



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Facultad de Químico-Farmacobiología



Tesis

Biorecuperación de suelo contaminado por 75,000 ppm de aceite residual automotriz y evaluado
con *Lactuca sativa* como bioindicador

Que presenta:

Juan Luis Ignacio de la Cruz

Para obtener el título de Químico Farmacobiólogo

Director:

Dr. Juan Manuel Sánchez-Yáñez

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas

Laboratorio de Microbiología Ambiental

Morelia, Michoacán. septiembre 2017

Esta investigación fue dirigida por el Dr. Juan Manuel Sánchez-Yáñez en el laboratorio de Microbiología Ambiental. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mich, México, con el apoyo del Proyecto 2.7 “Aislamiento y selección de microorganismos promotores de crecimiento vegetal de plantas nativas de bosque y desierto” (2017) de la CIC-UMSNH y BIONUTRA SA. CV Maravatío, Mich, México.



Agradecimientos

CIC-UMSNH proyecto 2.7 (2017), BIONUTRA S.A de C.V, Maravatío y el Laboratorio de Edafología de la facultad de Biología de la UMSNH. Mich. México.

Contenido

Tabla 1. Acrónimos.....	6
Resumen	7
Abstract	10
Introducción y antecedentes	11
Hipótesis	15
Objetivos	15
Materiales y métodos	15
a. Descripción y montaje del experimento	15
Figura 1. Jarra de Leonard (García-González <i>et al.</i> , 2005)	16
b. Diseño experimental	17
Cuadro 1. Diseño experimental para analizar la bioestimulación de un suelo contaminado con 75,000 ppm de aceite residual automotriz con solución mineral, lombricomposta, <i>Phaseolus vulgaris</i> o abono verde, H ₂ O ₂ al 80% de la capacidad de campo y control del pH.....	17
Cuadro 2. Diseño experimental para demostrar la biorecuperación de suelo contaminado con aceite residual automotriz con <i>Lactusa sativa</i> inoculado con y sin <i>Aspergillus fumigatus</i> y/o <i>Streptomyces griseus</i> para acelerar su germinación.	18
c. Caracterización fisicoquímica del suelo.....	18
d. Bioestimulación del suelo con aceite residual automotriz por solución mineral, lombricomposta, <i>Phaseolus vulgaris</i> o abono verde, H ₂ O ₂ , mantenimiento de la humedad al 80% y control del pH.....	18
e. Dinámica del pH en suelo contaminado con 75,000 ppm de aceite residual automotriz mediante la bioestimulación con detergente, solución mineral, lombricomposta, <i>Phaseolus vulgaris</i> o abono verde, H ₂ O ₂ , al 80% de la capacidad e campo.....	20
f. En suelo demostración de su biorrecuperación con <i>Lactua sativa</i> inoculado con y sin <i>Asperguillus fumigatus</i> y/o <i>Streptomyces griseus</i>	20
g. En suelo cuantificación de la población bacteriana heterotrófica oxidante de aceite residual automotriz inducida por bioestimulación integral	20
h. Análisis estadístico	21
Resultados	21
Cuadro 3. Propiedades fisicoquímicas del suelo sin contaminar con aceite residual automotriz.....	21
Tabla 4. En suelo concentración de aceite residual automotriz remanente derivado de la bioestimulación con detergente, solución mineral, lombricomposta, <i>Phaseolus vulgaris</i> o abono verde, H ₂ O ₂ , 80% de la capacidad de campo y control del pH por 110 días	22

Figura 2. En suelo concentración de aceite residual automotriz remanente derivado de la bioestimulación con detergente, solución mineral, lombricomposta, <i>Phaseolus vulgaris</i> o abono verde, H ₂ O ₂ , mantenimiento de la capacidad de campo al 80% y control del pH por 110 días.....	23
Cuadro 4. En suelo cuantificación de la población microbiana oxidante de aceite residual automotriz por bioestimulación con detergente, solución mineral, lombricomposta, <i>Phaseolus vulgaris</i> o abono verde, H ₂ O ₂ , al 80% de la capacidad de campo y control del pH.....	24
Figura 3. Dinámica del pH durante la bioestimulación de un suelo contaminado con 75,000 ppm de aceite residual automotriz mediante detergente, solución mineral, lombricomposta al 3%, <i>Phaseolus vulgaris</i> o abono verde, H ₂ O ₂ , mantenimiento de la capacidad de campo al 80% y control del pH.....	25
Figura 4. En suelo biorestaurado, germinación de las semillas de <i>Lactusa sativa</i> inoculado con <i>Aspergillus fumigatus</i> y/o <i>Streptomyces griseus</i>	26
Figura 5. En suelo biorestaurado, fenotípica de <i>Lactusa sativa</i> bioindicador de la desaparición del aceite residual automotriz	27
Figura 6. En suelo biorestaurado, peso fresco aéreo y radicular de <i>Lactusa sativa</i> , inoculado con <i>Aspergillus fumigatus</i> y/o <i>Streptomyces</i>	28
Figura 7. En suelo biorestaurado, peso seco aéreo y radicular de <i>Lactusa sativa</i> con y sin <i>Aspergillus fumigatus</i> / <i>Streptomyces griseus</i> , bioindicador de la desaparición del aceite residual automotriz	29
Discusión	30
Cuadro 3. <i>Propiedades fisicoquímicas del suelo sin contaminar con aceite residual automotriz.</i> 30	
Tabla 4. <i>En suelo concentración de aceite residual automotriz remanente derivado de la bioestimulación con detergente, solución mineral, lombricomposta, Phaseolus vulgaris o abono verde, H₂O₂, al 80% de la capacidad de campo y control del pH por 110 días ...</i> 30	
Figura 2. <i>En suelo concentración de aceite residual automotriz remanente derivado de la bioestimulación con detergente, solución mineral, lombricomposta, Phaseolus vulgaris o abono verde, H₂O₂, mantenimiento de la capacidad de campo al 80% y control del pH por 110 días.....</i>	31
Cuadro 4. <i>En suelo cuantificación de la población microbiana oxidante de aceite residual automotriz por bioestimulación con detergente, solución mineral, lombricomposta, Phaseolus vulgaris o abono verde, H₂O₂, al 80% de la capacidad de campo y control del pH.....</i>	33
Figura 3. <i>Dinámica del pH durante la bioestimulación de un suelo contaminado con 75,000 ppm de aceite residual automotriz mediante detergente, solución mineral, lombricomposta al 3%, Phaseolus vulgaris o abono verde, H₂O₂, mantenimiento de la capacidad de campo al 80% y control del pH.....</i>	33
Figura 4. <i>En suelo biorestaurado, germinación de las semillas de Lactusa sativa con Aspergillus fumigatus y/o Streptomyces griseus.....</i>	34

Figura 5. <i>En suelo biorestaurado la fenotípia de Lactusa sativa bioindicador de la desaparición del aceite residual automotriz.</i>	34
Figura 6. <i>En suelo biorestaurado, peso fresco aéreo y radicular de Lactusa sativa, inoculado con Aspergillus fumigatus y/o Streptomyces.</i>	35
Figura 7. <i>En suelo biorestaurado, peso seco aéreo y radicular de Lactusa sativa con y sin Aspergillus fumigatus y/o Streptomyces griseus, bioindicador de la desaparición del aceite residual automotriz.</i>	35
Conclusión	35
Bibliografía	37

Tabla 1. Acrónimos

Acrónimo	Significado
AA	Agar avena
ABARA	Agar base aceite residual automotriz
AMAHAOARA	Actividad Microbiota autóctona heterotrófica oxidante de aceite residual automotriz
AP	Altura de planta
ARA	Aceite residual automotriz
AVE	Abono verde
BIRRE	Biorestauración
BIS	Bioestimulación
CA	Control absoluto
CN	Control negativo
COBO	Composta bovina
CR	Control relativo
HICO	Hidrocarburos
LGEEPA	Ley General de Equilibrio Ecológico y Protección Ambiental
LOCO	Lombricomposta
LR	Longitud radical
NOM-138	NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2003
PA	Aromáticos policíclicos
PDA	Agar papa dextrosa
PFA	Peso fresco aéreo
PFR	Peso fresco radical
PSA	Peso seco aéreo
PSR	Peso seco radical
SOMI	Solución mineral
UFC	Unidades formadoras de colonias

Resumen

El suelo contaminado con aceite residual automotriz (ARA), es una mezcla de hidrocarburos (HICO) alifáticos, aromáticos y trazas de metales pesados, se le clasifica como un residuo peligroso según la Ley General de Equilibrio Ecológico y Protección Ambiental (LGEEPA, 2014). 75,000 ppm de ARA es una concentración relativamente alta para la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2003 (NOM-138), cuyo límite máximo en el suelo es 4,400 ppm. En suelo el ARA le causa pérdida de fertilidad e inhibe la actividad microbiana de mineralización de la materia orgánica. Acorde con la NOM-138, una alternativa solución para eliminar el exceso de ARA del suelo, es aplicar la remediación química, con agentes oxidantes con la desventaja de que son de alto costo y causan daños colaterales. En contraste la bioestimulación (BIS) explota el potencial microbiano autóctono para oxidar el ARA y una planta bioindicadora de su eliminación análoga a la concentración natural de HICO en suelo sin contaminar. Los objetivos de esta investigación fueron; a) BIS de suelo contaminado por 75,000 ppm de ARA con detergente (DEGE), solución mineral (SOMI), lombricomposta (LOCO), *Phaseolus vulgaris* o abono verde (AVE), H₂O₂ (peróxido de hidrogeno), al 80% de la capacidad de campo y control del pH; para decrecer el ARA a valor inferior al máximo permisible de la NOM-138 y b) demostrar la biorecuperación del suelo con *Lactusa sativa*. Para ello se realizó un ensayo basado en un diseño aleatorio de 11 tratamientos con 6 repeticiones en suelo con 75,000 ppm de ARA bioestimulado con DEGE, SOMI, LOCO, *P. vulgaris* o (AVE), H₂O₂, al 80% de la capacidad de campo y control del pH. En el suelo la variable-respuesta de la BIS fue la concentración inicial y final de ARA por Soxhlet; en *L. sativa* la fenología a plántula; altura de planta (AP) y longitud radical (LR) y la

biomasa; peso fresco y seco aéreo/radical (PFA)(PFR)/PSA(PSR). Los datos experimentales se analizaron por ANOVA/Tukey HSDP<0.025%, con el programa estadístico Statgraphics Centurion.

