



**Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo**

**Facultad de Biología**

**Programa institucional de maestría en Ciencias Biológicas:  
Interacción microorganismo-planta-insecto.**

Tesis para obtener el título de Maestro en Ciencias:

**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*.**

Alumno:

QFB. Iván Balderas-León<sup>1</sup>

Asesor:

Dr. Juan Manuel Sánchez-Yáñez<sup>1</sup>

Coasesor:

Dr. Nabanita Dasgupta-Schuber<sup>2</sup>

Laboratorio de Microbiología Ambiental<sup>1</sup> y Laboratorio de interacción suelo-planta-  
microorganismo<sup>2</sup> del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, UMSNH.

Morelia, Michoacán, febrero 2016

## Agradecimientos



Al proyecto 2.7 “Aislamiento y selección de microorganismos promotores de crecimiento vegetal de teocintle y leguminosas silvestres” (2014-2016), con el apoyo de la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 2014-2016 (CONACYT) y a BIONUTRA, SA de CV, Maravatio, Mich, Mex, por financiar esta investigación.

## Contenido

Tabla de acrónimos.....	v
Resumen .....	vi
Abstract.....	vii
1. Introducción y Antecedentes.....	1
2. Hipótesis.....	6
3. Objetivos .....	6
4. Material y Métodos .....	7
a) <i>Descripción y montaje del experimento</i> .....	7
Figura 1. Jarra de Leonard para la fitorremediación de suelo contaminado con aceite residual automotriz (García-González et al., 2005). .....	8
b) <i>Diseño experimental</i> .....	8
Tabla 1. Diseño experimental para analizar la biorremediación de un suelo contaminado con 80,000 ppm de aceite residual automotriz por bioestimulación múltiple.....	8
Tabla 2. Diseño experimental para analizar la biorremediación de un suelo contaminado con aceite residual automotriz vía bioestimulación múltiple y fitorremediación con <i>Sorghum vulgare</i> .....	8
c) <i>Propiedades fisicoquímicas del suelo</i> .....	9
Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas iniciales del suelo empleado en este estudio. .	9
d) <i>Determinación en suelo con aceite residual automotriz de la concentración óptima de ABS y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para su bioestimulación.</i> .....	9
e) <i>Cuantificación de la producción de CO<sub>2</sub> en suelo contaminado con 80,000 ppm de aceite residual automotriz bioestimulado con ABS y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.</i> .....	10
f) <i>Biorremediación del suelo con aceite residual automotriz por bioestimulación con solución mineral y Vicia sativa (abono verde).</i> .....	10
g) <i>Fitorremediación del suelo contaminado con aceite residual automotriz con Sorghum vulgare potenciado con Bacillus cereus y Burkholderia cepacia.</i> .....	12
h) <i>En suelo cuantificación de la población microbiana heterotrófica oxidante de aceite residual automotriz inducida por la bioestimulación múltiple.</i> .....	13
i) <i>Análisis estadístico</i> .....	13
5. Resultados y Discusión .....	14
Figura 2. Biorremediación de suelo un contaminado con 80,000 ppm de aceite residual automotriz vía bioestimulación con ABS al 4%, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , solución mineral y	

