



## **Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo**

Facultad de Químico-Farmacobiología

Tesis

### **Bioestimulación de Suelo Impactado por Aceite Residual Automotriz**

Que presenta:

**Daniel Filomeno Hernández Valencia**

Para obtener el grado de Licenciado de:

**Químico Farmacobiólogo**

Asesor

**D.C. Juan Manuel Sánchez-Yáñez**

Laboratorio de Microbiología Ambiental

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas

Coordinación de la Investigación Científica – Proyecto 2.7 (2017)

Septiembre 2017

## Reconocimiento

La presente investigación fue realizada en el Laboratorio de Microbiología Ambiental del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, perteneciente a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección y supervisión del **D.C. Juan Manuel Sánchez-Yáñez** y fue financiada por el proyecto 2.7 (2017) de la Coordinación de la Investigación Científica – UMSNH y BIONUTRA, S.A. de C.V., Maravatío, Michoacán, México.



UNIVERSIDAD MICHOCACANA  
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO  
*Cuna de héroes, crisol de pensadores*

## **Agradecimiento:**

**A mis padres:**

**Julián Hernández Landeros**

**Ma Eugenia Valencia Tinajero**

**A mis hermanos: Julián, Bibiana y Julia**

**Al Dr Juan Manuel Sánchez-Yáñez**

**A mis compañeros del laboratorio: Rubí, Guidier, Celeste, Yunuen, Missael, Pedro, Alejandra, Perla, Iván, Zoila, Juan, Dulce, Miguel.**

## **Dedicatoria:**

**La presente Tesis está dedicada a Dios, ya que gracias a él he logrado concluir mi carrera.**

***A mis padres por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo.***

**A mis hermanos, tíos y primos y a todos aquellos que participaron directa e indirectamente en esta tesis.**

**Al DC Juan Manuel Sánchez-Yáñez por su gran apoyo y motivación para la culminación de nuestros estudios profesionales y para la elaboración de esta tesis.**

# Índice

Índice de tablas.....	2
Índice de figuras .....	2
Acrónimos.....	3
Resumen.....	4
1. Introducción.....	6
1.1 Aceite residual automotriz.....	7
1.2 Detergentes.....	8
1.3 Solución mineral .....	9
1.4 Leguminosas <i>Phaseolus vulgaris</i> y <i>Vicia satina</i> o abono verde .....	9
1.5 Lombricomposta .....	9
1.6 Peróxido de hidrógeno.....	10
1.7 Cometabolismo .....	10
2. Antecedentes .....	11
3. Hipótesis .....	12
4. Objetivo .....	12
5. Materiales y métodos.....	13
5.1 Preparación de jarras de Leonard .....	13
5.2 Bioestimulación de suelo.....	14
5.3 En suelo densidad de los microorganismos oxidantes del aceite residual automotriz .....	15
5.4 En suelo control de pH durante la bioestimulación .....	16
5.5 En suelo determinación de la concentración del aceite residual automotriz por Soxhlet .....	16
5.6 En suelo determinación del perfil de hidrocarburos del aceite residual automotriz remanentes en el suelo por cromatografía de gases .....	17
6. Resultados.....	18
7. Discusión .....	23
8. Conclusión.....	25
9. Referencias .....	26

## Índice de tablas

Tabla 1. Composición química del aceite residual automotriz. ....	8
Tabla 2. Diseño experimental para la bioestimulación triple y secuencial de suelo contaminado con 75,000 ppm de aceite residual automotriz. ....	14
Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas del suelo sin aceite residual automotriz. ....	18
Tabla 4. En suelo cuantificación de la población microbiana heterotrófica oxidante del aceite residual automotriz, inducida por bioestimulación con solución mineral, lombricomposta al 3% y <i>Phaseolus vulgaris</i> como abono verde. ....	19
Tabla 5. En suelo impactado con 2,750 ppm dinámica del pH durante la bioestimulación mediante <i>Vicia sativa</i> o abono verde y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....	20

## Índice de figuras

Figura 1. Jarra de Leonard (Garcia-Gonzales <i>et al.</i> , 2005) .....	14
Figura 2. En suelo concentración de aceite residual automotriz bioestimulado secuencial y acumulativa mediante solución mineral, lombricomposta al 3% <i>Phaseolus vulgaris</i> y <i>Vicia sativa</i> incorporados como abono verde por 105 días. ....	19
Figura 3. En suelo cromatograma de suelo contaminado con 75,000 ppm de aceite residual automotriz antes de su bioestimulación al tiempo cero. ....	21
Figura 4. Cromatograma que muestra el perfil de hidrocarburos del aceite residual automotriz después de la bioestimulación secuencial y acumulativa mediante un detergente, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , solución mineral, lombricomposta al 3%, <i>Vicia sativa</i> / <i>Phaseolus vulgaris</i> , 80% de capacidad de campo. ....	22

## Acrónimos

<b>AHA</b>	Agar hueso de aguacate
<b>ARA</b>	Aceite residual automotriz
<b>AVE</b>	Abono verde
<b>BIO</b>	Biorremediación
<b>BIS</b>	Bioestimulación
<b>CA</b>	Control absoluto
<b>COBO</b>	Composta bovina
<b>CN</b>	Control negativo
<b>CR</b>	Control relativo
<b>CVP</b>	Cuenta viable en placa
<b>FITO</b>	Fitorremediación
<b>HICOS</b>	Hidrocarburos
<b>LOCO</b>	Lombricomposta
<b>MPCV</b>	Microorganismos promotores de crecimiento vegetal
<b>SOMI</b>	Solución mineral
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonias

## Resumen

El suelo impactado con 75,000 ppm de aceite residual automotriz (ARA) es una concentración relativamente alta, el ARA es considerado un residuo tóxico para todo tipo de vida según la Ley General de Equilibrio Ecológico y protección al Ambiente (LEGEEPA), y la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, que establece como límite máximo de 4,400 ppm, concentración que impide la mineralización de la materia orgánica, causa infertilidad con disminución de la producción vegetal. El objetivo de este trabajo fue: La bioestimulación (BIS) de un suelo impactado por 75,000 ppm de ARA con solución mineral (SOMI) + detergente, lombricomposta (LOCO), *Phaseolus vulgaris/Vicia sativa* o abono verde (AVE) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, para reducir el ARA a un valor inferior al máximo permisible por la NOM-138. Los datos experimentales fueron analizados estadísticamente con ANOVA/Tukey. Los resultados mostraron que la BIS secuencial y acumulativa de suelo impactado con 75,000 ppm de ARA mediante SOMI + detergente, LOCO al 3%, *P. vulgaris* y *V. sativa* como AVE y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lo disminuyeron a 1,532 ppm; lo indica que, en el suelo, el aporte de compuestos inorgánicos de N (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) y (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), minerales de P (PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>) y K (K<sub>2</sub>O) que en el suelo indujeron a la microbiota heterotrófica aerobia autóctona a mineralizar el ARA. En el suelo control negativo sin bioestimular se registró una reducción a 50,102 ppm, del ARA. En conclusión, el uso de la BIS de forma secuencial y acumulativa es una alternativa eficiente para la biorremediación de un suelo contaminado con 75,000 ppm de ARA.