Los resultados indicaron que la BIS del suelo por 75,000 ppm de ARA con DEGE, SOMI, LOCO, *P. vulgaris* o AVE, H₂O₂, al 80% de la capacidad de campo y control del pH lo minimizaron a 625 ppm en 110 días; el suelo con ARA sin BIS o control negativo (CN), la atenuación natural lo redujo a 51,440 ppm. Lo anterior apoyó que la BIS con DEGE aumentó la emulsión del ARA, la SOMI, LOCO y *P. vulgaris* o AVE aportó compuestos orgánicos e inorgánicos a base de N que restablecieron la relación C:N; P (fósforo) y K (potasio) que estimularon la actividad microbiota autóctona heterotrófica aerobia oxidante del ARA (AMAHAOARA) y el H₂O₂ como fuente de O₂ para acelerar la mineralización del ARA al 80% de la capacidad de campo y el control del pH después de la BIS. La densidad microbiana inicial fue de 59x10⁶ UFC/g; después de la BIS mediante DEGE, SOMI, LOCO, *P. vulgaris* o AVE y H₂O₂ fue de 326x10⁶ UFC/g de suelo seco en 110 días, este valor fue estadísticamente diferente al suelo (CN) con 61x10⁶ UFC/g; lo anterior indica que la BIS estimuló a la AMAHAOARA a decrecer la concentración a un valor inferior al mayor permisible de la NOM-138. En la demostración de la biorecuperación del suelo mediante *L. sativa*, con y sin inoculación individual o doble con *A. fumigatus* y *S. griseus*, indujeron diferentes porcentajes de germinación; 89.12% con *A. fumigatus*, de 89.85% con *S. griseus* y 91.61% con *A. fumigatus/S. griseus*; estos valores fueron estadísticamente diferentes con el 83% de *L. sativa* sembrada en suelo sin contaminar tratado con SOMI o control relativo (CR) y el 74.94% de *L. sativa* sembrada en suelo irrigado con agua o control absoluto (CA). En la fenología

AP y LR de *L. sativa* inoculado con y sin *A. fumigatus* y *S. griseus* se observó que la mayor AP fue 9.44 cm y LR de 3.51 cm en *L. sativa* inoculado con *A. fumigatus* y *S. griseus*, valores con diferencia estadística con los 7.19 cm de AP y 2.02 cm de LR en *L. sativa*, sembrado en suelo sin contaminar irrigado con agua o CA y ese mismo suelo tratado con SOMI o CR con los 8.01 cm de AP y 2.33 cm de LR. Por otra parte en la biomasa PFA y PFR a plántula de *L. sativa*, con *A. fumigatus* fue 0.093 g de PFA y 0.032 g de PFR comparado con *L. sativa* sembrada en suelo sin contaminar irrigado con agua o CA de 0.053 g de PFA y 0.016 g de PFR y el mismo suelo alimentado con SOMI o CR de 0.071 g de PFA y 0.026 g. Mientras que en PSA y PSR, *L. sativa* con *A. fumigatus* y/o *S. griseus* se registró diferencia estadística con 0.036 g de PSA y 0.0038 g de PSR, respecto a *L. sativa* sembrada en suelo sin contaminar tratado con agua o CA fue 0.021 g de PSA y 0.0015 g de PSR y el suelo alimentado con SOMI u CR fue 0.021 g de PSA y 0.0022 PSR. Lo anterior indica que la inoculación de *A. fumigatus* y/o *S. griseus* estimuló la conversión de exudados radicales en fitohormonas que indujeron la elongación de los pelos radicales que le confirieron una mayor disponibilidad mineral y de agua a la planta. Con base a lo anterior se sugiere que el suelo biorestaurado, el ARA no fue problema para el crecimiento de *L. sativa*.

Palabras clave: ARA, bioestimulación, solución mineral, *P. vulgaris*, pH, H₂O₂, *L. sativa*

Abstract

In the soil 75,000 ppm of waste motor oil (WMO) is a relative high concentration of the mixture of hydrocarbons (HICO) aliphatic, aromatic and traces of heavy metals; hazardous waste (LGEEPA, 2014) causes loss of fertility and inhibits microbial life. 75,000 ppm of WMO exceeds the maximum concentration of 4,400 ppm according to NOM-138-SEMARNAT-SSAI-2012 (NOM-138). The aims of the work were: a) Biostimulation (BIS) of contaminated soil by 75,000 ppm of WMO with detergent (DEGE), mineral solution (MISO), vermicompost (VERMI), *Phaseolus vulgaris* as green manure (GREM), H₂O₂ (hydrogen peroxide), humidity control at 80% and pH control to decrease the WMO to a value less than the maximum allowed by the NOM-138 and b) demonstrate the biorecovery of the soil with *Lactuca sativa*. In the soil the response variables were the initial and final concentration of WMO by Soxhlet, in *L. sativa* the phenology at plant level; plant height (PH) and root length (RL) and biomass: dry weight and fresh weight aerial/root: (ADW) (RDW)/(AFW)(RFW). The experimental data were analyzed by ANOVA/Tukey HSDP<0.025%. The results indicated that the BIS of soil with 75,000 ppm reduced WMO to 625 ppm in 110 days. In the soil with WMO without BIS or negative control (NC), the natural attenuation reduced to 51,440 ppm. In the soil, the remaining WMO did not affect the growth of *L. sativa* suggesting that the soil was biorecovered.

Keys words: soil, WMO, biostimulation, mineralization, recovery.

Introducción y antecedentes

En Latinoamérica y México la contaminación de suelo por hidrocarburos (HICO) del petróleo y sus derivados como el aceite residual automotriz (ARA) es un problema económico-ambiental (Juárez-Cisneros & Sánchez-Yáñez, 2014). El ARA es una mezcla de HICO alifáticos, aromáticos y trazas de metales pesados; producto del ciclo de lubricación de automotores y maquinaria industrial (Sharifi *et al.*, 2007; Ogedegbe *et al.*, 2013). En México al ARA se le clasifica como un residuo peligroso por la Ley General de Equilibrio Ecológico y Protección Ambiental (LGEEPA, 2014) por ser tóxico para diversas formas de vida; en suelo cuando se derrama por su inadecuada disposición final supera las 4,400 ppm según la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2003 (NOM-138); que establece los límites máximos permisibles de HICO dividida en la fracción ligera de 200 ppm, de la media 1,200 ppm y la pesada de 3,000 ppm.

En suelo impactado por 75,000 ppm, es una relativa alta concentración de ARA que forma una película hidrofóbica (Efe & Okpali, 2012), que inhibe la mineralización de la materia orgánica, impide la difusión del O₂ (oxígeno) y el movimiento del agua (Larenas & de Viana, 2005; Ogbo *et al.*, 2009). En suelo el exceso de ARA causa que la relación C:N (carbono:nitrógeno) que normalmente es de 20:1 aumente drásticamente el C, lo que inhibe la mineralización de la materia orgánica (Castro *et al.*, 2004; Balderas-León & Sánchez-Yáñez., 2015). Como consecuencia limita la producción agrícola (Pardo *et al.*, 2004).

En el suelo cuando la concentración de ARA es relativamente mayor a lo establecido por la NOM-138, se recomienda la remediación por métodos químicos como los agentes oxidantes del tipo: KMnO₄ (permanganato de potasio), el NaClO

(hipoclorito de sodio), el Cl_2 (cloro), el O_3 (ozono), etc., que son eficaces para oxidar los HICO (López-Martínez *et al.*, 2005; (Delgadillo-López *et al.*, 2011), sin embargo causan un daño en el ambiente por los residuos que dejan y su acción biocida, además de tener un alto costo (Domínguez-Rosado *et al.*, 2004). Cuando el suelo se impacta con elevados niveles de concentración de HICO una alternativa solución es la bioestimulación (BIS) mediante un detergente (DEGE) que los emulsifique, aumente su distribución y disposición para su mineralización (Riojas *et al.*, 2010; (Zhon-Yi *et al.*, 2013), seguida de una solución mineral (SOMI) que reestablezca la relación C:N con compuesto inorgánicos de N (nitrógeno); NH_4^+ (amonio) y NO_3^- (nitrato) que se requieren en la síntesis de aminoácidos, el P (fósforo); PO_4^{3-} (fosfatos) en la de ácidos nucleicos y generación de energía. Mientras que en la FITO el K (potasio); K_2O (óxido de potasio) interviene a nivel de la fotosíntesis y en la translocación de fotosintatos. Por lo que la bioestimulación con SOMI estimula la actividad microbiana autóctona heterotrófica aerobia que oxida el ARA (AMAHAOARA) (Ferrera-Cerrato *et al.*, 2007; Saucedo-Martínez *et al.*, 2016).

La incorporación de LOCO producto metabólico de *Lumbricus rubellus* o *Eisrnia fétida*, aporta materia orgánica de fácil degradación como: celobiosa y maltosa que al incorporarse al suelo los microorganismos lo utilizan como fuente de C y energía, el aporte de aminoácidos y urea para recuperar la relación C:N, los PO_4^{3-} y K, que al incorporarse en el suelo ayuden a la AMAHAOARA y además le enriquece una alta carga microbiana similar a la autóctona que por coometabolismo degraden los HICO aromáticos (Alexander, 1977; Olivares-Campos *et al.*, 2012).

En suelo para potenciar la acción de la mineralización del ARA con el DEGE, la SOMI y la LOCO, la incorporación de *P. vulgaris* o abono verde (AVE), leguminosa

que por su sistema radical profundo, fibroso, facilita la aireación; con sus exudados enriquecen el suelo a los microorganismos con los que se inoculan (Galván-Gutiérrez, 2004; Juárez-Cisneros & Sánchez-Yáñez, 2014) y aporte de N orgánico; del tipo urea y mineral; NH_4^+ para reestablecer el balance C:N e inducir la mineralización del ARA (Osaigbovo *et al.*, 2013; Balderas-León & Sánchez-Yáñez, 2015) y la bioestimulación con H_2O_2 como fuente de O_2 acelere la oxidación del ARA (Balderas-León, 2016) a la capacidad de campo del 80%.