<i>Vicia sativa</i> integrado como abono verde, sobre su concentración después de 45 y 75 días. ....	14
Figura 3. En suelo contaminado con 5,510 ppm de aceite residual automotriz: porcentaje de germinación de <i>Sorghum vulgare</i> potenciado con <i>Bacillus cereus</i> y <i>Burkholderia cepacia</i> , para su fitorremediación. ....	16
Figura 3a. En suelo contaminado con 5,510 ppm de aceite residual automotriz: fenología de <i>Sorghum vulgare</i> a plántula potenciado con <i>Bacillus cereus</i> y <i>Burkholderia cepacia</i> , para su fitorremediación. ....	17
Figura 3b. En suelo contaminado con 5,510 ppm de aceite residual automotriz: biomasa de <i>Sorghum vulgare</i> a plántula potenciado con <i>Bacillus cereus</i> y <i>Burkholderia cepacia</i> , para su fitorremediación. ....	19
Figura 3c. En suelo contaminado con 5,510 ppm de aceite residual automotriz: biomasa de <i>Sorghum vulgare</i> a plántula potenciado con <i>Bacillus cereus</i> y <i>Burkholderia cepacia</i> , para su fitorremediación. ....	20
Tabla. En suelo cuantificación de la población microbiana heterotrófica oxidante de aceite residual automotriz inducida por la bioestimulación con el ABS al 4%, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> solución mineral y <i>Vicia sativa</i> o abono verde. ....	22
Tabla 8. Fitorremediación del suelo contaminado con 5,510 ppm de aceite residual automotriz remanente, con <i>Sorghum vulgare</i> potenciado con <i>Bacillus cereus</i> y <i>Burkholderia cepacia</i> a nivel de plántula y a 60 días de su crecimiento. ....	23
Figura 4. En suelo contaminado con 5,510 ppm de aceite residual automotriz: fenología de <i>Sorghum vulgare</i> a floración potenciado con <i>Bacillus cereus</i> y <i>Burkholderia cepacia</i> , para su fitorremediación. ....	24
Figura 4b. En suelo contaminado con 5,510 ppm de aceite residual automotriz: biomasa de <i>Sorghum vulgare</i> a floración potenciado con <i>Bacillus cereus</i> y <i>Burkholderia cepacia</i> , para su fitorremediación. ....	25
Figura 4c. En suelo contaminado con 5,510 ppm de aceite residual automotriz: biomasa de <i>Sorghum vulgare</i> a floración potenciado con <i>Bacillus cereus</i> y <i>Burkholderia cepacia</i> , para su fitorremediación. ....	27
Tabla 10. Fitorremediación del suelo contaminado con de aceite residual automotriz remanente a la segunda bioestimulación con <i>Vicia sativa</i> como abono verde, con <i>Sorghum vulgare</i> a floración. ....	28
6. Conclusión.....	29
7. Bibliografía.....	30
8. Anexos.....	37

## Tabla de acrónimos

<b>Acrónimo</b>	<b>Significado</b>
AP	Altura de planta
ARA	Aceite residual automotriz
AV	Abono verde
BR	Biorremediación
BS	Bioestimulación
CA	Control absoluto
CN	Control negativo
CR	Control relativo
FR	Fitorremediación
HC	Hidrocarburos
LR	Longitud radical
NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012	NOM-138
PDA	Agar papa dextrosa
PFA	Peso fresco aéreo
PFR	Peso fresco radical
PSA	Peso seco aéreo
PSR	Peso seco radical
SM	Solución mineral
SPCV	Substancia promotora de crecimiento vegetal
UFC	Unidades formadoras de colonias

## Resumen

En México y el mundo, el suelo contaminado con 80,000 ppm una concentración relativamente alta de aceite residual automotriz (ARA) derivado del uso de automotores, se soluciona por biorremediación (BR) al mejorarla con una bioestimulación (BS) múltiple con alquil bencen sulfonato (ABS), que emulsifique eficazmente el ARA, una fuente disponible de O<sub>2</sub> (oxígeno) u H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y acciones de enriquecimiento nutricional del suelo; una solución mineral (SM) y *Vicia sativa* como abono verde (AV) concluida con fitorremediación (FR) para reducir la concentración aun nivel máximo permisible de 4,400 ppm por la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012 (NOM-138), y en ese suelo sembrar *Lactuca sativa* un bioindicador sensible a HC que indique que ya no es toxico. Al respecto la información en la literatura es insuficiente. La hipótesis de esta investigación fue que: la BR mejorada de un suelo contaminado con 80,000 ppm de ARA con una BS múltiple con ABS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, SM y AV concluir con FR con *S. vulgare* potenciado con *B. cereus* y/o *B. cepacia* disminuye el ARA por debajo del límite máximo permisible por la NOM-138. Los objetivos de esta investigación fueron: i) la BS secuencial de un suelo contaminado 80,000 ppm de ARA con ABS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, SM, AV, y ii) la FR de ese suelo con *Sorghum vulgare* potenciado con *Bacillus cereus* y *Burkholderia cepacia*, para minimizar el ARA a concentración inferior a la máxima permisible según la NOM-138. Los resultados indicaron que la BS del suelo con ABS y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, disminuyeron el ARA de 80,000 ppm a 7,700 ppm, en 45 días. En tanto que la BS con SM/AV decreció el ARA a 5,510 ppm en 75 días. Finalmente, la FR con *S. vulgare* potenciado con *B. cereus*/*B. cepacia*, minimizo el ARA a 500 ppm, inferior a al máximo de la NOM-138 lo anterior sugiere que la combinación, BS con ABS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, SM, AV y la FR potenciada con BPCV permite usar acciones biológicas en lugar de las químicas sin efectos negativos secundarios.