**Palabras clave:** Suelo, ARA, bioestimulación, solución mineral, *P. vulgaris*, lombricomposta.

## Abstract

The soil impacted with 75,000 ppm of waste motor oil (WMO) is a relative high concentration, is considered a hazardous waste, the NOM-138-SEMARNAT-SSAI-2012 (NOM-138) establishes as maximum limit of hydrocarbons in soil of 4,400 ppm, concentration that inhibits the mineralization of organic matter and causes infertility. The aim of the work was the biostimulation (BIS) of impacted soil by 75,000 ppm of WMO with detergent (DEGE), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mineral solution (MISO), vermicompost (VERMI), SOMI, *Phaseolus vulgaris* and *Vicia sativa* as Green manure to decrease the WMO to a value less than the maximum allowed by the NOM-138. The experimental data were analyzed by ANOVA/Tukey. The results showed that the sequential and cumulative BIS of soil with 75,000 ppm with MISO, VERMI 3%, *P. vulgaris* and *V. sativa* as Green manure reduced WMO to 1,532 ppm indicates that, in the soil, the contribution of inorganic compounds of N (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) y (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), minerals of P (PO<sub>4</sub>-3) and K (K<sub>2</sub>O) that in the soil induced the autochthonous aerobic heterotrophic microbiota to mineralize the WMO. In the negative control soil without BIS a reduction was recorded at 50,102 ppm of WMO. In conclusion, the use of BIS in a sequential and cumulative way is an efficient alternative for the bioremediation of soil contaminated with 75,000 ppm of WMO.

**Keys words:** Soil, WMO, biostimulation, mineral solution, *P. vulgaris*, vermicompost

## 1. Introducción

El aceite residual automotriz (ARA) es una mezcla compleja de hidrocarburos (HICO) alifáticos, aromáticos y trazas de metales pesados (Abioye *et al.*, 2011). El ARA es un residuo peligroso según la Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente (LGEEPA), debido al efecto tóxico para toda forma de vida (Sánchez-Yáñez, 2011). En el suelo cuando el ARA se derrama, forma una capa impermeable que bloquea la difusión de O<sub>2</sub> (oxígeno) y agua (Larenas & de Viana 2005; Ogbo *et al.*, 2009), ello inhibe la actividad de la microbiota heterotrófica aerobia autóctona que mineraliza la materia orgánica, lo que reduce su fertilidad y la producción agrícola (Banks *et al.*, 2003). Por lo que al respecto en suelo la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012 (NOM-138), establece como una concentración máxima permisible 4,400 ppm de HICO, dividida en la fracción ligera de 200 ppm, la mediana de 1,200 ppm y la pesada de 3,000 ppm, por lo que es necesario emplear un método de remediación para disminuir la concentración a un nivel inferior al máximo permisible por la NOM-138.

En un suelo cuando la concentración del ARA contaminante es superior a 35,000 ppm se remedia por métodos químicos tales como: O<sub>3</sub> (ozono), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrógeno), Cl (cloro), ClO<sub>2</sub> (dióxido de cloro) y el reactivo de Fenton (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Fe); con la desventaja que son costosos entre 190 y 600 USD/m<sup>3</sup> (precios no actualizados), y forma ácidos fuertes que inhiben el crecimiento de plantas y de la microbiota del suelo (Volke *et al.*, 2002), una opción ecológica de solución es la bioestimulación (BIS) secuencial y acumulativa del suelo por 75,000 ppm de ARA mediante solución mineral (SOMI) cuya composición química enriquece el suelo con sales de N (nitrógeno): NH<sub>4</sub>; NO<sub>3</sub>; P (fosforo): PO<sub>4</sub>, K (potasio): K<sub>2</sub>O, que reequilibran el desbalance mineral e inducen a la microbiota autóctona aerobia heterotrófica a mineralizar el ARA (Sánchez-Yáñez, 2008), seguido de la lombricomposta (LOCO) que aporta compuestos orgánicos de N como proteínas, ácidos nucleicos, aminoácidos, nucleótidos, urea, así como materia orgánica como la celulosa, celobiosa, almidón, lípidos sencillos, enriquecido con una alta carga

microbiana heterotrófica para acelerar la oxidación de los HICO, posteriormente *Phaseolus vulgaris* (frijol) y *Vicia sativa* o abono verde (AVE), enriquecen con proteína, aminoácidos, nucleótidos, urea, azúcares de bajo peso molecular como; celobiosa, maltosa, lípidos sencillos y mantiene la actividad de los microorganismos heterotróficos aerobios y los incorporados con la LOCO. mientras la inoculación de éstas leguminosas como *Micromonospora echinospora* y/o *Penicillium chrysogenum*, que convierten exudados de semilla y raíz en sustancias promotoras de crecimiento vegetal para aumentar la formación de raíces que aceleran la adaptación de la planta al ARA mediante acciones fisiológicas que permiten la tolerancia a la mezcla de HICO, inducen la germinación para posteriormente colonizar la raíz, donde transforma exudados radicales en fitohormonas, además de tener la capacidad de oxidar algunos HICOS del ARA. *P. vulgaris* y *V. sativa* son leguminosas que se incorporan a plántula cuando sus componentes, nitrogenados y carbonados son de fácil degradación para que se mantenga la diversidad y densidad de microbiota nativa del suelo, oxidante del ARA (Sánchez-Yáñez 2007).

### **1.1 Aceite residual automotriz**

El ARA es cualquier aceite refinado del petróleo crudo o sintético resultante del uso automotriz, los cuales pasan por condiciones térmicas y mecánicas rigurosas donde se satura de residuos de combustión y otras sustancias toxicas; benceno y el tolueno al igual que con solventes clorados (Sánchez-Yáñez, 2008). En la tabla 1, se muestran los principales componentes tóxicos del aceite residual automotriz para todo tipo de vida (Sánchez-Yáñez, 2008).

**Tabla 1. Composición química del aceite residual automotriz.**

<b>Hidrocarburos clorados</b>	<b>Aromáticos</b>	<b>Metales (trazas)</b>
Diclorofluorometano	Benceno	Al (Aluminio)
Triclorotrifluoroetano	Tolueno	Sb (Antimonio)
1,1,1-Tricloroetano	Xilenos	As (Arsénico)
Tetracloroetileno	Benzo- $\alpha$ -antraceno	Ba (Bario)
Cloruro	Naftaleno	Cd (Cadmio)
Bifenilos policlorados	Otros hidrocarburos	Cr (Cromo)
	Aromáticos policíclicos	Co (Cobalto)
		Pb (Plomo)

El ARA químicamente es una mezcla compleja de HICOS aromáticos, alifáticos, policíclicos y trazas de metales pesados, los HICOS aromáticos son componentes de origen orgánico generados por la descomposición térmica del petróleo, los HICOS aromáticos están constituidos por dos o más anillos bencénicos. En general son tóxicos para todo tipo de vida por sus propiedades mutagénicas, cancerígenas y su persistencia en la naturaleza, por su afinidad en la materia orgánica y arcillas del suelo. El ARA cuando es derramado en el suelo forma una película impermeable que impide la difusión de O<sub>2</sub> y agua, e inhibe los ciclos biogeoquímicos; ciclo del C (carbono), ciclo del N, ciclo del S<sub>2</sub>, ciclo del H<sub>2</sub>O (agua) y ciclo del O<sub>2</sub>, que sustentan la vida (Banks *et al.*, 2003), para la oxidación de los HICOS del ARA, cuando se inicia con un método físico de reducción se concluye con un biológico (Sánchez-Yáñez, 2008).

## **1.2 Detergentes**

Un aspecto indispensable de la BIS de suelo contaminado con una elevada concentración de ARA es la aplicación de un detergente, que en la concentración adecuada emulsifique una extensa diversidad de HICO del ARA (Wong *et al.*, 2004). Los detergentes están formados por una fracción polar hidrofílica y una no polar, que los mantiene en la interfase aceite/agua, un efecto determinante entre el suelo y el ARA, que es relacionado con los mecanismos de solubilización y mineralización del ARA (González *et al.*, 2010).

