



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
FACULTAD DE BIOLOGIA

Programa Institucional de maestría en Ciencias Biológicas

**Biorremediación de suelo contaminado con aceite residual automotriz
por bioestimulación y fitorremediación con *Sorghum vulgare* inoculado
con *Rhizobium etli* y *Rhizophagus irregularis***

Tesis para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Biológicas

Presenta: **QFB. GLADYS JUÁREZ CISNEROS**

Asesor: Doctor en Ciencias Juan Manuel Sánchez Yáñez

Coasesor: Doctora en Química Nabanita Dasgupta Schubert

Morelia, Mich. Abril, 2015



Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Juan Manuel Sánchez Yáñez en el laboratorio de Microbiología Ambiental del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, con el apoyo financiero del proyecto 2.7 (2013-2015) de la Coordinación de Investigación Científica de la UMSNH y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (2013-2015).

Dedicatoria:

Agradecimientos:

- Al proyecto 2.7 (2013-2015) de la Coordinación de Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) 2013-2015.
- Al Dr. Juan Manuel Sánchez Yáñez
- A los integrantes del Comité Tutorial: Dra. Nabanita Dasgupta Shubert; Dra. Yazmín Carreón Abud; Dr. Edmundo López Barbosa; Dr. Javier Villegas Moreno.

- Instituto de Investigaciones Químico Biológicas:
 - Dr. Javier Villegas Moreno y Biol. Lorena Carreto Montoya del Laboratorio de Interacción Suelo- Planta-Microorganismo.
 - Dr. Jesús Campos García y Biol. Rodolfo Fulgencio Negrete del Laboratorio de Biotecnología Microbiana.

- Instituto de Investigaciones Agrícolas, Pecuarias y Forestales de la UMSNH.
 - Dr. Gerardo Rodríguez Alvarado, Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavia y Biol. Marlene Díaz Celaya del Laboratorio de Patología Vegetal.
 - Dra. Liliana Márquez Benavidez del Laboratorio de Residuos Sólidos.

- Facultad de Biología: MC. Juan Carlos González Cortés del Laboratorio de edafología “Martha Bustos Zagal”.

Contenido:

Resumen.....	xi
Abstrac:	xii
2. Introducción y antecedentes:.....	1
2.1. Contaminación de suelo por aceite residual automotriz.....	1
2.2. Estrategias de biorremediación de suelo contaminado con aceite residual automotriz:.....	2
2.3. Biorremediación vía Bioestimulación:.....	2
2.3.1.1. Bioestimulación de suelo impactado con aceite residual automotriz con un extracto fúngico crudo	3
2.3.1.2. Bioestimulación de suelo contaminado con aceite residual automotriz con <i>Cicer arietinum</i> como abono verde.....	4
2.4. Fitorremediación del suelo para eliminar el aceite residual automotriz remanente	5
2.4.1. Fitorremediación de suelo contaminado con aceite residual automotriz con <i>Sorghum vulgare</i> inoculado con <i>Rhizobium etli</i> y/o <i>Rhizophagus irregularis</i>	5
3. Hipótesis:.....	7
4. Objetivo general:.....	7
4.1. Objetivos particulares:.....	7
5. Material y métodos:.....	8
5.1. Diagrama de bloques: Biorremediación de suelo contaminado con aceite residual automotriz por bioestimulación con un extracto fúngico crudo y/o <i>C. arietinum</i> como abono verde	9
5.2. Producción de extracto fúngico crudo para bioestimulación de suelo contaminado con aceite residual automotriz.....	10
5.2.1. Actividad lacasa, lignino y manganeso peroxidasa generados por hongos mitospóricos ligninolíticos.....	11
5.3. Análisis fisico-químico del suelo:.....	13
5.4. Cultivo de <i>Cicer arietinum</i> como abono verde para bioestimular el suelo contaminado con aceite residual automotriz.....	14
5.5. Diseño experimental fase I:.....	14
5.5.1. Cuantificación inicial y final de aceite residual automotriz del suelo bioestimulado con extracto fúngico crudo y <i>C. arietinum</i> como abono verde	15
5.6. Identificación de hidrocarburos aromáticos remanentes del aceite residual automotriz en un suelo biorremediado	16
5.6.1. Extracción de aceite residual automotriz:	16
5.6.2. Identificación de hidrocarburos por cromatografía de gases acoplada a masas:	16
5.7. Análisis de resultados.....	17

5.8.	Diagrama de bloques fase II: Bioestimulación de suelo contaminado con 34500 ppm de aceite residual automotriz con un extracto fúngico y/o <i>C. arietinum</i> y fitorremediación con <i>S. vulgare</i> inoculado con <i>R. irregularis</i> y <i>Rhizobium etli</i>	19
5.9.	Diseño experimental fase II: Biorremediación de suelo contaminado con 34500 ppm de aceite residual automotriz con extracto fúngico crudo en jarras de Leonard	20
5.9.1.	Bioestimulación de suelo contaminado con aceite residual automotriz con <i>Cicer arietinum</i> en jarras de Leonard.....	20
5.9.2.	Actividad lacasa, manganeso y lignino peroxidasa en suelo contaminado con aceite residual automotriz.....	20
5.10.	Fitorremediación de suelo para eliminar el aceite residual automotriz remanente con <i>Sorghum vulgare</i> coinoculado con <i>Rhizophagus irregularis</i> y/o <i>Rhizobium etli</i>	21
5.10.1.	Desinfección y siembra de la semilla de <i>Sorghum vulgare</i> usado para fitorremediación del suelo contaminado con el aceite residual automotriz remanente.....	21
5.10.2.	Inóculo de <i>Rhizophagus irregularis</i> para <i>Sorghum vulgare</i> usado en fitorremediación de suelo con aceite residual automotriz:	21
	22
5.10.3.	Colonización de <i>Rhizophagus irregularis</i> en <i>Sorghum vulgare</i> usado para fitorremediación de suelo contaminado con aceite residual automotriz remanente	22
5.11.	Inóculo de <i>Rhizobium etli</i> durante la fitorremediación de suelo con aceite residual automotriz	23
5.12.	Fitorremediación del suelo para eliminar el aceite residual automotriz remanente con <i>Sorghum vulgare</i> coinoculado con <i>Rhizophagus irregularis</i> y/o <i>Rhizobium etli</i>	24
5.13.	Solución mineral completa para alimentar a <i>Sorghum vulgare</i> usado en la fitorremediación de suelo contaminado con aceite residual automotriz.....	24
5.14.	Cuantificación e identificación de los hidrocarburos del aceite residual automotriz en el suelo biorremediado	25
5.15.	Diseño experimental fase II:.....	25
6.	Resultados y discusión fase I:	26
6.1.	Actividad lacasa, manganeso y lignino peroxidasa generada en un extracto fúngico crudo por hongos mitospóricos ligninolíticos en medio de cultivo con lignina residual de paja de trigo	26
Figura 7. Actividad enzimática de hongos mitospóricos ligninolíticos en medio de cultivo con lignina residual de paja de trigo		
6.2.	Bioestimulación de suelo contaminado con aceite residual automotriz con un extracto fúngico crudo y/o <i>Cicer arietinum</i>	27
6.2.1.	Cuantificación de aceite residual automotriz remanente:.....	27
6.2.2.	Identificación de hidrocarburos aromáticos del aceite residual automotriz remanente:.....	29
7.	Resultados y discusión fase II:	34

7.1.	Actividad lacasa, manganeso y lignino peroxidasa en suelo contaminado con aceite residual automotriz bioestimulado con un extracto fúngico crudo y abono verde:	34
7.2.	Fenotipia de <i>Sorghum vulgare</i> inoculado con <i>Rhizophagus irregularis</i> y/o <i>Rhizobium etli</i> usado en la fitorremediación de suelo con el aceite residual automotriz remanente.....	35
7.3.	Biomasa de <i>Sorghum vulgare</i> inoculado con <i>Rhizophagus irregularis</i> y/o <i>Rhizobium etli</i> en suelo con el aceite residual automotriz remanente.....	38
7.4.	Colonización radical de <i>Sorghum vulgare</i> por <i>Rhizophagus irregularis</i> cultivado en suelo contaminado con aceite residual automotriz	41
7.5.	Identificación de hidrocarburos aromáticos del aceite residual automotriz remanente:	49
8.	Conclusión:	52
9.	Perspectivas:.....	53
10.	Bibliografía:	54
11.	Anexos:	61
11.1.	Cromatogramas: Identificación de HC en suelo contaminado con 34500, 65418 y 89830 ppm de ARA bioestimulado con un EFC y <i>C. arietinum</i> como abono verde (Fase I).....	61
11.2.	Clasificación macro y microscópica de hongos mitospóricos ligninolíticos productores del extracto un fúngico crudo.....	67
11.2.1.	Obtención de cultivos axénicos de hongos mitospóricos ligninolíticos:	68
11.2.2.	Extracción de DNA de hongos mitospóricos ligninolíticos:	69
11.2.3.	Identificación molecular de hongos mitospóricos ligninolíticos.....	70
12.	Bibliografía fase complementaria:	76

Índice de cuadros:

Cuadro 1. Acrónimos	ix
Cuadro 2. Análisis físico químico de suelo sin contaminar con aceite residual automotriz	14
Cuadro 3. Bioestimulación de un suelo contaminado con aceite residual automotriz con un extracto fúngico y/o <i>Cicer arietinum</i> como abono verde.....	15
Cuadro 4. Biorremediación de un suelo contaminado con 34500 ppm de aceite residual automotriz por bioestimulación con un extracto fúngico, abono verde y fitorremediación con <i>Sorghum vulgare</i> inoculado con <i>R. irregularis</i> y <i>Rhizobium etli</i>	25
Cuadro 5. Hidrocarburos remanentes en un suelo contaminado con 34500 ppm de aceite residual automotriz bioestimulado con un extracto fúngico crudo y/o <i>Cicer arietinum</i> como abono verde	31
Cuadro 6. Hidrocarburos presentes en un suelo contaminado con 65418 y 89830 ppm de aceite residual automotriz bioestimulado con un extracto fúngico crudo y/o <i>Cicer arietinum</i> como abono verde	33
Cuadro 7. Hidrocarburos remanentes en un suelo contaminado con 34500 ppm de aceite residual automotriz bioestimulado con un extracto fúngico crudo, <i>Cicer arietinum</i> y fitorremediación con <i>Sorghum vulgare</i> inoculado con <i>Rhizophagus irregularis</i> y/o <i>Rhizobium etli</i>	51
Cuadro 10. Porcentaje de materia orgánica antes y después de la bioestimulación del suelo con <i>C. arietinum</i> y un extracto fúngico crudo	66

Índice de figuras:

Figura 1. Disposición de aceite residual automotriz en México	1
Figura 2. Obtención de extracto fúngico crudo para biorremediar un suelo contaminado con aceite residual automotriz.....	11
Figuras 4. Identificación de hidrocarburos del aceite residual automotriz:.....	17
Figura 6. Jarra de Leonard para biorremediar suelo contaminado con aceite residual automotriz	18
Figura 7. Tinción de raíces de <i>Sorghum vulgare</i> con tinta china-vinagre para cuantificar el porcentaje de colonización de <i>Rhizophagus irregularis</i>	22
Figura 8. <i>Rhizobium etli</i> en agar extracto de lavadura manitol y rojo congo	23
Figura 9. Actividad enzimática de hongos mitosporicos ligninolíticos en medio de cultivo con lignina residual de paja de trigo	26
Figura 10. Concentración de aceite residual automotriz remanente en un suelo bioestimulado con <i>Cicer arietinum</i> y/o extracto fúngico crudo.	29
Figura 11. Actividad enzimática en suelo con aceite residual automotriz bioestimulado con un extracto fúngico crudo y <i>Cicer arietinum</i>	35
Figura 12. Fenotipia de <i>Sorghum vulgare</i> inoculado con <i>Rhizobium etli</i> y <i>Rhizophagus irregularis</i> usado en la fitorremediación de aceite residual remanente.	37
Figura 13. Peso fresco aéreo y de raíz de <i>Sorghum vulgare</i> inoculado con <i>Rhizobium etli</i> y <i>Rhizophagus irregularis</i> usado en la fitorremediación del suelo para eliminar el aceite residual.	39
Figura 14. Peso seco aéreo y radical de <i>Sorghum vulgare</i> inoculado con <i>Rhizobium etli</i> y <i>Rhizophagus irregularis</i> usado en la fitorremediación del suelo para eliminar el aceite residual remanente	41
Figura 15. Porcentaje de colonización de <i>Rhizophagus irregularis</i> en raíces de <i>Sorghum vulgare</i> usado para fitorremediar un suelo con 34500 ppm de aceite residual automotriz.....	43

Figura 16. Arbúsculos de hongos micorrícicos nativos en raíz de <i>Sorghum vulgare</i> en suelo sin contaminar con aceite residual automotriz.....	44
Figura 17. Arbúsculos de hongos micorrícicos nativos en raíz de <i>Sorghum vulgare</i> en suelo con aceite residual automotriz.....	44
Figura 18. Arbúsculos de <i>Rhizophagus irregularis</i> y hongos micorrícicos nativos en raíz de <i>Sorghum vulgare</i> en suelo contaminado con aceite residual automotriz.....	45
Figura 19. Micelio extrarradical de hongos micorrícicos nativos en raíz de <i>Sorghum vulgare</i> en suelo sin contaminar con aceite residual automotriz.....	45
Figura 20. Vesículas de <i>Rhizophagus irregularis</i> y hongos micorrícicos nativos en raíz de <i>Sorghum vulgare</i> en suelo contaminado con aceite residual automotriz.....	46
Figura 21. Aceite residual automotriz remanente en suelo bioestimulado secuencialmente con un extracto fúngico crudo, <i>Cicer arietinum</i> y fitorremediado con <i>Sorghum vulgare</i> inoculado con <i>Rhizophagus irregularis</i> y <i>Rhizobium etli</i>	47
Figura 22. Aceite residual automotriz remanente en la última fase de biorremediación por fitorremediación con <i>Sorghum vulgare</i> inoculado con <i>Rhizophagus irregularis</i> y/o <i>Rhizobium etli</i>	48

Cuadro 1. Acrónimos

Acrónimo	Significado
AP	Altura de planta
ARA	Aceite residual automotriz
AV	Abono verde
CNA, CNB, CNC	Control negativo A, B o C
CTX	Cefotaxima sódica
EFC	Extracto fúngico crudo
ELM	Extracto de levadura manitol
HC	Hidrocarburos
HMA	Hongo micorrízico arbuscular
HML	Hongos mitospóricos ligninolíticos
HPA	Hidrocarburos policíclicos aromáticos
LiP	Lignino peroxidasa
LIREPATO	Lignina residual de paja de trigo
LR	Longitud de raíz
MnP	Manganeso peroxidasa
PFA	Peso fresco aéreo
PFR	Peso fresco de raíz
PSA	Peso seco aéreo
PSR	Peso seco de raíz
UFC	Unidades formadoras de colonias

Resumen

La contaminación de suelo por mezclas de hidrocarburos (HC) alifáticos y aromáticos como el aceite residual automotriz (ARA) afecta negativamente su fertilidad, así como su producción y cobertura vegetal, además inhibe la actividad microbiana en los ciclos biogeoquímicos que sustentan la vida. Para biorrestaurar un suelo impactado con ARA, esta investigación se dividió en dos fases experimentales: I) el suelo se contaminó con 34500, 65418 y 89830 ppm de ARA, y se biorremedió por bioestimulación con un extracto fúngico crudo (EFC) para hidrolizar la fracción aromática del ARA y/o *Cicer arietinum* como abono verde (AV) e inducir mineralización de los HC alifáticos. II) El suelo se contaminó con 34500 ppm de ARA y se biorremedió en tres etapas secuenciales: 1) Bioestimulación con un EFC. 2) después se cultivó e incorporó *C.arietinum* como AV, y para el ARA remanente, 3) el suelo se fitorremedió con *Sorghum vulgare* inoculado con *Rhizophagus irregularis* y/o *Rhizobium etli*. El objetivo de esta investigación fue analizar la biorremediación de un suelo contaminado con ARA por una doble bioestimulación en secuencia con un EFC y/o *C. arietinum* y la ulterior fitorremediación del suelo con *S. vulgare* tratado con *R. irregularis* y/o *R. etli* para el ARA restante. El ensayo se evaluó con las variables respuesta: concentración inicial y final de ARA e identificación de sus principales HC. En la etapa de fitorremediación del suelo con *S. vulgare* se midió su fenotipia: altura, longitud radical y biomasa: peso fresco y seco aéreo y radical en estadio de floración. A nivel radical se determinó el porcentaje de colonización de *R. irregularis*. Los datos experimentales se analizaron por combinación de varianza (ANOVA) y Tukey con $p < 0.05$ (programa JMP versión 6.0).

Palabras clave: gramínea, monooxigenasas, cometabolismo, mineralización

Abstrac:

Soil contamination by mixtures of aliphatic and aromatic hydrocarbons (HC) such as waste motor oil (WMO) adversely affects fertility and production and plant cover also inhibits microbial activity in biogeochemical cycles that sustain life. To biorrestaurar soil impacted with WMO, this research was divided into two experimental phases: I) the soil was contaminated with 34500, 65418 and 89830 ppm of WMO, and biostimulation biorremedió by a fungal crude extract (FCE) to hydrolyze the fraction WMO aromatic and / or *Cicer arietinum* as green manure (GM) and induce mineralization of aliphatic HC. II) The soil was contaminated with 34500 ppm of WMO and bioremedio in three sequential steps: 1) Biostimulation with an EFC. 2) then cultured and incorporated *C.arietinum* as GM , and the remainder, 3) WMO phytoremedio the soil with *Sorghum vulgare* inoculated with *Rhizophagus irregularis* and / or *Rhizobium etli*. The objective of this research was to analyze the bioremediation of soil contaminated with WMO by a double biostimulation in sequence with an EFC and / or *C. arietinum* and subsequent soil phytoremediation with *S. vulgare* treated with *R. irregularis* and / or *R. etli* for the remaining WMO. The assay was evaluated with the response variables: initial and final concentration of WMO and identification of its main HC. Height, root length and biomass: Fresh aerial and root dry weight and flowering stage in soil phytoremediation stage with *S. vulgare* your phenotyping was measured. A radical level the percentage of colonization of *R. irregularis* was determined. Experimental data were analyzed by combination of variance (ANOVA) and Tukey with P0.05 (JMP program version 6.0).

Keywords: grass, monooxygenases, cometabolism, mineralization

2. Introducción y antecedentes:

2.1. Contaminación de suelo por aceite residual automotriz

La contaminación de suelo por hidrocarburos derivados del petróleo, como el aceite residual automotriz (ARA) es un problema económico-ambiental en el mundo. El ARA es un residuo peligroso constituido por una mezcla heterogénea de hidrocarburos (HC) alifáticos lineales o ramificados y monoaromáticos, diaromáticos, aromáticos policíclicos (HPA), resinas y asfaltenos de alto peso molecular (Gómez *et al.*, 2007); además contiene metales pesados como el níquel o el plomo y otros compuestos de azufre y/o nitrógeno como el n-fenil- α -naftilamina, n-fenil- β -naftilamina y tetrametil-diamino-difenil-metano (Vallejo *et al.*, 2005). De acuerdo con el Instituto Nacional de Ecología y SEMARNAT (2007) en México se producen 450×10^6 L de ARA/año, y la mayor parte, equivalente a 400×10^6 L de ARA o al 89 %, se desconoce su disposición final (LGEEPA 2012), lo que origina un grave problema de contaminación ambiental, especialmente en suelo, donde el ARA impide el intercambio gaseoso, la mineralización de la materia orgánica, reducen su fertilidad e inhibe

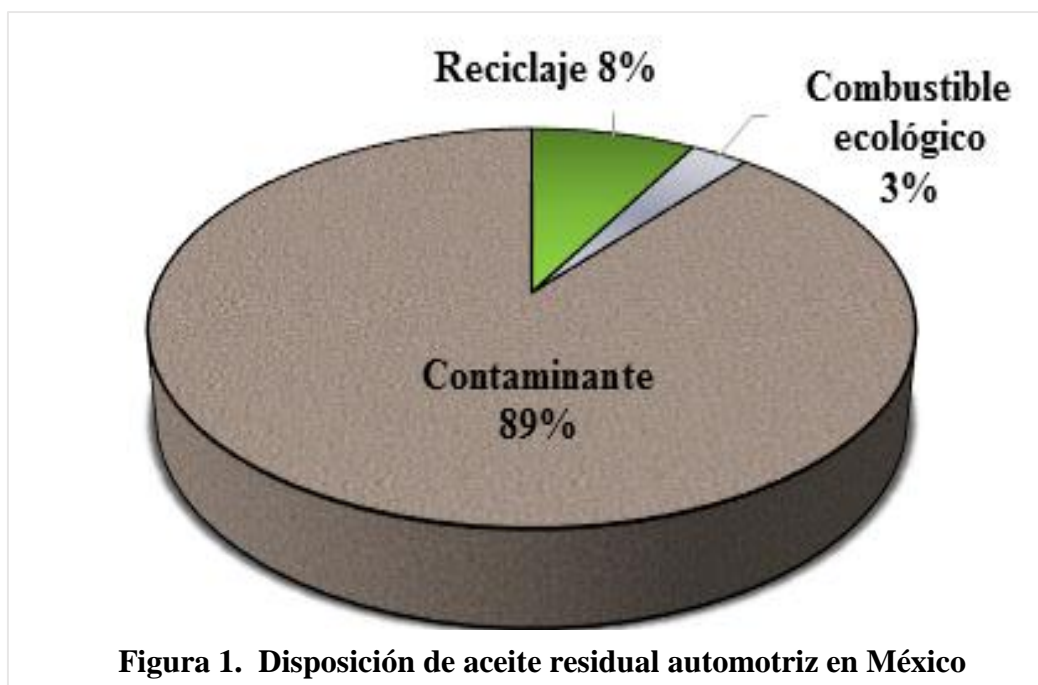


Figura 1. Disposición de aceite residual automotriz en México

la actividad microbiana involucrada en los ciclos biogeoquímicos que sustentan la vida (Pardo *et al.*, 2004).

2.2. Estrategias de biorremediación de suelo contaminado con aceite residual automotriz:

Se han empleado estrategias para restaurar suelos impactados con HC como el ARA, y se requiere aplicarlas en orden de sucesión y no simultáneamente como erróneamente se hace (Maldonado-Chávez *et al.*, 2010; Ferrera-Cerrato *et al.*, 2007). En la primera fase se emplean los métodos físicos cuando el nivel de contaminación es tan alto que se requiere la remoción mecánica o lavado para eliminar el exceso de HC en ese ambiente; en la segunda fase se usan químicos como el H_2O_2 , $KMnO_4$ y el O_3 y/o la incineración para eliminar los HC en ese suelo (Delgadillo-López *et al.*, 2011; NOM-138-SEMARNAT/SS, 2003); y cuando la concentración del ARA en el suelo es tolerable para la microbiota heterotrófica oxidante de HC y/o las plantas, entonces se utiliza la biorremediación con sus variantes: bioaumentación, bioestimulación y fitorremediación de acuerdo con el problema (Vidali 2001).

2.3. Biorremediación vía Bioestimulación:

La bioestimulación es una estrategia de biorremediación que consiste en incorporar al suelo contaminado con ARA un abono orgánico animal o vegetal, y/o un fertilizante químico que supla la demanda de compuestos de N, P y/o K esencial para que la microbiota nativa heterotrófica aeróbica oxide sus HC (Roane *et al.*, 2001). Sin embargo la biorremediación únicamente por bioestimulación es lenta comparada con los métodos químicos. Al respecto la información asociada con la biorremediación de un suelo contaminado con ARA en diferentes niveles de contaminación aplicando bioestimulación con fertilizantes orgánico o inorgánicos es escasa, como lo reportaron Abdulsalam y Omale (2009), que analizaron la

bioestimulación de un suelo impactado con 40000 ppm de ARA con 57.2 (g/kg de suelo) de un fertilizante (N.P.K; 20:10:10) por 42 días y mostraron que después de la bioestimulación se redujo en un $69.2 \pm 0.05\%$, comparado con el mismo suelo contaminado con ARA sin bioestimar empleado como control negativo, donde la atenuación natural eliminó el $43.2 \pm 1.5\%$.

2.3.1.1. Bioestimulación de suelo impactado con aceite residual automotriz con un extracto fúngico crudo

Uno de los factores limitantes de la biorremediación de un suelo contaminado con ARA son sus HC policíclicos aromáticos (HPA) que son recalcitrantes, una opción para su degradación parcial es aplicar enzimas extracelulares de hongos mitosporicos ligninolíticos (HML), como *Aspergillus* sp. *Alternaria* sp. (Laura y Castellanos, 2009), *Fusarium solani*, *Cladosporium cladosporioides* (Nazareno *et al.*, 2000), *Chaetomium globosum* y *C. erraticum* (Troya *et al.*, 2000) que al sintetizar: a) la manganeso peroxidasa (MnP) hidroliza fenol por oxidación de Mn^{2+} a Mn^{3+} ; con b) la lignino peroxidasa (LiP) y la lacasa (*p*-difenol- dioxígeno: óxido-reductasa), ambas dependientes de cobre, rompen aromáticos del ARA en ausencia de MnP (Rodríguez *et al.*, 2003). Con base en lo anterior es posible suponer que en un suelo contaminado con ARA la aplicación de un extracto fúngico crudo (EFC) de HML es útil para degradar la fracción aromática del ARA, puesto que estas enzimas ligninolíticas son activas en condiciones físico-químicas ambientales diversas y adversas de temperatura, pH e inhibidores naturales de las proteínas (Pineda-Flores y Mesta-Howard, 2001).