Otro factor asociado con una BIS mejorada es el control del pH ya que en investigaciones no se regula. En suelo las leguminosas como AVE al degradarse acidifican el pH por la AMAHAOARA que generan ácidos orgánicos del tipo CH_3COOH (ácido acético); el exceso de iones hidrogeno, inhibe la microbiota autóctona. Es por ello que en suelo bioestimulado el control del pH es necesario para mantener la AMAHAOARA y el crecimiento de plantas (Alexander, 1977; Paredes-Mendoza & Espinosa-Victoria, 2010). La BIS, por principio se aplica para cumplir con la remediación de suelo de acuerdo a la NOM-138, sin embargo cuando la concentración de ARA se reduce a nivel igual o menor a la natural es recomendable reutilizar el suelo para fines agrícolas, una forma de probar es mediante plantas bioindicadores como *Lactusa sativa* hortaliza con una alta sensibilidad máxima de 1,000 ppm de HICO. *L. sativa* es un herramienta en validar la eficacia de la BIS dado que detecta niveles bajos de ARA comparado con los métodos analíticos cuantitativos que no los detectan (Balderas-León, 2016).

En la literatura se reporta que es limitado el alcance de información donde se emplea la BIS en suelos contaminados con HICO como única estrategia para decrecer la concentración a un valor inferior a lo señalado por la NOM-138, así

mismo existen pocas investigaciones que sustentan que de forma integral la BIS y FITO de suelo impactado con una relativa alta concentración de ARA minimiza parcialmente los HICO y pasar a la biorecuperación, tal como lo reportan:

Balderas-León & Sánchez-Yáñez, 2015. Que evaluaron la BIS de suelo contaminado con 75,000 ppm de ARA con SOMI, *P. vulgaris* o AVE, seguida de su fitorremediación (FITO) con *Sorghum vulgare* inoculado con *Bacillus cereus* y/o *Burkholderia cepacia*. Los resultados señalaron que la BIS de suelo contaminado con 75,000 ppm de ARA con SOMI y *P. vulgaris* aportó compuestos a base de N, P y K, lo que minimizó la concentración a 10,100 ppm por 90 días. Su FITO con *S. vulgare* potenciado con *B. cereus* y/o *B. cepacia* redujo el ARA remanente a 800 ppm en 90 días, concentración inferior al máximo establecido por la NOM-138.

Mientras que Balderas-León, 2016. Reportó la BIS de suelo contaminado con 80,000 ppm de ARA con DEGE al 4%, H₂O₂, SOMI y *V. sativa* o AVE y FITO con *S. vulgare* inoculado con *B. cereus* y/o *B. cepacia*. Los resultados indicaron que la BIS con DEGE al 4% emulsificó los HICO del ARA, el H₂O₂ como fuente de O₂ y la SOMI con compuestos a base de NH₄⁺, PO₄⁻³ y K₂O, *V. sativa* o AVE aportó elementos del tipo; N, P y K lo que disminuyó a 5,510 ppm en 105 días, seguida de su FITO mediante *S. vulgare* con *B. cereus* y/o *B. cepacia* a floración lo minimizó a 500 ppm en 90 días, valor por debajo a la máxima aceptada por la NOM-138. El crecimiento de *L. sativa* a plántula en 30 días indicó la biorecuperación del suelo contaminado

Lo anterior indica que en suelo el empleo de BIS con una o dos acciones no soluciona problema de contaminación con una relativa elevada concentración por ARA por lo que es necesario la integración de la BIS con DEGE, SOMI, LOCO, *P.*

vulgaris o AVE, H₂O₂, al 80% de la capacidad de campo y el control del pH para reducir el ARA y demostrar la biorecuperación mediante *L. sativa*, por lo que se planteó la siguiente hipótesis:

Hipótesis

La BIS de un suelo contaminado por 75,000 ppm de ARA con DEGE, SOMI, LOCO, *P. vulgaris* o AVE, H₂O₂, al 80% de la capacidad de campo y el control del pH decrecerá el ARA a valor inferior al máximo permisible de la NOM-138 y demostrará la biorecuperación del suelo mediante el crecimiento de *L. sativa*.

Objetivos

- I) BIS de un suelo contaminado con 75,000 ppm de ARA mediante DEGE, SOMI, LOCO, *P. vulgaris* o AVE, H₂O₂, al 80% de la capacidad de campo y control del pH para eliminar el ARA a valor inferior al máximo permisible de la NOM-138
- II) Demostrar la biorecuperación del suelo con *L. sativa*

Materiales y métodos

a. Descripción y montaje del experimento

Esta investigación se realizó en el invernadero del laboratorio de Microbiología Ambiental del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH. En ese invernadero las condiciones microclimáticas promedio fueron: temperatura de 23.2°C, luminosidad de 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y humedad relativa de 67%. El suelo se solarizó a 70°C/48 para minimizar el problema de plagas y enfermedades, posteriormente se tamizó con una malla del No. 20. El suelo se contaminó con 75,000 ppm de ARA proveniente de un taller mecánico automotriz de la ciudad de

Morelia, Mich. diluido en agua con un DEGE comercial (La Corona®) al 1.0% (v/v)
(Balderas-León & Sánchez-Yáñez, 2015)



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

Luego un 1.0 Kg suelo se colocó en el contenedor superior de la jarra de Leonard, mientras que en el reservorio de la parte inferior la SOMI, ambas partes se conectaron por una tira de algodón de aproximadamente 35 cm de largo para permitir el movimiento de la SOMI o agua por capilaridad al suelo (Figura 1); según el tratamiento especificado en el cuadro 1 y 2 que describe el diseño experimental. El diseño experimental de BIS del suelo impactado con ARA se dividió en dos fases, en donde se describen 11 tratamientos con 6 repeticiones cada uno; el suelo sin contaminar con ARA irrigado solo con agua como el control absoluto (CA), ese suelo alimentado con SOMI como el control relativo (CR) y el suelo contaminado con ARA sin biorremediar o control negativo (CN) y el suelo bioestimulado (Saucedo-Martínez *et al.*, 2016).

b. Diseño experimental

Cuadro 1. Diseño experimental para analizar la bioestimulación de un suelo contaminado con 75,000 ppm de aceite residual automotriz con solución mineral, lombricomposta, *Phaseolus vulgaris* o abono verde, H₂O₂ al 80% de la capacidad de campo y control del pH.

Suelo tratado con	Aceite residual automotriz	Solución mineral	Lombricomposta al 3%	<i>Phaseolus vulgaris</i> (AVE)	H ₂ O ₂ al 0.5%
Agua (control absoluto)	-	-	-	-	-
Solución mineral (control relativo)	-	100%	-	-	-
Aceite residual automotriz (control negativo)	+	-	-	-	-
Bioestimulación	+	100%	+	+	+

(+) = agregado, (-) = no agregado, n=4

Cuadro 2. Diseño experimental para demostrar la biorecuperación de suelo contaminado con aceite residual automotriz con *Lactusa sativa* inoculado con y sin *Aspergillus fumigatus* y/o *Streptomyces griseus* para acelerar su germinación.

Suelo tratado con	Bioindicador con <i>L. sativa</i>
Agua (control absoluto)	-
Solución mineral (control relativo)	+
Aceite residual automotriz (control negativo)	-
<i>L. sativa</i> inoculado con; <i>A. fumigatus</i>	+
<i>S. griseus</i>	+
<i>A. fumigatus</i> / <i>S. griseus</i>	+
sin inocular con <i>A. fumigatus</i> / <i>S. griseus</i>	+

(+) = agregado, (-) = no agregado, n=7

c. Caracterización fisicoquímica del suelo

El suelo se tamizó, se analizaron sus propiedades físico-química del suelo; pH, materia orgánica y humedad, de acuerdo a la: NOM-021-RECNAT-2000, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad, clasificación de suelos, estudios, muestreo y análisis.

d. Bioestimulación del suelo con aceite residual automotriz por solución mineral, lombricomposta, *Phaseolus vulgaris* o abono verde, H₂O₂, mantenimiento de la humedad al 80% y control del pH

En la jarra de Leonard la BIS del suelo con 75, 000 ppm de ARA se inicio por una SOMI con la siguiente composición (g/L): NH₄NO₃, 10; K₂HPO₄, 2.5; KH₂PO₄, 2.0; MgSO₄, 1.0; NaCl, 0.1; CaCl₂, 0.1; FeSO₄, trazas y 10.0 mL/L de microelementos (g/L): H₃BO₃, 2.86; ZnSO₄•7H₂O, 0.22; MgCl₂•7H₂O, 1.81, pH 6.8. Se agregó 20.0 mL de la SOMI cada 3 días por 40 días (Maldonado-Chávez *et al.*, 2010; Meza-Ramírez *et al.*, 2016), al terminar esta fase se determinó la concentración del ARA

por Soxhlet (Hernández-Valencia & Mager., 2003).

En la segunda BIS con LOCO al 3% (p/p). Este suelo en ambos casos se mantuvo la humedad a capacidad de campo al 80% con agua potable, después de 30 días se colectaron 15.0 g y se determino la concentración del ARA por Soxhlet (Saucedo-Martínez *et al.*, 2016). Mientras en la tercera BIS se inoculo *P. vulgaris* con *A. fumigatus* y/o *S. griseus*. Para ello *A. fumigatus* se cultivo en agar papa dextrosa agar (PDA) con la siguiente composición (g/L): infusión de papa 4.0; dextrosa 20.0; agar 15.0 y pH ajustado a 5.6; para *S. griseus* se reprodujo en agar avena (AA) con la siguiente composición (g/L): avena 30.0; MgSO₄.7H₂O 1.0; PO₄H₂K 1.5; Tecto al 10% 1.0; Agar 18.0; pH 6.8, se incubo a 30°C/72 horas entonces por cada 20 semillas de *P. vulgaris* se trataron con 1.0 mL de cada género microbiano referido, la concentración se ajusto a la solución patrón No. 0.5 del nefelómetro de McFarlad con 1.0 mL de solución detergente al 10% en 99.0 mL de NaCl 0.85% (solución salina) equivalente a una concentración celular de 1.5x10⁸ UFC/g, que *A. fumigatus* y *S. griseus* se inocularon en relación 1:1 (v/v) de cada una a partir del PDA y AA respectivamente (Sánchez-Yañez, 2007). Las semillas de *P. vulgaris* inoculado con *A. fumigatus* y/o *S. griseus* se sembraron hasta el estadio fisiológico de plántula, se barbecho e incorporo al suelo como AVE por 30 días (Osaigbovo *et al.*, 2013). Al finalizar se determino la concentración de ARA por Soxhlet (Domínguez-Rosado *et al.*, 2004). La cuarta BIS se aplicó H₂O₂ al 0.05%, se agregó 10.0 mL cada 2 días por 10 días, al terminar esta fase se determinó la concentración del ARA por Soxhlet (Hernández-Valencia & Mager., 2003).