### **1.3 Solución mineral**

Éstas son mezclas de sales inorgánicas de N como;  $\text{NH}_4^+$ , que estimulan a la microbiota heterotrófica aerobia del suelo, que adicionados en su forma más simple son absorbidos rápidamente por los microorganismos para iniciar la oxidación del ARA, el P como fuente de  $\text{PO}_4^-$ ; es un elemento importante para la síntesis de ácidos nucleicos y transferencia de energía, mientras que el S; en su forma inorgánica como  $\text{SO}_4$ ; participan en la síntesis de proteína, mientras que los microelementos son necesarios en concentraciones bajas, como los iones: manganeso (Mn), hierro (Fe), cobre (Cu), zinc (Zn), molibdeno (Mo), son fundamentales para el metabolismo primario de los microorganismos, en la activación de enzimas y vitaminas, que contribuye a restaurar el equilibrio mineral, con ello estimula la microbiota autóctona del suelo para mineralizar el ARA (Sánchez-Yáñez 2011).

### **1.4 Leguminosas *Phaseolus vulgaris* y *Vicia sativa* o abono verde**

Las leguminosas son incorporadas como abono verde por su aporte de nitrógeno, que influye en una mejor mineralización de los HICOS. La materia orgánica que aporta el abono verde tiene como función la absorción de HICOS, mediante un mecanismo fisicoquímico de enlaces de hidrogeno y la interacción ión-dipolo, que favorece tanto la oxidación y cometabolismo para reducir una fracción de HICOS del ARA (Prager et al., 2002 & Sánchez-Yáñez, 2008).

### **1.5 Lombricomposta**

La lombricomposta es usada como parte de la estrategia de BIS para disminuir rápidamente el exceso del ARA, donde enriquece el suelo con una mezcla de

minerales de  $\text{NH}_4^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , materia orgánica de fácil degradación como celulosa y almidón, además de aporta una carga adicional microbiana debido a que es producto del metabolismo de la lombriz, que con la microbiota nativa del suelo contribuye a la eficaz oxidación de una fracción del ARA, mediante acciones directas de oxidación de los HICO alifáticos y apoyar el cometabolismo para oxidar una parte de la fracción aromática, dado que los residuos de la materia orgánica vegetal de la LOCO es usada como energía alterna para la hidrólisis de la parte compleja del ARA (Ferrera-Cerrato *et al.*, 2006)

### **1.6 Peróxido de hidrógeno**

El  $\text{O}_2$  es un factor crítico en la BIO de suelos impactados con HICOS, debido a que los microorganismos aerobios dependen de  $\text{O}_2$  para la generación de energía, un problema que se resuelve con la aplicación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , debido a que es más soluble que el  $\text{O}_2$ , donde su hidrolisis libera  $\text{O}_2$  e induce a la microbiota autóctona para la oxidación de HICOS del ARA (Sánchez-Yáñez 2011).

### **1.7 Cometabolismo**

El cometabolismo es una acción bioquímica para producir energía alterna, que consiste en la transformación de un cosustrato en presencia de un sustrato, donde el sustrato actúa como un donador de electrones que aporta energía, y mantenimiento celular, además de permitir la reducción de los HICOS del ARA a compuestos más simples, por lo que son usados por la microbiota autóctona heterotrófica del suelo como fuente única de carbón y energía (Alexander 1978 & Sánchez-Yáñez 2008).

## 2. Antecedentes

Existen investigaciones que sustentan que la BIS es una alternativa aplicada como estrategia única, por acción integral de los factores físicos, químicos y biológicos, que generalmente solo reduce una fracción de HICOS, como se muestra a continuación:

- Basumatary *et al.*, 2012 un suelo contaminado con 81,500 ppm de petróleo ligero, empleo la fitorremediación (FITO) con *Cyperus rotundus*, lo que señala que la concentración de petróleo crudo se disminuyó a 49,878 ppm, una concentración de 11 veces mayor, al límite máximo permisible por la NOM-138.
- Osadolor *et al.*, 2013 reportaron un suelo contaminado con 76,460 ppm de ARA, por medio de FITO con *Melampodium Paludosum* lo eliminó hasta 30,460 ppm, lo que señala que la concentración 7 veces mayor al máximo permitido por la NOM-138.
- Balderas *et al.*, 2015 en un suelo impactado por 75,000 ppm de ARA, por BIS doble y secuencial con SOMI/*Phaseolus vulgaris* o AVE, seguido de FITO con *S. vulgare* inoculado con *Bacillus cereus* y *Burkholderia cepacea*, disminuyó a 800 ppm, este valor indica la capacidad metabólica del *S. vulgare* inoculado con las bacterias promotoras del crecimiento vegetal mencionadas anteriormente degradaron el ARA a un nivel no tóxico según lo establecido por la NOM-138.

Con base en las investigaciones antes señaladas sobre biorremediación de suelo contaminado con elevados niveles de ARA, es necesario utilizar una estrategia integral de BIO y FITO, bajo la idea que el exceso de ARA requiere más de una acción. Es por ello que un aspecto innovador es la BIS integral de un suelo contaminado con 75,000 ppm de ARA con un surfactante, SOMI, lombricomposta al 3%, *P. vulgaris* y *V. sativa* o abono verde y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; por tal motivo se plantea la BIS controlando es eficaz controlando los factores físicos, químicos y biológicos, es posible evitar el siguiente paso de FITO, un factor crítico durante la BIO es la

aplicación de detergente y la aplicación continua de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en dosis bajas del 0.5%, como un generador de O<sub>2</sub> para acelerar la mineralización permanente. Un aspecto innovador que ninguna investigación considera es el control del pH del suelo, por tal motivo la mineralización, con el control del pH del suelo y el manejo de la humedad al 80%, permite una mayor difusión de H<sub>2</sub>O y gases, lo que hace posible que la concentración del ARA se reduzca a una concentración inferior a la establecida por la NOM-138.

Con base a los antecedentes y a la escasa información se ha planteado la siguiente hipótesis:

### **3. Hipótesis**

La BIS de un suelo impactado con 75,000 ppm de ARA por BIS mediante SOMI + detergente, LOCO al 3%, *P. vulgaris/V. sativa* o AVE y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para reducir el ARA a una concentración inferior a la máxima permisible por la NOM-138.

### **4. Objetivo**

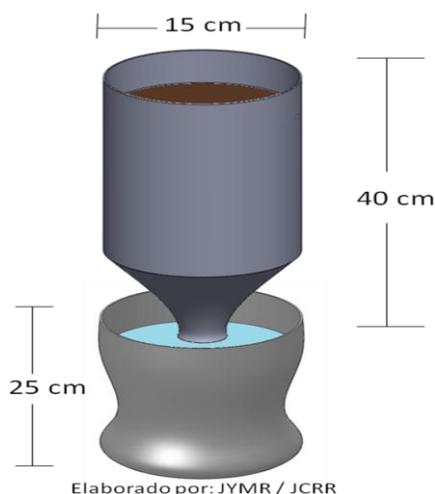
La BIS de un suelo impactado por 75,000 ppm de ARA con SOMI + detergente, LOCO, *Phaseolus vulgaris/Vicia sativa* o AVE y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, para reducir el ARA a un valor inferior al máximo permisible por la NOM-138.