**Palabras clave:** hidrocarburos, solubilización, rizomicroorganismos, mineralización, restauración.

## Abstract

In Mexico and the world, soil contaminated with 80,000 ppm a relatively high concentration of automotive residual oil (ARO) derived from the use of motor vehicles, is solved by bioremediation (BR) to improve with a biostimulation (BS) manifold with alkyl benzene sulfonate (ABS), which effectively emulsify the ARA, a ready source of O<sub>2</sub> (oxygen) or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and actions of nutritional enrichment of the soil; a mineral solution (SM) and *Vicia sativa* as green manure (AV) concluded with phytoremediation (FR) to reduce the maximum allowable concentration of 4,400 ppm level even by NOM-138-SEMARNAT / SSA1-2012 (NOM-138), and in that soil to plant *Lactuca sativa* HC sensitive biomarker to indicate that it is no longer toxic. About the information in the literature is insufficient. The hypothesis of this research was that: the improved soil contaminated with 80,000 ppm of ARA with multiple BS with ABS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, SM and FR BR AV conclude with *S. vulgare* boosted with *B. cereus* and / or *B. cepacia* ARA decreases below the allowable limit by NOM-138. The objectives of this research were: i) a sequential BS contaminated soil ARA 80,000 ppm with ABS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, SM, AV, and ii) the FR of the *Sorghum vulgare* floor with *Bacillus cereus* and boosted with *Burkholderia cepacia*, to minimize ARA to below the maximum permissible concentration according to NOM-138. The results indicated that the soil BS with ABS and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decreased ARA 80,000 ppm to 7,700 ppm, in 45 days. While the BS with SM / AV ARA decreased to 5,510 ppm in 75 days. Finally, FR *S. vulgare* enhanced with *B. cereus* / *B. cepacia*, downplayed the ARA 500 ppm, less than the maximum of the NOM-138 this suggests that the combination, BS with ABS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, SM, AV and FR enhanced with PGPR allows using biological action in place of chemical free negative side effects.

**Keywords:** *hydrocarbons, solubilization, rizomicroorganismos, mineralization, restoration*

## **1. Introducción y Antecedentes**

El aceite residual automotriz (ARA) es una mezcla de hidrocarburos alifáticos, aromáticos y otros elementos; producto del ciclo de lubricación de automotores y maquinaria industrial, en México se le clasifica como un residuo peligroso según la Ley General de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente (LGEEPA, 2012) por su inadecuada disposición final se derrama en suelo (Agarry & Latinwo, 2015; Vaca, Flores, Bandala, & Torres, 2013). Por su composición química es tóxico para la vida humana y vegetal (O. P. Abioye, Agamuthu, & Abdul, 2012; Agamuthu, Abioye, & Aziz, 2010). Cuando se derrama en suelo el ARA forma una película hidrofóbica que impide la difusión de agua y el intercambio gaseoso con la atmosfera, afecta la relación C:N, lo que inhibe la actividad microbiana encargada de la mineralización de la materia orgánica relacionada con los ciclos biogeoquímicos que sustentan la vida, esto reduce su fertilidad y en consecuencia una drástica disminución en la producción agrícola (Abdulsalam & Omale, 2009; Banks, Kulakow, Schwab, Chen, & Rathbone, 2003). En suelo la concentración máxima aceptada es de 4,400 ppm como límite según la NOM-138-SEMARNAT/SS, 2012 (NOM-138) por lo que es necesario aplicar un método de remediación para minimizar su nivel a un valor inferior al señalado por la NOM-138 y mejor aún emplear un bioindicador para asegurar que el suelo quedo libre de contaminación y emplearse para cualesquier fin útil humano o animal (O. P. Abioye et al., 2012; Millioli, Servulo, & Sobral, L. G. S., & De Carvalho, 2009; Minoui, Minai-Tehrani, & Shahriari, 2015).

