesto a peso constante y preparar el equipo Soxhlet. Evitar tocar con las manos el cartucho y el matraz de extracción, para ello utilizar pinzas ó guantes de látex.
- 9) Colocar el equipo de extracción sobre la parrilla de calentamiento, controlar la temperatura del reflujo y extraer a una velocidad de 20 ciclos por hora durante un período de 4 h.
- 10) Una vez terminada la extracción, retirar el matraz del equipo Soxhlet y evaporar el disolvente.
- 11) El matraz de extracción libre de disolvente se coloca en el desecador hasta que alcance la temperatura ambiente.
- 12) Pesar el matraz de extracción y determinar la concentración de grasas y aceites recuperables. Analizar un blanco de reactivo bajo las mismas condiciones de la muestra.