- e. Dinámica del pH en suelo contaminado con 75,000 ppm de aceite residual automotriz mediante la bioestimulación con detergente, solución mineral, lombricomposta, *Phaseolus vulgaris* o abono verde, H₂O₂, al 80% de la capacidad e campo.

El control de pH se midió al finalizar la BIS mediante DEGE, SOMI, LOCO, *P. vulgaris* o AVE, H₂O₂, al 80% de la capacidad de campo cada 3 días por 30 días; para neutralizar el suelo se agregó 1.0 g de Na₂CO₃ por cada 500 g para ajustar el pH entre 6.8 y 7.2 (Sánchez-Yáñez, 2007).

- f. En suelo demostración de su biorrecuperación con *Lactua sativa* inoculado con y sin *Asperguillus fumigatus* y/o *Streptomyces griseus*

En este suelo para demostrar su biorecuperación se sembró *L. sativa* inoculado con y sin *A. fumigatus* y *S. griseus* de acuerdo al procedimiento descrito en *P. vulgaris* (Sánchez-Yáñez, 2007), cuando *L. sativa* alcanzó la etapa a plántula se determinó la fenología y biomasa, la concentración del ARA por Soxhlet (Domínguez-Rosado *et al.*, 2004).

- g. En suelo cuantificación de la población bacteriana heterotrófica oxidante de aceite residual automotriz inducida por bioestimulación integral

En suelo para la cuantificación de la AMAHAOARA se empleó la técnica de cuenta viable en placa (CVP); para ello se pesó 1.0 g de suelo y se adicionó a 9.9 mL de NaCl 0.85% (solución salina), se realizaron diluciones de la 10¹ a la 10⁸, se transfirieron 0.2 mL para sembrar en agar base aceite residual automotriz (ABARA) con la siguiente composición (g/L): peptona de caseína, 5.0; extracto de levadura, 1.0; H₂PO₄, 2.5; HPO₄, 2.5; NaCl, 1.0; solución de oligoelementos 1.0 mL; azul de bromotimol al 0.01%, 5.0 mL, 10.0 mL de ARA emulsificado al 0.5% (0.5 mL de detergente líquido por cada 100 mL de ARA); agar 18.0, ajustado a pH 7.0; incubado a 30°C/48 horas por triplicado /g de suelo (Bahadure *et al.*, 2013).

h. Análisis estadístico

Los datos experimentales se analizaron mediante ANOVA/Tukey HSD $P < 0.025\%$ y uso del programa estadístico StatgraphicsCenturion (Meza-Ramírez *et al.*, 2016)

Resultados

Cuadro 3. Propiedades fisicoquímicas del suelo sin contaminar con aceite residual automotriz.

Parámetro	Valor
pH (1:20)	6.64
Material orgánica (%)	4.57
Capacidad de intercambio catiónico (Cmol(+) Kg ⁻¹)	4.61
Textura (%)	22.16(Ac)-37.28(L)- 40.56(Ar)
Densidad real (g/cm ³)	2.01
Densidad aparente (g/cm ³)	1.08
Porosidad** (%)	46.35
Porcentaje de saturación de humedad (%)	46.95
Capacidad de campo*** (%)	30.08
Porcentaje de marchitez permanente	15.04
Humedad aprovechable (%)	13.25

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-arenoso NOM-021-RECNAT-2000.

El cuadro 3 muestra las propiedades fisicoquímicas del suelo sin ARA: ahí se detectó un pH moderadamente ácido de 6.64, con un bajo contenido de materia orgánica de 4.57%, esto implica un evidente desequilibrio en la relación C:N; alta

capacidad de intercambio catiónico de 4.61 Cmol(+) Kg⁻¹ salinidad general; con una de textura: arcilla 22.16%, limo 37.28% y arena 40.56% de un suelo clasificado como franco-arcilloso-arenoso de difícil intercambio gaseoso.

Tabla 4. En suelo concentración de aceite residual automotriz remanente derivado de la bioestimulación con detergente, solución mineral, lombricomposta, *Phaseolus vulgaris* o abono verde, H₂O₂, 80% de la capacidad de campo y control del pH por 110 días

Tipo de bioestimulación	Concentración remanente de ARA
Concentración inicial	75,000 ppm ^e
Detergente + Solución mineral	33,423 ppm ^d
Detergente + Solución mineral + Lombricomposta	18,764 ppm ^c
Detergente + Solución mineral + Lombricomposta + <i>Phaseolus vulgaris</i> o abono verde	2,199 ppm ^{b*}
Detergente + Solución mineral + Lombricomposta + <i>Phaseolus vulgaris</i> o abono verde + H ₂ O ₂	625 ppm ^{a*}

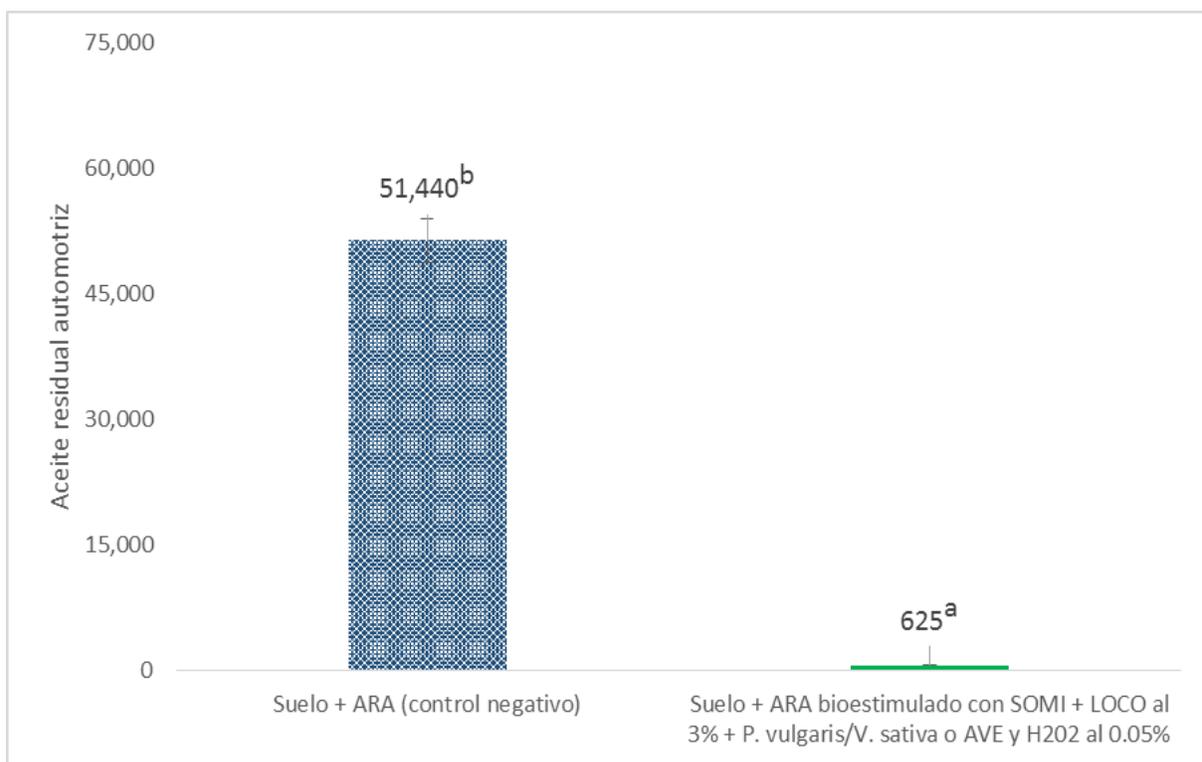
* indica valor es inferior al límite máximo permisible por la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2003.

Letras distintas indican diferencia estadística al 0.025% según Tukey

En la tabla 4 muestra la BIS del suelo contaminado con 75,000 ppm de ARA con DEGE, SOMI, LOCO, *P. vulgaris* o AVE, H₂O₂, al 80% de la capacidad de campo y control del pH por 110 días. En el suelo contaminado por 75, 000 ppm de ARA el DEGE y la SOMI decreció el ARA a 33,423 ppm en 40 días, seguida de la incorporación de la LOCO para reducir la concentración a 18,764 ppm por 30 días (Juárez-Cisneros & Sánchez-Yáñez, 2014). La acción integral de la SOMI, la LOCO

y *P. vulgaris* como AVE favoreció la rápida mineralización del ARA a 2,199 ppm en 30 días y la adición de H₂O₂ al 0.5% redujo el ARA remanente a 625 ppm en 110 días.

Figura 2. En suelo concentración de aceite residual automotriz remanente derivado de la bioestimulación con detergente, solución mineral, lombricomposta, *Phaseolus vulgaris* o abono verde, H₂O₂, mantenimiento de la capacidad de campo al 80% y control del pH por 110 días



Control Negativo = Suelo contaminado a 75,000 ppm de ARA + agua; Suelo contaminado a 75,000 ppm de ARA + solución mineral, lombricomposta al 3% y *Phaseolus vulgaris* o abono verde. Letras distintas indican diferencia estadística al 0.025% según Tukey

En la Figura 2 muestra la BIS del suelo contaminado con 75,000 ppm de ARA con DEGE, SOMI, LOCO, *P. vulgaris* o AVE, H₂O₂, al 80% de la capacidad de campo y control del pH por 110 días que lo minimizaron hasta 625 ppm, este valor tuvo diferencia estadística comparada con 51,440 ppm suelo con ARA sin bioestimar empleado como CN.