Aunque la información generada hasta el momento sobre la biorremediación de suelo contaminado con ARA por bioestimulación con un EFC de HML es mínima, investigaciones relacionadas sí existen, como lo reportó Leal (2003), que realizó una doble y secuencial

bioestimulación de un suelo contaminado con 25000 ppm de ARA con un EFC de *Phanerochaete chrisosporium* y una solución mineral y lo comparó con la bioestimulación de ese mismo suelo solo con la solución mineral. Sus resultados reportaron que la doble bioestimulación con el EFC y solución mineral redujo hasta 12080 ppm del ARA, mientras que la bioestimulación solo con la solución mineral eliminó apenas 3900 ppm, lo que demuestra que al combinar en secuencia dos estrategias de bioestimulación se acelera la detoxificación de suelo impactado con ARA. Asimismo García *et al.*, (2007), en agua doméstica contaminada con ARA y bioestimulada con un extracto fúngico purificado de *Pleurotus florida* y una solución mineral, en 96.7 h mineralizó el benceno del ARA y lo redujo a 7.72 ppm, en comparación al agua con ARA sin bioestimar, donde por atenuación natural el remanente de benceno fue de 32.77 ppm.

2.3.1.2. Bioestimulación de suelo contaminado con aceite residual automotriz con *Cicer arietinum* como abono verde

La continuación de la biorremediación de ese suelo impactado con ARA se mejora y acelera con *C. arietinum* aplicado como abono verde (AV), ya que restaura el desequilibrio mineral de ese suelo, especialmente la deficiencia de nitrógeno e induce a las poblaciones nativas microbianas heterotróficas a mineralizar los HC del ARA, como lo señalado por Balderas (2014) en un suelo contaminado con 75000 ppm de ARA por bioestimulación doble y combinada con una solución mineral, AV de *Phaseolus vulgaris* inoculado con *Bacillus cereus* y *Burkholderia* sp. y sucesiva fitorremediación con *S. vulgare* redujo el ARA hasta 80 ppm, comparado con la atenuación natural donde el total del ARA fue persistente. También Asquith *et al.*, (2012), reportaron que en un suelo contaminado con 30,000 mg/kg de hidrocarburos totales de petróleo al ser bioestimulado con enmiendas con abono verde combinado con Daramend™ después de 195 días redujo hasta un 80 % de esos HC,

comparado con un 10 % que se eliminó por atenuación natural en el mismo suelo contaminado sin bioestimular usado como control negativo.

2.4. Fitorremediación del suelo para eliminar el aceite residual automotriz remanente

En la biorrestauración del suelo impactado con HC para eliminar el ARA remanente se recomienda la fitorremediación con gramíneas como el *S. vulgare* por su denso sistema radial que se asocia con microorganismos oxidantes de HC (Salt *et al.*, 1998; USEPA, 2001). Esta gramínea además de un sistema radical extenso y fibroso puede ser tolerante a la fitotoxicidad de algunos HC, y mecánicamente facilita la aireación del suelo por la penetración radical, mientras que sus exudados enriquecen la rizosfera para estimular la actividad de la microbiota heterótrofa oxidante de HC (Peña-Castro, *et al.*, 2006). Al respecto Shirdam *et al.*, (2008) fitorremediaron un suelo contaminado con 40 000 ppm de petróleo con *Sorghum bicolor L* y *Linum usitatissimum L.* y mostraron una reducción de 9500 y 18500 ppm de petróleo respectivamente, comparado con el suelo sin fitorremediar usado como control negativo donde la eliminación de petróleo fue nula a los 90 días. También Osadolor y Seghosime (2013) fitorremediaron un suelo contaminado con 7546 ppm de ARA con *Melampodium paludosum*. El resultado mostró una reducción de 4539 ppm de ARA después de 16 semanas.

2.4.1. Fitorremediación de suelo contaminado con aceite residual automotriz con *Sorghum vulgare* inoculado con *Rhizobium etli* y/o *Rhizophagus irregularis*

Los HC insolubles del ARA en el suelo inhiben el crecimiento vegetal al impedir el intercambio gaseoso, al limitar la disponibilidad de agua, y colateralmente retardar las fases de plántula o floración (Méndez-Natera *et al.*, 2004). Mientras que se reporta que los HC al solubilizarse en la raíz disuelven las membranas de sus células corticales, por lo que la planta

tiene un mayor gasto energético para reparar el tejido radical dañado y en ello disminuye el crecimiento vegetal aéreo (Chaîneau, *et al.*, 1997; Loredó-Ostí *et al.*, 2004; Peña-Castro, *et al.*, 2006).

La fitorremediación del suelo para reducir el ARA remanente con *S. vulgare* podría mejorarse por la inoculación con *R. etli*; un género bacteriano promotor de crecimiento vegetal que sintetiza fitohormonas en la rizosfera y tiene capacidad de mineralizar los HC alifáticos y por cometabolismo degradar parcialmente los HPA (Loredó-Ostí *et al.*, 2004; García-Rivero y Peralta-Pérez, 2008). Otra manera de mejorar la fitorremediación de suelo impactado con HC del ARA e incrementar la mineralización de sus alifáticos, es la siembra de *S. vulgare* inoculado con *R. irregularis*, que estimula su crecimiento por traslocación de PO₄, además de conferirle tolerancia a la fitotoxicidad de HC alifáticos y aromáticos, sin embargo mínima información se reporta en suelo contaminado con HC biorremediado por bioestimulación y posterior fitorremediación con *S. vulgare* inoculado con *R. irregularis*, pero sí de investigaciones análogas con leguminosas; como el trabajo de Villegas (2011), que analizó en un suelo contaminado con fenantreno su fitorremediación con *Leucaena* sp. coinoculada con *Glomus* spp. y/o *Rhizobium* sp. Los resultados mostraron que en el suelo fitorremediado con la leguminosa coinoculada se eliminó 60 µg/kg de suelo de fenantreno más, que la cantidad eliminada de estos aromáticos que con la *Leucaena* sin inocular a los 60 días. También Zhou *et al.*, (2013) en un suelo contaminado con 50000 ppm de pireno fitorremediaron con *Medicago sativa* cv Europe y *Fetuca arundinacea* cv Barclay inoculadas con *R. irregularis* durante 60 días. Los resultados mostraron que en el suelo la fitorremediación con *M. sativa* redujo el 28% de pireno y *F. arundinacea* un 9.95% mientras que en el suelo contaminado usado como control la mineralización de pireno fue nula.

Lo anterior muestra que la biorremediación con las diversas variantes reducen la concentración de mezclas de HC, sin embargo, se emplean estas estrategias de forma independiente y la depuración de esos suelos generalmente es lenta, por lo que para acelerar la restauración de un suelo contaminado con ARA se planteó la siguiente hipótesis:

3. Hipótesis:

Un suelo contaminado con 34500, 64418 y 89830 ppm de aceite residual automotriz será eficazmente restaurado por doble bioestimulación con un extracto fúngico crudo, *Cicer arietinum* y/o ulterior fitorremediación con *Sorghum vulgare* inoculado con *Rhizobium etli* y/o *Rhizophagus irregularis*.

4. Objetivo general:

Analizar en un suelo contaminado con aceite residual automotriz la bioestimulación con un extracto fúngico crudo, *Cicer arietinum* y posterior fitorremediación con *Sorghum vulgare* inoculado con microorganismos promotores de crecimiento vegetal.

4.1. Objetivos particulares:

1. Evaluar en un suelo contaminado con aceite residual automotriz su bioestimulación con *Cicer arietinum* como un abono verde y un extracto fúngico crudo individualmente o combinado.
2. Analizar el efecto de la fitorremediación de suelo para reducir el aceite residual remanente con *Sorghum vulgare* inoculado con *Rhizophagus irregularis* y *Rhizobium etli*.

5. Material y métodos:

Este trabajo de investigación se realizó en dos fases experimentales establecidas de la siguiente manera:

FASE I

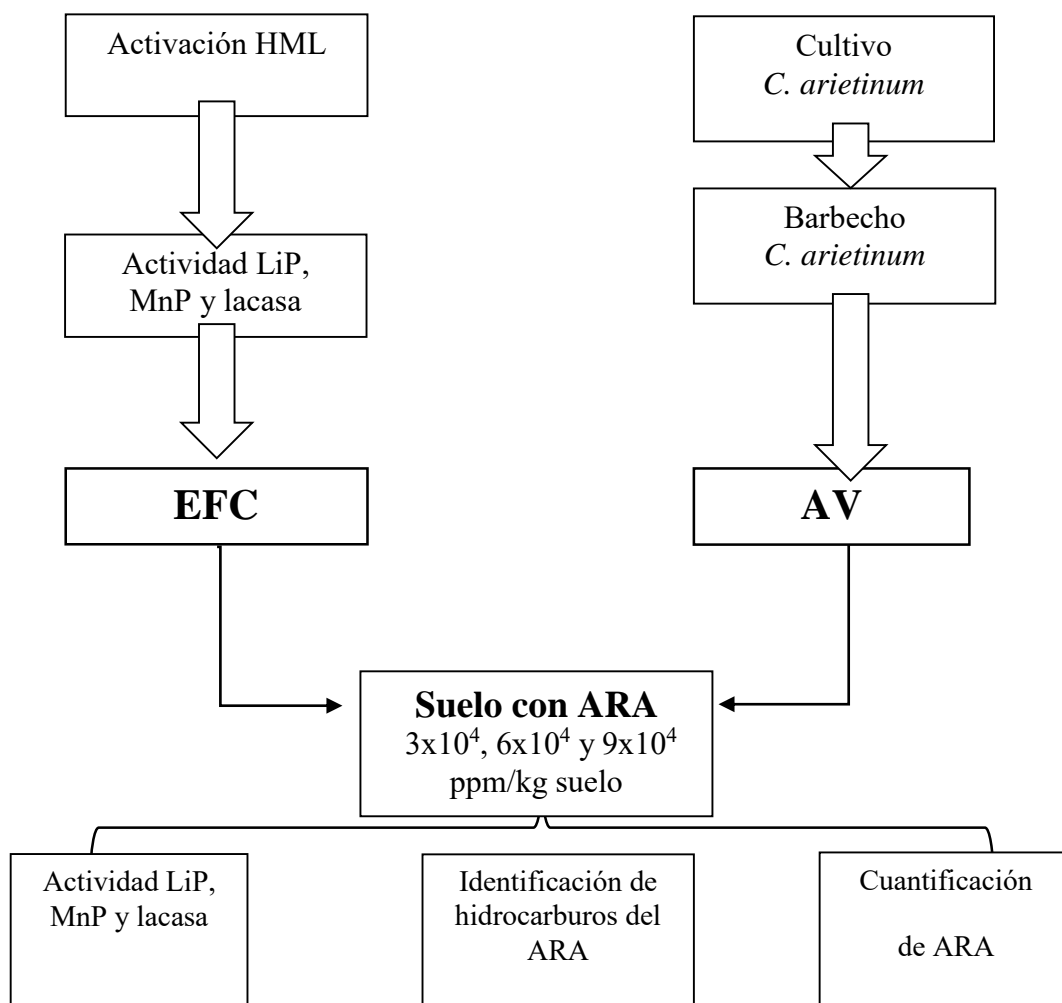
Suelo contaminado con 34500, 65418 y 89830 ppm de aceite residual automotriz se biorremedió con una doble bioestimulación con un extracto fúngico crudo y/o *C. arietinum* como abono verde por 60 días.

FASE II

Biorremediación secuencial de suelo contaminado con 34500 ppm de aceite residual automotriz con un extracto fúngico crudo seguido de la bioestimulación con *Cicer arietinum* como abono verde y ulterior fitorremediación con *Sorghum vulgare* inoculado con *Rhizophagus irregularis* y/o *Rhizobium etli* por 120 días.

FASE I:

5.1. Diagrama de bloques: Biorremediación de suelo contaminado con aceite residual automotriz por bioestimulación con un extracto fúngico crudo y/o *C. arietinum* como abono verde



Nota: ARA= aceite residual automotriz; AV= abono verde; HML=hongos mitospóricos ligninolíticos; LiP=lignino peroxidasa; MnP=manganeso peroxidasa

5.2. Producción de extracto fúngico crudo para bioestimulación de suelo contaminado con aceite residual automotriz

De la colección de HML del laboratorio de Microbiología Ambiental del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH, se cultivaron *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus tubingensis*, *A. fumigatus* y *Fusarium thapsinum* en medio líquido con lignina residual de paja de trigo (LIREPATO) como única fuente de carbono y energía, con la siguiente composición química (g/L): LIREPATO, 10,0; peptona de soya, 5,0; CuSO₄, 0,01; MgSO₄, 1,5; KH₂PO₄, 1,5; K₂HPO₄, 1,5, NaCl, 0,9; extracto de levadura, 1,0; detergente Roma® al 1%, 2,5mL; solución de oligoelementos 0,001 mL; azul de bromotimol al 0,1%, 10,0mL, pH ajustado a 5,5. Los HML se incubaron 18 días/28°C en agitador mecánico (Thermo Scientific MaxQ 4000) a 150 rpm y se mantuvo un pH 5,5 ± 0,2 constante. Cada semana se colectó 10,0 mL del medio LIREPATO para determinar la actividad lacasa, LiP y MnP durante dos semanas y luego se congelaron las muestras hasta su análisis (Bonilla *et al.*, 2013). Para obtener el EFC, con bomba de vacío (Power electric) las muestras de LIREPATO con los HML se filtraron y se ajustó a un pH de 6,5 ± 0,2 con potenciómetro (HANNA instruments) y se conservó en frascos schott /en congelación hasta su aplicación para bioestimular el suelo contaminado con ARA (Figura 2).

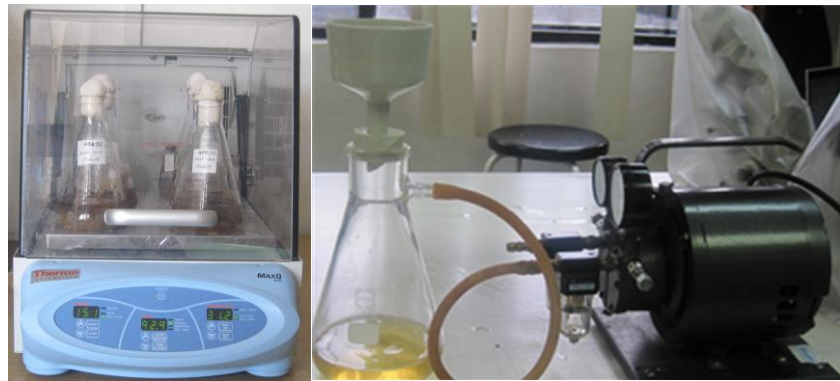


Figura 2. Obtención de extracto fúngico crudo para biorremediar un suelo contaminado con aceite residual automotriz

5.2.1. Actividad lacasa, lignino y manganeso peroxidasa generados por hongos mitospóricos ligninolíticos

Las muestras de LIREPATO con los HML se centrifugaron a 8000 rpm (Hettich Universal 320R) y 4°C/15 min (Troya *et al.*, 2000; Laura y Castellanos 2009); el sobrenadante obtenido se utilizó para medir la actividad Lacasa, LiP y MnP:

Actividad lacasa: para cada muestra se mezcló 300 μ L del sobrenadante, 2.4 mL del buffer acetato de sodio (Sigma) 25 mM pH 3, 300 μ L CuSO₄ (5ppm), 300 μ L 2,2'-acino-bis-(3 etilbenzotiazolin-6-sulfónico) o ABTS (Sigma) 10 Mm y para el blanco 300 μ L agua destilada; 2.4 mL del buffer acetato de sodio; 300 μ L CuSO₄ y 300 μ L del ABTS. La actividad lacasa se cuantificó en espectrofotómetro (UV-Vis Thermo Scientific Evolution 60S) mediante la oxidación de ABTS a 25°C/ 420 nm/3min, con un coeficiente de extinción molar de $\epsilon_{420} = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Mun-Jung *et al.*, 2004).

LiP: para cada muestra se mezcló 400 μ L del sobrenadante; 2.5 mL del buffer sodio (Sigma) 100 mM pH 3.0; 1.0 mL del alcohol veratrílico (Sigma) 10 mM, 100 μ L de H₂O₂ (AlyM®) 10 mM. El blanco se preparó con 400 μ L del agua destilada; 2.5 mL del buffer tartrato de

sodio; 1.0 mL del alcohol veratrílico y 100 μL del H_2O_2 ; la adición de 100 μL del H_2O_2 inicia la oxidación del alcohol veratrílico. La actividad LiP se cuantificó en espectrofotometro (UV-Vis Thermo Scientific Evolution 60S) mediante la oxidación de alcohol veratrílico a 25°C/ 310 nm /3min, con un coeficiente de extinción molar de $\epsilon_{310}=9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Moldes *et al.*, 2003 en Gao *et al.*, 2011; Bonilla *et al.*, 2013).

MnP: se mezcló para cada muestra 400 μL del sobrenadante; 3.4 mL de buffer malonato de sodio (Sigma) 50 mM pH 4.5; 0.1 mL de MnSO_4 (Baker) 15 mM, la reacción inicia con la adición de 100 μL de H_2O_2 (AlyMR) 10 mM. El blanco se preparó con 400 μL agua destilada; 3.4 mL de buffer malonato de sodio; 0.1 mL de MnSO_4 ; 100 μL de H_2O_2 . La actividad MnP se cuantificó en espectrofotómetro (UV-Vis Thermo Scientific Evolution 60S) por oxidación de MnSO_4 a tartrato Mn^{+3} , se consideró 25°C/ 240 nm /3min, con un coeficiente de extinción molar de $\epsilon_{240}=6500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Moldes *et al.*, 2003 en Gao *et al.*, 2011). La actividad lacasa, LiP y MnP se convirtió a unidades enzimáticas internacionales (IU) con la siguiente fórmula:

$$\text{IU (l}^{-1}\text{)} = \frac{(\Delta A)(V_t)(10^6)}{(t)(\epsilon)(b)(V_m)}$$

Donde:

- IU = actividad enzimática ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{ l}^{-1}$)
- ΔA = Absorbancia final – absorbancia inicial
- V_t = Volumen total de la reacción (mL)
- 10^6 = conversión de mol a μmol
- t = Tiempo de la reacción (min)
- ϵ = Coeficiente de extinción molar ($\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ($\text{mol l}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
- b = Trayectoria óptica (1.0 cm)

5.3. Análisis físico-químico del suelo:

Se utilizó un suelo laterítico sódico en un terreno agrícola denominado “La cajita” de la Tenencia Zapata del municipio de Morelia, Mich., sobre el km 5 de la carretera Morelia-Pátzcuaro, México. Un suelo degradado y con un historial agrícola de 20 años de un sistema de cultivo intensivo cereal-cereal: maíz-trigo y maíz-cebada, ubicado a los 19° 39’ 27’’ de latitud norte 100° 19’ 59’’ de longitud oeste, con una altitud de 1820 msnm con clima templado, temperatura media anual de 17.3 °C, precipitación anual de 796 mm, granizadas promedio 3-4/año, heladas 4-8/año e insolación 227:63 h: min.

Se dispuso de 1.0 kg de suelo sin contaminar con ARA y se tamizó con malla no. 40 (0.1682 mm) para analizar sus propiedades físico-químicas en el laboratorio de Edafología “Martha Bustos Zagal” de la facultad de Biología de la UMSNH. Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 2: textura arenoso-franco con pH moderadamente ácido, alta concentración de materia orgánica y baja capacidad de intercambio catiónico. Este suelo tiene propiedades de un suelo volcánico de porosidad ligeramente alta, porcentaje de saturación alta y capacidad de campo y humedad aprovechable baja según la Norma Oficial mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000.

Cuadro 2. Análisis físico químico de un suelo sin contaminar con aceite residual automotriz

Parámetro	Unidad	Valor	Interpretación*
pH: 1:20	UPH	6,1	Moderadamente ácido
Materia orgánica	%	7,33	Muy alto
Capacidad de intercambio catiónico	Cmol(+)Kg ⁻¹	15	Baja
Textura	%Ac-%L- %Ar	7-12- 81	Arenoso-franco
Densidad real	g/cm ₃	2,03	Sin interpretación en la NOM
Densidad aparente	g/cm ₃	0,96	Común en suelo volcánico
Porosidad	%	53	Ligeramente alta ⁺
Porcentaje de saturación de humedad	%	63	Alta ⁺
Capacidad de campo	%	8,4	Baja ⁺
Humedad aprovechable	%	4,2	Baja ⁺

*NOM-021-SEMARNAT-2000

5.4. Cultivo de *Cicer arietinum* como abono verde para bioestimular el suelo contaminado con aceite residual automotriz

En el suelo contaminado con 34500 ppm de ARA primero bioestimulado con el EFC, se sembró *C. arietinum* y 30 días posteriores a su siembra se barbechó e incorporó como AV para bioestimulación de ese suelo durante 30 días más (Álvarez y Treto, 2002).

5.5. Diseño experimental fase I:

El suelo contaminado con 34500, 65418 y 89830 ppm de ARA se colocó en matraces Bartha, con un diseño experimental de bloques al azar con 8 tratamientos y 5 repeticiones. Se dejó el mismo suelo contaminado con ARA en esas concentraciones como control negativo y solo se conservó la humedad a capacidad de campo para medir el efecto de la atenuación natural;

y se comparó con el suelo contaminado con AR bioestimulado con EFC y/o *C. arietinum* como abono verde (Cuadro 3):

Cuadro 3. Bioestimulación de un suelo contaminado con aceite residual automotriz con un extracto fúngico y/o *Cicer arietinum* como abono verde

Bioestimulación de suelo	Aceite residual automotriz (ppm)	Bioestimulación con extracto fúngico crudo y abono verde
Control negativo A	89830	-
Tratamiento A	89830	+
Control negativo B	65418	-
Tratamiento B	65418	+
Control negativo C	34500	-
Tratamiento C	34500	+

Simbología: (+) Bioestimulación; (-) Atenuación natural

5.5.1. Cuantificación inicial y final de aceite residual automotriz del suelo bioestimulado con extracto fúngico crudo y *C. arietinum* como abono verde

Cada 30 días se colectaron muestras de 10.0 g de suelo que se conservaron a 4°C hasta el análisis de ARA, por el método de Soxhlet (Smith *et al.*, 2011).

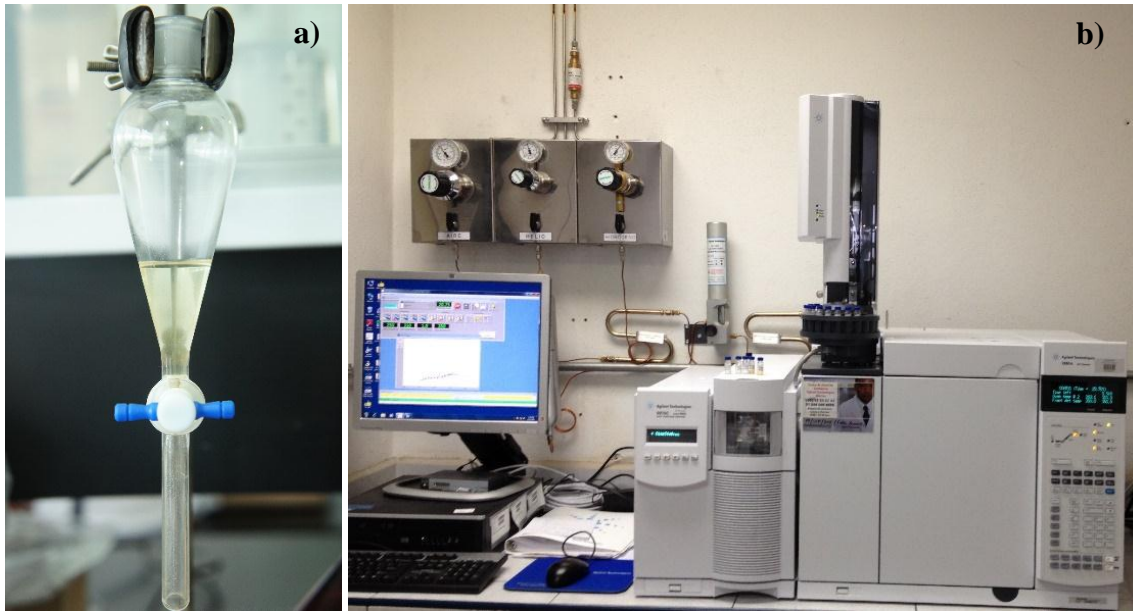
5.6. Identificación de hidrocarburos aromáticos remanentes del aceite residual automotriz en un suelo biorremediado

5.6.1. Extracción de aceite residual automotriz:

Las muestras de suelo contaminadas con ARA conservadas a 4°C se secaron a temperatura ambiente por 48 h, se homogenizaron y de cada una se tomaron tres alícuotas de 3.0 g para un total de 3 repeticiones. Se colocaron en tubos hasch de 10.0 mL y se adicionó 3.0 mL de hexano (pureza 98.5% ACS-Sigma Aldrich grado HPLC); se agitó por 60 s en bortex y posteriormente se filtraron en embudo de separación tres veces; se eliminó residuos de agua en embudo con filtro de algodón y MgSO₄, finalmente se dejó evaporar el solvente por 24 h a temperatura ambiente y se aforó cada muestra a un volumen total de 1.0 mL para su posterior análisis.

5.6.2. Identificación de hidrocarburos por cromatografía de gases acoplada a masas:

Las muestras de suelo con el ARA se analizaron en cromatógrafo de gases Agilent Technologies serie 7890A acoplado a masas serie 5975C, se inyectó 1.0 µL de muestra modo Splitless, se usó helio (99.995% pureza) como gas de acarreo en una columna capilar Zebron-5MS de 30.0 m de longitud, con un diámetro interno de 0.25 mm y un espesor de película de 0.25 mm. La temperatura de inyector fue de 250°C y la temperatura inicial del horno fue de 50 °C con rampa 30-150°C rampa 2 de 10°C c/min hasta 310°C/2min. El detector de temperatura fue de 280°C con un tiempo de equilibrio de 3 min y una temperatura máxima de 320°C (método modificado de Peng *et al.*, 2009).



**Figuras 3. Identificación de hidrocarburos del aceite residual automotriz:
a) extracción con hexano; b) cromatografo Agilent Technologies serie 7890^a**

5.7. Análisis de resultados

Los datos experimentales fueron sujetos a un análisis combinado de varianza (ANOVA) y Tukey para comparar diferencia estadística significativa con $p < 0.05$ (programa JMP versión 6.0).