En suelo contaminado con una concentración relativamente alta de ARA de mayor a 35,000 ppm, de acuerdo con normas nacionales o internacionales de contaminación



ambiental por HC como la United States Environmental Protection Agency (EPA, 1992) y con lo reportado en la literatura, lo conveniente es usar remediación química con agentes oxidantes nocivos para la salud humana y vegetal como el  $\text{KMnO}_4$  (permanganato de potasio), el  $\text{NaClO}$  (hipoclorito de sodio), el  $\text{Cl}_2$  (cloro), el  $\text{O}_3$  (ozono) y el  $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$  (persulfato) etc. (Adibarata & Achibana, 2009; Wang et al., 2012) pero es limitado por ser costosa y generar una contaminación colateral al ambiente (Dominguez-Rosado & Pichtel, 2004; Vallejo, Salgado, & Roldan, 2005). En suelo contaminado con una relativa elevada concentración de ARA, una alternativa ecológica y relativamente barata que podría evitar el empleo de agentes químicos nocivos, es la biorremediación (BR) por bioestimulación (BS) que recomienda el uso de detergentes anionicos como el alquil bencen sulfonato (ABS) para facilitar su mineralización (S. E. Agarry & Ogunleye, 2012; S. Agarry & Latinwo, 2015), además de una fuente de  $\text{O}_2$  simple como el  $\text{H}_2\text{O}_2$  (peróxido de hidrogeno) para la oxidación de los HC del ARA de la fracción de HC alifáticos y oxidación parcial de la fracción aromática (Asquith, Geary, Nolan, & Evans, 2012; Franzetti, Gandolfi, Bestetti, & Banat, 2010).

Sin embargo se requiere una base mineral adecuada para los microorganismos heterotróficos oxidantes de esta mezcla, que en suelo restituya su relación C:N y mejore la acción oxidante de la microbiota, con una solución mineral (SM) en balance adecuado de los principales compuestos inductores de la actividad microbiana oxidante de los HC del ARA y *Vicia sativa* integrado como abono verde (AV) que suple la demanda de nutrientes especialmente de N, P y K que induce una mayor diversidad y densidad microbiana nativa aerobia heterotrófica especializada a mineralizar las fracciones de los HC del ARA (Abioye, Abdul Aziz, & Agamuthu, 2010; Ighovie, 2012; Osaigbovo, Law-Ogbomo, & Agele, 2013). En suelo esta fase se disminuye la concentración de ARA para

permitir la posterior fitorremediación (FR) con plantas que naturalmente lo toleraren y lo degraden con *Sorghum vulgare* su capacidad y adaptación fisiológica que le permite un patrón de crecimiento del sistema radical extenso y fibroso para evitar la fitotoxicidad del ARA, potenciado con géneros de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) como *Bacillus cereus* y *Burkholderia cepacia*, que estimulan su crecimiento vegetal al convertir exudados radicales en fitohormonas y además oxidan algunos HC del ARA (Southam, Whitney, & Knickerbocker, 2001; J. C. Tang et al., 2010; Zhao, 2011).