## 5. Materiales y métodos

Esta investigación fue realizada en el invernadero del laboratorio de Microbiología Ambiental del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la UMSNH, cuyas condiciones microclimáticas promedio son una temperatura de 23.2° C, luminosidad de 450  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y humedad relativa de 67%.

### 5.1 Preparación de jarras de Leonard

El suelo del ensayo se solarizo por 48 h para minimizar el problema de plagas y enfermedades, posteriormente se tamizó con una malla del No. 20 y se impactó con 75,000 mg/kg de ARA de un taller mecánico automotriz diluido en agua con un detergente comercial al 0.5% (p/v). Después un 1.0 Kg suelo se colocó en el contenedor superior de la jarra de Leonard, mientras que la SOMI o agua en el reservorio de la parte inferior, ambas partes se conectaron por una tira de algodón de aproximadamente de 35 cm de largo que permitió el movimiento por capilaridad al suelo como se muestra en la figura 1; según el tratamiento especificado en la Tabla 1 con un diseño experimental de bloques al azar, que consistió en 1 tratamiento con 6 repeticiones, los 2 controles que fueron; suelo sin contaminar por ARA irrigado solo con agua o control absoluto (CA); el mismo suelo con ARA, irrigado solo con agua sin BIS o control negativo (CN).



**Figura 1. Jarra de Leonard (García-Gonzales et al., 2005)**

**Tabla 2. Diseño experimental para la bioestimulación triple y secuencial de suelo contaminado con 75,000 ppm de aceite residual automotriz.**

Suelo tratado con	Aceite residual automotriz	Solución mineral al 100%	Lombri-composta al 3%	<i>Phaseolus vulgaris</i> / <i>Vicia sativa</i> (abono verde) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Sin bioestimulación ni fitorremediación (control negativo)	+	-	-	-	-
Bioestimulación	+	+	+	+	+

(+)= agregado, (-)= no agregado, n=6

## 5.2 Bioestimulación de suelo

El suelo bioestimulado con SOMI + detergente, LOCO al 3%, *P. vulgaris*/ *V. sativa* como AVE y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La BIS del suelo con ARA primero con la SOMI de la siguiente composición química g/L: NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 10; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.0; MgSO<sub>4</sub> 0.5 ; NaCl, 0.1; CaCl<sub>2</sub>, 0.1; FeSO<sub>4</sub> y 1.0 ml/L de una solución de microelementos g/L: H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 2.86 ; ZnSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 0.22 ; MgCl<sub>2</sub>•7H<sub>2</sub>O 1.81 pH 6.8. La SOMI se aplicaron 18 mL cada 3 días por 30 días (Vallejo *et al.*, 2005). En la segunda BIS por LOCO

al 3% (p/p), por 30 días (Leal, 2003). Posteriormente en la BIS se sembró *P. vulgaris* inoculado con *P. chrysogenum* y *M. echinospora*, que se incorporó como AVE; para lo cual *P. chrysogenum* y *M. echinospora* se cultivaron en agar hueso de aguacate (AHA) g/L: hueso de aguacate 10, peptona caseína 5, extracto de levadura 1.3,  $K_2HPO_4$  0.17,  $KH_2PO_4$  2.61,  $MgSO_4$  1.5, NaCl 0.9,  $CuSO_4$  0.05, azul de bromotimol 10ppm, detergente al 10% 2.5, oligoelementos 1, agar 18.0gr, pH 5.5. La semilla de *P. vulgaris* que inoculada con *P. chrysogenum* y/o *M. echinospora* y se sembró en suelo, 25 días después *P. vulgaris*, se incorporó al suelo como AVE, y se dejó mineralizar por 30 días (Osaigbovo *et al.* 2013), al finalizar este periodo se midió la concentración de ARA por Soxhlet (Hernández-Valencia & Mager 2003; Domínguez-Rosado *et al.* 2004). Durante la BIS del suelo se mantuvo su capacidad de campo al 80% con la SOMI para asegurar el suministro de  $O_2$ , que mejora la oxigenación durante la mineralización del ARA.

### **5.3 En suelo densidad de los microorganismos oxidantes del aceite residual automotriz**

Se cuantificó la densidad de los microorganismos heterotróficos aeróbicos oxidantes de ARA por cuenta viable en placa (CVP); para ello se tomó 1.0 g de suelo disuelto en 9.0 ml de NaCl 0.85%, y se realizaron diluciones desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ , se usó 0.2 mL de la dilución seleccionada en agar ARA (AARA) con la siguiente composición g/L: peptona de caseína, 5.0; extracto de levadura, 1.0;  $H_2PO_4$ , 2.5;  $HPO_4$ ,  $MgSO_4$ , 2.5; NaCl, 1.0; solución de oligoelementos, 1.0 mL, azul de bromotimol al 0.01%, 5.0 mL; agar, 18.0, ARA emulsificado con detergente al 4%; el medio de cultivo se ajustó a pH 7.0; las cajas se incubaron a 30°C por 48 h por triplicado. (Abioye *et al.*, 2011).

#### **5.4 En suelo control de pH durante la bioestimulación**

El control de pH se llevó a cabo tomando una muestra de suelo, que fue secada y tamizada, enseguida se pesaron 10g de suelo que se colocaron en un vaso de precipitado de 50 mL y se agregaron 20 mL de agua destilada, después de dejó reposar por 30 minutos, enseguida se agitó por 20 segundos y se determinó el pH de la suspensión del suelo. El pH del suelo fue regulado con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (carbonato de sodio), 1g por cada 500g de suelo, posteriormente se midió el pH nuevamente del suelo (Sánchez-Yáñez. 2007).

#### **5.5 En suelo determinación de la concentración del aceite residual automotriz por Soxhlet**

Finalmente en suelo se midió la concentración de ARA como se indica a continuación; se transfirieron 5.0 g de suelo, previamente seco y tamizado en malla No 20, enseguida se colocó el cartucho dentro del extractor Soxhlet, en la parte inferior ajusto el matraz con cuerpos de ebullición (llevados previamente a peso constante por calentamiento a 100 – 110°C), después se añadió éter por el extremo superior del refrigerante en cantidad suficiente para tener 2 ó 3 descargas del extractor (alrededor de 80 ml), en seguida se colocó refrigerante y se hizo circular el agua por el refrigerante y calentar hasta que se obtenga una frecuencia de unas 2 gotas por segundo, posteriormente se efectúa la extracción durante 4 a 6 horas, al finalizar la extracción se evapora suavemente el éter restante del matraz y se seca hasta peso constante (NMX-F-089-S-1978). Los resultados se validaron con ANOVA/Tukey HSD  $P < 0.05\%$  con el programa estadístico Statgraphics Centurión.

## **5.6 En suelo determinación del perfil de hidrocarburos del aceite residual automotriz remanentes en el suelo por cromatografía de gases**

El suelo contaminado con ARA se conservó a 4 °C, se secó a temperatura ambiente por 48 h y se homogenizó. Se tomaron tres muestras de 3 g, para un total de tres repeticiones. Posteriormente se colocaron en tubos de cultivo de 10 mL con tapón rosca, y se adicionaron 3 mL de hexano (pureza 98.5 %, ACS-Sigma Aldrich grado HPLC); se agitaron por 60 s en Vortex Genie II, y se filtró tres veces en embudo de separación; posteriormente se pasó por otro filtro, de algodón de 0.5 cm, y 1 g de MgSO<sub>4</sub>. Finalmente se evaporó el solvente por 24 h en temperatura ambiente, y se aforó cada muestra a 1 mL para su posterior análisis.