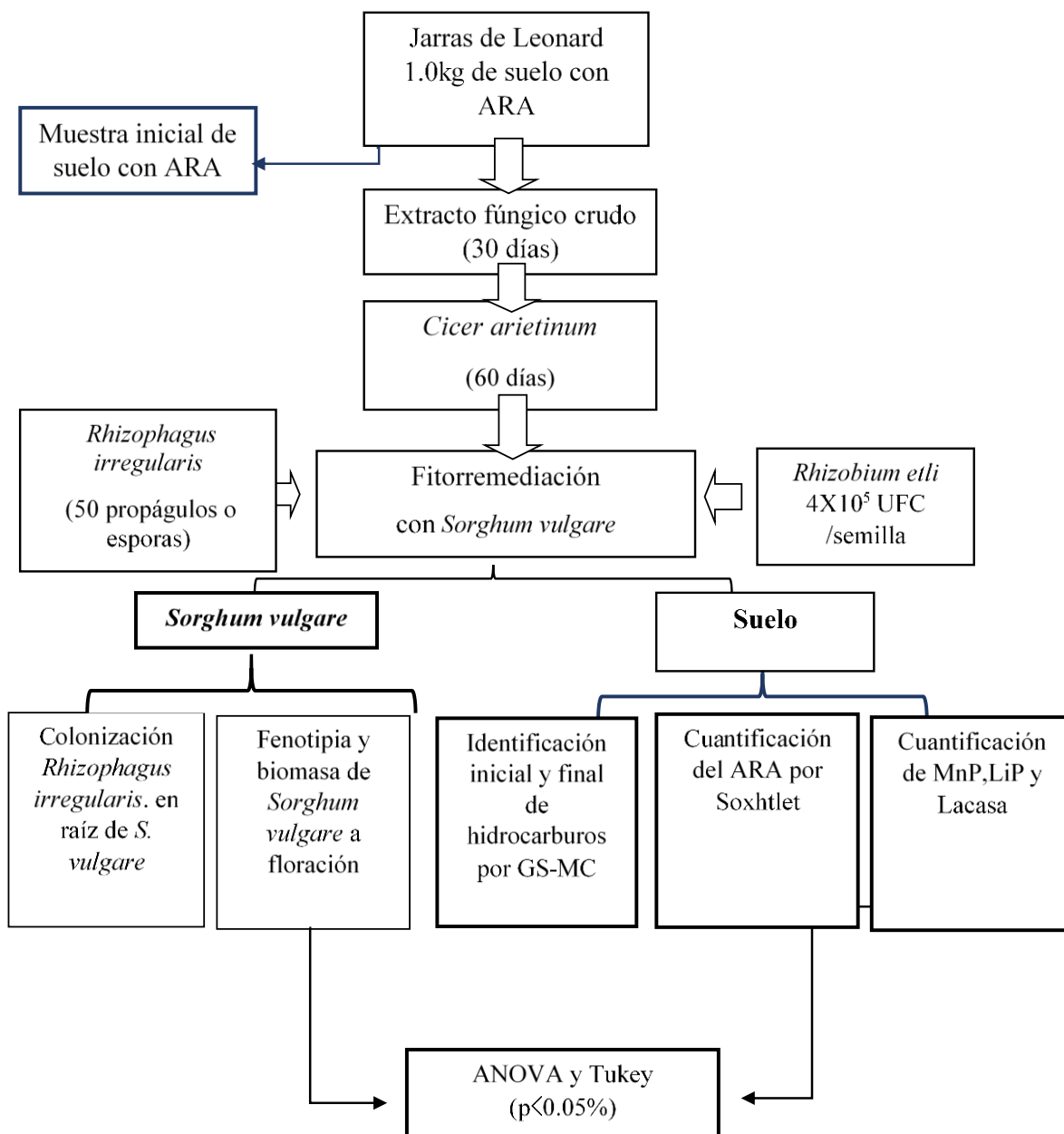
FASE II:

La segunda parte experimental se realizó en invernadero, bajo un diseño de bloques al azar con cinco repeticiones, para ello suelo contaminado con 34500 ppm de ARA/kg de suelo se biorremedió en jarras de Leonard como se muestra en la figura 5, primero con un EFC por 30 días y después con *C. arietinum* como abono verde, barbechado e incorporado al suelo a nivel de plántula por 60 días. Después de esta doble bioestimulación se inició etapa de fitorremediación del ARA remanente con *S. vulgare* inoculado con *R. irregularis* y/o *R. etli*; con las variables respuesta: fenotipia y biomasa a nivel fisiológico de floración; también se midió en su raíz el porcentaje de colonización de *R. irregularis*. Finalmente en el suelo biorremediado se cuantificó la concentración de lacasa, MnP y LiP inicial y final; así como la concentración e identificación inicial y final de del ARA remanente.



Figura 4. Jarra de Leonard para biorremediar suelo contaminado con aceite residual automotriz

5.8. Diagrama de bloques fase II: Bioestimulación de suelo contaminado con 34500 ppm de aceite residual automotriz con un extracto fúngico y/o *C. arietinum* y fitorremediación con *S. vulgare* inoculado con *R. irregularis* y *Rhizobium etli*.



Simbología: ARA= aceite residual automotriz; GS-MC=cromatografía de gases acoplada a masas; LiP=lignino peroxidasa; MnP=manganeso peroxidasa, UFC=unidades formadoras de colonias.

5.9. Diseño experimental fase II: Biorremediación de suelo contaminado con 34500 ppm de aceite residual automotriz con extracto fúngico crudo en jarras de Leonard

Suelo arenoso-franco fue solarizado durante 7 días y tamizado con malla no. 40 (0.1682 mm), ese suelo se colocó en jarras de Leonard de acuerdo al diseño experimental del cuadro 5 y posteriormente el suelo correspondiente a los tratamientos: control relativo, *Ri-Rh*, *Rh* y *Ri* se contaminó con 34500 ppm de ARA (p/v) y se adicionó por cada kg de suelo: H₂O₂ a 5.0 ppm/50.0 mL, MnSO₄ al 0.9%/10.0 mL y CuSO₄ al 0.5%/ 10.0 mL (Jiménez *et al.*, 1999 y García *et al.*, 2007).

5.9.1. Bioestimulación de suelo contaminado con aceite residual automotriz con *Cicer arietinum* en jarras de Leonard

La semilla de *C. arietinum* se germinó en una cama de algodón húmeda y estéril en oscuridad, luego de su emergencia se trasplantó en las jarras de Leonard con el suelo previamente bioestimulado con el EFC; después de 30 días de la siembra de *C. arietinum*, este se cortó en trozos de 0.5 cm aproximadamente y se incorporó al suelo. Se humedeció hasta capacidad de campo y se bioestimuló con el abono verde por 30 días (Álvarez y Treto, 1995). Del suelo bioestimulado con el EFC y *C. arietinum*, se colectó 30 g de ese suelo y se conservaron hasta su análisis a 4°C para medir la actividad lacasa, LiP y MnP y en congelación para ARA remanente e identificar los HC presentes.

5.9.2. Actividad lacasa, manganeso y lignino peroxidasa en suelo contaminado con aceite residual automotriz

Para medir la actividad de estas enzimas del suelo contaminado con ARA y doblemente bioestimulado con EFC y *C. arietinum* se diluyó 1.0 g en 9.0 mL de NaCl al 0.85%-tween

80 al 5% (100:1). La mezcla se mantuvo en agitación 10 min/150rpm y centrifugaron a 8000 rpm/4°C/ 15min; del sobrenadante se tomó una alícuota para medir la actividad lacasa, LiP y MnP de acuerdo al apartado 5.2.1.

5.10. Fitorremediación de suelo para eliminar el aceite residual automotriz remanente con *Sorghum vulgare* coinoculado con *Rhizophagus irregularis* y/o *Rhizobium etli*

5.10.1. Desinfección y siembra de la semilla de *Sorghum vulgare* usado para fitorremediación del suelo contaminado con el aceite residual automotriz remanente

La semilla de *S. vulgare* se desinfectó con cloralex ®/5min y etanol 70°/7 min, entre cada reactivo se realizaron 5 lavados con agua potable estéril. Se sembraron 5 semillas de *S. vulgare* inoculadas con 50 propágulos de *R. irregularis* y/o 4×10^5 UFC de *Rhizobium etli* por cada semilla en el suelo con o sin ARA previamente bioestimulado con EFC y *C. arietinum* (Larenas y L de Viana 2005).

5.10.2. Inóculo de *Rhizophagus irregularis* para *Sorghum vulgare* usado en fitorremediación de suelo con aceite residual automotriz:

Se inocularon 50 propágulos de *R. irregularis* (Ferbiliq ®) por cada semilla de *S. vulgare*, para ello, 2500 esporas de este hongo micorrícico arbuscular (HMA) con agua destilada estéril como vehículo y se aplicó 1.0 mL de este inóculo por cada semilla de *S. vulgare* o 0.5 mL en la semilla coinoculada con *R. etli*.



Figura 5. Tinción de raíces de *Sorghum vulgare* con tinta china-vinagre para cuantificar el porcentaje de colonización de *Rhizóphagus irregularis*.

5.10.3. Colonización de *Rhizopagus irregularis* en *Sorghum vulgare* usado para fitorremediación de suelo contaminado con aceite residual automotriz remanente

Para determinar el porcentaje de colonización de *R. irregularis* en *S. vulgare*, sus raíces de esta gramínea se tiñeron, para ello, el sistema radicular completo de cada planta se lavó con agua potable corriente para eliminar residuos de suelo y se cortaron en segmentos de 1.0 cm aproximadamente y se dispusieron en cassettes de plástico para citología. Se realizó el aclareamiento de las raíces con KOH al 10% (p/v) en ebullición por 10 min. Posteriormente se eliminó los residuos de KOH con agua potable y se mantuvieron en ebullición con tinta china-vinagre 5% (v/v) y se lavaron con agua (figura 6). Se retiró el excedente y se conservaron por 24 h a 4°C en una solución vinagre al 5%. Se eliminó el excedente y se colocaron las raíces teñidas en glicerol 70% (v/v) hasta su observación en microscopio a 40X

para cuantificar el porcentaje de colonización de *R. irregularis* en la raíz de *S. vulgare* (Vierheilig *et al.*, 1998 y Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2007).

5.11. Inóculo de *Rhizobium etli* durante la fitorremediación de suelo con aceite residual automotriz

R. etli pertenece a la colección microbiana del Laboratorio de Microbiología Ambiental del IIQB de la UMSNH. Esta bacteria se activó en caldo extracto de levadura manitol y rojo

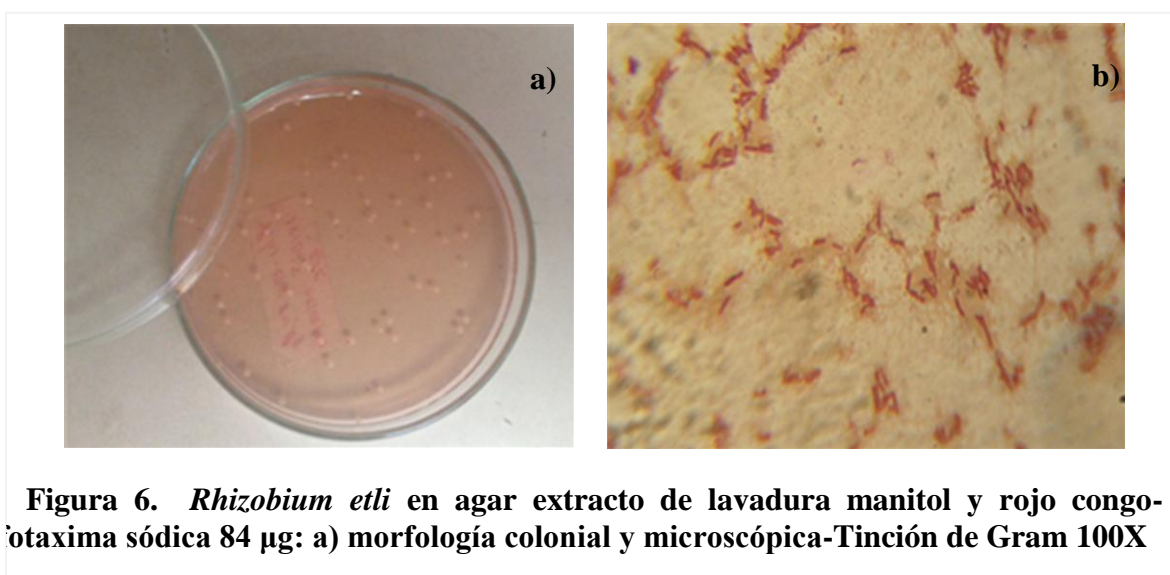


Figura 6. *Rhizobium etli* en agar extracto de levadura manitol y rojo congo-totaxima sódica 84 µg: a) morfología colonial y microscópica-Tinción de Gram 100X

congo con la siguiente composición química (g/l): manitol, 10.0; KH_2PO_4 , 1.0; K_2HPO_4 , 1.0; MgSO_4 , 1.0; NaCl , 1.0; extracto de levadura, 5.0 y rojo congo 10mL/l a pH 6.7 ± 0.2 y se incubó a $28^\circ\text{C}/24\text{h}/150\text{rpm}$. Después se sembró en el mismo medio sólido para observar morfología colonial, microscópica y verificar pureza; se observó su morfología microscópica por tinción de Gram a 100X. Posteriormente se determinó el perfil de sensibilidad de *R. etli* con sensidiscos de antibióticos para géneros bacterianos Gram negativo- positivo y se incubó 48h / 28°C . Luego *R. etli* se inoculó en la semilla de *S. vulgare* con 4×10^5 UFC /semilla (García-González *et al.*, 2005; Hudzicki, 2009).

5.12. Fitorremediación del suelo para eliminar el aceite residual automotriz remanente con *Sorghum vulgare* coinoculado con *Rhizophagus irregularis* y/o *Rhizobium etli*

El suelo contaminado con ARA primero bioestimulado con el EFC y luego con *C. arietinum*, después se fitorremedió con *S. vulgare* inoculado con *R. irregularis* y/o *R. etli*; para ello se sembraron 5 de sus semillas en cada jarra de Leonard y se mantuvieron en *solarium* hasta su emergencia, posteriormente se trasladaron al invernadero (Taiz y Zeiger, 2006). Las variables repuesta evaluadas en *S. vulgare* a nivel de floración fueron la fenotipia: su altura y longitud radical; la biomasa: peso fresco y seco de la parte aérea y radical (Juárez-Cisneros y Sánchez-Yáñez 2014).

5.13. Solución mineral completa para alimentar a *Sorghum vulgare* usado en la fitorremediación de suelo contaminado con aceite residual automotriz

Se empleó una solución mineral de ultrasol multipropósito ® MKP (1:1:1) para alimentar el *S. vulgare* con la siguiente composición química: NO₃, 18 %; P₂O₅, 18 %; K₂O, 18 %; MgO, 1 %; Fe, 400 ppm; Cu, 100 ppm; Mo, 100 ppm, pH (1g/L 20° C) 5-6. Para la fitorremediación del suelo para eliminar el ARA remanente esta gramínea inoculada con *R. irregularis* y/o *R. etli*, se alimentó con una concentración reducida de la solución mineral en un 50% de la fórmula anterior (Juárez-Cisneros y Sánchez-Yáñez 2014).

5.14. Cuantificación e identificación de los hidrocarburos del aceite residual automotriz en el suelo biorremediado

Se colectaron muestras de suelo contaminado con 34500 ppm de ARA cada 30 días al final de cada una de las fases de su biorremediación y se determinó la concentración del ARA por extracción con Soxhlet (Vásquez, 2010; Smith *et al.*, 2011), mientras que la identificación de los HC se realizó de acuerdo al apartado 5.5 y 5.6.

5.15. Diseño experimental fase II:

En la segunda fase se colocó 1.0 kg de suelo solarizado en Jarras de Leonard, se empleó un diseño experimental de bloques al azar con 6 tratamientos y 5 repeticiones.

Cuadro 4. Biorremediación de un suelo contaminado con 34500 ppm de aceite residual automotriz por bioestimulación con un extracto fúngico, abono verde y fitorremediación con *Sorghum vulgare* inoculado con *R. irregularis* y *Rhizobium etli*.

Tratamiento	Contenido
Control absoluto	Suelo + <i>S. vulgare</i> + agua
Control relativo	Suelo + <i>S. vulgare</i> + *SM100%
Control negativo	Suelo + ARA
<i>Ri-Re</i>	Suelo + ARA+ <i>S. vulgare</i> + <i>R. etli</i> + <i>R. irregularis</i> + **SM50%
<i>Ri</i>	Suelo + ARA+ <i>S. vulgare</i> + <i>R. etli</i> + SM50%
<i>Re</i>	Suelo + ARA+ <i>S. vulgare</i> + <i>R. irregularis</i> + SM50%

Simbología: ARA=aceite residual automotriz; EFC=Extracto fúngico crudo; *SM100N/P=Solución mineral completa al 100% del N/P recomendado; **SM50N/P=Solución mineral reducida en 50% del N/P recomendado.

6. Resultados y discusión fase I:

6.1. Actividad lacasa, manganeso y lignino peroxidasa generada en un extracto fúngico crudo por hongos mitospóricos ligninolíticos en medio de cultivo con lignina residual de paja de trigo

En la figura 9 se muestra la actividad enzimática individual de los HML que después fueron mezclados entre sí en relación 1:1 y aplicados como EFC para bioestimular el suelo contaminado con ARA. Estos HML sintetizaron MnP, LiP y lacasa, ahí la mayor actividad alcanzada fue de MnP donde *P. chrysogenum* generó una actividad de 17.7 UI⁻¹ de MnP y *A. fumigatus* 15.39, mientras que la menor actividad MnP fue por *A. tubingensis* con 8.37 y *F. thapsinum* con 6.92 UI⁻¹. En contraste, se obtuvo una menor actividad lacasa y LiP con valores inferiores a 1.6 UI⁻¹.

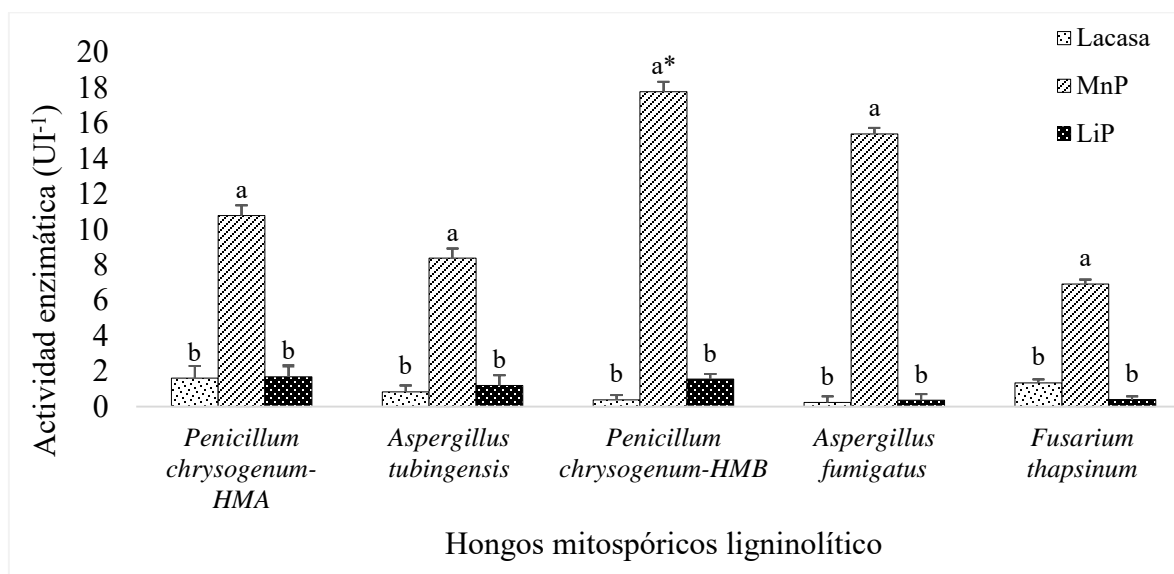


Figura 7. Actividad enzimática de hongos mitospóricos ligninolíticos en medio de cultivo con lignina residual de paja de trigo

Simbología: MnP=Manganeso peroxidasa; LiP= Lignino peroxidasa. *Letras diferentes indican diferencia estadística significativa, ANOVA-Tukey ($p < 0.05$). $n=3$

6.2. Bioestimulación de suelo contaminado con aceite residual automotriz con un extracto fúngico crudo y/o *Cicer arietinum*

6.2.1. Cuantificación de aceite residual automotriz remanente:

En la figura 9 se evidenció el efecto positivo de la bioestimulación de suelo con un EFC y *C. arietinum* aplicado como AV simultáneamente para reducir la concentración de ARA en un suelo contaminado con 34500 ppm en 60 días. En consecuencia se registró una disminución del ARA donde el remanente fue de solo 7776.6 ppm, valor con diferencia estadística significativa comparado con el suelo bioestimulado solo con el EFC donde el ARA remanente fue de 10645 y en el bioestimulado solo con *C. arietinum* de 11690 ppm respectivamente. En contraste, en el suelo sin biorremediar por la atenuación natural se redujo un mínimo del ARA, con un remanente de 31531 ppm. Lo anterior hizo evidente que la doble bioestimulación con el EFC y *C. arietinum* como abono verde facilitó la disminución del ARA, lo que apoya que el EFC hidrolizó parcialmente los HC aromáticos parcialmente recalcitrantes del ARA y los transformó en otros susceptibles a la mineralización por la microbiota heterotrófica aerobia y con la incorporación de *C. arietinum* al suelo se reestableció el equilibrio mineral, en especial la relación C:N, esencial para la oxidación del ARA (García *et al.*, 2002; Vallejo y Roldán, 2005; Balderas, 2013).

En la figura 9 también se muestra que en el suelo contaminado con 65418 ppm de ARA la doble bioestimulación con *C. arietinum* aplicado como AV y el EFC tuvo un efecto positivo, donde el ARA remanente fue de solo 22540 ppm; en contraste se registró una mínima disminución del ARA en el suelo que no se biorremedió considerado control negativo A, donde la concentración de ARA persistente fue de 64500 ppm de este contaminante. En esta

figura también se observó que en el suelo A con 89830 ppm de ARA bioestimulado simultáneamente con el EFC y *C. arietinum* se redujo su concentración hasta 37366 ppm, contrario a lo observado en el suelo sin biorremediar denominado control negativo B, ahí el ARA remanente fue de 85533 ppm. El análisis estadístico mostró que el ARA remanente tanto en el suelo contaminado con 65418 ppm de ARA y el del suelo con 89830 ppm no mostraron diferencia estadística significativa, por lo que se demostró que en ese suelo la doble bioestimulación con el EFC y *C. arietinum* puede ser eficaz en suelo con un nivel de hasta 89830 ppm de ARA. Sin embargo, a pesar de que la eliminación del ARA fue evidente en solo 8 semanas con la doble bioestimulación, no se redujo la concentración hasta los niveles permisibles de contaminación de suelo de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SS-2003, pero es importante señalar que con niveles altos de contaminación no es recomendable la biorremediación, sino agentes químicos que tienen un impacto negativo colateral, sin embargo, fue evidente que la doble bioestimulación con un EFC y *C. arietinum* redujo la cantidad de ARA y entonces sí sería factible concluir con fitorremediación y microorganismos promotores de crecimiento vegetal para la depuración final de ese suelo.

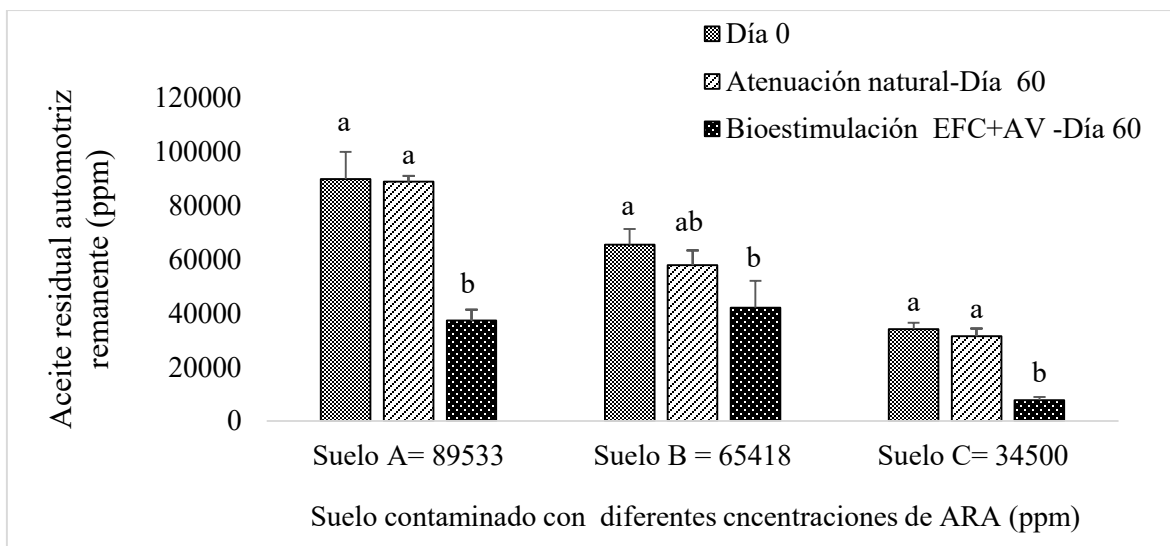


Figura 8. Concentración de aceite residual automotriz remanente en un suelo bioestimulado con *Cicer arietinum* y/o extracto fúngico crudo.

Simbología: AV= abono verde; EFC= extracto fúngico crudo. *Letras diferentes indica diferencia estadística significativa ANOVA-Tukey ($p < 0.05$) $n=5$.

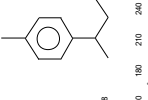
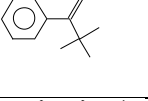
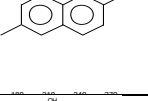
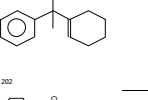
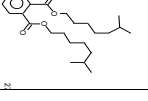
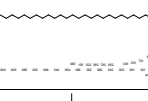
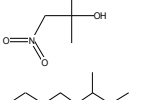
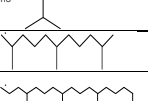
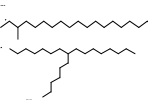
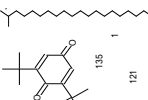
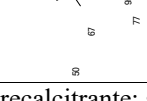
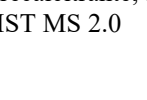

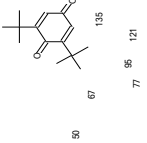
6.2.2. Identificación de hidrocarburos aromáticos del aceite residual automotriz remanente:

El ARA es una mezcla de HC aromáticos y alifáticos dependiendo del uso que haya tenido antes de su disposición final, sin embargo de acuerdo a la literatura hasta la fecha no se ha reportado un perfil general de los principales HC que lo constituyen, ni se ha reportado el efecto de las diferentes estrategias de biorremediación sobre cada uno de estos HC, por lo que en esta fase de la investigación se reportan los HC encontrados en un suelo contaminado con ARA antes y después de su biorremediación con un EFC y *C. arietinum* como AV.