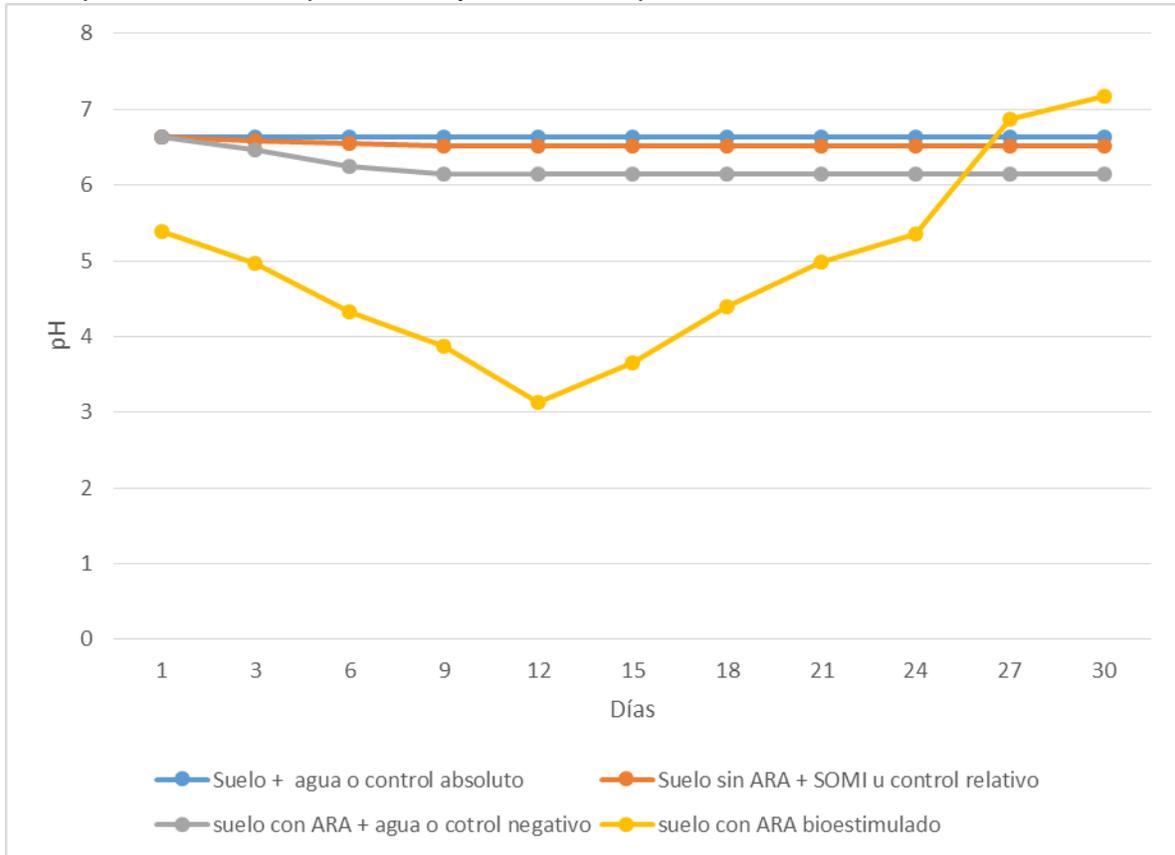
Cuadro 4. En suelo cuantificación de la población microbiana oxidante de aceite residual automotriz por bioestimulación con detergente, solución mineral, lombricomposta, *Phaseolus vulgaris* o abono verde, H₂O₂, al 80% de la capacidad de campo y control del pH.

Tiempo (días)	Unidades Formadoras de Colonias por 10 ⁶ /g de suelo seco		
	Suelo + agua (Control absoluto)	Suelo con 75,000 ppm de ARA + agua (Control negativo)	Suelo con 75,000 ppm de ARA + bioestimulación
10	8.34 ^d	41.00 ^c	59.00 ^b
110	37.00 ^c	68.00 ^b	326.00^a

Control negativo = Suelo con 75,000 ppm de ARA + agua; Control absoluto = Suelo + agua; BIS = suelo con 75,000 ppm de ARA bioestimulado con solución mineral, lombricomposta al 3% y *Phaseolus vulgaris* como abono verde. Letras distintas indican diferencia estadística al 0.025% según Tukey

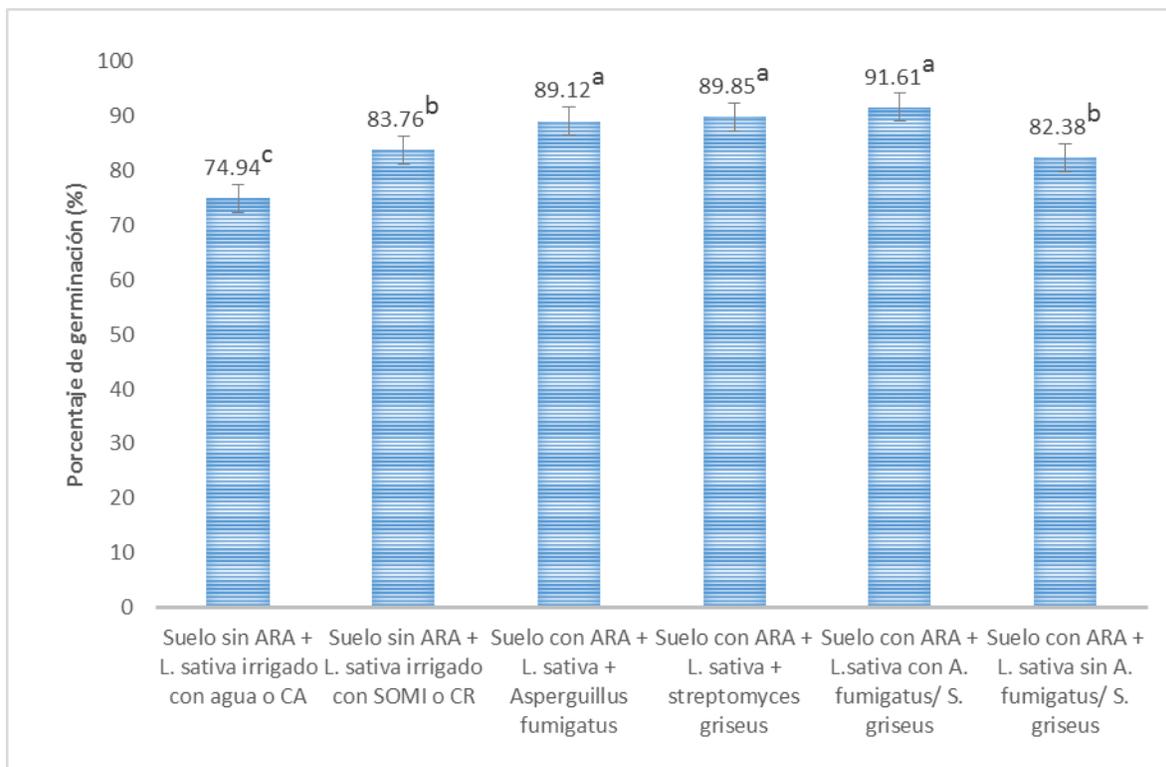
En la Tabla 4, en suelo se muestra la cuantificación de la población microbiana autóctona oxidante del ARA inducida por la BIS mediante DEGE, SOMI, LOCO, *P. vulgaris* o AVE, H₂O₂, mantenimiento de la capacidad de campo al 80% y el control del pH en 110 días, incrementó la densidad microbiana de 59x10⁶ a 326x10⁶ UFC/g de suelo seco. Este valor con diferencia estadística comparado con el suelo sin contaminar con ARA o CA que se registró de 8.34x10⁶ a 37.00x10⁶ UFC/g y ese mismo suelo contaminado con ARA usado como CN donde no cambio esa densidad de 68x10⁶ UFC/g.

Figura 3. Dinámica del pH durante la bioestimulación de un suelo contaminado con 75,000 ppm de aceite residual automotriz mediante detergente, solución mineral, lombricomposta al 3%, *Phaseolus vulgaris* o abono verde, H₂O₂, mantenimiento de la capacidad de campo al 80% y control del pH.



En la figura 3 se muestra el suelo contaminado por 75,000 ppm de ARA bioestimulado con DEGE, SOMI, LOCO, *P. vulgaris* o AVE, H₂O₂, al 80% de la capacidad de campo por 110 días; ahí se registró una disminución del pH a 3.2 con respecto al mismo suelo contaminado con ARA sin bioestimulación o CN con pH de 6.14.

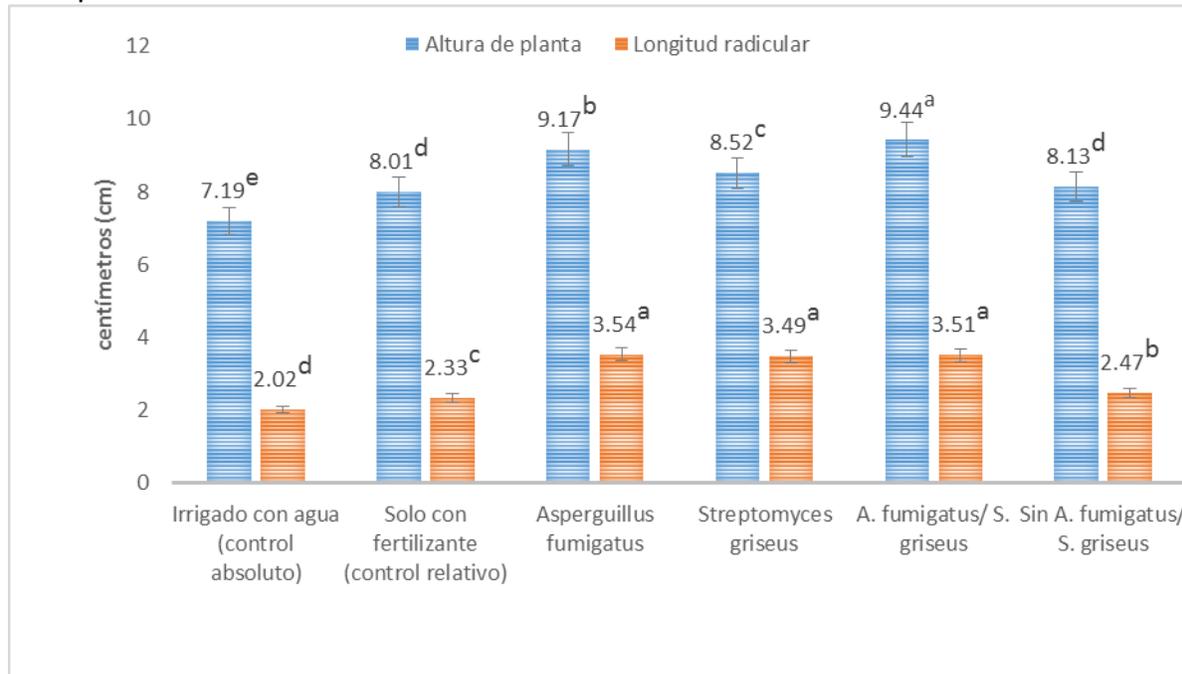
Figura 4. En suelo biorestaurado, germinación de las semillas de *Lactusa sativa* inoculado con *Aspergillus fumigatus* y/o *Streptomyces griseus*



Control absoluto = Suelo + agua; Control relativo= Suelo + SOMI al 100%. Letras distintas indican diferencia estadística al 0.025% según Tukey

En la figura 4 se muestra que la biorestauración en suelo contaminado por 75,000 ppm de ARA por BIS con DEGE, SOMI, LOCO, *P. vulgaris* o AVE, H₂O₂, al 80% de la capacidad de campo y control del pH, el porcentaje de germinación de *L. sativa* sin y con inoculación individual o doble con *A. fumigatus* y *S. griseus* fueron; 89.12% con *A. fumigatus*, de 89.85% con *S. griseus* y 91.61% con *A. fumigatus/S. griseus*; estos valores fueron estadísticamente diferentes en *L. sativa* sin inocular con 83.76% sembrada en suelo sin contaminar con SOMI referido como CR y *L. sativa* irrigado con agua o CA fue 74.94%.