Las muestras de suelo con ARA se analizaron en cromatógrafo de gases, Agilent Technologies serie 7890A, acoplado a masas serie 5975C; se inyectó 1 µL de muestra modo Splitless y se usó helio (99.995 % pureza) como gas de acarreo en una columna capilar Zebron- 5MS de 30 m de longitud, con diámetro interno de 0.25 mm y espesor de película de 0.25 mm. La temperatura del inyector fue de 250 °C y la inicial del horno de 50 °C con rampa de 30-150 °C, rampa 2 de 10 °C por min hasta 310 °C por 2 min. El detector de temperatura fue de 280 °C con tiempo de equilibrio de 3 min y una temperatura máxima de 320 °C (Peng, Zhou, Cai, & Zhang, 2009)

En la tabla 3 se muestran las propiedades fisicoquímicas del suelo sin aceite residual automotriz.

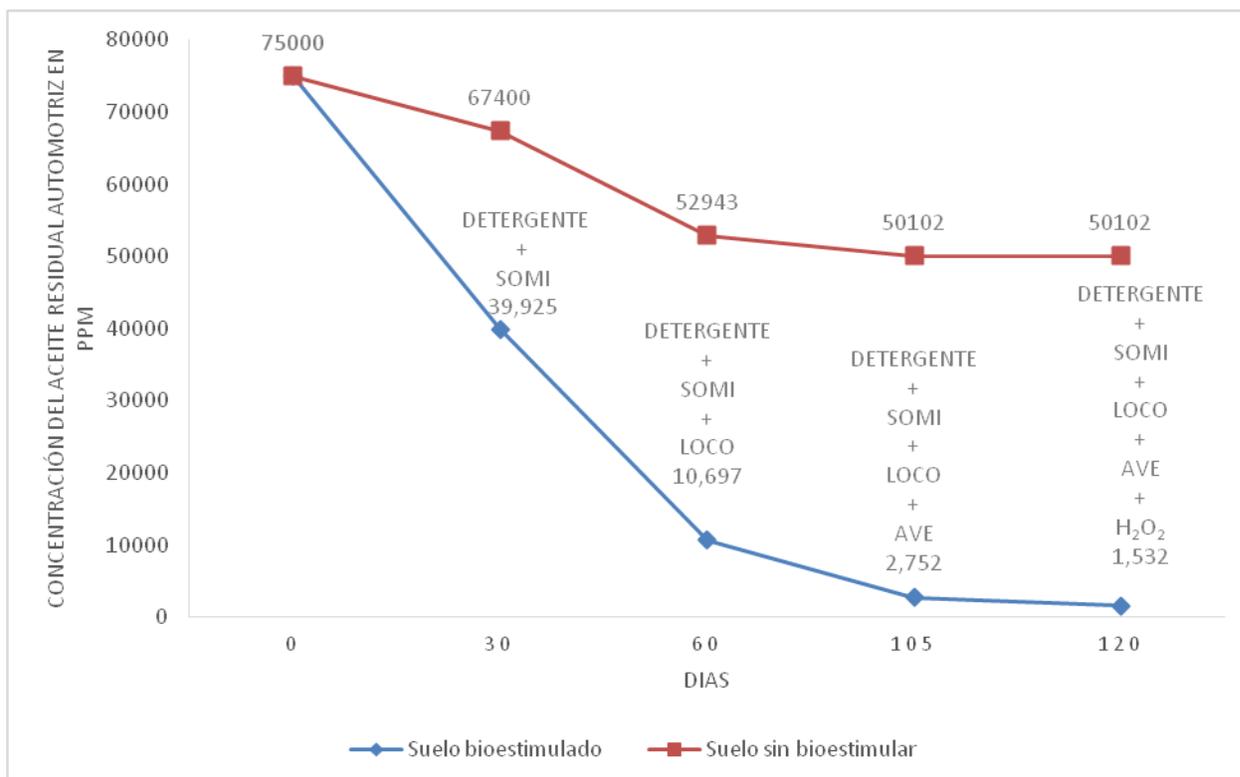
**Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas del suelo sin aceite residual automotriz.**

<b>Parámetro</b>	<b>Valor</b>
pH (1:20)	6.64
Material orgánica (%)	4.57
Capacidad de intercambio catiónico (Cmol(+) Kg <sup>-1</sup> )	4.61
Textura (%)	40.56(Ac)-37.28(L)-22.16(Ar)
Densidad real (g/cm <sup>3</sup> )	2.01
Densidad aparente (g/cm <sup>3</sup> )	1.08
Porosidad** (%)	46.35
Saturación de humedad (%)	46.95
Capacidad de campo *** (%)	30.08
Humedad aprovechable (%)	<b>13.25</b>
<b>Ar: arena, L: limo, Ac: arcilla / *Para suelos de origen volcánico,  **Calculada a partir de Da y Dr; /*** Estimada a partir de textura,  *Reportada para suelos franco-arcilloso NOM-021-RECNAT-2000.</b>	

## 6. Resultados

En la figura 2 se muestra la BIS secuencial y acumulativa de un suelo impactado por 75,000 ppm de ARA con detergente al 0.5%, SOMI, LOCO al 3% y *P. vulgaris*/*V. sativa* como AVE y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, por 120 días mantenido a una capacidad de campo del 80%, donde se registró una disminución desde 75,000 ppm hasta 39,925 ppm en la primera BIO con detergente al 0.5% (solo una aplicación) Y SOMI, seguido LOCO al 3% decreció la concentración a 10,697 ppm, mientras que con *P. vulgaris* y *V. sativa* incorporado como AVE y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se reportó que se degradó la concentración a 2,752 ppm, al finalizar se controló el pH del suelo y se mantuvo la capacidad de campo aplicando SOMI, dando como resultado la reducción de 2,752 ppm a 1,532 ppm de ARA.

**Figura 2. En suelo concentración de aceite residual automotriz bioestimulado secuencial y acumulativa mediante solución mineral + detergente, lombricomposta al 3% *Phaseolus vulgaris* y *Vicia sativa*, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, incorporados como abono verde por 105 días.**



**SOMI= solución mineral, LOCO= lombricomposta al 3%, AVE= *Phaseolus vulgaris* y *Vicia sativa* como abono verde, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>= peróxido de hidrogeno al 0.5%.**

**Tabla 4. En suelo cuantificación de la población microbiana heterotrófica oxidante del aceite residual automotriz, inducida por bioestimulación con solución mineral, lombricomposta al 3% y *Phaseolus vulgaris* como abono verde.**

Población microbiana heterotrófica oxidante del aceite residual automotriz (UFC/g de suelo)	Bacterias	Bioestimulación	8.68 <sup>a*</sup>
		Control negativo	6.48 <sup>b</sup>
	Hongos	Bioestimulación	7.11 <sup>b</sup>
		Control negativo	4.04 <sup>c</sup>
	Actinomicetos	Bioestimulación	7.33 <sup>b</sup>
		Control negativo	3.15 <sup>c</sup>

Las letras distintas con diferencia estadística de 0.025% según Tukey.

En la tabla 4, muestra en suelo la cuantificación de la población microbiana heterotrófica aerobia nativa oxidante de ARA inducida por BIS secuencial y acumulativa con detergente al 0.5%, SOMI, LOCO al 3% y *Phaseolus vulgaris* o abono verde por 105 días. donde se registró en las bacterias alcanzaron un valor de 8.68, actinomicetos 7.33 de hongos 7.11 UFC g<sup>-1</sup> de suelo seco; estos valores comparados con ese mismo suelo contaminado con ARA o CN en la que reporto en bacterias 7.48, de los actinomicetos 5.15, de hongos 5.04.