En el cuadro 5 se muestra que en el suelo contaminado con 34500 ppm ARA los HC presentes al inicio del experimento fueron una mezcla heterogénea de HC alifáticos lineales y

ramificados de 12 hasta 27 carbonos; también se detectaron aromáticos como el benceno, fenoles y naftaleno. Asimismo se observa que en el suelo con ARA sin bioestimular usado como control negativo a los 60 días la atenuación natural eliminó el benceno y los HC alifáticos lineales sencillos $C < 15$. Mientras que se evidenció que en el suelo con ARA bioestimulado con un EFC y *C. arietinum* combinados se eliminaron moléculas más complejas, como el benceno, 2,2-dimetil-1-metilenpropil, el naftaleno e HC alifáticos lineales o ramificados de 12 hasta 24 carbonos; sin embargo también se observó que los HC alifáticos con $C > 24$ fueron recalcitrantes. Lo anterior sugiere que el EFC degradó parcialmente los HC aromáticos del ARA y los hizo susceptibles a una posterior mineralización por las poblaciones microbianas heterótrofas autóctonas, que al mismo tiempo fueron favorecidas por la bioestimulación conjunta con *C. arietinum* como AV, que les aportó macro y micro nutrientes, especialmente N, para contrarrestar el desequilibrio mineral generado por el exceso de C del ARA y usarlos como fuente de C y energía (Gómez *et al.*, 2009; Naiying *et al.*, 2009; Juckpech *et al.*, 2012).

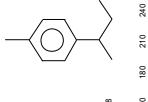
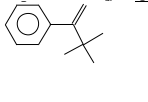
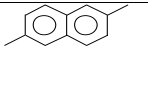
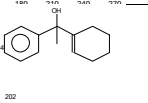
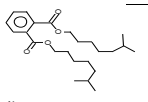
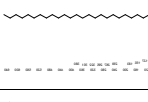
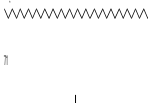
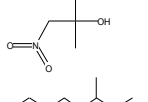
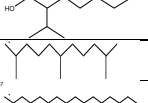
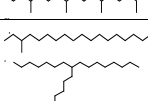
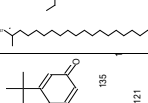
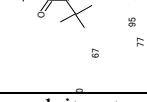
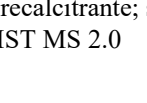

Cuadro 5. Hidrocarburos remanentes en un suelo contaminado con 34500 ppm de aceite residual automotriz bioestimulado con un extracto fúngico crudo y/o *Cicer arietinum* como abono verde

Hidrocarburos identificados	Fórmula química	Estructura	Suelo con ARA Día 0	Atenuación Natural Día 60	Bioestimulación Día 60
			Muestra inicial	Control negativo	Abono verde- Extracto fúngico crudo
Aromáticos	C ₁₁ H ₁₆		+	-	-
	C ₁₂ H ₁₆		+	+	-
	C ₁₂ H ₁₂		+	+	-
	C ₁₄ H ₁₈ O		+	+	+
	C ₂₄ H ₃₈ O ₄		+	+	+
Alifáticos lineales	C ₁₇ H ₃₆ - C ₂₇ H ₅₆		+	+	+
Alifáticos ramificados	C ₄ H ₉ NO ₃		+	-	-
	C ₁₁ H ₂₄ O		+	-	-
	C ₁₅ H ₃₂		+	-	-
	C ₂₁ H ₄₄		+	-	-
	C ₂₁ H ₄₄		+	+	+
	C ₂₃ H ₄₈		+	+	+
	C ₂₄ H ₅₀		+	+	+
Cíclicos	C ₁₄ H ₂₀ O ₂		+	+	+

Simbología: signo (+) = hidrocarburo recalcitrante; signo (-) = hidrocarburo mineralizado. Resultado generado por comparación en BIBLIOTECA NIST MS 2.0

En el cuadro 6 se muestran los HC en un suelo contaminado con 65418 y 89830 ppm de ARA bioestimulado con un EFC y *Cicer arietinum* como AV. Ahí también se encontró una mezcla inicial de HC alifáticos lineales y ramificados de 12 hasta 27 carbonos, benceno, fenoles y naftaleno; y pudo observarse que después de 60 días por atenuación natural se eliminaron solo el benceno (1-metil-4-(1-metilpropil), el 2-nitro-tertari-butanol, el 2-isopropil-5-metil-1-heptanol y el octadecano. Lo que sugiere que la contaminación de suelo con ambas concentraciones de ARA afectó negativamente a las poblaciones microbianas heterotróficas nativas y en consecuencia la oxidación de HC fue mínima por atenuación natural (Leal 2003; Fernández *et al.*, 2008); contrario a lo observado en el suelo contaminado con ambas concentraciones de ARA, donde la bioestimulación con el EFC combinado con la incorporación mineral de nutrimentos de *C. aritinum* en forma de AV favoreció la oxidación de HC alifáticos lineales de C<22 y diaromáticos como el naftaleno y el 2,5-ciclohexadieno-1,4,diona,2,6,bis (1,1,dimetiletil). Este resultado es posible debido a que la bioestimulación con el AV incorporó minerales como el N al suelo e indujo a las poblaciones microbianas heterotróficas a mineralizar los HC alifáticos de cadena corta (Gómez *et al.*, 2009), y colateralmente por cometabolismo pudo inducirse la oxidación de otros HC de mayor número de carbonos (Pardo *et al.*, 2004; Vallejo *et al.*, 2005; Peña-Castro *et al.*, 2006). Además se ha reportado que la acción de las enzimas ligninolíticas como la MnP, lacasa y LiP del EFC hidrolizan los HC aromáticos fenólicos y no fenólicos a metabolitos secundarios susceptibles a la oxidación por las poblaciones microbiana heterotróficas nativas (Jiménez *et al.*, 1999; Gianfreda y Rao 2004; Naiying *et al.*, 2009; Juckpech *et al.*, 2012).

Cuadro 6. Hidrocarburos presentes en un suelo contaminado con 65418 y 89830 ppm de aceite residual automotriz bioestimulado con un extracto fúngico crudo y/o *Cicer arietinum* como abono verde

Hidrocarburos identificados	Fórmula química	Estructura	Suelo con ARA Día 0	Atenuación Natural Día 60	Bioestimulación Día 60
			Muestra inicial	Control negativo	Abono verde- Extracto fúngico crudo
Aromáticos	C ₁₁ H ₁₆		+	-	-
	C ₁₂ H ₁₆		+	+	+
	C ₁₂ H ₁₂		+	+	-
	C ₁₄ H ₁₈ O		+	+	-
	C ₂₄ H ₃₈ O ₄		+	+	+
Alifáticos lineales	C ₁₇ H ₃₆ y C ₁₈ H ₃₈		+	+	-
	C ₁₉ H ₄₀ -C ₂₇ H ₅₆		+	+	+
Alifáticos ramificados	C ₄ H ₉ NO ₃		+	-	-
	C ₁₁ H ₂₄ O		+	-	-
	C ₁₅ H ₃₂		+	-	-
	C ₂₁ H ₄₄		+	+	+
	C ₂₁ H ₄₄		+	+	+
	C ₂₃ H ₄₈		+	+	+
Cíclicos	C ₁₄ H ₂₀ O ₂		+	+	+

Simbología: signo (+) = hidrocarburo recalcitrante; signo (-) = hidrocarburo mineralizado. Resultado generado por comparación en BIBLIOTECA NIST MS 2.0

7. Resultados y discusión fase II:

7.1. Actividad lacasa, manganeso y lignino peroxidasa en suelo contaminado con aceite residual automotriz bioestimulado con un extracto fúngico crudo y abono verde:

Se ha reportado que algunos HML sintetizan las enzimas extracelulares lacasa, MnP y LiP para hidrolizar la lignina de los residuos vegetales (Gianfreda y Rao, 2004; Riva 2006 y Gao *et al.*, 2011); esto pudo evidenciarse en la figura 11, donde se reportó que en el suelo sin ARA y sin EFC se generó una actividad de la MnP de 5.64 UI⁻¹, 2.44 de lacasa y su menor actividad fue de la LiP con 0.11 UI⁻¹. También se ha reportado que la presencia de HC como el ARA puede impedir el intercambio gaseoso e inhibir parcialmente la actividad enzimática, como se observó en un suelo contaminado con 34500 ppm de ARA usado como control negativo (CN) donde solo se detectó 6.15 UI⁻¹ de la MnP, mientras que la lacasa y la LiP se redujo hasta 0.03 y 0.11 UI⁻¹ respectivamente. Sin embargo, también fue evidente que en ese suelo contaminado con 34500 ppm de ARA cuando se agregó el EFC incrementó significativamente la actividad de estas monooxigenasas por la combinación de las enzimas nativas y las del EFC, ahí la MnP a los 30 días fue de 9.4, la LiP de 7.16 y la lacasa fue de 1.35 UI⁻¹. Esa actividad enzimática se redujo a los 60 días posteriores a la bioestimulación hasta 4.96 de MnP y de la LiP 3.22 UI⁻¹, mientras que la lacasa aumentó como consecuencia de la enmienda con *C. arietinum* como AV, ahí se observó un incremento de su actividad hasta 5.6 UI⁻¹, lo que sugiere que a los 60 días de la bioestimulación la concentración del ARA remanente no afectó significativamente la actividad de esta enzima y permitió su síntesis por los HML nativos que degradan la lignina presente en el AV (Cañas y Camarero, 2010). Además fue evidente la reducción de la actividad de estas enzimas a los 90 días, con

0.6 UI⁻¹ de la MnP, 1.6 de LiP y lacasa de 1.86 UI⁻¹, posiblemente como consecuencia de la mínima disponibilidad de HC aromáticos de la lignina o el ARA que son el sustrato en el que actúan o como consecuencia de los factores físico-químicas ambientales adversos (Nousiainen *et al.*, 2014).

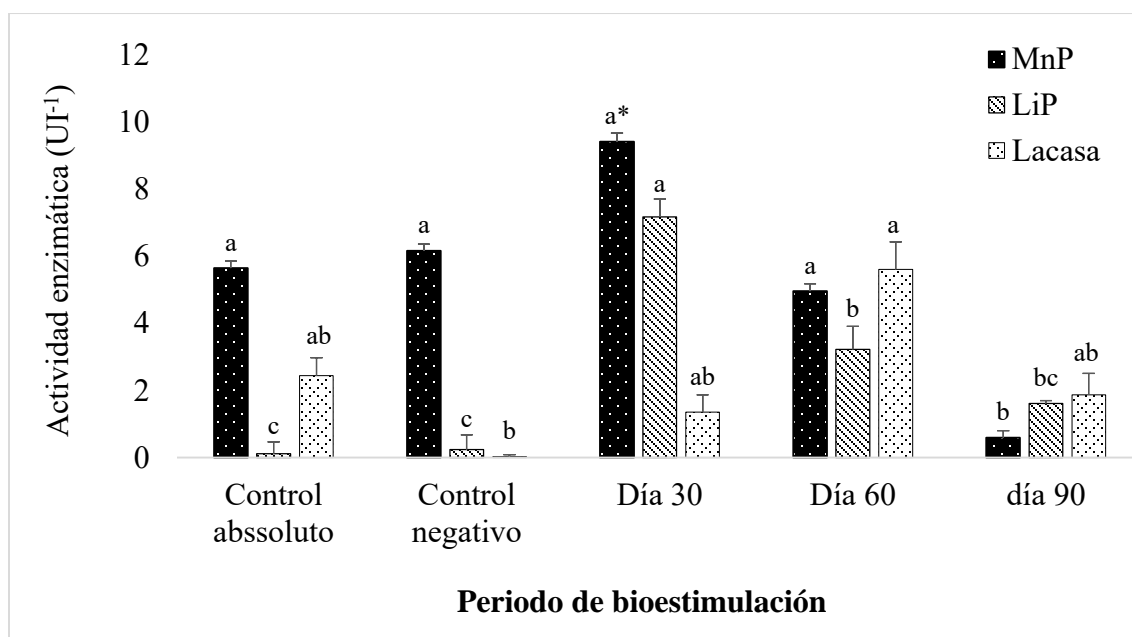


Figura 9. Actividad enzimática en suelo con aceite residual automotriz bioestimulado con un extracto fúngico crudo y *Cicer arietinum*.

Simbología: LiP= Lignino peroxidasa; MnP=Manganeso peroxidasa. *Letras diferentes indica diferencia estadística significativa ANOVA-Tukey (p<0.05) n=3

7.2. Fenotipia de *Sorghum vulgare* inoculado con *Rhizophagus irregularis* y/o *Rhizobium etli* usado en la fitorremediación de suelo con el aceite residual automotriz remanente

En el suelo contaminado la concentración de ARA SE sugiere SE redujo por el efecto de la bioestimulación con el EFC y el AV niveles que permiten su fitorremediación con *S. vulgare*

inoculado con *R. etli* y *R. irregularis* que aumentan su resistencia al estrés causado por HC del ARA para acelerar y favorecer su depuración (Binet *et al.*, 2000).

En la figura 12 se muestra la altura de la planta (AP) y la longitud de la raíz (LR) del *S. vulgare* inoculado con *R. irregularis* y/o *R. etli* usado para fitorremediar el ARA remante en un suelo inicialmente contaminado con 34500 ppm y bioestimulado con un EFC y la posterior incorporación de *C. arietinum* como AV. Ahí se muestra que *S. vulgare* cultivado en suelo sin ARA usado como control absoluto alcanzó AP de 53.6 cm, valor sin diferencia estadística de *S. vulgare* usado como control relativo con una AP de 52.9 cm. En contraste, en el suelo con ARA la altura de *S. vulgare* fue inferior, con 40.1 cm cuando fue inoculado con *R. irregularis* y *R. etli*, mientras que con la inoculación individual de esta gramínea solo con *R. etli* el valor fue de 35.0 cm y 38.4 cm en *S. vulgare* inoculado solo con *R. irregularis*, ambos valores sin diferencia estadística significativa. Estos resultados mostraron el efecto negativo del ARA en el crecimiento vegetal al reducirse la altura del *S. vulgare* comparado con esta gramínea cultivada en suelo sin contaminante. Al respecto se ha reportado que el ARA es fitotóxico en contacto directo con la planta al lisar las membranas plasmáticas de las células corticales de sus raíces, esto induce un mayor gasto energético para mantener y reestablecer su arquitectura radical y en consecuencia se limita su crecimiento aéreo, además la hidrofobicidad del ARA impide el intercambio gaseoso y adecuada capación de agua y/o adquisición de nutrimentos (Udo y Fayemi, 1975; Peña-Castro *et al.*, 2006). En esa figura también se observó que el valor de la LR fue superior en *S. vulgare* en suelo sin ARA, irrigado solo con agua, donde se obtuvo 47.2 cm, lo que sugiere que esta gramínea mostró una mayor elongación radical inducido como mecanismo de resistencia al déficit mineral en este suelo (Lira 2010). En contraste se observó que en *S. vulgare* cultivado en suelo contaminado con

ARA coinoculado con *R. irregularis* y *R. etli* la LR fue de 10.7 cm, asimismo en el inoculado solo con *R. etli* con 10.1 cm y de 13.4 cm en el inoculado con *R. irregularis*. Esta respuesta fenológica sugiere que la inoculación de *S. vulgare* de forma individual o combinada con *R. irregularis* y *R. etli* contrarrestaron el efecto fitotóxico del ARA al no generar diferencia estadística significativa al *S. vulgare* usado como control relativo donde se generó una LR de 14.5 cm. Al respecto se ha reportado que ambos géneros microbianos le confieren resistencia a las plantas expuestas a HC como el ARA; se ha reportado que *R. irregularis* favorece la absorción y/o asimilación de algunos nutrientes y agua, y esto colateralmente reduce el estrés abiótico generado por estos HC (Zhou *et al.*, 2013).

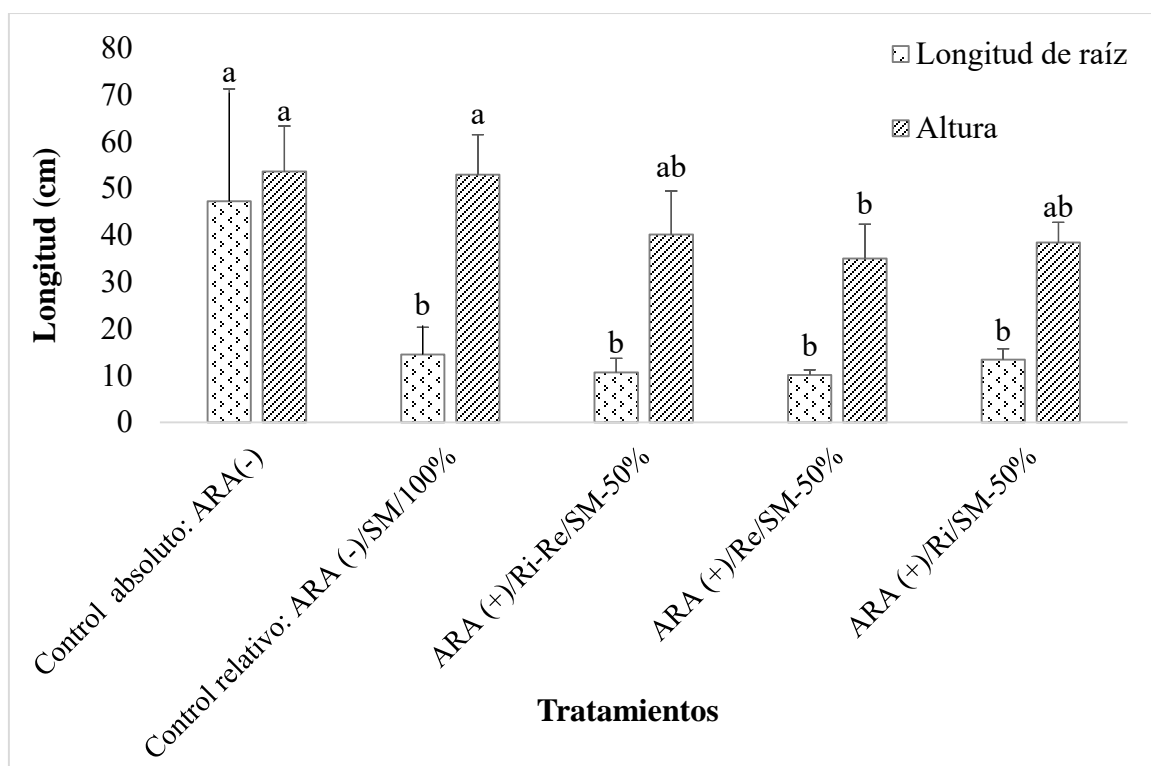


Figura 10. Fenotipia de *Sorghum vulgare* inoculado con *Rhizobium etli* y *Rhizopagus irregularis* usado en la fitorremediación de aceite residual remanente.

Simbología= ARA: aceite residual automotriz; SM/100%: Solución mineral completa; SM/50%: solución mineral reducida un 50% de N-P; Re: *Rhizobium etli*; Ri: *R. irregularis* *Letras diferentes indica diferencia estadística significativa ANOVA-Tukey (p<0.5), n=5

7.3. Biomasa de *Sorghum vulgare* inoculado con *Rhizophagus irregularis* y/o *Rhizobium etli* en suelo con el aceite residual automotriz remanente

La figura 13 muestra los valores del peso fresco aéreo (PFA) de *S. vulgare* usado en la fitorremediación de un suelo para eliminar el ARA remanente previamente bioestimulado con un EFC y *C. arietinum*. Ahí se muestra que el mayor PFA se registró en *S. vulgare* con 5.04 g usado como control relativo, seguido de *S. vulgare* cultivado en el suelo control absoluto, con 4.36 g. En esa misma figura se observó el efecto negativo del ARA en esta gramínea cultivada en suelo con el ARA restante, con un PFA de 2.14 g en *S. vulgare* coinoculado con *R. irregularis* y *R. etli* y de 2.18 g en el inoculado solo con *R. irregularis*, ambos valores sin diferencia estadística significativa. Sin embargo, *S. vulgare* inoculado solo con *R. etli* generó el menor PFA con valor de 1.34 g.

En *S. vulgare* el peso fresco de la raíz (PFR) en el suelo sin ARA, alcanzó un valor de 1.84 g en el suelo control relativo y 0.86 g en el control absoluto, ambos valores sin diferencia estadística significativa. En contraste, en *S. vulgare* coinoculado con *R. etli* y *R. irregularis* el PFR fue de 0.5 g, mientras que al inoculado solo con *R. etli* fue de 0.42 y 0.24 g en el inoculado con *R. irregularis*. Tanto el PFA como el PFR de *S. vulgare* cultivado en suelo sin ARA fue superior que el cultivado en suelo contaminado, debido al estrés ocasionado por los HC del ARA, pues se ha demostrado que lisan las membranas celulares, lo que afecta la fotosíntesis, síntesis de lípidos y proteínas, lo que se refleja en la reducción del tejido vegetal (Debiane *et al.*, 2008; Cheema *et al.*, 2008).

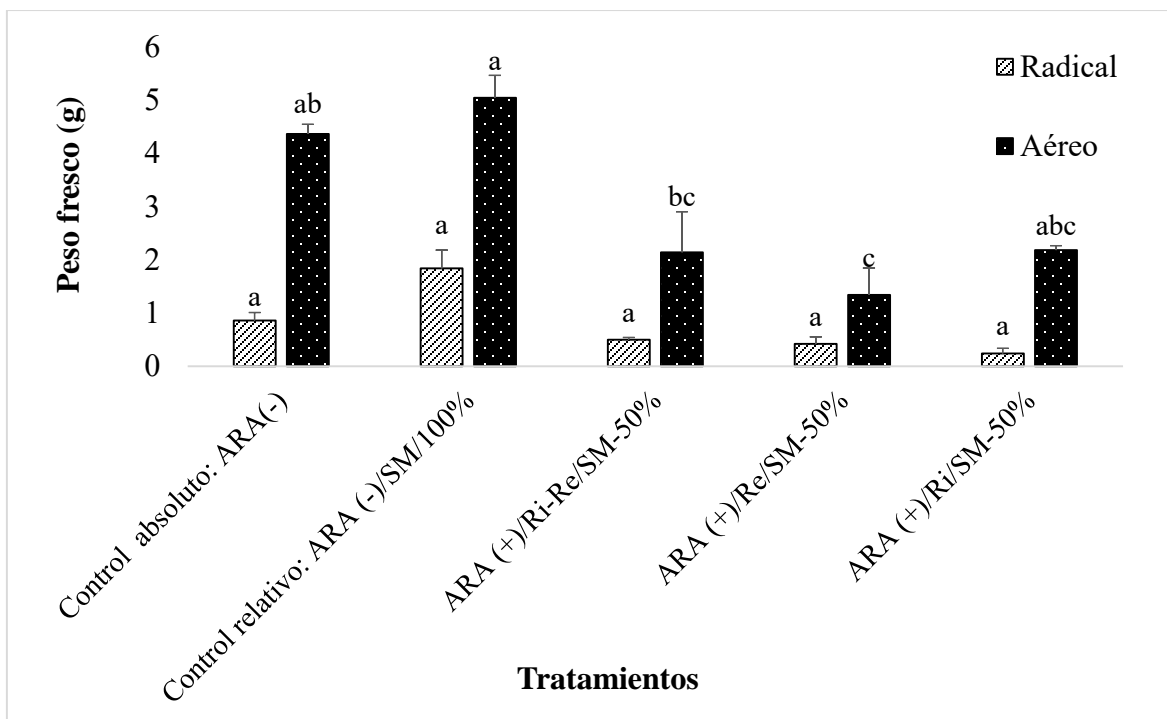


Figura 11. Peso fresco aéreo y de raíz de *Sorghum vulgare* inoculado con *Rhizobium etli* y *Rhizopagus irregularis* usado en la fitorremediación del suelo para eliminar el aceite residual remanente.

Simbología= ARA: aceite residual automotriz; SM/100%: Solución mineral completa; SM/50%: solución mineral reducida un 50% de N-P; Re: *Rhizobium etli*; Ri: *R. irregularis* *Letras diferentes indica diferencia estadística significativa ANOVA-Tukey (p<0.5), n=5

La figura 14 muestra el peso seco aéreo de *S. vulgare* en la fitorremediación de un suelo contaminado con 34500 ppm de ARA remanente posterior a su bioestimulación con un EFC y *C. arietinum*. Se observó que *S. vulgare* cultivado en suelo sin contaminar alimentado con una solución mineral o control relativo generó un PSA de 1.6 g, seguido de 1.08 de *S. vulgare* cultivado en el mismo suelo sin ARA irrigado solo con agua (control absoluto); además fue evidente una reducción del PSA en la gramínea cultivada en suelo con ARA coinoculada con *R. etli* y *R. irregularis* o solo con este HMA; donde *S. vulgare* registró un PSA de 0.69 y 0.416 g respectivamente. Sin embargo el menor PSA se obtuvo en *S. vulgare* del suelo con ARA inoculado solo con *R. etli*. Al respecto se ha reportado que los HC policíclicos

aromáticos como los del ARA causan estrés vegetal al impedir la correcta absorción de agua y nutrimentos, lo que se evidencia por una menor biomasa vegetal, en comparación con *S. vulgare* crecido en suelo sin ARA y alimentado con una solución mineral (Joner y Leyval, 2003; Zhou *et al.*, 2013). En esta figura también se muestra que el valor del peso seco de la raíz (PSR) de *S. vulgare* usado como control absoluto fue estadísticamente superior, con 0.71 g, comparado con *S. vulgare* correspondiente al control relativo que fue de 0.36 g. Sin embargo también se observó un efecto negativo del ARA en la raíz de esta gramínea coinoculada con *R. irregularis* y *R. etli*, con 0.17 g de PSR y sin diferencia estadística a 0.14 del inoculado con *R. etli*. El menor valor de PSR se obtuvo en *S. vulgare* inoculado solo con *R. irregularis*, con 0.09 g. En diversas investigaciones se ha demostrado que la presencia de HC aromáticos como los del ARA afectan negativamente el crecimiento vegetal, como lo reportan Verdin *et al.*, (2006) en *Cichorium intybus* inoculada con *R. irregularis* cultivado en un suelo contaminado con 140 ppm de antraceno, causó una reducción de hasta el 70 % de su biomasa comparada con la cultivada en suelo sin este contaminante. También Cheema *et al.*, (2009) reportaron que en un suelo contaminado con 70 (mg/kg⁻¹suelo) de fenantreno y 72 (mg/kg⁻¹ suelo) de pireno *Festuca arundinacea* fue negativamente afectado al reportarse una biomasa de hasta 53.5% menor que el obtenido en esta planta usada como control absoluto cultivada en suelo sin contaminación. Además Wu *et al.*, (2009) demostraron que en un suelo contaminado con 2.44, 4.05 y 9.46 mg/ kg⁻¹ de fenantreno con *Medicago sativa* L. inoculada con *Glomus etunicatum* (BGC USA01) mostró un PSA y un PSR estadísticamente inferior que el obtenido en esta leguminosa cultivada en suelo sin este

contaminante.