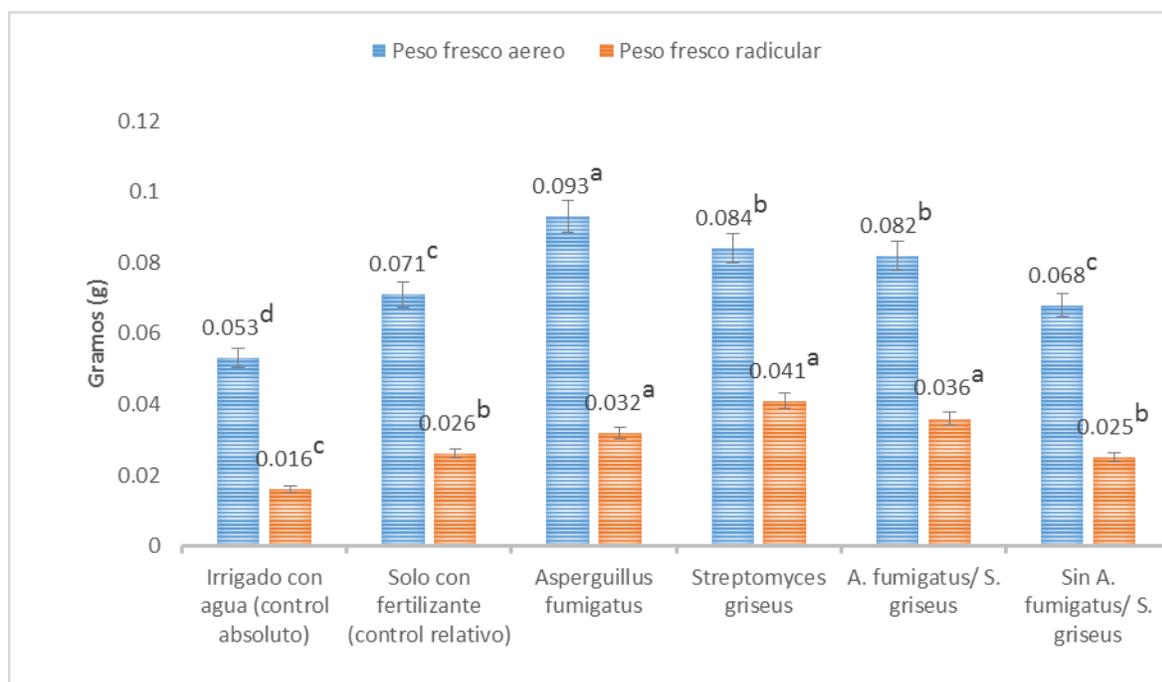
Figura 5. En suelo biorestaurado, fenotípica de *Lactusa sativa* bioindicador de la desaparición del aceite residual automotriz



Control absoluto = Suelo + agua; Control relativo= Suelo + SOMI al 100%; BIS = suelo con 75,000 ppm de ARA bioestimulado con solución mineral, lombricomposta al 3% y *Phaseolus vulgaris* como abono verde. Letras distintas indican diferencia estadística al 0.025% según Tukey

En la Figura 5 se muestra la altura de la planta (AP) y longitud de la raíz (LR) de *L. sativa* inoculado con y sin *A. fumigatus* y *S. griseus* usado como planta bioindicador del ARA remanente en suelo inicialmente contaminado con 75,000 ppm bioestimulado mediante DEGE, SOMI, LOCO, *P. vulgaris* o AVE, H₂O₂, al 80% de la capacidad de campo y control del pH, ahí se observó que la mayor AP fue 9.44 cm y LR de 3.51 cm en *L. sativa* inoculado con *A. fumigatus* y *S. griseus*, valores con diferencia estadística con los 7.19 cm de AP y 2.02 cm de LR en *L. sativa* sembrado en suelo sin contaminar irrigado con agua o CA y los 8.01 cm de AP y 2.33 cm de LR en el mismo suelo *L. sativa* alimentado con SOMI o CR.

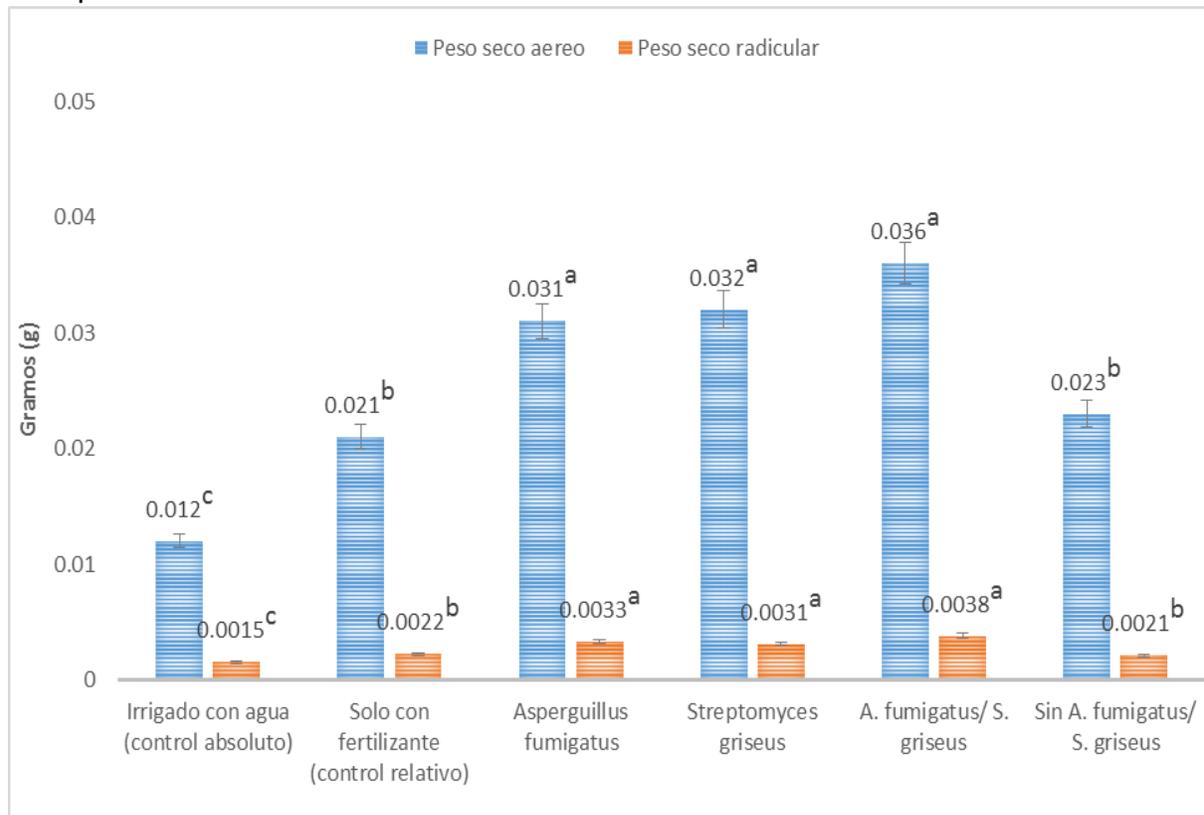
Figura 6. En suelo biorestaurado, peso fresco aéreo y radicular de *Lactusa sativa*, inoculado con *Aspergillus fumigatus* y/o *Streptomyces*



Control absoluto = Suelo + agua; Control relativo= Suelo + SOMI al 100%. Letras distintas indican diferencia estadística al 0.025% según Tukey

En la Figura 6 se muestra en suelo biorecuperado por BIS mediante la acción integral y secuencial de DEGE, SOMI, LOCO, *P. vulgaris* o AVE, H₂O₂, al 80% de la capacidad de campo y control del pH; ahí se encontró diferencia estadística en la biomasa de peso fresco aéreo (PFA) y peso fresco radical (PFR) a plántula de *L. sativa* con *A. fumigatus* fue 0.093 g de PFA y 0.032 g de PFR comparado con *L. sativa* sembrada en suelo sin contaminar irrigado con agua o CA fue 0.053 g de PFA y 0.016 g de PFR y en el mismo suelo *L. sativa* alimentado con SOMI referido como CR con 0.071 g de FRA y 0.026 g.

Figura 7. En suelo biorestaurado, peso seco aéreo y radicular de *Lactusa sativa* con y sin *Aspergillus fumigatus*/*Streptomyces griseus*, bioindicador de la desaparición del aceite residual automotriz



Control absoluto = Suelo + agua; Control relativo= Suelo + SOMI al 100%. Letras distintas indican diferencia estadística al 0.025% según Tukey

En la Figura 7 se muestra en suelo biorestaurado la biomasa de peso seco aéreo (PSA) y peso seco radical (PSR) a plántula de *L. sativa* inoculada con y sin *A. fumigatus* y/o *S. griseus*; donde se observó diferencia estadística con 0.036 g de PSA y 0.0038 g de PSR de *L. sativa* con *A. fumigatus* y *S. griseus* respecto a los 0.021 g de PSA y 0.0015 g de PSR en *L. sativa* sembrada en suelo sin contaminar tratado con agua o CA y con 0.021 g de PSA y 0.0022 PSR de *L. sativa* alimentado con SOMI o CR.