En la literatura se reporta que la BR o la FR de suelo contaminado con ARA se aplican como estrategia única e independiente de biorestauración, lo que por lo general solo decrece parcialmente su concentración. En contraste cuando la BR y FR se aplican de manera secuencial, es posible que se disminuya más rápido y en cantidad mayor que cuando solo se emplean independientemente, a un valor inferior al máximo permisible por la NOM-138. A pesar de que en la literatura relacionada con remediación de suelo contaminado con HC salvo la LGEEPA y la NOM-138 que establece los límites máximos permisibles de HC en suelo para la fracción de HC ligera de 200 ppm, la fracción media de 1,200 ppm y pesada de 3,000 ppm, en total 4,400 ppm, no existe un consenso sobre que concentración es el límite permisible para considerar si está o no remediado como lo reportan: Vallejo *et al.*, 2005 que analizaron la BR de un suelo contaminado con 30,000 ppm de petróleo crudo mediante la BS con fertilizante mineral reportó una disminución a 17,700 ppm en 28 días, esto indica que el problema de contaminación no se resolvió a un nivel máximo permisible por la NOM-138. Al respecto Abdulsalam & Omale., 2009 reportaron la BR de un suelo contaminado con 40,000 ppm de ARA por BS con fertilizante mineral que lo disminuyó a 12,320 ppm luego 42 días, evidentemente la estrategia individual de BS fue insuficiente de acuerdo con la NOM-138. Millioli *et al.*,

2009 reportaron la BR de un suelo contaminado con 50,000 ppm de petróleo mediante BS con una SM y un biosurfactante a base de ramnolípidos y lo redujo a 20,000 ppm, en 45 días, valor de concentración cinco veces mayor al límite máximo permitido por la NOM-138. Abioye *et al.*, 2012 reportó la BR de un suelo contaminado con 10,000 ppm y 25,000 ppm de ARA por BS con composta de residuos de setas y posterior FR con *Hibiscus cannabinus* y lo redujo a 8,225 ppm y 8,475 ppm respectivamente, en 90 días, valores que no indican que el problema de contaminación en suelo se resolvió según a la NOM-138. En tanto que, Asquith *et al.*, 2012 valoraron la BR de un suelo contaminado con 30,000 ppm de ARA por BS con detergente Teric® G9A6 al 1% y *Phaseolus vulgaris* como AV al 25%, que lo redujo a 8,400 ppm luego de 102 días, valor que no sostiene que el suelo fue recuperado de la contaminación a lo establecido por la NOM-138. Hernández-Espriú *et al.*, 2013 analizaron la BR de un suelo contaminado con 32,100 ppm de diesel por BS con surfactantes y lo redujo 6,898 ppm con Maranil LAB, mientras que con el detergente Texapon 40 lo redujo a 9,222 ppm, con el detergente SDS a 12,798 ppm y con Surfapcol G hasta 16,631 ppm, luego de 66 días, todos los valores de concentración aun altos para el límite máximo permitido por la NOM-138

Existen numerosos reportes sobre FR forma unilateral y no bilateral con la BR de suelo contaminado con mezclas de HC como el ARA, que emplearon plantas no aptas, sin potenciar con BPCV; en los resultados se indican que hubo una disminución de la concentración de la mezcla de HC, pero que de acuerdo con la NOM-138 el suelo no se ha remediado al no reportar una cantidad inferior al límite máximo permisible por esta regulación ambiental; como lo señalado por: Merkl *et al.*, 2005, que reportaron la FR de un suelo contaminado con 50,000 ppm de petróleo crudo con *Brachiaria brizantha* que lo redujo a 31,000 ppm, mientras que *Eleusine indica* lo disminuyo a 30,000 ppm en 120