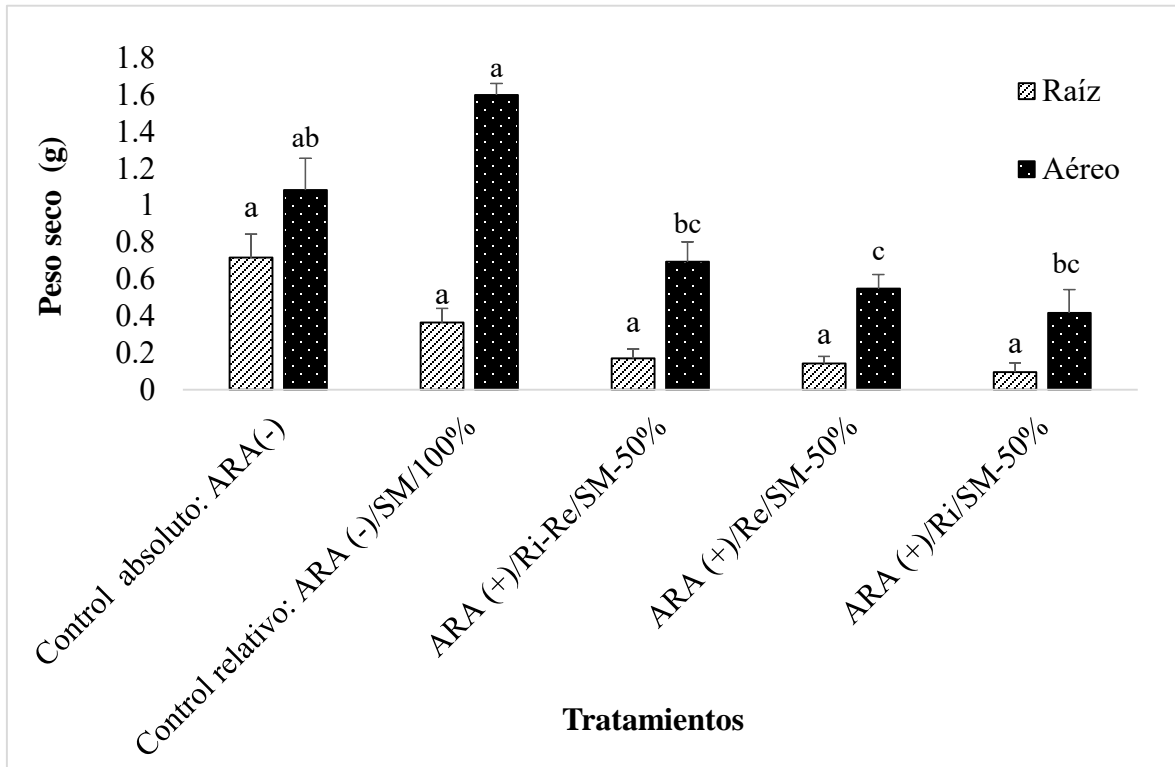


Figura 12. Peso seco aéreo y radical de *Sorghum vulgare* inoculado con *Rhizobium etli* y *Rhizophagus irregularis* usado en la fitorremediación del suelo para eliminar el aceite residual remanente

Simbología= ARA: aceite residual automotriz; SM/100%: Solución mineral completa; SM/50%: solución mineral reducida un 50% de N-P; Re: *Rhizobium etli*; Ri: *R. irregularis* *Letras diferentes indica diferencia estadística significativa ANOVA-Tukey ($p < 0.5$), $n=5$

7.4. Colonización radical de *Sorghum vulgare* por *Rhizophagus irregularis* cultivado en suelo contaminado con aceite residual automotriz

La figura 15 muestra el porcentaje de colonización de *R. irregularis* en la raíz de *S. vulgare* cultivado en la última fase de biorremediación de un suelo contaminado con el ARA remanente después de su bioestimulación con un EFC y *C. arietinum* como AV. Ahí se observó que el mayor porcentaje de colonización se alcanzó en la raíz de *S. vulgare* cultivado en suelo sin ARA irrigado solo con agua usado como control absoluto, con un 79.2 % de

micelio interno y externo, y un 10.1% de arbusculos. Lo anterior sugiere que la colonización de esta gramínea corresponde a HMA nativo de ese suelo, puesto que no se había inoculado previamente, y al compararlo con el porcentaje de colonización en *S. vulgare* alimentado con una solución mineral correspondiente al control relativo, se mostró una reducción en la colonización, ahí se obtuvo un 52% de micelio pero no se encontraron otras estructuras, lo que sugiere que en el control absoluto la escasa disponibilidad de nutrientes como el P, N, K favoreció la colonización y generó las diferentes estructuras de este HMA; al respecto Smith *et al.*, (2004) y Gao *et al* (2010) reportaron que cuando la disponibilidad de nutrientes es baja *R. irregularis* genera abundante micelio y otras estructuras para su absorción, translocación y asimilación hacia la planta hospedera como respuesta a esta condición nutricional. También se ha demostrado que la colonización por HMA como *R. irregularis* en algunas gramíneas puede contrarrestar el efecto negativo de los HC aromáticos como los del ARA sobre su crecimiento y acelerar la depuración de ese suelo (Debiane *et al.*, 2007; Ruiz-Sánchez *et al.*, 2010). En esta figura también se observó que *S. vulgare* inoculado solo con este HMA con un 59 % de colonización generó micelio intra y extraradical, también se observaron arbusculos y vesículas, y además no fue estadísticamente diferente al obtenido en suelo sin el contaminante, es decir, contrarrestó el efecto tóxico del ARA. Al respecto se ha demostrado que este HMA tolera algunos HC como el fenantreno, antraceno, criseno, dibenzo (a,h)antraceno, pireno y benzopireno (Joner *et al.* 2001 en Gao *et al.*, 2010). Sin embargo, también se ha reportado que la presencia de estos HC inhiben parcialmente la colonización de *R. irregularis* y otros HMA en diversas plantas, como se evidenció en *S. vulgare* inoculado con *R. etli* y *R. irregularis* que registró un 31% de colonización por un HMA nativos, valor sin diferencia estadística significativa comparado con el al 24% reportado en esta gramínea inoculada solo con *R. etli*, en ambos casos se encontró un mayor

porcentaje de micelio y menor de arbusculos. Joner y Leyval (2003) reportaron que en un suelo contaminado con 50 (mg kg^{-1} suelo seco) de dibenzo(a, h) antraceno fitorremediado con *Lolium perenne*, cv. Barclay inoculado con un HMA, se alcanzó un 17 % de colonización después de 16 semanas, comparado con un 42 % de colonización en esta leguminosa cultivada en suelo sin contaminar. Lo que se explica porque los HC del ARA impiden el correcto crecimiento de los HMA en las células vegetales, además afectan negativamente la arquitectura de las membranas celulares al inhibir la síntesis de lípidos estructurales y de reserva en los HMA (Debiane *et al.*, 2011 y Calonne *et al.*, 2014).

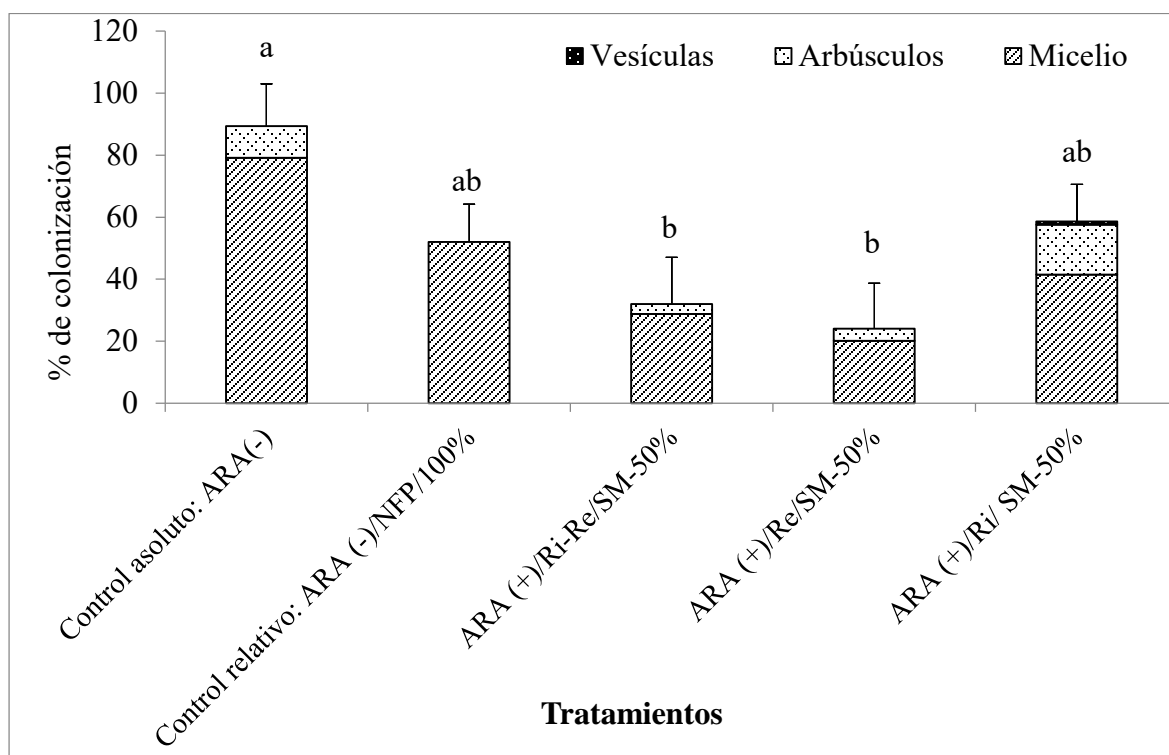


Figura 13. Porcentaje de colonización de *Rhizophagus irregularis* en raíces de *Sorghum vulgare* usado para fitorremediar un suelo con 34500 ppm de aceite residual automotriz.

Simbología= ARA: aceite residual automotriz; SM-100%: Solución mineral completa; SM-50%: solución mineral reducida un 50% de N-P; Re: *Rhizobium etli*; Ri: *R. irregularis* *Letras diferentes indica diferencia estadística significativa ANOVA-Tukey ($p < 0.5$), $n=5$

Las figuras 16 hasta la 20 muestran que durante la fitorremediación de suelo para eliminar el ARA remanente con *S. vulgare* inoculado con *R. irregularis* y/o *R. etli* en sus raíces se detectaron diferentes estructuras morfológicas diversas.

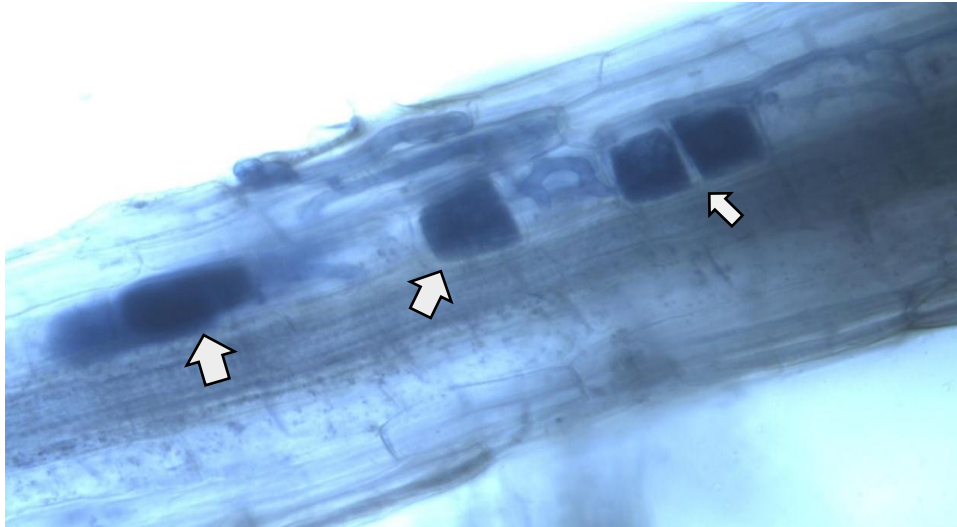


Figura 14. Arbúsculos de hongos micorrícicos nativos en raíz de *Sorghum vulgare* en suelo sin contaminar con aceite residual automotriz. Observación en microscopio óptico 40X.

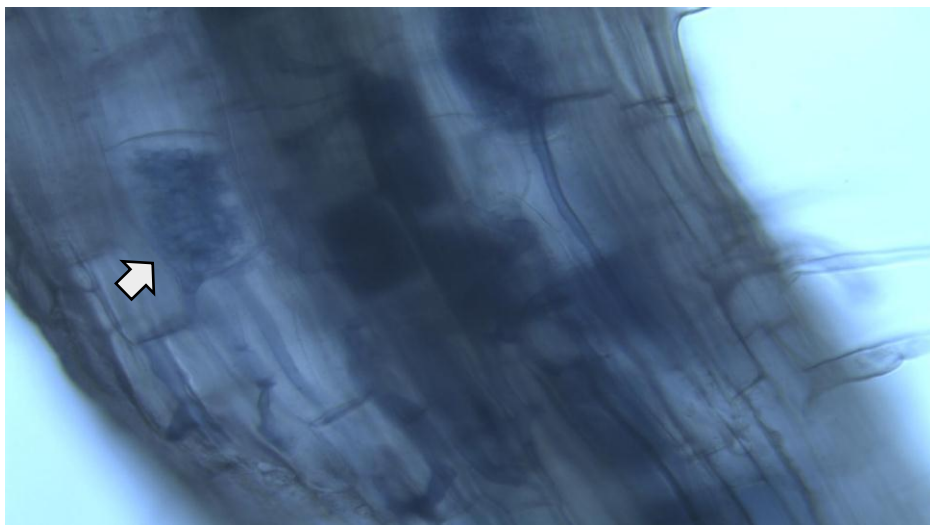


Figura 15. Arbúsculos de hongos micorrícicos nativos en raíz de *Sorghum vulgare* en suelo con aceite residual automotriz. Observación en microscopio óptico 40X.

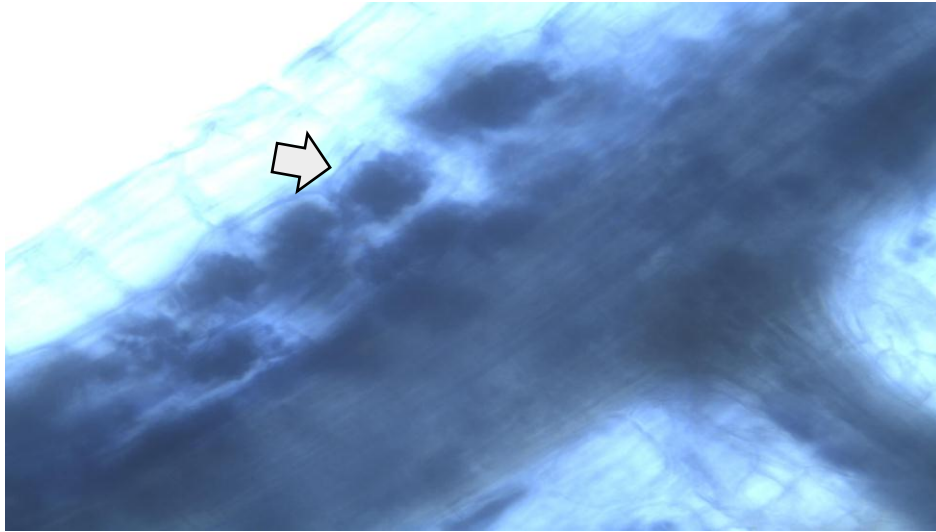


Figura 16. Arbúsculos de *Rhizophagus irregularis* y hongos micorrícicos nativos en raíz de *Sorghum vulgare* en suelo contaminado con aceite residual automotriz. Microscopio óptico 40X.



Figura 17. Micelio extrarradical de hongos micorrícicos nativos en raíz de *Sorghum vulgare* en suelo sin contaminar con aceite residual automotriz alimentado con solución mineral por 60 días. Observación en microscopio óptico 40X.

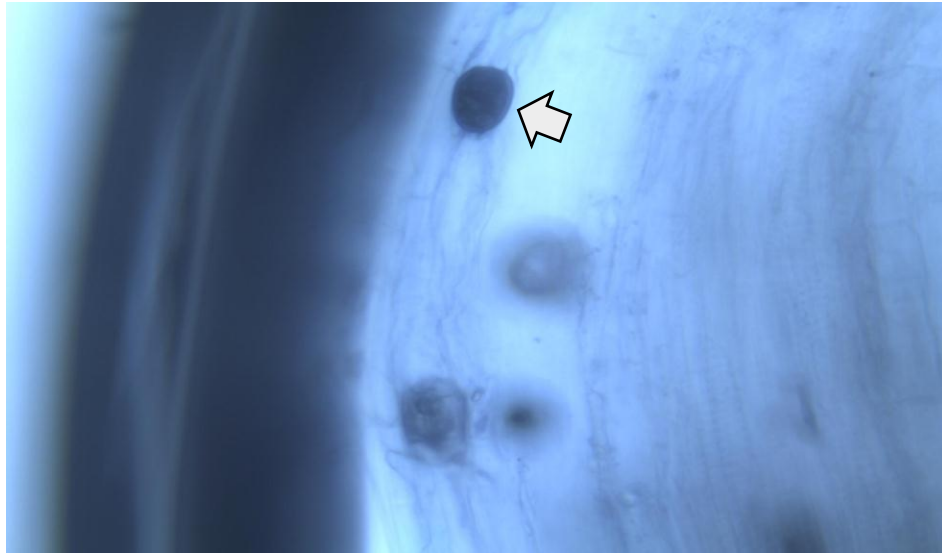


Figura 18. Vesículas de *Rhizophagus irregularis* y hongos micorrícicos nativos en raíz de *Sorghum vulgare* en suelo contaminado con aceite residual automotriz. Microscopio óptico 40X.

En la figura 21 se muestra el efecto de la biorremediación por bioestimulación con un EFC y *C. arietinum* y posterior fitorremediación con *S. vulgare* en el suelo contaminado con 34500 ppm de ARA. Ahí pudo evidenciarse que en el suelo contaminado con ARA que no fue biorremediado (control negativo), se redujo mínimamente la concentración de este contaminante, donde el remanente fue de 30264 ppm de ARA, mientras que al aplicarse una estrategia secuencial el ARA remanente fue mínimo, ahí la primera fase en la que se aplicó un EFC por 30 días el ARA se redujo hasta 6786 ppm, esta evidente reducción de ARA sugiere que la adición de lacasa, MnP y LiP favoreció la degradación de algunos de los HC del ARA susceptibles a una posterior mineralización por las poblaciones microbianas heterotróficas aeróbicas, ya que se ha reportado que estas monooxigenasas oxidan diversos HC aromáticos (Gianfreda y Rao, 2004; Rodríguez 2006; Juckpech *et al.*, 2012). En ese mismo suelo, después de su bioestimulación con un EFC se observó que con la siembra de

C. arietinum a los 60 días se redujo el ARA hasta 2127 ppm y al incorporar esta leguminosa como AV después de 30 días hasta 2066 ppm; este resultado sugiere que esta leguminosa generó exudados radicales que favorecieron el crecimiento de poblaciones microbianas nativas y al incorporarlo en la segunda fase como abono verde aportó minerales esenciales como el N, lo que mejoró el equilibrio mineral en ese suelo y promovió a las poblaciones microbianas heterotróficas aerobias a mineralizar los HC del ARA (García y Treto 2002).

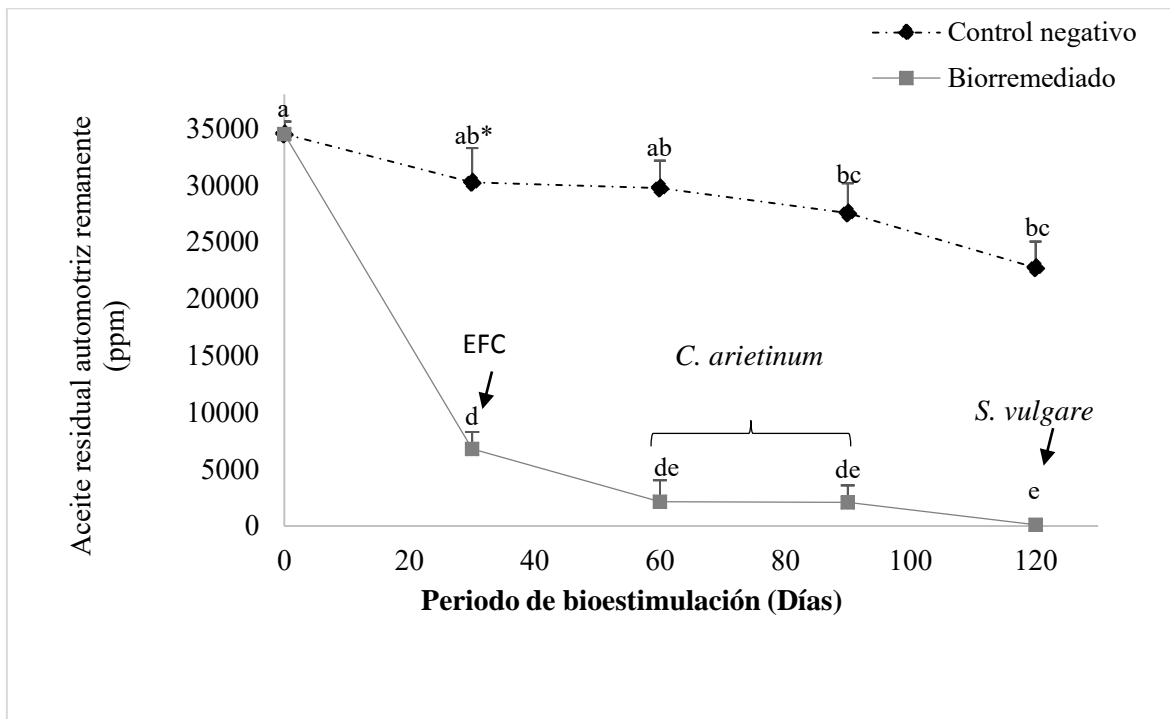


Figura 19. Aceite residual automotriz remanente en suelo bioestimulado secuencialmente con un extracto fúngico crudo, *Cicer arietinum* y fitorremediado con *Sorghum vulgare* inoculado con *Rhizophagus irregularis* y *Rhizobium etli*.

*Letras diferentes indica diferencia estadística significativa ANOVA-Tukey ($p < 0.5$), $n = 5$

Finalmente para concluir la biorremediación de ese suelo contaminado con ARA y bioestimulado, se aplicó fitorremediación con *S. vulgare* inoculado con microorganismos promotores de crecimiento vegetal (figura 22); y se observó que el ARA remanente en el

suelo cultivado con esta gramínea coinoculada con *R. irregularis* y *R. etli* fue de 114 ppm de ARA, mientras que al inocularse solo con *R. etli* fue de 100 ppm y con diferencia estadística significativa en el inoculado con *R. irregularis* el ARA remanente fue de 86.9 ppm. Con este resultado se mostró que la inoculación individual de *S. vulgare* con *R. irregularis* fue la mejor opción para concluir la depuración de ese suelo. Al respecto se ha reportado que *R. irregularis* mejoran el crecimiento vegetal al conferirle a la planta resistencia al estrés abiótico como el generado por HC como el ARA, favorece su establecimiento en suelo contaminado, le aporta nutrimentos, mejora el intercambio gaseoso, la absorción y asimilación de los HC por las plantas (Debiane *et al.*, 2007; Ruiz-Sánchez *et al.*, 2010). Además se ha demostrado que *R. irregularis* puede absorber y asimilar algunos de los HC en sus hifas, lo que favoreció la depuración de ese suelo (Debiane *et al.*, 2008; Naiying *et al.*, 2009; Calonne *et al.*, 2014).