Discusión

Cuadro 3. *Propiedades fisicoquímicas del suelo sin contaminar con aceite residual automotriz.* En el suelo para mejorar algunas de sus propiedades físico-químicas se incorporaran abonos orgánico como la LOCO y leguminosas como AVE que incrementan la calidad del suelo, con materia orgánica de fácil degradación como proteínas, celobiosa, maltosa, que los microbios lo utilizan como fuente de C y energía, restablecer la relación C:N con compuestos a base de N como la urea y aminoácidos, mientras que los P (PO_4^{-3}) y K para estimular la microbiota autóctona del suelo (Vallejo *et al.* 2005; Saucedo-Martínez *et al.*, 2016), la difusión de O_2 y agua (Mósquera *et al.*, 2012).

Tabla 4. *En suelo concentración de aceite residual automotriz remanente derivado de la bioestimulación con detergente, solución mineral, lombricomposta, Phaseolus vulgaris o abono verde, H_2O_2 , al 80% de la capacidad de campo y control del pH por 110 días.* En el suelo contaminado por 75, 000 ppm de ARA el DEGE solubilizó el ARA, aumentando su distribución y disposición para que los microorganismos autóctonos mineralizaran el ARA (Riojas *et al.*, 2010) y la SOMI apporto compuestos en forma de NH_4^+ que restableció la relación C:N, los PO_4^{-3} y K estimularon la AMAHAOARA (Ferrera-Cerrato *et al.*, 2007; Saucedo-Martínez *et al.*, 2016) para decrecer el ARA remanente a 33,423 ppm en 40 días, seguida de la incorporación de la LOCO aumentó la concentración de urea y proteínas, al igual que de materia orgánica de fácil degradación como la celobiosa y manosa como fuente de C y energía; los PO_4^{-3} que indujeron a la AMAHAOARA que por coometabolismo degradó los HICO para reducir la concentración a 18,764 ppm por 30 días (Juárez-Cisneros & Sánchez-Yáñez, 2014). Para potenciar la acción integral de la SOMI y la LOCO, *P. vulgaris* al incorporarlo como AVE aumentó materia orgánica;

proteínas, ácidos nucleicos, urea para favorecer la rápida mineralización del ARA a 2,199 ppm en 30 días (Sangabriel *et al.*, 2006; Balderas-León & Sánchez-Yáñez, 2015) y la adición de H₂O₂ al 0.5% como fuente de O₂ aceleró la mineralización de los HICO de fracción alifática del ARA remanente a 625 ppm en 10 días (Balderas-León, 2016). La humedad al 80% de la capacidad de campo fue un factor importante para facilitar el movimiento de agua y la difusión O₂, necesarios para la mineralización de los HICO alifáticos del ARA (Saucedo-Martínez *et al.*, 2016).

Figura 2. En suelo concentración de aceite residual automotriz remanente derivado de la bioestimulación con detergente, solución mineral, lombricomposta, *Phaseolus vulgaris* o abono verde, H₂O₂, mantenimiento de la capacidad de campo al 80% y control del pH por 110 días. Los resultados anteriores apoyan que en el suelo existen microorganismos autóctonos capaces de mineralizar el ARA, que se inhiben cuando la concentración es relativamente alta, condición de contaminación agravada por la deficiencia de elementos como; N, P y K (Vallejo *et al.* 2005; Asquith *et al.* 2012). La BIS del suelo contaminado con 75,000 ppm de ARA con el DEGE solubilizó los HICO del ARA para que los microorganismos autóctonos mineralizaran el ARA (Riojas *et al.*, 2010). La SOMI aportó NH₄ que restableció la relación C:N, PO₄⁻³ y K estimularon la AMAHAOARA (Ferrera-Cerrato *et al.*, 2007; Saucedo-Martínez *et al.*, 2016). La incorporación de la LOCO mantuvo la oxidación del ARA y aumentó la concentración de urea, aminoácidos, vitaminas, al igual que de materia orgánica de fácil degradación como la celobiosa y manosa, como fuente de C y energía, mientras que los PO₄⁻³ mantuvieron a la AMAHAOARA y el aporte de microorganismos que degradaron los HICO alifáticos (Juárez-Cisneros & Sánchez-Yáñez, 2014). Para potenciar la acción de la SOMI y la LOCO en la degradación del

ARA, *P. vulgaris* a través de sus raíces permitieron el flujo de agua, simultáneamente el intercambio de gases, mientras las hojas de la leguminosa se secaron, trituraron e incorporaron como AVE, lo que al degradarse aumentó la concentración de compuestos orgánicos de N; proteínas y nucleótidos que favorecieron el coometabolismo del ARA (Sangabriel *et al.*, 2006; Balderas-León & Sánchez-Yáñez, 2015) y la adición del H₂O₂ al 0.5% como fuente de O₂ aceleró la mineralización del ARA (Balderas-León, 2016). El mantenimiento de la capacidad de campo al 80% durante la BIS facilitó el movimiento de agua y la difusión del O₂ a través de los poros del suelo, para la oxidación del ARA (Saucedo-Martínez *et al.*, 2016). En contraste cuando la microbiota nativa fue bioestimulada mediante DEGE, SOMI, LOCO, *P. vulgaris* o AVE y H₂O₂ con la humedad al 80% de la capacidad de campo y el control del pH favorecieron una rápida y eficaz mineralización del ARA comparado con el CN que por el desequilibrio C:N, la deficiencia de elementos como N, P y K (Asquith *et al.* 2012) OTRA CITA, la no difusión de O₂, del agua y el aumento de C inhibe la oxidación del ARA por lo que la atenuación natural fue insuficiente para la remediación de suelos contaminados con altas concentraciones de HICO (Gómez *et al.*, 2009). Al respecto es conocido que en suelo bioestimulado con compuestos orgánicos e inorgánicos derivados de SOMI y AVE en forma de urea, NH₄, PO₄⁻³ y K favorecen la mineralización del ARA al inducir la actividad de la MAHAOARA (Abdulsalam & Omale, 2009; Meza-Ramírez *et al.*, 2016).

La BIS de suelo contaminado por 75,000 ppm de ARA mediante DEGE, SOMI, LOCO, *P. vulgaris* o AVE y H₂O₂ a capacidad de campo del 80% y el control del pH fue más eficaz para la eliminación de una mayor concentración del ARA, comparadas con otras investigaciones recientes donde se bioestimuló el suelo

contaminado con ARA con una o dos acciones integrales, tal es el caso de: Balderas León, 2016. Que reportó la BIS de suelo contaminado con 80,000 ppm de ARA con detergente al 4%, H₂O₂, SOMI y *V. sativa* o AVE. Los resultados indicaron que la BIS con detergente al 4% emulsificó los HICO del ARA, el H₂O₂ como fuente de O₂ y la SOMI con compuestos a base de NH₄⁺, PO₄⁻³ y K₂O y la incorporación de *V. sativa* como AVE con elementos de N, P y K lo que disminuyó a 5,510 ppm en 75 días, valor por encima a la máxima aceptada por la NOM-138.

Cuadro 4. *En suelo cuantificación de la población microbiana oxidante de aceite residual automotriz por bioestimulación con detergente, solución mineral, lombricomposta, Phaseolus vulgaris o abono verde, H₂O₂, al 80% de la capacidad de campo y control del pH.* Lo anterior sugiere que la mayor disponibilidad de compuestos inorgánicos en forma de NH₄⁺ restablecieron la relación C:N, los PO₄⁻³ y K indujeron a la AMAHAOARA para mineralizar el ARA (Castro *et al.*, 2004) y el aporte de materia orgánica de fácil degradación; proteínas, vitaminas, maltosa y celobiosa como fuente de C y energía, el N en forma de urea, aminoácidos y ácidos nucleicos, mantuvieron la actividad de los microorganismos autóctonos que por coometabolismo degradan los HICO del ARA (Alexander, 1977; López-Martínez *et al.*, 2005) con respecto al CN donde el desequilibrio mineral, la atenuación es insuficiente para mineralizar los HICO (Balderas-León, 2016)

Figura 3. *Dinámica del pH durante la bioestimulación de un suelo contaminado con 75,000 ppm de aceite residual automotriz mediante detergente, solución mineral, lombricomposta al 3%, Phaseolus vulgaris o abono verde, H₂O₂, mantenimiento de la capacidad de campo al 80% y control del pH.* La AMAHAOARA genera ácidos orgánicos como él; CH₃COOH, H-COOH, etc., derivados de la mineralización de los

HICO que acidifican el pH del suelo, condición que inhibió la AMAHAOARA (Alexander, 1977). Por lo que en suelo bioestimulado para mantener el pH entre 6.8 y 7.2 se agregó 1 g de Na₂CO₃ por cada 500 g de suelo (Sánchez-Yáñez, 2007).

Figura 4. En suelo biorestaurado, germinación de las semillas de *Lactuca sativa* con *Aspergillus fumigatus* y/o *Streptomyces griseus*. Los resultados anteriores apoyan que en suelo biorestaurado el nivel del ARA remanente de la BIS con DEGE, SOMI, LOCO, *P. vulgaris* o AVE y H₂O₂ con la humedad al 80% de la capacidad de campo y control de pH, no fue tóxico para *L. sativa*, la inoculación de *A. fumigatus* y/o *S. griseus* favorecieron la rápida germinación al generar sustancias promotoras de crecimiento vegetal (Infante & García, 2012; Balderas-León, 2016).

Figura 5. En suelo biorestaurado la fenotípia de *Lactuca sativa* bioindicador de la desaparición del aceite residual automotriz. Lo anterior indica que en el suelo bioestimulado mediante DEGE, SOMI, LOCO, *P. vulgaris* o AVE, H₂O₂, al 80% de la capacidad de campo y control de pH, el ARA es menor a 1000 ppm, valor no tóxico para el crecimiento de *L. sativa*, es decir el efecto de la concentración del ARA es comparable a la concentración de HICO que naturalmente se encuentran en suelo. En *L. sativa* la inoculación individual o combinada con *A. fumigatus* y *S. griseus* estimuló la conversión de exudados radicales en fitohormonas que indujeron la elongación de los pelos radicales que le confirieron una mayor disponibilidad mineral y de agua a *L. sativa* que incrementaron la AP y LR (Sánchez-Yáñez 2007; Balderas-León). Al respecto se ha reportado que *A. fumigatus* y *S. griseus* favorecen la absorción y/o asimilación de algunos nutrientes, agua y esto colateralmente reduce el estrés en *L. sativa* (Alexander, 1977).