**Tabla 5. En suelo impactado con 2,750 ppm dinámica del pH durante la bioestimulación mediante *Vicia sativa* o abono verde y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

pH de suelo sin contaminar irrigado con agua (control absoluto)	pH de suelo a partir de 2,752 ppm de aceite residual automotriz	pH de suelo contaminado irrigado con agua (control negativo)
6.64	4.70 – 2,750 ppm	6.42
6.67	4.95 -- 1,674 ppm	6.40
6.65	5.35 – 1,636 ppm	6.45
6.70	6.53 – 1,532 ppm	6.51

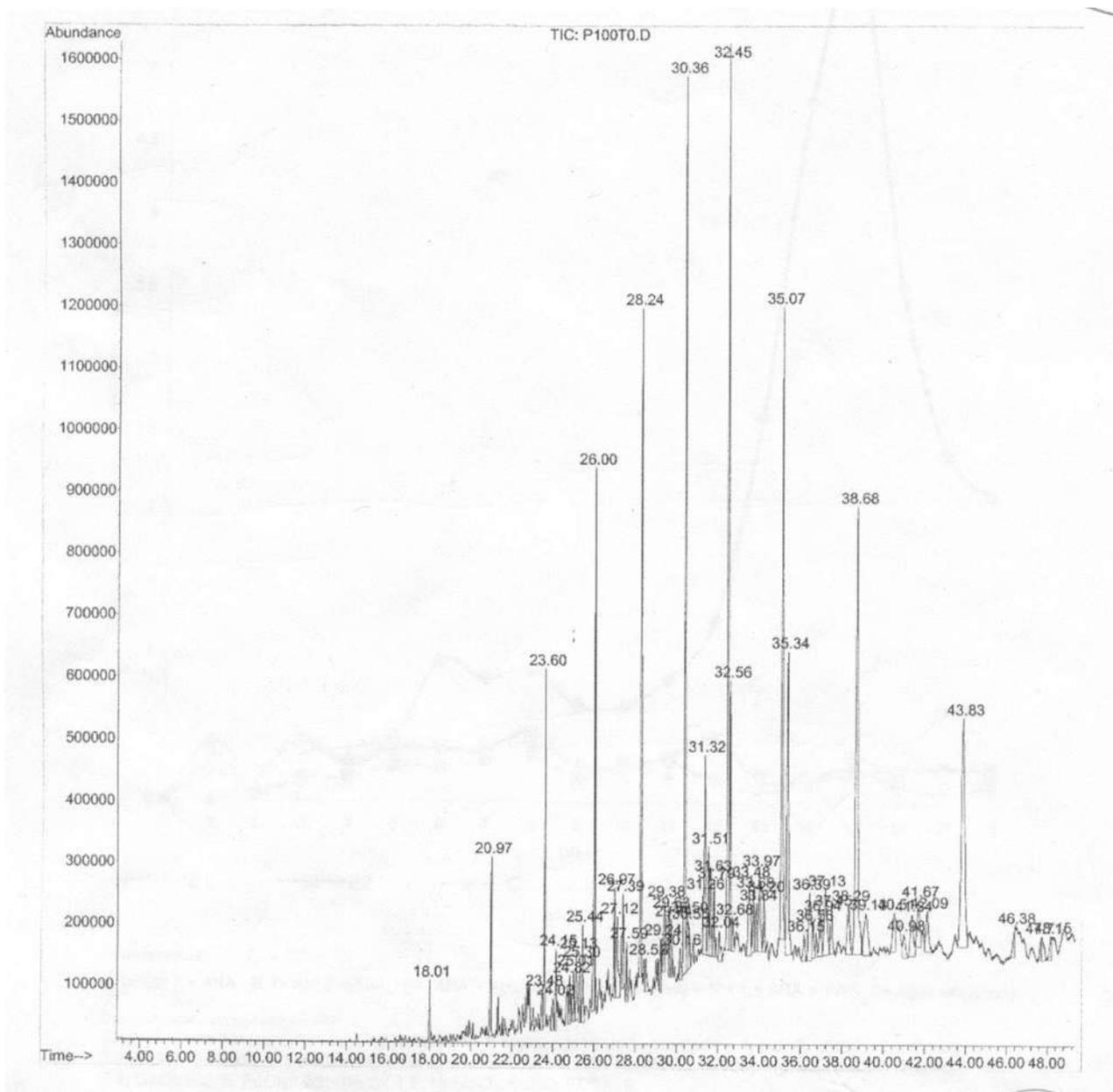
**Los valores del pH representan el promedio de dos repeticiones.**

En la tabla 5, señala que suelo sometido a bioestimulación secuencial y acumulativa con detergente al 0.5%, SOMI, LOCO al 3% *P. vulgaris* / *V. sativa* y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 105 días, donde se muestra un notable cambio en la dinámica del pH, donde existió una variación mínima entre el control negativo y absoluto, mientras en el suelo bioestimulado se aprecia una disminución hasta 4.70 considerado pH ácido.

La figura 3 señala la cromatografía de gases del suelo contaminado con 75,000 ppm de ARA, al inicio de la BIO; donde se observan picos de elución con tiempos que pertenecen a la fracción ligera de HICOS del ARA, y otros que pertenecen a la fracción pesada (mayores). En el tiempo cero del ensayo se observó que el ARA

contienen una mezcla de HICOS alifáticos lineales y ramificados, desde 12 hasta 35 carbonos de la clase del dodecano, tetradecano, octadecano y eicosano; ramificados como; pristano y el fitano; algunos aromáticos como el benceno, el fenol, el benzoantraceno, el metildifenilo y el naftaleno (Sharifi et al., 2007)

**Figura 3. En suelo cromatograma de suelo contaminado con 75,000 ppm de aceite residual automotriz antes de su bioestimulación al tiempo cero.**





## 7. Discusión

Los resultados anteriores apoyan que la BIS secuencial y acumulativa en suelo contaminado con 75,000 ppm de ARA como se muestra en la figura,1 que con la aplicación de detergente al 0.5% seguido de SOMI por 45 días, manteniendo la capacidad de campo al 80%; el detergente favoreció la emulsificación del ARA, para su oxidación por la microbiota del suelo, mientras que el enriquecimiento con SOMI tuvo un efecto directo en la mineralización del ARA por acción de la microbiota del suelo, considerado de acción directa por la disponibilidad de las sales de;  $\text{NH}_4$ ,  $\text{NO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , así mismo reestableció la relación C/N, para una mineralización más rápida, mientras que la capacidad de campo al 80% permitió el intercambio de gases y  $\text{O}_2$ , lo que estimuló la mineralización del ARA (Vallejo *et al.*, 2005, Pasaye, 2011).