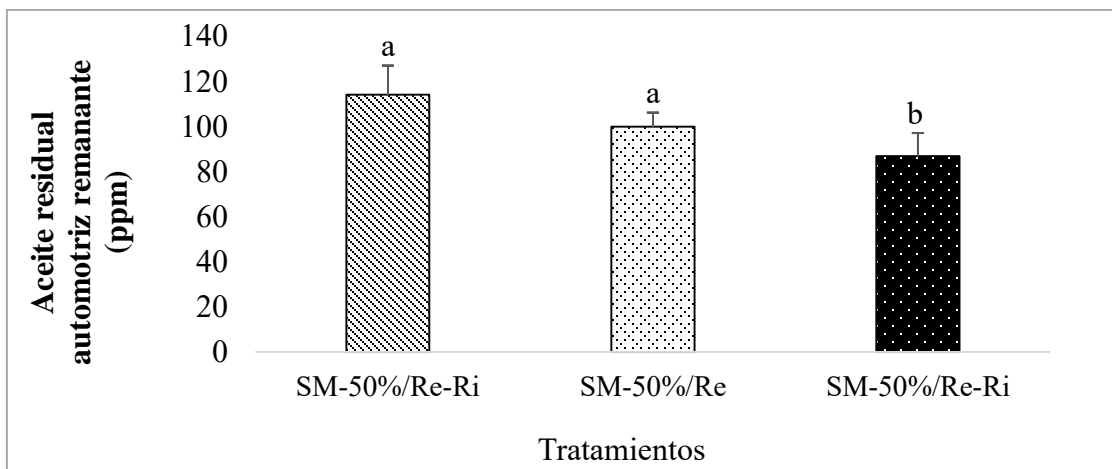


Figura 20. Aceite residual automotriz remanente en la última fase de biorremediación por fitorremediación con *Sorghum vulgare* inoculado con *Rhizopagus irregularis* y/o *Rhizobium etli*

Simbología= ARA: aceite residual automotriz; SM: Solución mineral reducida un 50% del N-P-K recomendado; Re: *Rhizobium etli*; Ri: *R. irregularis* *Letras diferentes indica diferencia estadística significativa ANOVA-Tukey ($p < 0.05$), $n=5$

7.5. Identificación de hidrocarburos aromáticos del aceite residual automotriz remanente:

En el cuadro 8 se muestran los principales HC del ARA en un suelo contaminado con 34500 ppm antes y después de su biorremediación en secuencia, primero por bioestimulación con un EFC, después con *C. arietinum* como AV y para concluir su depuración por fitorremediación con *S. vulgare* inoculado con *R. etli* y/o *R. irregularis*.

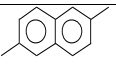
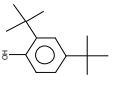
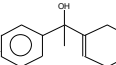
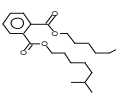
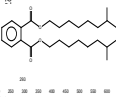

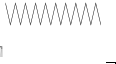
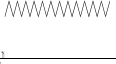
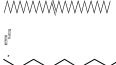
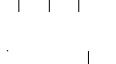
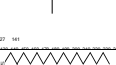
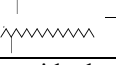
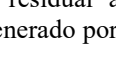
En el suelo con ARA correspondiente al día 0, se muestran los HC presentes antes de su biorremediación, ahí se encontró una mezcla heterogénea de alifáticos lineales y ramificados de 12 hasta 35 carbonos; algunos aromáticos como el benceno, fenoles y naftaleno; se mostró que en el suelo contaminado con ARA por atenuación natural considerado como control negativo a los 120 días se eliminó el fenol, 2,4-di (1,1-dimetiletil) e HC alifáticos ramificados de 12 y 14 carbonos. Mientras que se observó que en el suelo biorremediado se eliminaron y se generaron diversos HC según la fase de biorremediación. Se observó que en ese suelo al aplicar el EFC durante los primeros 30 días se eliminó HC alifáticos ramificados de 12 y 14 carbonos y lineales de hasta 35 carbonos y aromáticos como el benceno (1-metil-4-(1-metilpropil), el 2-nitro-tercari-butanol, el 2-isopropil-5-metil-1-heptanol; después con la segunda fase de bioestimulación con *C. arietinum* como AV, además se eliminó el naftaleno, el 1-ciclohex-1-1-enil-1-fenil-etanol; y colateralmente se generó ácido ftálico di(7-metil-octil) éster. Al respecto se ha reportado que las monooxigenasas del EFC oxidan alcanos y otros HC del petróleo y generan alcoholes, aldehídos y ácidos carboxílicos, principalmente; la MnP oxida compuestos aromáticos fenólicos mientras que la lacasa oxida aromáticos no fenólicos (Gianfreda y Rao 2004; Alcalde *et al.*, 2006; Kinne *et al.*, 2010). Finalmente en la tercera fase de biorremediación correspondiente a la fitorremediación de ese mismo suelo con *S. vulgare* se observó la eliminación y formación de diversos HC: en el suelo

fitorremediado con esa gramínea inoculada con *R. etli* y/o *R. irregularis* se eliminaron el nonadecano, eneicosano, eicosano y el heptacosano, mientras que de los aromáticos se oxidaron el naftaleno y el 1-ciclohex-1-1-enil-1-fenil-etanol. Sin embargo también se generó 1-decanol, 2 hexil-1-, fenol, 2,4-di(1-1 dimetiletil), heptadecano, 1-decanol y ácido ftálico di(7-metil-octil) éster.

De acuerdo a la literatura el perfil de diversidad de HC del ARA, tanto alifáticos como aromáticos producto de la fitorremediación es de los primeros reportados que demuestran que una parte de los HC se mineraliza, otra se degrada y genera nuevos HC que incluso pueden ser recalcitrantes.

Algunas investigaciones relacionadas han reportado que la fitorremediación de suelos contaminados con HC del petróleo, como el benceno, naftaleno, antraceno o pireno es una opción al favorecer la eliminación de una mezcla heterogénea de HC debido a que el sistema radical de estas plantas en parte mejora la estructura del suelo favoreciendo el intercambio gaseoso y por medio de sus exudados promueve a las poblaciones microbianas heterotróficas a oxidar los HC (Wang *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2013; Calonne *et al.*, 2014). Asimismo se ha reportado que la inoculación de plantas como *S. vulgare* con *R. irregularis* acelera la depuración de ese suelo al favorecer la asimilación de algunos HC en las células lipídicas vegetales y también en las hifas de este HMA (Verdín *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2011).

Cuadro 7. Hidrocarburos remanentes en un suelo contaminado con 34500 ppm de aceite residual automotriz bioestimulado con un extracto fúngico crudo, *Cicer arietinum* y fitorremediación con *Sorghum vulgare* inoculado con *Rhizophagus irregularis* y/o *Rhizobium etli*

Hidrocarburos identificados	Fórmula química	Estructura Química	Inicio: Suelo + ARA- Día 0	Control negativo- Día 120	Bioestimulación Días-30-90		Fitorremediación con <i>S. vulgare</i> Día 120		
					Extracto fúngico crudo	<i>C. arietinum</i>	<i>R. irregularis</i> y <i>R. etli</i>	<i>R. etli</i>	<i>R. irregularis</i>
Aromáticos	C ₁₂ H ₁₂		+	+	+	-	-	-	-
	C ₁₄ H ₂₂ O		-	-	-	-	+	+	+
	C ₁₄ H ₁₈ O		+	+	+	-	-	-	-
	C ₂₄ H ₃₈ O ₄		+	+	+	+	-	-	-
	C ₂₆ H ₄₂ O ₄		-	-	+	+	+	+	+
Alifáticos lineales	C ₁₇ H ₃₆		+	+	+	+	-	+	+
	C ₂₁ H ₄₄		+	+	+	+	-	-	-
	C ₂₇ H ₅₆		+	+	+	-	-	-	-
	C ₃₅ H ₇₀		+	+	+	-	-	-	-
Alifáticos ramificados	C ₁₂ H ₂₄		+	+	+	+	-	-	-
	13H ₂₈		+	+	+	+	-	-	-
	C ₁₇ H ₃₆ O		+	+	+	+	+	+	+
	C ₂₁ H ₄₄		+	+	+	+	+	-	-

Simbología: ARA=aceite residual automotriz; signo (+)= presencia del hidrocarburo; (-) ausencia del hidrocarburo. Resultado generado por comparación en BIBLIOTECA NIST MS 2

8. Conclusión:

La biorremediación de suelo contaminado con 34500, 65418 y 89830 ppm de ARA con una doble bioestimulación con un EFC y *Cicer arietinum* como AV redujo significativamente la concentración de ARA en 8 semanas y se demostró su eficacia para mineralizar los HC más sencillos del ARA y degradar HC alifáticos de cadena larga y ramificados e HC aromáticos del ARA haciéndolos susceptibles para una fácil mineralización por las poblaciones microbianas heterotróficas nativas. También se demostró que en el suelo contaminado con 34500 de ARA la biorremediación secuencial por bioestimulación primero con el EFC se degradó la mayor concentración del ARA, después con *C. arietinum* como AV y con la fitorremediación con *S. vulgare* inoculado con *R. irregularis* y/o *R. etli* a las 17 semanas se redujo la concentración de ARA hasta alcanzar los niveles permisibles de contaminación de acuerdo a la NOM-138-SEMARNAT/SS (2009), ahí la fitorremediación con *S. vulgare* inoculado solo con *R. irregularis* fue la mejor opción para eliminar la mayor concentración de ARA y el suelo fue restaurado.

En esta investigación también se identificó el perfil de los principales HC que constituyen el ARA y se observó su mineralización, degradación y/o transformación en otros compuestos dependiendo de la estrategia de biorremediación empleada, lo que servirá como base para nuevas investigaciones en este tópico, puesto que a la fecha la información generada es mínima o inexistente.

9. Perspectivas:

La contaminación de suelo por ARA es un problema ambiental creciente cuya restauración puede ser por biorremediación; en este trabajo se demostró la importancia de aplicar de forma simultánea y en secuencia la bioestimulación y fitorremediación asociada con microorganismos promotores de crecimiento vegetal para eliminar una fracción de los HC alifáticos lineales o ramificados y aromáticos parcialmente recalcitrantes. Sin embargo, para mejorar esta investigación es importante en posteriores trabajos evaluar lo siguiente:

- a) Conocer los principales mecanismos fisiológicos y/o estructurales de *S. vulgare* para eliminar el ARA: asimilación, oxidación, barreras mecánicas
- b) Conocer en *S. vulgare* el metabolismo de los HC del ARA y demostrar su inocuidad como producto forrajero.
- c) Investigar en *R.irregularis* y *R.etli* los principales mecanismos fisiológicos y/o estructurales para oxidar y/o asimilar HC del ARA y los factores físico-químicos críticos involucrados en este proceso.
- d) Determinar en suelo la cinética de las lacasa, LiP, y MnP a diversas concentraciones de ARA, al ser empleadas como herramienta de biorremediación ambiental.

10. Bibliografía:

- Abdulsalam S. and Omale A.B. (2009). Comparison of Biostimulation and Bioaugmentation Techniques for the Remediation of Used Motor Oil Contaminated Soil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 52: 747-754.
- Alcalde M., Ferrer M., Plou F.J. and Ballesteros A. (2006) Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes. *TRENDS in Biotechnology*, 24: 281-7.
- Álvarez M., y Treto E. (2002). Estudio comparativo de diferentes especies de abonos verdes y su influencia en el cultivo del maíz. *Cultivos Tropicales*, 23: 19-30.
- Amador R. A., y Boschini F. C.(2000). Fenología productiva y nutricional de maíz para la producción de forraje. *Terra Latinoamericana*, 11:171-177.
- Asquith E. A., Geary P.M., Nolan A.L., and Evans C.A. (2012).Comparative bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated Soil by biostimulation, bioaugmentation and surfactant addition. *Journal of Environmental Science and Engineering*, 1:637-650.
- Balderas L.I. (2013). Biorestauración de un suelo contaminado con aceite residual automotriz al 7.5% con solución mineral, abono verde y fitorremediación con sorgo. *Laboratorio de Microbiología Ambiental, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. UMSNH. Morelia Mich. pp:32-45 (Inédita).*
- Binet J. M. Portal Y., and Leyval C. (2000). Fate of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the rhizosphere and mycorrhizosphere of ryegrass. *Plant Soil* 227:207–213.
- Bonilla F. S. Márquez-Benavide, L., Sánchez-Yáñez J. M. (2013). Aprovechamiento de residuos lignocelulósicos de trigo de una biorefinería: pretratamiento. 23-24 Mayo. Lima, Perú: DIRSA-AIDIS V Congreso Interamericano de Residuos Sólidos.
- Calonne M., Fontaine J., Debiane D., Laruelle F., Grandmougin-Ferjani A., and Lounès-Hadj S. (2014). The arbuscular mycorrhizal *Rhizophagus irregularis* activates storage lipid biosynthesis to cope with the benzo[a]pyrene oxidative stress. *Phytochemistry*, 97:30-7.
- Cañas A. I. and Camarero S. (2010). Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. *Biotechnology Advances*, 28: 694–705.
- Chaîneau C. H., Morel J. L., and Oudot J. (1997). Phytotoxicity and Plant Uptake of Fuel Oil Hydrocarbons. *Journal of Environmental Quality*, 26: 1478-1483.
- Cheema S.A. Khan M.I, Tang X., Zhang C., Shen C., Malik Z., Ali S., Yang J., Shen K., Chen X., Chen Y. (2008). Enhancement of phenanthrene and pyrene degradation in rhizosphere of tall fescue (*Festuca arundinacea*).*Journal of Hazardous Materials*, 166:1226-31.
- Clemente A. R., Anazawa T.A., and Durant L.R. (2001). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by soil fungi. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32:255-261.

- Debiane D., Calonne M., Fontaine J., Laruelle F., Grandmougin-Ferjani A., and Lounes-Hadj S. (2011). Lipid content disturbance in the arbuscular mycorrhizal, *Glomus irregulare* grown in monoxenic conditions under PAHs pollution. *Fungal Biology*, 115:82-92.
- Debiane D., Garçon G., Verdin A., Fontaine J., Durand R., Grandmougin-Ferjani A., Shirali P., Lounès-Hadj S. (2008). In vitro evaluation of oxidative stress and genotoxic potentials of anthracene on mycorrhizal chicory root. *Environmental and Experimental Botany*, 64:120-127.
- Delgadillo-López A. E., González-Ramírez C. A., Prieto-García F., Villagómez-Ibarra J.R., and Acevedo-Sandoval O. (2011). Fitorremediación: Una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 14: 597-612.
- Diab E. A. (2008). Phytoremediation of Oil Contaminated Desert Soil Using the Rhizosphere Effect. *Global Journal of Environmental*, 2: 66-73.
- Elise A., Asquith. E.A., Geary P.M., Nolan A.L., and Evans C.A. (2012). Comparative Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Soil by Biostimulation, Bioaugmentation and Surfactant Addition. *Journal of Environmental Science and Engineering*. 1: 637-650.
- Fernandez C. Llobrega T. M., Jiménez B., Altomare V. y Labrador H. (2008). Biodegradación de asfalteno y resinas por microorganismos presentes en suelo contaminado con hidrocarburo. *Revista de la Facultad de Ingeniería U.C.V.* 23: 7–15.
- Ferrera-Cerrato R., Alarcón A., Mendoza-López M.R., Sangabriel W., Trejo-Aguilar D., Cruz-Sánchez J., López-Ortiz C., Delgadillo-Martínez J. (2007). Phytoremediation of a fuel oil-polluted soil with *Phaseolus coccineus* using organic or inorganic fertilization. *Agrociencia*, 41: 817-826.
- Gao Y., Cheng Z., Ling W., and Huang J. (2010). Arbuscular mycorrhizal fungal hyphae contribute to the uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons by plant roots. *Bioresource Technology*, 101:6895–6901.
- Gao H., Wang Y., Zhang W., Wang W., and Mu Z. (2011). Isolation, identification and application in lignin degradation of an ascomycete GHJ-4. *African Journal of Biotechnology* 10: 4166-4174.
- García-González M. M., Farías-Rodríguez R., Peña-Cabriales J.J., Sánchez-Yáñez J.M. (2005). Inoculación del trigo *var.* Pavón con *Azospirillum spp.* y *Azotobacter beijerinckii*. *Terra Latinoamericana*, 23: 65-72.
- García H. D., Sosa-Aguirre C.R., Sánchez-Yáñez J.M. (2007). Biorremediación de agua doméstica contaminada con aceite residual automotriz. *Ingeniería Hidráulica en México*. 22: 113-118.
- García M., Álvarez M., y Treto E. (2002). Estudio comparativo de diferentes especies de abonos verdes y su influencia en el cultivo del maíz. *Cultivos Tropicales*, 23: 19-30.
- García-Rivero M. and Peralta-Pérez, M. R. (2008). Cometabolism in the biodegradation of hydrocarbons. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 7:1-12.

- Gianfreda L., and Rao M.A. (2004). Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. *Enzyme and Microbial Technology Journal*, 35: 339–354.
- Gao H., Wang y., Zhang W., Wang W., and Mu Z. (2011). Isolation, identification and application in lignin degradation of an ascomycete GHJ-4. *African Journal of Biotechnology*, 10:4166-4174.
- Instituto Nacional de Ecología, y SEMARNAT, (2000). Manual de buenas prácticas de manejo para los aceites usados. Gobierno de México. URL:http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/consultaPublicacion.html?id_pub=324, 03/12/14.
- 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 – diésel. *Dyna*, 76: 83-93.
- Hudzicki J. (2009). Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. American Society for Microbiology ASM MicrobeLibrary. URL: <http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/3189-kirby-bauer-disk-diffusion-susceptibility-test-protocol>
- Jiménez G. A., Mejía A. I., y López B.L. (1999). Actividad de las enzimas ligninolíticas del *Phanerochaete chrysosporium* y su variación con la adición de Mn⁺². *Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 23: 587-594.
- Joner J. E., and Leyval C. (2003). Phytoremediation of organic pollutants using mycorrhizal plants: a new aspect of rhizosphere interactions. *Agronomie*, 23 (1): 495–502.
- Juckpech K., Pinyakong O., and Rerngsamran P. (2012). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by newly isolated *Curvularia* sp. F18, *Lentinus* sp. S5, and *Phanerochaete* sp. T20. *Science Asia*, 38: 147–156.
- Juárez-Cisneros G. y Sánchez-Yáñez J.M. (2014). Biorrestauración de suelo contaminado con aceite residual automotriz por bioestimulación con lombricomposta y fitorremediación con *Sorghum vulgare* inoculado con *Bacillus cereus* y *Rhizobium etli*. *Journal of Selva Andina Biosphere*, 2:15-22.
- Kinne M., Zeisig C., Ullrich R., Kayser G., Hammel K.E., and Hofrichter M. Stepwise oxygenations of toluene and 4-nitrotoluene by a fungal peroxygenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 397:18–21.
- Larenas P. G., y L de Viana M. (2005). Germinación y supervivencia del pasto cubano *Tithonia tubaeformis* (Asteraceae) en suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo. *Ecología Austral* 15:177-181.
- Laura J., and Castellanos P. (2009). Lignin-degrading filamentous fungi isolated from *Calamagrostis nitidula* Pilg. *Revista Peruana de Biología*, 16: 125- 128.
- Leal C. M. (2003). Biorremediación de un suelo agrícola contaminado con aceite residual automotriz. Tesis doctoral, Universidad Colima, Col, México. 47-50 (Inédita). URL:

http://digeset.ucol.mx/tesis_posgrado/Pdf/Maribel%20Leal%20Castillo.pdf

- LGEEPA 2012. Ley General de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente. Url: http://www.cnsns.gob.mx/acerca_de/marco/reglamentos/equilibrio_ecologico_impacto_ambiental.pdf
- Lira S.R.H. (2007). Transporte de agua y solutos en el tejido conductivo. Conducción del agua y nutrientes en el xilema. Fisiología vegetal. Ed Trillas S.A. de C.V. México D.F., México. 87-90. ISBN: 978-968-24-8004-1.
- López-Ortiz C., Ferrera-Cerrato R., Alarcón A., Almaraz J.J., Martínez-Romero E., y Mendoza-López M.A. (2012). Establecimiento y respuestas fisiológicas de la simbiosis *Rhizobium tropici*-*Leucaena leucocephala* en presencia de fenantreno y naftaleno. Revista Internacional de Contaminación Ambiental, 28: 333-342.
- Loredo-Osti C., López-Reyes L., y Espinosa-Victoria D. (2004). Bacterias Promotoras de crecimiento vegetal asociadas a gramíneas: Una revisión. Terra Latinoamericana, 22:225-239.
- Maldonado-Chávez E., Rivera-Cruz M.C., Izquierdo-Reyes F., and Palma-López D.J. (2010). Effects of rizosphere, microorganisms and fertilization on bioremediation and phytoremediation of soils with new and weathered crude oil. Universidad y Ciencias Trópico Húmedo. 26:121-136.
- Méndez-Natera J. R., Celymar R., Zapata K., y Otahola G. V. (2004). Efecto de la concentración y tiempo de contaminación de un suelo por petróleo en la germinación de semillas de maíz (*Zea mays L.*) cv. Himeca 95. Revista Científica UDO Agrícola, 4: 66-71.
- Mun-Jung H., Hyoungh-Tae C., and Hong-Gyu S. (2004). Degradation of Phenanthrene by *Trametes versicolor* and Its Laccase. Microbiology, 42: 94-98.
- Naiying W., Honglin H., Shuzhen Z., Yong-Guan Z., Peter C., Yong Z. (2009). Phenanthrene uptake by *Medicago sativa* L. under the influence of an arbuscular mycorrhizal fungus. Environmental Pollution, 157: 1613–1618.
- Nazareno S. M. C., Martínez M. J., Alfio T. H., Cabello M. N., and Arambarri A. M. (2000). Production of ligninolytic enzymes by *Fusarium solani* strain isolated from different substrata. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 16: 799-803.
- Norma oficial mexicana NOM-138-SEMARNAT/SS-2003, límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación. <https://www.google.com.mx/webhp?sourceid=chrome-instant&ion=1&espv=2&ie=UTF-8#q=NORMA%20OFICIAL%20MEXICANA%20NOM-138-SEMARNAT%20FSS-2003%2C%20L%20C%20M%20MITES%20M%20C%20XIMOS%20PERMISIBLES%20DE%20HIDROCARBUROS%20EN%20SUELOS%20Y%20LAS%20ESPECIFICACIONES%20PARA%20SU%20CARACTERIZACION%20Y%20REMEDIACION>

- Norma oficial mexicana, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. Nom-021-SEMARNAT-2000. URL: <http://legismex.mty.itesm.mx/normas/rn/rn021-02.pdf>
- Nousiainen P., Kontro J, Manner H., and Hatakka A. (2014). Phenolic mediators enhance the manganese peroxidase catalyzed oxidation of recalcitrant lignin model compounds and synthetic lignin. *Fungal Genetics and Biology*.72: 137-149.
- Osadolor C. I., and Animetu S. (2013). Assessment of Show Star Grass (*Melampodium Paludosum*) for Phytoremediation of Motor Oil Contaminated Soil. *Civil and Environmental Research*. 3: 19-28.
- Pardo C.Y.L., Perdomo Rojas M.C., y Benavides J. (2004). Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo. *Revista NOVA-Publicación Científica*, 2: 40-49.
- Pasaye A. M. (2011). Biorremediación de un suelo agrícola impactado con aceite residual automotriz. Tesis maestría. Laboratorio de Microbiología Ambiental, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. UMSNH. Morelia Mich. pp:39-41 (Inédita). URL: http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/jspui/bitstream/123456789/72/1/BIORREMEDIACION_DEUNSUELOAGRICOLAIMPACTADOCONACEITERESIDUALAUTOMOTRIZ.pdf
- Peña-Castro J. M., Barrera-Figueroa B. E., Ruiz-Medrano R., Xoconostle-Cázares B. (2006). Bases moleculares de la fitorremediación de hidrocarburos totales del petróleo. *Terra Latinoamericana*, 24:529-539.
- Peng S., Zhou Q., Cai Z., Zhang Z. (2009). Phytoremediation of petroleum contaminated soils by *Mirabilis Jalapa* L. in a greenhouse plot experiment. *Journal of Hazardous Materials*, 16: 1490-1496.
- Pineda-Flores G., and Mesta-Howard A.M. (2001). Petroleum asphaltenes: generated problematic and possible biodegradation mechanisms. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 43: 143-150.
- Pivetz E. (2001). Phytoremediation of Contaminated Soil and Ground Water at Hazardous Waste Sites. ManTech Environmental Research Services Corporation, Technology Innovation Office of Solid Waste and Emergency Response, USEPA, Washington, DC.USA.
- Rivas S. (2006). Laccases: blue enzymes for green chemistry. *TRENDS in Biotechnology* 24:219-226.
- Roane T. M., Josephson, K. L., and Pepper I. L. (2001). Dual-Bioaugmentation Strategy To Enhance. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 3208-3215.
- Rodríguez S.E. (2006). Caracterización molecular de lacasas de *Pleurotus eryngii*: Expresión heteróloga de estas enzimas y aplicaciones en la degradación de contaminantes aromáticos. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas. Madrid, España. (Inédita).URL: http://digital.csic.es/bitstream/10261/40187/1/TESIS_EnriqueRodriguezSanchez.pdf

- Rodríguez S., Fernández M., Bermudez R.C., y Morris H. (2003). Tratamiento de efluentes industriales coloreados con *Pleurotus* spp. Revista Iberoamericana de Micología, 20: 164-168.
- Ruiz-Sánchez M., Aroca R., Muñoz Y., Polón R., and Ruiz-Lozano J.M. (2010). The arbuscular mycorrhizal symbiosis enhances the photosynthetic efficiency and the antioxidative response of rice plant subjected to drought stress. Journal of Plant Physiology, 167:862-869.
- Sánchez-Yáñez J.M. (2007). Ciclo del Carbono. La mineralización de carbono orgánico en el suelo y la rizosfera de plantas: medición del CO₂. Breve tratado de Microbiología Agrícola. Teoría y práctica. Ed(s). Coordinación de la Investigación Científica-UMSNH, Secretaría de Desarrollo del Estado de Michoacán, Centro de Investigaciones y Desarrollo del Estado de Michoacán, COSUSTENTA, SA de CV Morelia Michoacán, México. 1:118-120. ISBN: 978-970-95424-1-7.
- Salt D. E., Smith, R. D., and Raskin I. (1998). Phytoremediation. Journal of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 49: 643-668.
- SEMARNAT-INE (2009). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. <http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/download/139.pdf>
- Shirdam R., Daryabeigi Z.A., Nabi B.G., et Nasser M. (2008). "Phytoremediation of hydrocarbon-contaminated soils with emphasis on the effect of petroleum hydrocarbons on the growth of plant species". Phytoremediation, 89: 21-29.
- Smith S. E., Smith, F.A., and Jakobsen, I. (2004). Functional diversity in arbuscular mycorrhizal (AM) symbioses: the contribution of the mycorrhizal P uptake pathway is not correlated with mycorrhizal responses in growth or total P uptake. New Phytologist, 162: 511–524.
- Smith. M.J., Flowers T.H. Duncana, H. J. and Saitob. H. (2011). Study of PAH dissipation and phytoremediation in soils: Comparing freshly spiked with weathered soil from a former coking works. Journal of Hazardous Materials, 192:1229-1225.
- Taiz L., y Zeiger E. (2006). Fisiología Vegetal, Giberelinas: reguladores de la altura de las plantas. Publicacions de la Universitat Journal, 3ra edición, pp: 20-28. La Serena, Chile.
[URL:http://www.academia.edu/4428657/Cap%C3%ADtulo_XV_Hormonas_y_Reguladores_del_Crecimiento_Auxinas_Giberelinas_y_Citocininas](http://www.academia.edu/4428657/Cap%C3%ADtulo_XV_Hormonas_y_Reguladores_del_Crecimiento_Auxinas_Giberelinas_y_Citocininas)
- Troya T., Muñoz-Mingarro D., y Llinares, F. (2000). Detección de actividades enzimáticas lignocelulolíticas de *Chaetomium* spp. Rev. Investigación agraria. Sistemas y Recursos Forestales, 9:89-99.
- Udo E. J. and Fayemi A.A. (1975). The effect of oil pollution of soil on germination, growth and nutrient uptake of corn. Journal of Environmental Quality. 4:537-540.
- USEPA (2001). Brownfields Technology Primer: Selecting and using phytoremediation for site cleanup. Office of Solid Waste and Emergency Response. Washington, USA.