Figura 6. En suelo biorestaurado, peso fresco aéreo y radicular de *Lactusa sativa*, inoculado con *Aspergillus fumigatus* y/o *Streptomyces*. Lo anterior indica que en suelo biorestaurado el ARA remanente no es problema para el crecimiento de *L. sativa* inoculado con y sin *A. fumigatus* y *S. griseus*, favorecieron la absorción de nutrimentos y agua. En suelo la BIS integral y secuencial con DEGE, SOMI, LOCO, *P. vulgaris* o AVE, H₂O₂, mantenimiento de la capacidad de campo al 80 % y control de pH fueron acciones determinantes en suelo para reducir el ARA a un nivel no tóxico para *L. sativa* (Infante & García, 2012)

Figura 7. En suelo biorestaurado, peso seco aéreo y radicular de *Lactusa sativa* con y sin *Aspergillus fumigatus* y/o *Streptomyces griseus*, bioindicador de la desaparición del aceite residual automotriz. Los resultados anterior sugieren que el suelo biorestaurado el ARA no es problema para el crecimiento de *L. sativa* y la inoculación individual o combinada con *A. fumigatus* y *S. griseus* transforman los exudados en las semillas de *L. sativa* en fitohormonas que incrementaron la biomasa de PSA y PSR (Sánchez-Yáñez 2007; Balderas-León). En suelo biorestaurado, la concentración del ARA remanente de la BIS permite la actividad y estabilidad de cualquier forma de vida y posterior uso para fines agrícolas (Infante & García, 2012; Carter *et al.*, 2013).

Conclusión

La BIS de un suelo contaminado con 75,000 ppm de ARA, fue mejorada y acelerada mediante la aplicación integral y secuencial con DEGE, SOMI, LOCO, *P. vulgaris* o AVE, H₂O₂, al 80% de la capacidad de campo y el control del pH, favorecieron una rápida y eficaz mineralización del ARA a 625 ppm en 110 días valor inferior al

máximo permitido por la NOM-138 de 4,400 ppm. El crecimiento de *L. sativa* demostró que en suelo la concentración remanente del ARA no es problema de contaminación, lo que indicó que el suelo quedó biorestaurado para fines agrícolas.

Bibliografía

1. 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.
2. Asquith, E. A., Geary, P. M., Nolan, A. L., & Evans, C. A. 2012. Comparative bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by biostimulation, bioaugmentation and surfactant addition. *Journal of Environmental Science and Engineering A*. 1(5): 637-650.
3. Balderas-León, I., & Sánchez-Yáñez, J. M. 2015. Biorremediación de suelo contaminado con 75,000 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.
4. Balderas León, I. 2016. Biorremediación mejorada de un suelo contaminado con 80,000 ppm de aceite residual automotriz por bioestimulación con solución mineral, *vicia sativa* (Abono verde) y fitorremediación con *Sorghum vulgare* potenciado con *Bacillus cereus* y/o *Burkholderia cepacia*. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Facultad de Biología. Morelia, Michoacán, México. (Inédita).

5. Bahadure S., Kalia R. y R. Chavan. 2013. Comparative Study of Bioremediation of Hydrocarbon Fuels. *International Journal of Biotechnology and Bioengineering Research*. 4(7): 677-686.
6. Carter, S., Shackley, S., Sohi, S., Suy, T. B., & Haefele, S. (2013). The impact of biochar application on soil properties and plant growth of pot grown lettuce (*Lactuca sativa*) and cabbage (*Brassica chinensis*). *Agronomy* 3(2): 404-418.
7. 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):40-49.
8. Delgadillo-López, A. E., González-Ramírez. C. A., Prieto-García, F., Villagómez-Ibarra, J. R., Acevedo-Sandoval, O. 2011. Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 14: 597-612.
9. Domínguez-Rosado, E & J Pichtel. 2004a. Phytoremediation of Soil Contaminated with Used Motor Oil: II. Enhanced Microbial Activities from Laboratory and Growth Chamber Studies. *Environment Engineer Science*. 21(2): 169-180.
10. Domínguez-Rosado, E & J Pichtel; M Coughlin. 2004b. Phytoremediation of Soil Contaminated with Used Motor Oil: I. Enhanced Microbial Activities from Laboratory and Growth Chamber Studies. *Environment Engineer Science* 21(2): 157-169.
11. Efe, S. I., & Okpali, A. E. 2012. Management of Petroleum Impacted Soil with Phytoremediation and Soil Amendments in Ekpan Delta State, Nigeria. *Journal of Environmental Protection*, 3(5): 386.

12. Ferrera-Cerrato, R., A. Alarcón., D. Trejo-Aguilar., W. Sangabriel & M. Mendoza-López. ET AL. 2007. Fitorremediación de un suelo contaminado con combustóleo utilizando *Phaseolus coccineus* y fertilización orgánica e inorgánica. *Agrociencia*. 41(8): 817-826.
13. 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(1): 65–72.
14. Galvan-Gutierrez, D. 2004. Sistema sostenible de producción de trigo (*Triticum aestivum* L.) Mediante labranza de conservación, abono verde e inoculación con *Bacillus cereus*. Laboratorio de Microbiología Ambiental. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Universidad de Colima. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Postgrado Interinstitucional de Ciencias Agrícolas y Forestales. Colima, Michoacán, México. Tesis doctotal (Inédita).
15. 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.
16. Infante, C., & García, F. A. M. 2012. Evaluación de la Toxicidad en Desechos y Suelos Petrolizados empleando semillas de *Lactuca sativa* L. *Interciencia*, 37(10): 782.
17. 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.
18. Ley General de Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente (LGEEPA) 2014. *Diario Oficial de la Federación del*, 28.
19. 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 petróleo crudo nuevo e intemperizado. *Universidad y Ciencia* 26(2): 121-136.
20. Martin Alexander. 1977. *Introducción a la Microbiología del Suelo*. Ed 1er. AGT Editor, S.A. México.
21. Meza-Ramírez, J. Y., Rico-Cerda, J., Ruiz-Nájera, R. E., & Sánchez-Yáñez, J. M. 2016. Bioestimulación de suelo contaminado con 40,000 ppm de aceite residual automotriz y fitorremediación con *Cicer arietinum* y *Burkholderia cepacia*. *Journal of the Selva Andina Research Society* 7(2): 76-85.
22. Mósquera, M. P., Reyes, O. E. S., de Prager, M. S., Gallego, J. M., & Sánchez, D. I. Á. (2012). Abonos verdes: Tecnología para el manejo agroecológico de los cultivos. *Agroecología*, 7(1): 53-62.
23. Larenas, G & M de Viana. 2005. Germinación y supervivencia del pasto cubano *Tithonia tubaeformis* (Asteraceae) en suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo. *Ecología Austral* 15(2): 177-181.
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. López-Martínez, S., Gallegos-Martínez, M. E., Pérez, F. L., & Gutiérrez, R. M. 2005. Mecanismos de fitorremediación de suelos contaminados con moléculas orgánicas xenobióticas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 21(2): 91-100.
26. “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.
27. Ogedegbe, A. Uwaila., B. Ikhajagbe & GO Anoliefo. 2013. Growth Response of *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze in a Waste Engine Oil-Polluted Soil. *Journal of Emerging Trends in Engineering and Applied Sciences*. 4(2): 322-327.
28. Ogbo, E. 2009. Effects of diesel fuel contamination on seed germination of four crop plants - *Arachis hypogaea*, *Vigna unguiculata*, *Sorghum bicolor* and *Zea mays*. *African Journal Biotechnology* 8(2): 250-253.
29. Olivares-Campos, M. A., Hernández-Rodríguez, A., Vences-Contreras, C., Jáquez-Balderrama, J. L., & Ojeda-Barrios, D. 2012. Lombricomposta y composta de estiércol de ganado vacuno lechero como fertilizantes y mejoradores de suelo. *Universidad y ciencia* 28(1): 27-37.
30. 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.

31. Pardo L., Perdomo C., L. Benavides J. 2004. Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo. *NOVA* 2:40-49.
32. Paredes-Mendoza, M., & Espinosa-Victoria, D. 2010. Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. *Terra Latinoamericana*. 28(1): 61-70.
33. Rahman, P. K. S. M. *et al.*, 2003. The potential of bacterial isolates for emulsification with a range of hydrocarbons. *Acta Biotechnologica* 23(4):335-345.
34. Saucedo-Martínez, B. C., Montañó-Arias, N. M., Márquez-Benavides, L., & Sánchez-Yáñez, J. M. 2016. Bioestimulación de suelo impactado con 45,000 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.
35. Sánchez-Yáñez, J. M., Bravo, J. N. A., Schuber, N. D., & Márquez-Benavides, L. (2015). Biorremediación de suelo contaminado con 55,000 y 65,000 de aceite residual automotriz y fitorremediación con *Sorghum bicolor* inoculado con *Burkholderia cepacia* y *Penicillium chrysogenum*. *Journal of the Selva Andina Biosphere* 3(2): 86-94.
36. Sánchez-Yáñez JM. 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 Michoacán. COSUTENTA, SA de CV Morelia, Mich, México. ISBN: 978-970-95424-1-7

37. Sangabriel, W., Ferrera-Cerrato, R., Trejo-Aguilar, D., Mendoza-López, M. R., Cruz-Sánchez, J. S., López-Ortiz, C. & Alarcón, A. 2006. Tolerance and phytoremediation of fuel oil-contaminated soil by six plant species. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 22(2): 63-73.
38. 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.
39. Vallejo, V., Salgado, L., & Roldan, F. 2007. Evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de TPHs en suelos contaminados con petróleo. *Revista Colombiana de Biotecnología* 7(2): 67-78.
40. Zhong-Yi C., Xiao-Yong L., Xiu-Lan Y., Lu S., Dan Z & Tao L. 2013. Enhanced Desorption of PAHs from Manufactured Gas Plant Soils Using Different Types of Surfactants. *Pedosphere*. 24:209-219.