Al transcurrir la primera BIS con el proceso de mineralización activo se continuó con LOCO al 3%, para mantener el proceso oxidativo por el aporte de nutrientes con sales minerales de  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ . Al mismo tiempo se incorporó compuestos orgánicos como: urea y nucleótidos, así como el suministro de materia orgánica: celulosa, almidón y azúcares de fácil degradación para mantener la mineralización del ARA, con la fracción aromática parcialmente degradada por cometabolismo, dado que la lombricomposta es un producto digestivo, aporta microorganismo que contribuyen en la mineralización de una fracción sencilla del ARA (Maldonado-Chávez *et al.*, 2010; Juárez-Cisneros & Sánchez-Yáñez, 2014), antes de concluir la BIS con LOCO se agregaron las leguminosas; *P. vulgaris/V. sativa* o AVE en etapa de plántula por la ausencia de lignina, con ello se incorporó al suelo materia orgánica como; almidón, celulosa y glucosa de fácil degradación con una adecuada relación C/N, que permite una mayor mineralización de los HICOS del ARA, por otra parte la materia orgánica proporcionada por el AVE, tiene la capacidad de absorber los HICOS del ARA formado compuestos más simples, además de estimular la actividad biológica oxidante del ARA, al reestablecer el balance de nutrientes por el alto contenido de proteína fácilmente degradable,

como nucleótidos y vitaminas, con ello aumenta la población microbiana y su actividad para continuar la mineralización del ARA (Sánchez-Yáñez, 2011; Asquit *et al.*, 2012), con la aplicación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.5% favoreció al aporte de O<sub>2</sub>, un factor limitante la β-oxidación y la aceleración de la mineralización de los HICOS del ARA, con una concentración final de la BIS de 1,532 ppm un valor inferior al máximo permisible por la NOM-138. El valor obtenido por la BIS de 1,532 ppm fue estadísticamente diferente comparado con el mismo suelo contaminado con 75,000 ppm de ARA sin bioestimular o CN, con una mínima disminución por atenuación natural a 50,102 ppm, que por la falta de nutrientes esenciales de N, P y K, el impedimento de la difusión de gases y agua, la presencia de compuestos tóxicos de los HICOS en el suelo, así como el desequilibrio de la concentración C/N, que impide el crecimiento de poblaciones microbianas aerobias con el potencial de mineralizar el ARA, por lo que la atenuación natural es insuficiente para la remediación de suelos con altas concentraciones de HICO (Gómez *et al.*, 2009).

En la tabla 4, sugiere que durante la BIS secuencial y acumulativa hubo una mayor disponibilidad de nutrientes esenciales de N y P, así como una mejor difusión de gases y O<sub>2</sub>, que influyeron directamente en la actividad de la microbiota autóctona del suelo para la mineralización de los HICOS del ARA, mientras que en el suelo contaminado sin BIS o CN, se reporta una menor concentración de microbiota capaz de mineralizar los HICOS del ARA, lo que sugiere que es debido al desbalance nutricional y la escasa o nula difusión de gases y O<sub>2</sub>, lo que señala que la atenuación natural es insuficiente para permitir mayor diversidad microbiana oxidante de los HICOS del ARA (Gómez *et al.*, 2009)

En la tabla 5, durante la mineralización del ARA el pH se acidificó en comparación al suelo CA, lo que sugiere que durante la mineralización del ARA, se generaron ácidos orgánicos, provocaron la acidificación del suelo (Rivera-Cruz *et al.*, 2004), por lo tanto, cuando el pH se encuentra ácido disminuye la diversidad de microorganismos en suelo, lo cual indica que la mineralización de los HICOS es

lenta, además de afectar la biodisponibilidad de fuentes de carbono y energía, siendo un factor crítico, lo que hace necesario mantener el pH entre 6.5 y 7.0, ya que afecta directamente la actividad de la microbiota autóctona del suelo además de la solubilidad y la absorción de los contaminantes y nutrientes (Romero, 2008).

La figura 3 del perfil cromatográfico demuestra la amplia diversidad y complejidad de esta mezcla del ARA (Sharifi et al., 2007), mediante la BIOS secuencial y acumulativa (Banks et al., 2003) para lograr su reducción a un nivel inferior al máximo permitido por la NOM-138. En la figura 4, presenta la desaparición de los HICOS alifáticos de cadena larga como: dodecano, tetracosano, heptacosano, nonadecano y eicosano; también desaparecieron los HICOS aromáticos: benceno, tolueno, xileno, benzoantraceno y naftaleno considerados tóxicos para el ambiente. esto prueba que la BIOS secuencial y acumulativa, indujo una amplia diversidad microbiana para eliminar la complejidad de los HICOS del ARA,

## **8. Conclusión**

La BIS es una alternativa de restauración de suelo contaminado con HICOS del ARA, que requiere de acciones secuenciales y acumulativas al integrar factores físicos como; capacidad de campo, mientras en químicos; disponibilidad de O<sub>2</sub>, la adición de nutrientes por medio de la aplicación de SOMI, el N aportado por el AVE y control de pH, y en los biológicos es muy importante la diversidad de microorganismos oxidantes del ARA para reducir a una concentración inferior a la máxima establecida por NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012.

## 9. Referencias

- 1) Abioye, O. P., Agamuthu, P., & Abdul Aziz, A. R. 2012. Biodegradation of used motor oil in soil using organic waste amendments. *Biotechnology research international*.2012
- 2) Abdulsalam, S., & 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(3): 747-754.
- 3) Alexander M., 1978. Introducción a la microbiología del suelo, AGT, México, 491 p
- 4) Asquith E., Geary M., Nolan A., Evans C. 2012. Comparative Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Soil by Biostimulation, Bioaugmentation and Surfactant Addition. *Journal of Environmental Science and Engineering*: 637-650.
- 5) April, T. M., Foght, J. M., & Currah, R. S. 1999. Hydrocarbon-degrading filamentous fungi isolated from flare pit soils in northern and western Canada. *Canadian Journal of Microbiology*, 46(1), 38-49.
- 6) Balderas-León, I., & Sánchez-Yáñez, J. M. 2015. Biorremediación de suelo contaminado con 75000 ppm de aceite residual automotriz por bioestimulación y fitorremediación con *Sorghum vulgare* y *Bacillus cereus* y/o *Burkholderia cepacia*. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 6(1), 23-32.
- 7) Banks, M. K., Kulakow, P., Schwab, A. P., Chen, Z., & Rathbone, K. 2003. Degradation of crude oil in the rhizosphere of *Sorghum bicolor*. *International Journal of Phytoremediation* 5(3): 225-234.
- 8) Basumatary B, Bordoloi S, Sarma HP. Crude Oil-Contaminated Soil Phytoremediation by Using *Cyperus brevifolius* (Rottb.) Hassk. *Water Air Soli Poll.* 2012a; 223(6): 3373-3383.

- 9) Castro, J. L. P., Rojas, M. C. P., & de Mesa, J. B. L. (2004). Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo. *Nova*, 2(2).
- 10) De Vasconcellos, S. P., Angolini, C. F. F., García, I. N. S., Dellagnezze, B. M., da Silva, C. C., Marsaioli, A. J., ... & de Oliveira, V. M. 2010. Screening for hydrocarbon biodegraders in a metagenomic clone library derived from Brazilian petroleum reservoirs. *Organic Geochemistry*, 41(7), 675-681.
- 11) Del Carmen Rivera-Cruz, M., Ferrera-Cerrato, R., Haller, V. V., Vázquez, R. R., & Linares, L. F. 2002. Adaptacion y seleccion de microorganismos autoctonos en medios de cultivos enriquecidos con petroleo crudo. *Terra, LATINOAMERICANA* 20, 423-434.
- 12) Dominguez-Rosado, E., Pichtel, J., & Coughlin, M. 2004. Phytoremediation of soil contaminated with used motor oil: I. Enhanced microbial activities from laboratory and growth chamber studies. *Environmental Engineering Science* 21(2): 157-168.
- 13) Dominguez-Rosado, E., & Pichtel, J. 2004. Phytoremediation of soil contaminated with used motor oil: II. Greenhouse studies. *Environmental Engineering Science* 21(2):169-180.
- 14) El-Naggar, AY; MM Kamel; YM Hassan; KAYoussef; AA Al-Adly & NA Ismail. 2012. Gas Chromatographic Assessment for Bioremediation of Hydrocarbons pollutants Using *Bacillus Amylolyquefaciens*. *Archives of Applied Science Research* 4(4): 1593-1599.
- 15) Ferrera-Cerrato R, Alarcón A, Trejo-Aguilar D, Sangabriel W, Mendoza-López M, Cruz-Sánchez J, et al. Fitorremediación de un suelo contaminado con combustóleo utilizando *Phaseolus coccineus* y fertilización orgánica e inorgánica. *Agrociencia*. 2007; 41: 817-826.
- 16) García-González, M. M., Farías-Rodríguez, R., Peña-Cabriales, J. J., & Sánchez-Yáñez, J. M. 2005. Aminoácidos del trigo var. Pavón con *Azospirillum* spp. y *Azotobacter beijerinckii*. *Terra Latinoamericana* 23(1): 65-72.