- USEPA (2000). Introduction to phytoremediation. Cincinnati, USA.
- Vallejo V., Salgado, L., y Roldan, F. (2005). Evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de TPHs en suelos contaminados con petróleo. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 7: 67-78.
- Vásquez M.C. (2010). Biorremediación de lodos contaminados con aceites lubricantes usados. *Revista Colombiana de Biotecnología* 12: 141-157.
- Verdín A., Lounès-Hadj S., Fontaine J., Grandmougin-Ferjani A., Durand R. (2006). Effects of anthracene on development of an arbuscular mycorrhizal fungus and contribution of the symbiotic association to pollutant dissipation. *Mycorrhiza* 16:397-405.
- Vidali M. (2001). Bioremediation. *Pure and Applied Chemistry*; 73: 1163–1172.
- Villegas I. (2011). Respuestas de *Leucaena leucocephala* en simbiosis con *Rhizobium* y/o micorriza en diferentes etapas de desarrollo durante la fitorremediación de fenantreno. Tesis maestría, Colegio de Postgraduados, Montecillos Texcoco, Mex. (Inédita) pp:62-65.
<http://www.biblio.colpos.mx:8080/xmlui/handle/10521/516>
- Vierheilig H., Coughlan A. P., Wyss U., and Piche Y. (1998). Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 5004–5007.
- Wang S., Nomura N., Nakajima T., and Uchiyama H. (2012). Case study of the relationship between fungi and bacteria associated with high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*: 624–630.
- Wu J., Ma F., Wang L., Yang J., Huang X., An G., and Liu S. (2014). Seedling performance of *Phragmites australis* (Cav.) Trin ex. Steudel in the presence of arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of applied Microbiology*, 116:1593-1606.
- Zhou X., Zhou J., Xiang X., Cébron A., Béguiristain T., and Leyval C. (2013). Impact of four plant species and arbuscular mycorrhizal (AM) fungi on polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) dissipation in spiked soil. *Polish Journal of Environmental Studies*. 22(4):1239-1245.

11. Anexos:

11.1. Cromatogramas: Identificación de HC en suelo contaminado con 34500, 65418 y 89830 ppm de ARA bioestimulado con un EFC y *C. arietinum* como abono verde (Fase I)

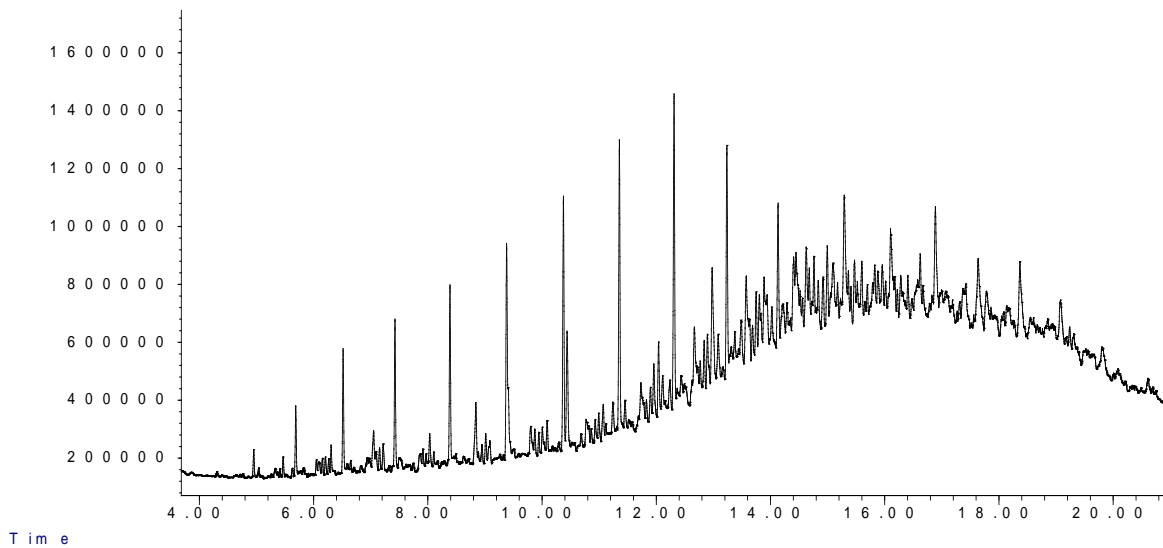


Figura 24. Cromatograma de suelo contaminado con 34500 ppm de aceite residual automotriz sin biorremediar, día 0

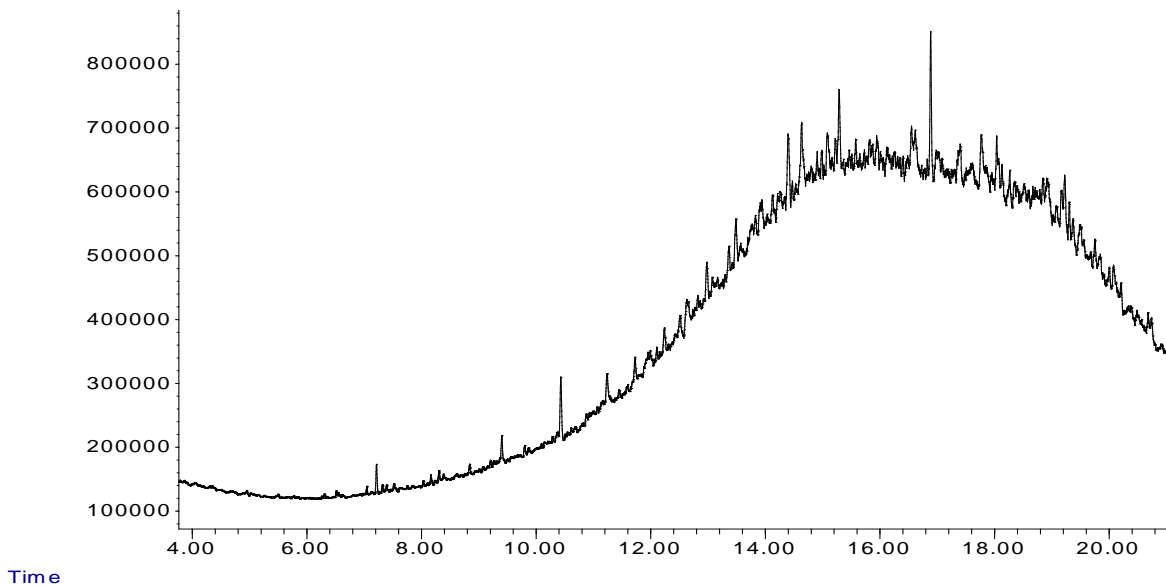
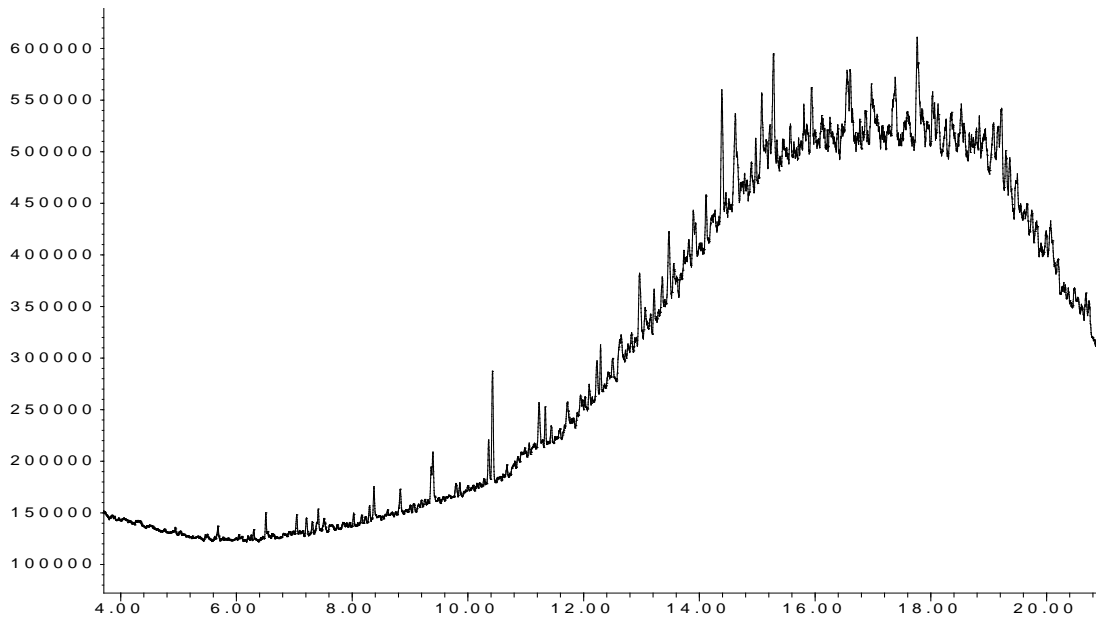
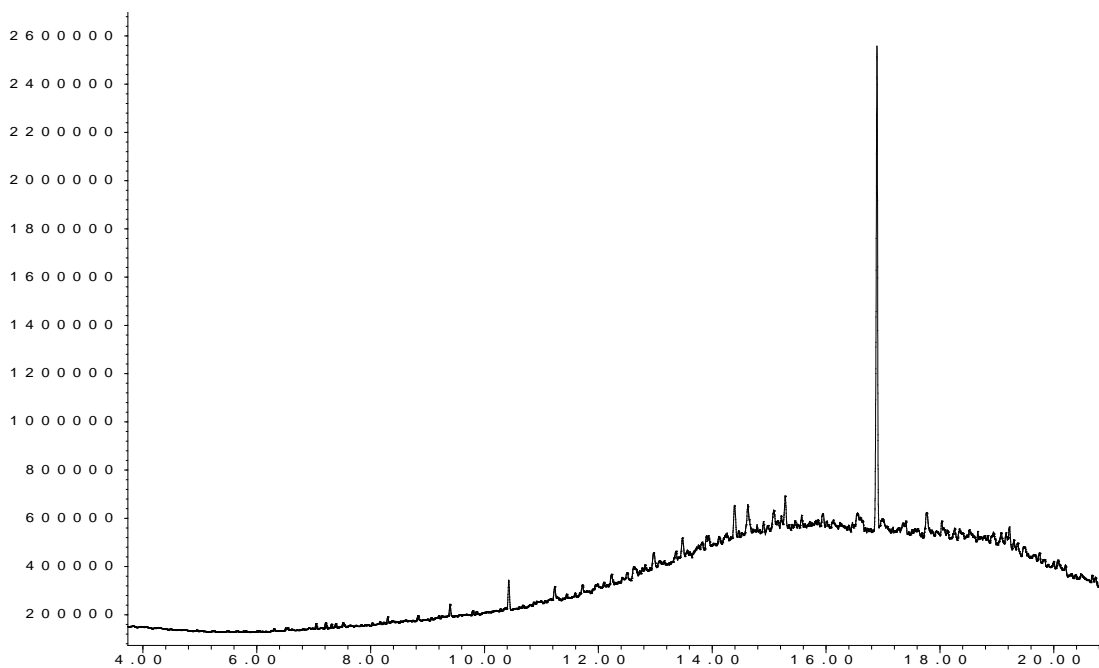


Figura 25. Cromatograma de suelo contaminado con 34500 ppm de aceite residual automotriz sin biorremediar, día 60



Time

Figura 26. Cromatograma de suelo contaminado con 34500ppm de aceite residual automotriz bioestimulado con un extracto fúngico crudo y *C. arietinum* como abono verde



Time

Figura 27. Cromatograma de suelo contaminado con 34500ppm de aceite residual automotriz bioestimulado con un extracto fúngico crudo

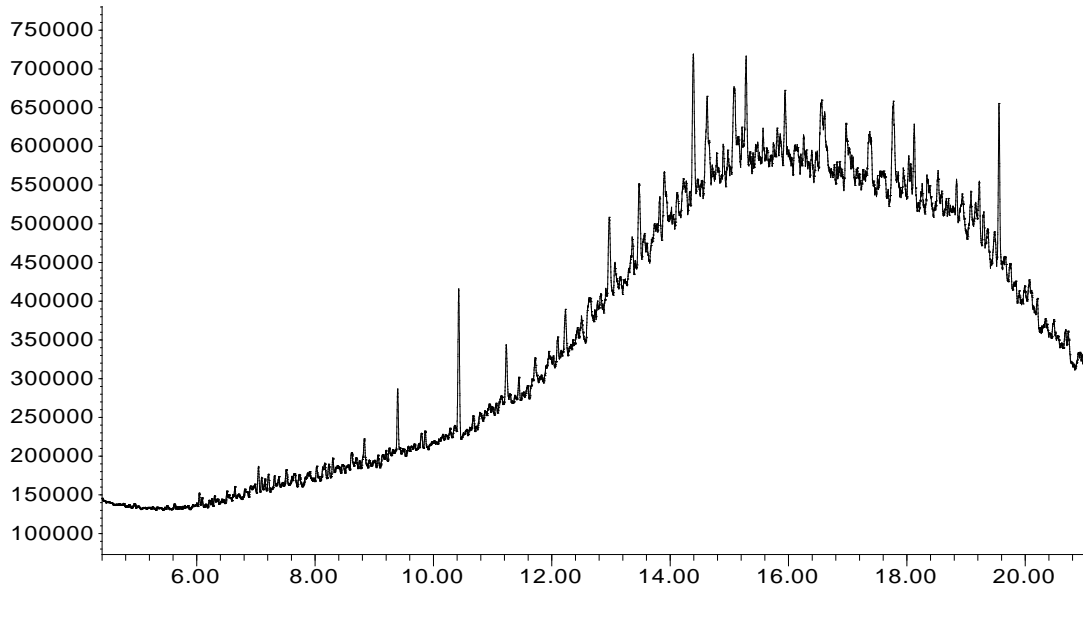


Figura 28. Cromatograma de suelo contaminado con 34500ppm de aceite residual automotriz bioestimulado con *C. arietinum* como abono verde

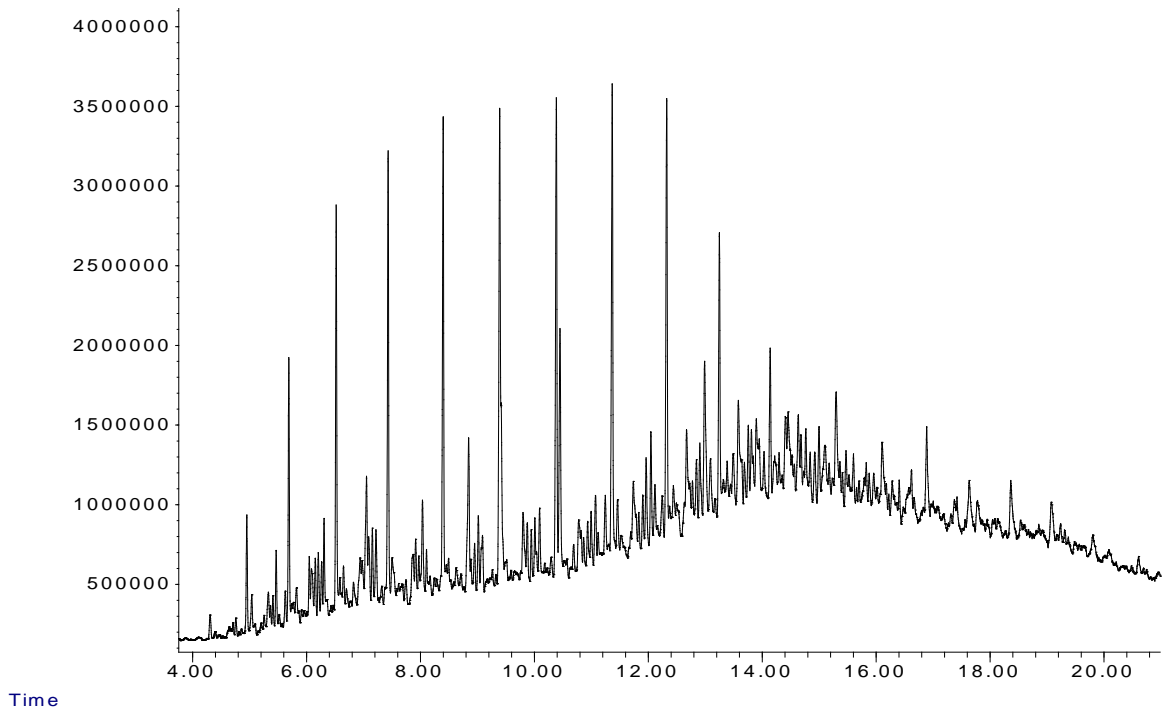


Figura 29. Cromatograma de suelo contaminado con 65418 ppm de aceite residual automotriz sin biorremediar, día 0

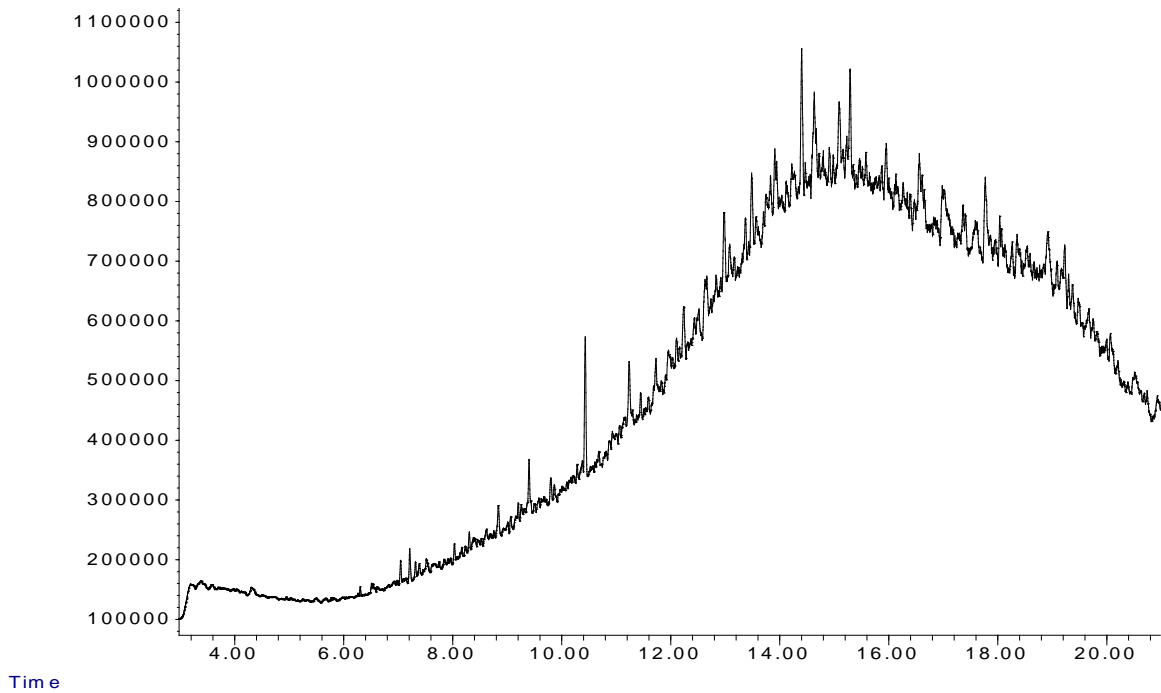


Figura 30. Cromatograma de suelo contaminado con 65418 ppm de aceite residual automotriz sin biorremediar, día 60

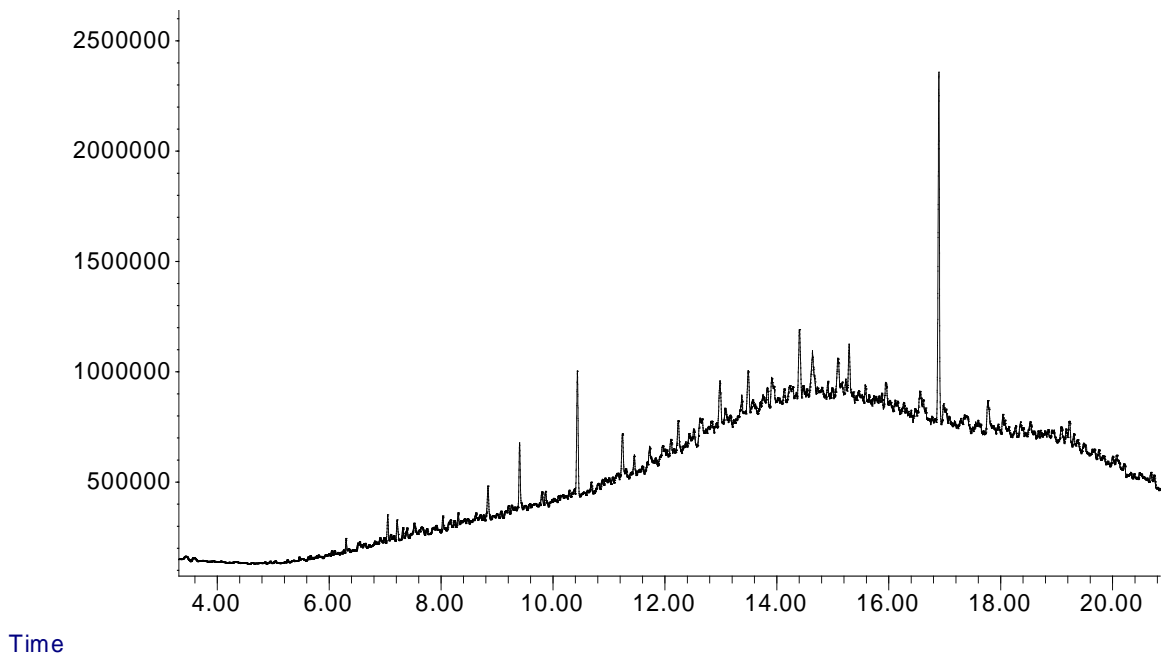


Figura 31. Cromatograma de suelo contaminado con 65418 ppm de aceite residual automotriz bioestimulado con un extracto fúngico crudo y *C. arietinum* como abono verde

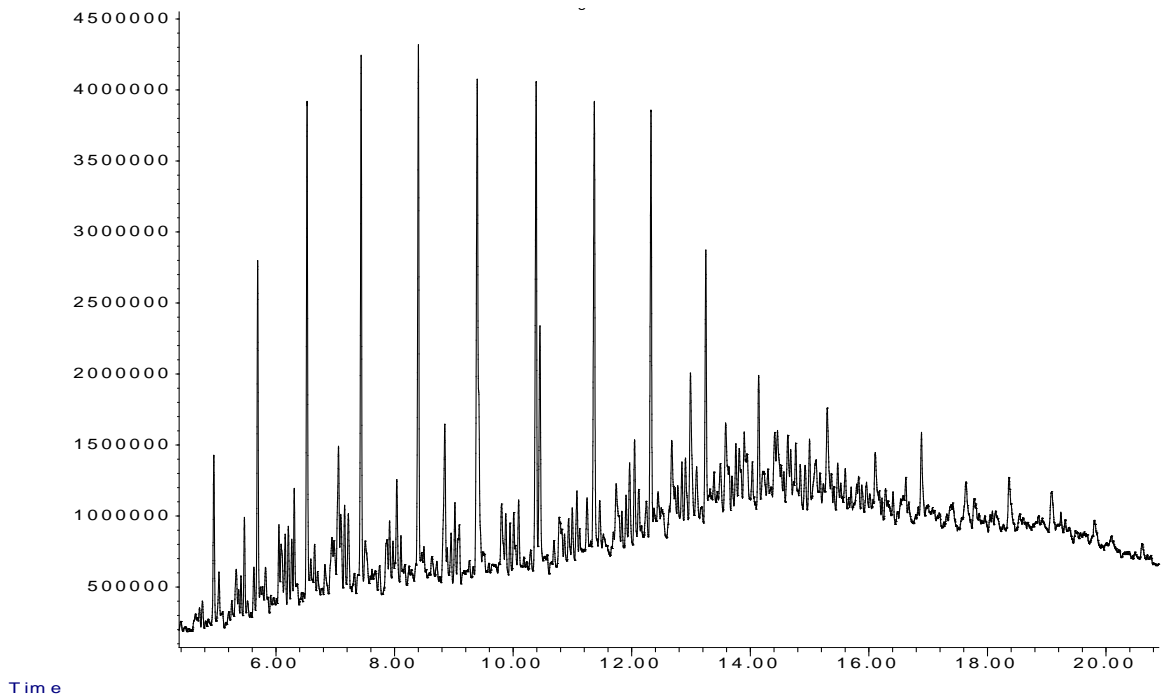


Figura 32. Cromatograma de suelo contaminado con 89830 ppm de aceite residual automotriz sin biorremediar, día 0

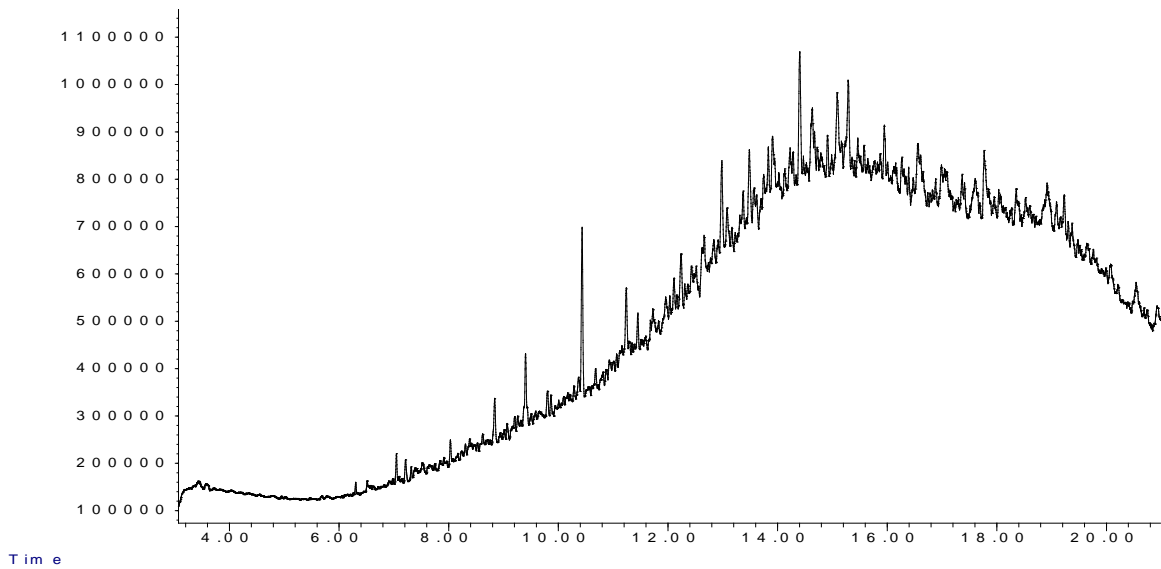


Figura33. Cromatograma de suelo contaminado con 89830 ppm de aceite residual automotriz sin biorremediar, día 60

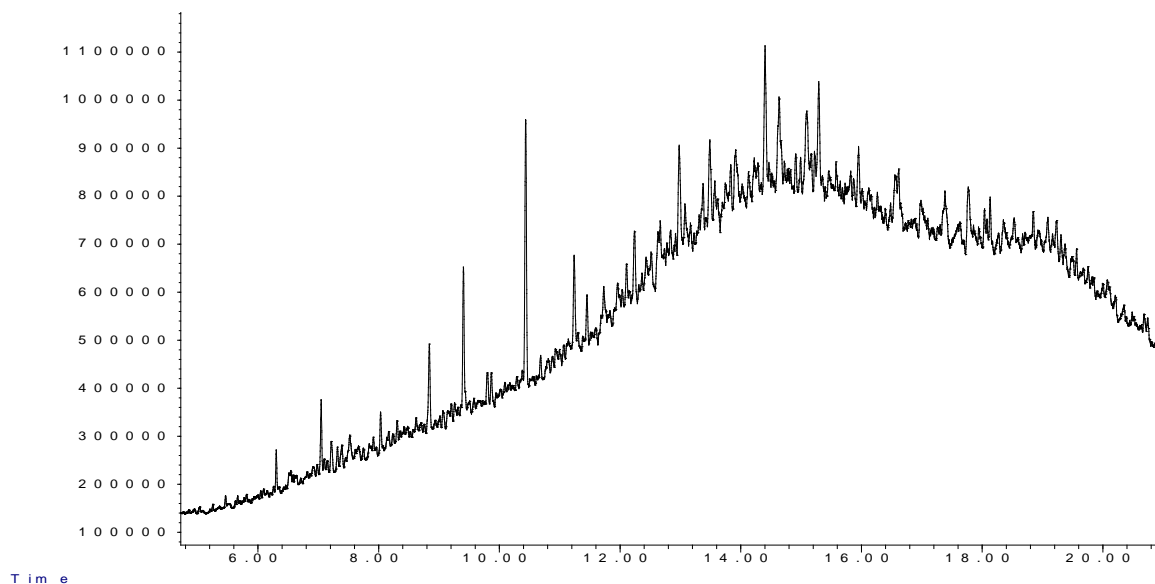


Figura 34. Cromatograma de suelo contaminado con 89830 ppm de aceite residual automotriz bioestimulado con un extracto fúngico crudo y *C. arietinum* como abono verde

Cuadro 8. Porcentaje de materia orgánica antes y después de la bioestimulación del suelo con *C. arietinum* y un extracto fúngico crudo

Tratamiento	Aceite residual automotriz (ppm)	Materia orgánica (%)	Interpretación*
Control absoluto**	-----	5.33	Alto
Control negativo A	34500	6.22	Muy alto
Abono verde-extracto fúngico crudo	34500	5.28	Alto
Extracto fúngico crudo	34500	4.40	Alto
Abono verde	34500	6.02	Muy alto
Control negativo B	65418	8.34	Muy alto
Abono verde-extracto fúngico crudo	65418	7.9	Muy alto
Control negativo C	89830	9.78	Muy alto
Abono verde-extracto fúngico crudo	89830	9.85	Muy alto

*NOM-021-RECNAT-2000

**Control absoluto-suelo sin aceite residual automotriz

11.2. Clasificación macro y microscópica de hongos mitosporicos ligninolíticos productores del extracto un fúngico crudo

De la colección de hongos del laboratorio de Microbiología Ambiental del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH los HML codificados como *Aspergillus* sp-MAA, *Penicillium* sp- MAB y MAC, *Aspergillus* sp-MAD y *Fusarium* sp- MAE cultivados en PDA después de 7 fueron clasificados de acuerdo a su morfología colonial y microscópica (figura 25).

Se mostró que *Aspergillus* sp-MAA formó una colonia granular con micelio aéreo de color negro-pardo muy abundante y radiada, sin otros pigmentos ni color al reverso. Su morfología microscópica mostró conidióforos aseptados y conidios globosos de forma radial de tamaño relativamente grande con respecto a otros *Aspergillus* sp. De acuerdo a estas características macro y microscópicas el HML fue clasificado como *A. niger*. El HML *Aspergillus* sp-MAD formó una colonia lisa de color verde pardo, radiada, de textura polvorosa y sin pigmentos al reverso. Su morfología microscópica mostró conidióforos aseptados y conidios globosos abundantes características de *Aspergillus* sp. También se identificaron los HML denominados *Penicillium* sp-MAB y MAC, los cuales formaron una colonial radial de color verde en el centro y crema en la periferia con textura aterciopelada-algodonosa. Su morfología microscópica mostró conidióforos terventicilados con fiálides cilíndricas y conidios esféricos (Carrillo 2003). El HML *Fusarium* sp-MAD formó una colonia circular de micelio aéreo en color blanco-crema con textura aterciopelada y sin pigmentos en el reverso. En su estructura microscópica se observaron cadenas largas de microconidios y monofialides, pocos macroconidos ligeramente curvados y escasa formación de clamidosporas (Ochoa *et al.*, 2012).

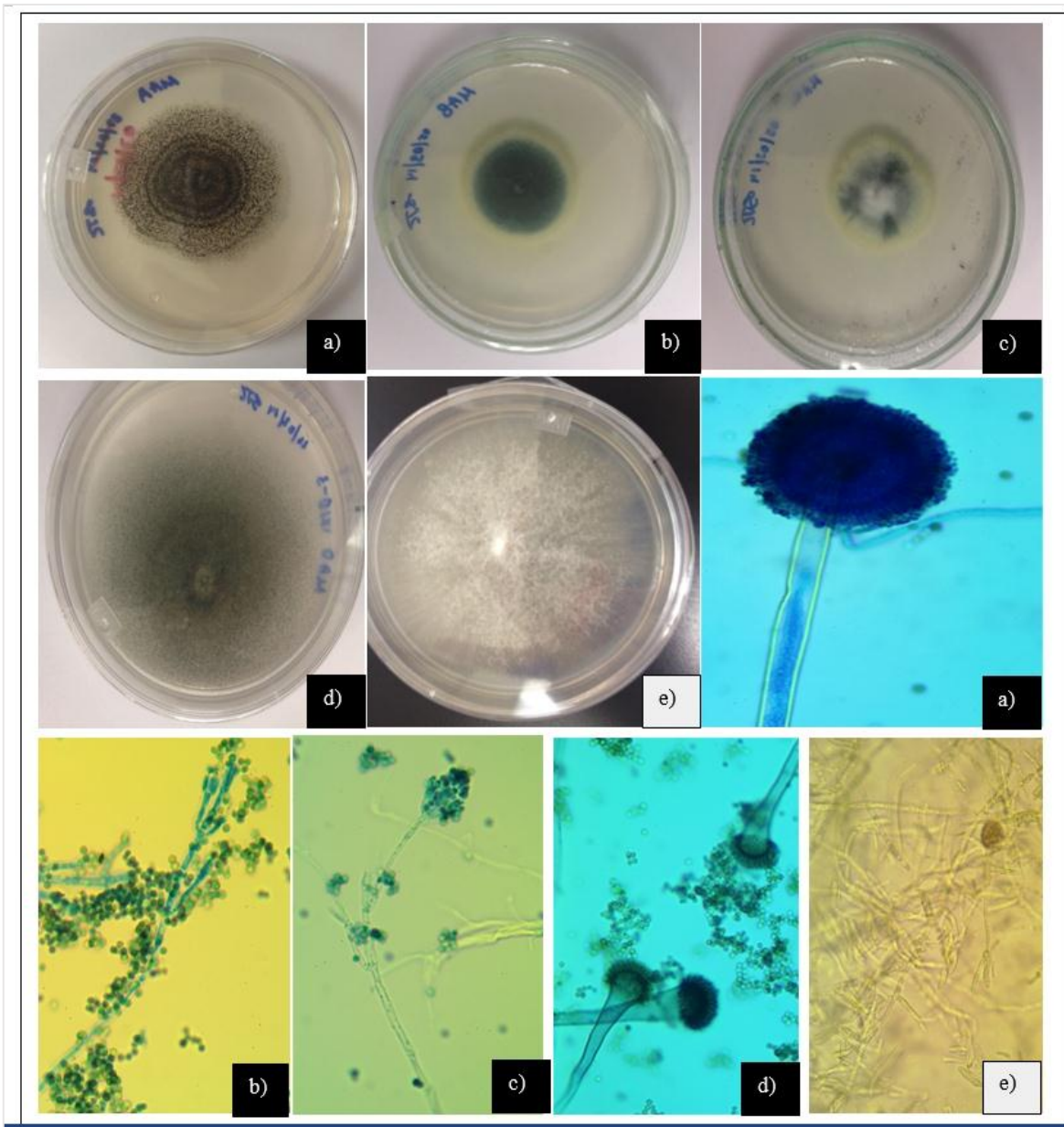


Figura 35. Morfología colonial de hongos mitospóricos ligninolíticos en agar papa dextrosa y morfología microscópica con azul de lactofenol, 40X a) y d)= *Aspergillus* sp; b) y c)= *Penicillium* sp; d): *Fusarium* sp

11.2.1. Obtención de cultivos axénicos de hongos mitospóricos ligninolíticos:

Los HML *Penicillium* sp-MAB, *Penicillium* sp-MAC, *Aspergillus* sp-MAD se cultivaron en agar papa dextrosa (APD) Bioxon® (g/L): infusión de papa 4,0; dextrosa 20,0 y agar 15,0 con pH = $5,6 \pm 0,2$ y se incubaron 72 h/28°C. El HML *Aspergillus* sp-MAA se cultivó en

agar V8 (AV8) (g/L): CaCO₃, 1.0; jugo V8®, 160mL y agar, 15.0 y el HML *Fusarium* sp-MAE se cultivó en agar Spezieller Nährstoffarmer (ASN) con la siguiente composición (g/l): cada HML se transfirió un disco de 6mm de diámetro en agua desionizada estéril, se realizaron las diluciones 1X10⁻¹ hasta 1x10⁻³; se tomaron 30µL de cada dilución a PDA/AV8 o SNA y se sembró con asa de Drigalsky, se incubó a 30°C/24h en oscuridad. Después con estereoscopio a 40X y bisturí se transfirieron 2 esporas aisladas de cada HML en APD o AV8 y se incubaron 30°C/días para obtener cultivos axénicos. También se observó su morfología colonial: color, textura, tamaño, forma y producción de pigmentos y su morfología microscópica por tinción con azul de lactofenol en microscopio óptico a 40X (Betancourt 2013).

11.2.2. Extracción de DNA de hongos mitospóricos ligninolíticos:

De cada HML crecido en PDA/AV8 o SNA se tomaron 3 discos de 6.0 mm de diámetro en tubos Eppendorf de 1,5mL estéril, y se adicionó nitrógeno líquido; para la extracción de DNA genómico de los los HML *Penicillium* sp-MAB, *Penicillium* sp-MAC, *Aspergillus* sp-MAD y *Fusarium* sp-MAE se empleó Wizard® Genomic DNA purification Kit (Promega ®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de DNA extraídas se conservaron 4°C/24h (Promega Corporation, 2010).

Para el HML *Aspergillus* sp-MAA se transfirieron 2 discos de 6.0 mm en tubos Eppendorf y se adicionó 0.2ml de buffer con Tris-HCl 0.2N pH 8.0, NaCl 0.5M, EDTA 0.01M y SDS 1% y 2mL de fenol: cloroformo (1:1 v/v). Se agitó en vortex 6min. Se adicionó 0.3mL de buffer y 0.3mL de fenol: cloroformo. Se mezcló y centrifugó por 30s. La fase acuosa se transfirió a otro tubo y se repitió este proceso hasta adición del fenol: cloroformo para obtener separación de fase acuosa. Se adicionó etanol 95% y permanecieron en reposo 30min. Posteriormente se centrifugó por 5min, la pastilla se lavó con etanol 70% a temperatura ambiente se dejó evaporar el residuo de etanol, se lavó con agua desionizada para su conservación y se mantuvo 24h/ 4°C. El ADN extraído se visualizó en un gel agarosa 1.5% mediante electroforesis. Posteriormente se amplificó por el método de reacción en cadena a la polimerasa (PCR) las regiones internas transcritas ITS1-5.8s-ITS2 del rDNA mediante los iniciadores ITS5 (5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3') e ITS4

(5'TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'). Las reacciones de PCR se realizaron con HotStarTaq DNA polymerase (HotStarTaq Master Mix Kit, Qiagen, Valencia, CA) en termorreclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf).

Las muestras fueron purificadas con Wizard SV Gel y PCR Clean-up System (Promega, Corp., Madison, Wisconsin) siguiendo el protocolo del fabricante. Los productos de la PCR fueron observados en gel agarosa 1.5% con buffer TAE. Las secuencias de los nucleótidos de los productos de la PCR se obtuvieron de una compañía externa (Macrogen Inc. Soul, Korea). La secuencias obtenidas fueron comparadas con el total de las secuencias nucleotídicas de hongos reportados en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information (Ochoa *et al.*, 2007; Ochoa *et al.*, 2012 y Rodriguez-Alvarado *et al.*, 2012); URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

11.2.3. Identificación molecular de hongos mitospóricos ligninolíticos

La figura 36 muestra la amplificación por PCR de la región ITS ribosomal de los géneros *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. y *Fusarium* sp. Utilizados en la producción de un extracto fúngico crudo. Sel análisis comparativo de las secuencias con la base de datos NCBI permitió identificar las especies de *Aspergillus thubingensis* y *A. Fumigatus*, así como dos cepas de *Penicillium Chrysogenum* y *Fusarium thapsinum*.

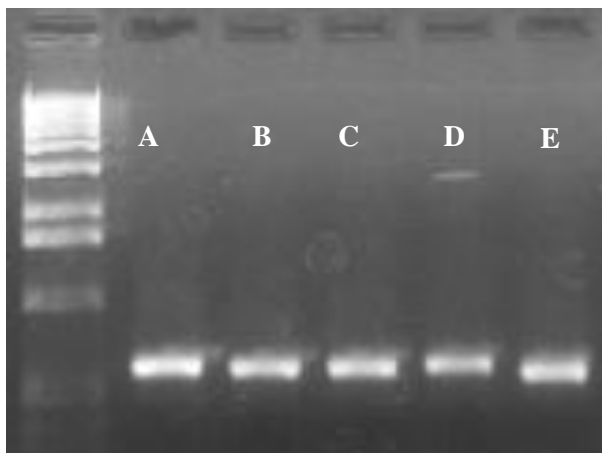


Figura 36. Amplificación de la región ITS 1-5.8 S-ITS4 del rDNA. de los hongos mitospóricos ligninolíticos: **A**=*Aspergillus* sp. **B**= *Penicillium* sp. **C**=*Penicillium* sp. **D**=*Aspergillus* sp. y **E**=*Fusarium* sp.

Aspergillus tubingensis partial 18S rRNA gene, 5.8S rRNA gene, partial 28S rRNA gene, internal transcribed spacer 1 (ITS1) and internal transcribed spacer 2 (ITS2), isolate CBS 127.49

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1110 bits(601)	0.0	601/601(100%)	0/601(0%)	Plus/Plus
Query 14				
73				
Sbjct 1				
60				
Query 74				
133				
Sbjct 61				
120				
Query 134				
193				
Sbjct 121				
180				
Query 194				
253				
Sbjct 181				
240				
Query 254				
313				
Sbjct 241				
300				
Query 314				
373				
Sbjct 301				
360				
Query 374				
433				
Sbjct 361				
420				
Query 434				
493				
Sbjct 421				
480				
Query 494				
553				
Sbjct 481				
540				
Query 554				
613				
Sbjct 541				
600				
Query 614	A	614		
Sbjct 601	A	601		

Penicillium chrysogenum isolate ER 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1068 bits(578)	0.0	581/582(99%)	1/582(0%)	Plus/Plus
Query 1		GTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGG		
60				
Sbjct 48		GTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGG		
107				
Query 61		GTCCAACCTCCCACCCGTGTTTATTTTACCTTGTTGCTTcgggcgggcccgccttaactgg		
120				
Sbjct 108		GTCCAACCTCCCACCCGTGTTTATTTTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAACTGG		
167				
Query 121		ccgccccgggggcttacgcccccgggccccgcgccccgAAGACACCCTCGAACTCTGTCT		
180				
Sbjct 168		CCGCCGGGGGCTTACGCCCCGGGCCCGCGCCCGCGAAGACACCCTCGAACTCTGTCT		
227				
Query 181		GAAGATTGTAGTCTGAGTGAAAATATAAATTATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTG		
240				
Sbjct 228		GAAGATTGTAGTCTGAGTGAAAATATAAATTATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTG		
287				
Query 241		GTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAG		
300				
Sbjct 288		GTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAG		
347				
Query 301		TGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGT		
360				
Sbjct 348		TGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGT		
407				
Query 361		CCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCTCCGATCCCG		
420				
Sbjct 408		CCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCTCCGATCCCG		
467				
Query 421		GGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGGGCACCAGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTT		
480				
Sbjct 468		GGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGGGCACCAGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTT		
527				
Query 481		GTCACCCGCTCTGTAGGCCCGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTATCCAGGTT		
540				
Sbjct 528		GTCACCCGCTCTGTAGGCCCGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTATCCAGGTT		
587				
Query 541		GACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGC-TAT	581	
Sbjct 588		GACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATAT	629	

***Penicillium chrysogenum* isolate ER** 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1079 bits(584)	0.0	584/584(100%)	0/584(0%)	Plus/Plus
Query 1		GTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGG		
60				
Sbjct 48		GTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGG		
107				
Query 61		GTCCAACCTCCCACCCGTGTTTATTTTACCTTGTTGCTTcgggcgggccccgccttaactgg		
120				
Sbjct 108		GTCCAACCTCCCACCCGTGTTTATTTTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAACTGG		
167				
Query 121		ccgccggggggccttacgcccccgggcccgcgcccgccgAAGACACCCTCGAACTCTGTCT		
180				
Sbjct 168		CCGCCGGGGGGCTTACGCCCCGGGCCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCTCGAACTCTGTCT		
227				
Query 181		GAAGATTGTAGTCTGAGTGAAAATATAAAATTATTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTG		
240				
Sbjct 228		GAAGATTGTAGTCTGAGTGAAAATATAAAATTATTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTG		
287				
Query 241		GTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAG		
300				
Sbjct 288		GTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAG		
347				
Query 301		TGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGT		
360				
Sbjct 348		TGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGT		
407				
Query 361		CCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCTCCGATCCCG		
420				
Sbjct 408		CCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCTCCGATCCCG		
467				
Query 421		GGGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTT		
480				
Sbjct 468		GGGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTT		
527				
Query 481		GTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTTATCCAGGTT		
540				
Sbjct 528		GTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTTATCCAGGTT		
587				
Query 541		GACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA	584	
Sbjct 588		GACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA	631	

Aspergillus fumigatus strain KARVS04 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1103 bits(597)	0.0	597/597(100%)	0/597(0%)	Plus/Plus
Query 1		GTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGG		
60				
Sbjct 65		GTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGG		
124				
Query 61		GTCCAACCTCCCACCCGTGTCTATCGTACCTTGTTGCTTcggcggggcccgccgtttcgac		
120				
Sbjct 125		GTCCAACCTCCCACCCGTGTCTATCGTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCGTTTCGAC		
184				
Query 121		ggccgcccggggaggccttgcgcccccgggcccgcgcccgcgAAGACCCCAACATGAACG		
180				
Sbjct 185		GGCCGCCGGGGAGGCCTTGCGCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACCCCAACATGAACG		
244				
Query 181		CTGTTCTGAAAGTATGCAGTCTGAGTTGATTATCGTAATCAGTTAAAACCTTCAACAACG		
240				
Sbjct 245		CTGTTCTGAAAGTATGCAGTCTGAGTTGATTATCGTAATCAGTTAAAACCTTCAACAACG		
304				
Query 241		GATCTCTTGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTG		
300				
Sbjct 305		GATCTCTTGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTG		
364				
Query 301		CAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGG		
360				
Sbjct 365		CAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGG		
424				
Query 361		GCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCCGTC		
420				
Sbjct 425		GCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCCGTC		
484				
Query 421		CCCCTCTCCCGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGGCGGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCG		
480				
Sbjct 485		CCCCTCTCCCGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGGCGGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCG		
544				
Query 481		TATGGGGCTTTGTACCTGCTCTGTAGGCCCGCCGGCGCCAGCCGACACCCAACCTTAT		
540				
Sbjct 545		TATGGGGCTTTGTACCTGCTCTGTAGGCCCGCCGGCGCCAGCCGACACCCAACCTTAT		
604				
Query 541		TTTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCGCTGAACTTAAGCATATCAA		
597				
Sbjct 605		TTTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCGCTGAACTTAAGCATATCAA		
661				

Fusarium thapsinum isolate LK FI 27 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
953 bits(516)	0.0	516/516(100%)	0/516(0%)	Plus/Plus
Query 1	TACCGAGTTTACAAC	TCCCAAACCCCTGTGAAC	CATACCAATTGTTGCCTCGGCGGATCAG	60
Sbjct 21	TACCGAGTTTACAAC	TCCCAAACCCCTGTGAAC	CATACCAATTGTTGCCTCGGCGGATCAG	80
Query 61	CCCGCTCCCGGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGT	120		
Sbjct 81	CCCGCTCCCGGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGT	140		
Query 121	AACTTCTGAGTAAAACCATAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTTCTGG	180		
Sbjct 141	AACTTCTGAGTAAAACCATAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTTCTGG	200		
Query 181	CATCGATGAAGAACGCAGCAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATC	240		
Sbjct 201	CATCGATGAAGAACGCAGCAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATC	260		
Query 241	ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGC	300		
Sbjct 261	ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGC	320		
Query 301	GTCATTTCAACCCTCAAGCCCCGGGTTTGGTGTGGGGATCGGCGAGCCTCACGGCAAG	360		
Sbjct 321	GTCATTTCAACCCTCAAGCCCCGGGTTTGGTGTGGGGATCGGCGAGCCTCACGGCAAG	380		
Query 361	CCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCTGCAGCTTCCATTGCGTAGTAGTAAAACCCCT	420		
Sbjct 381	CCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCTGCAGCTTCCATTGCGTAGTAGTAAAACCCCT	440		
Query 421	CGCAACTGGTACGCGGCGCGGCCAAGCCGTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCG	480		
Sbjct 441	CGCAACTGGTACGCGGCGCGGCCAAGCCGTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCG	500		
Query 481	GATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATC	516		
Sbjct 501	GATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATC	536		

12. Bibliografía fase complementaria:

- Betancour R.I., (2013). Co-infección genética de *Fusarium* sp. y *Fusarium mexicanum* en árboles de mango (*Mangifera indica* L.). Tesis inédita para obtener el título de maestro en ciencias biológicas. UMSNH. Facultad de Biología. UMSNH.
- Carrillo L. and Hammel E., (1995). Mechanisms for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation by Ligninolytic Fung. *Environmental Health Perspectives*, 103:41-43.
- Ochoa F.Y.M., Cerna C.E., Gallegos M.G., Landeros F.J., Delgado O.J.C., Hernández C.S., Rodríguez G.R., Olalde P.V. (2012). Identificación de especies de *Fusarium* en semilla de ajo en Aguascalientes, México. *Revista mexicana de Micología* 36: 27-31.
- Ochoa J.L. Hernández M., H. Latisnere Barragán, J. L. León de la Luz, C. P. Larralde Corona. 2007. Aislamiento e identificación de hongos patógenos de naranja *Citrus sinensis* L. Osbeck cultivada en Baja California Sur, México. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5: 352-359.
- Promega Corporation · 2800 Woods Hollow Road · Madison, WI 53711-5399 USA Toll Free in USA 800-356-9526 · Phone 608-274-4330 · Fax 608-277-2516 · www.promega.com Printed in USA. Part# TM050.
Revised 12/10 URL:
<http://www.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Manuals/0/Wizard%20Genomic%20DNA%20Purification%20Kit%20Protocol.pdf>
- Rodríguez-Alvarado G. Soto-Plancarte A. Fernández-Pavía S.P. Betancourt-Resendes I., and Braun U. (2012). Identity of powdery mildew on *Senna* in Mexico. *Plant Pathology & Quarantine* 2(1), 37-42.