- 17)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.
- 18)González, H. H. R., Bustillos, L. G. T., Fernández, I. M., Cortes, J. D. J. B., & Moroyoqui, P. G. 2010. Efectos de los surfactantes en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Química Viva*, 9(3), 120-145.
- 19)Hernández-Valencia, I., & Mager, D. 2003. Uso de *Panicum maximum* y *Brachiaria brizantha* para fitorremediar suelos contaminados con un crudo de petróleo liviano. *Bioagro* 15(3): 149-155.
- 20)Izinyon, O. C., & Seghosime, A. 2013. Assessment of Show Star Grass (*Melampodium Paludosum*) for Phytoremediation of Motor Oil Contaminated Soil. *Civil and Environmental Research* 3(3): 19-28.
- 21)Juárez-Cisneros, G., & 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 the Selva Andina Biosphere*, 2(1), 15-22.
- 22)Larenas Parada, G., & De Viana, M. L. 2005. Germinación y supervivencia del pasto cubano *Tithonia tubaeformis* (Asteraceae) en suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo. *Ecología Austral* 15(2): 177-181.
- 23)Leitão, A. L. 2009. Potential of *Penicillium* species in the bioremediation field. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6(4): 1393-1417.
- 24)Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación. Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SS-2003. Diario Oficial de la Federación, 29 de marzo de 2005.
- 25)Maldonado-Chávez, E., Rivera-Cruz, M. C., Izquierdo-Reyes, F., & Palma-López, D. J. 2010. Efectos de rizosfera, microorganismos y fertilización en

- la biorremediación y fitorremediación de suelos con petróleos crudo nuevo e intemperizado. *Universidad y Ciencia*, 26(2), 121-136.
- 26) Millioli, V. S., Servulo, E. L. C., Sobral, L. G. S., & De Carvalho, D. D. 2009. Bioremediation of crude oil-bearing soil: evaluating the effect of rhamnolipid addition to soil toxicity and to crude oil biodegradation efficiency. *Global NEST Journal*, 11(2), 181-188.
- 27) Norma oficial mexicana, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. Norma Oficial Mexicana NOM-021- RECNAT-2000. Diario Oficial de la Federación, 31 de diciembre de 2002.
- 28) NMX-F-089-S-1978. Determinación de extracto etéreo (método soxhlet) en alimentos. foodstuff-determination of ether extract (soxhlet). Normas Mexicanas. Dirección -General de Normas.
- 29) Osaigbovo, A. U., Law-Ogbomo, K. E., & Agele, S. O. 2014. Effects of Spent Engine Oil Polluted Soil and Organic Amendment on Soil Chemical Properties, Micro-Flora on Growth and Herbage of *Telfairia Occidentalis* (hook f). *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences* 6(1): 72-78.
- 30) Prager, M.; Sanclemente, O.; Sánchez de P, M.; Gallego, D. y Ángel, D. 2012. Abonos verdes: tecnología para el manejo agroecológico de los cultivos. *En: Agroecología*, vol. 7, p. 53-62
- 31) Rinaldi, A., & Da Silva, M. R. 2011. Degradation of BTX in contaminated soil by using hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and potassium permanganate (KMnO<sub>4</sub>). *Water, Air, & Soil Pollution*, 217(1-4), 245-254.
- 32) Romero, S. E. G. 2008. Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos. *Nova*, 6(9).
- 33) Roselene, H. 2014. A Study on Remediation of Polluted Water Using *Canna indica*. *International Journal of Research & Review* 1(1):1-15.
- 34) Sánchez-Yáñez J M. 2007. Breve Tratado de Microbiología Agrícola, Teoría y Práctica. Ed. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, CIDEM, Secretaria de Desarrollo Agropecuario del Gobierno del Estado de

- Michoacan. SA de CV Morelia, Mich, México. 2007. ISBN: 978- 970-95424-1-7.
- 35) Sánchez-Yáñez, J. M. 2008. Biorremediación (Antología). Ed. Secretaría de Difusión Cultural y Extensión Universitaria. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Centro de Investigación y Desarrollo del Estado de Michoacán, Bionutra, S.A. de C.V. Morelia, Mich, México ISBN, 978-970.
- 36) Sánchez-Yáñez J M., 2011. Biorremediación de ambientes impactados con aceites y lubricantes en: Biorremediación, Estrategias contra la contaminación ambiental. ISBN: 978-1-59754-728-4 pp: 62-75, 79-91.  
[www.librosenred.com](http://www.librosenred.com)
- 37) Saucedo-Martínez, B. C., Montaña-Arias, N. M., Márquez-Benavides, L., & Sánchez-Yáñez, J. M. 2016. Bioestimulación de suelo impactado con 45000 ppm de aceite residual automotriz y Fitorremediación con *Zea mays* y *Burkholderia cepacia* y/o *Rhizobium etli*. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 7(2), 86-94.
- 38) Roselene, H. 2014. A Study on Remediation of Polluted Water Using *Canna indica*. *International Journal of Research & Review* 1(1):1-15.
- 39) Sharifi, M., Sadeghi, Y., & Akbarpour, M. 2007. Germination and growth of six plant species on contaminated soil with spent oil. *International Journal of Environmental Science & Technology* 4(4): 463-470.
- 40) Shirdam, R., Zand, A. D., Bidhendi, G. N., & Mehrdadi, N. 2008. Phytoremediation of hydrocarbon-contaminated soils with emphasis on the effect of petroleum hydrocarbons on the growth of plant species. *Phytoprotection*, 89(1), 21-29.
- 41) Tejada, M.; Gonzalez, J.; Gracia, A. and Parrado, J. 2008. Effects of different green manures on soil biological properties and maize yield. *In: Bioresource Technology*, vol. 99, p. 1758–1767.
- 42) Trujillo-Narcía, A., Rivera-Cruz, M. D. C., Lagunes-Espinoza, L. D. C., Palma-López, D. J., Sánchez-Soto, S., & Ramírez-Valverde, G. 2014. Parámetros biológicos de la restauración de suelos contaminados por petróleo crudo. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 1(2), 107-122.

- 43) Vallejo, V., Salgado, L., & Roldan, F. 2005. Evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de TPHs en suelos contaminados con petróleo. *Revista Colombiana de Biotecnología* 7(2): 67-78.
- 44) Volke Sepúlveda, T., & Velasco Trejo, J. A. 2002. Tecnologías de remediación. *Tecnologías de remediación para suelos contaminados. México: Instituto Nacional de Ecología.*
- 45) Wong, J. W., Fang, M., Zhao, Z., & Xing, B. 2004. Effect of surfactants on solubilization and degradation of phenanthrene under thermophilic conditions. *Journal of environmental quality*, 33(6), 2015-2025.