días, estos valores no minimizaron los HC del petróleo a un nivel aceptable por la NOM-138. Así mismo, Shirdam *et al.*, 2008, reportaron la FR de un suelo con 40,000 ppm de petróleo crudo con *Sorghum vulgare* y lo decreció a 9,500 ppm después de 90 días, lo que de acuerdo con la NOM-138 indico que en suelo la concentración de petróleo crudo remanente aún fue tóxica para ese ambiente. En tanto que Njoku *et al.*, 2009, analizaron la FR de un suelo contaminado con 75,000 ppm de petróleo crudo con *Glycine max* y lo disminuyo a 44,000 ppm luego de 105 días, este valor indica que el problema de contaminación no se resolvió, acuerdo a lo establecido por la NOM-138. Tanee y Akonye., 2009, reportaron la FR de un suelo contaminado por 50,000 ppm de petróleo crudo con *Vigna unguiculata* que disminuyo a 6,000 ppm luego de dos meses, sin embargo, la concentración restante de HC no sostiene que la contaminación haya decrecido a un nivel aceptable por la norma NOM-138. Mientras que, Agamuthu *et al.*, 2010, señalaron la FR de un suelo con 25,000 ppm de ARA con *Jatropha curcas*, y lo redujo a 8,175 ppm luego de 180 días, este valor muestra que evidentemente el problema de contaminación no se solucionó, a un nivel aceptable por la NOM-138. Por otro lado, Zand *et al.*, 2010, reportaron la FR de un suelo contaminado con 40,000 ppm de petróleo crudo con *Zea mays* que disminuyo hasta 17,920 ppm después de 120 días, este valor fue insuficiente para señalar que el suelo fue biorecuperado, según la NOM-138. De la misma manera que Basumatary *et al.*, 2012, reportaron la FR de un suelo contaminado con 81,500 ppm de petróleo ligero con *Cyperus rotundus* y lo redujo a 49,878 ppm luego de 180 días, valor que indica fue insuficiente para corregir el problema de contaminación con base en la NOM-138. Entre tanto, Asiabadi *et al.*, 2014, analizaron la FR de un suelo con 75,000 ppm de petróleo con *S. bicolor* que lo disminuyo hasta 27,000 ppm en 90 días, valor que no arreglo el problema de contaminación del suelo a lo establecido NOM-138.

Lo anterior señala que es necesario ajustar criterios para definir cuando el empleo de BR o FR o ambos han solucionado un problema de contaminación, la información al respecto es nula y su concesión es inconsistente con la realidad. Es por ello que un aspecto innovador es la BS secuencial de un suelo contaminado 80,000 ppm de ARA con ABS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, SM, AV y su posterior FR con *S. vulgare* potenciado con *B. cereus* y *B. cepacia*. Al finalizar la BR de ese suelo sembrar *Lactuca sativa* sensible a HC un bioindicador de que el suelo quedo libre de esta mezcla contaminante (Adam & Duncan, 2003; Minoui et al., 2015; Sharifi, Sadeghi, & Akbarpour, 2007).

## 2. Hipótesis

La BR mejorada de un suelo contaminado con 80,000 ppm de ARA por BS múltiple con ABS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, SM y AV y con su ulterior FR con *S. vulgare* potenciado con *B. cereus* y/o *B. cepacia*, puede disminuir el ARA por debajo del límite máximo permisible por la NOM-138. Concluir con la siembra de *Lactuca sativa* sensible a HC un bioindicador de que el suelo quedo biorestaurado y libre de esta mezcla contaminante.

## 3. Objetivos

i) La BS secuencial de un suelo contaminado 80,000 ppm de ARA con ABS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, SM, AV, y ii) la FR de ese suelo con *Sorghum vulgare* potenciado con *Bacillus cereus* y *Burkholderia cepacia*, para minimizar el ARA a concentración inferior a la máxima permisible según la NOM-138.

## 4. Material 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%. Para este ensayo se usó un suelo colectado de un sitio ubicado a los 19° 39' 27'' de latitud norte 100° 19' 59'' de longitud oeste, con una altitud de 1,820 msnm de clima templado en un terreno agrícola denominado La Cajita de la Tenencia Zapata de la ciudad de Morelia, sobre el Km 5 de la carretera Morelia-Pátzcuaro, Michoacán, México. El suelo se solarizó a 70°C por 48 h para minimizar el problema de plagas y enfermedades, posteriormente se tamizó con una malla del No. 20. El suelo se contaminó artificialmente con 80,000 ppm de ARA proveniente de un taller mecánico diluido con una solución de detergente La Corona® al 4%. Este detergente, cuyo principio activo es el ABS, modifica su emulsificación para facilitar su mineralización sin modificar sustancialmente la composición química del ARA (Asquith et al., 2012; Franzetti et al., 2010; Oladapo T. Okareh, 2012).

Después se colocó 1.0 Kg suelo en el contenedor superior de la unidad experimental jarra de Leonard (Figura 1); mientras que la SM (o agua) se colocó en el reservorio de la parte inferior. Ambas partes se conectaron por una tira de algodón de aproximadamente 20 cm de largo, para permitir el movimiento de la SM por capilaridad al suelo según el tratamiento especificado en la Tabla 1 del diseño experimental: suelo sin contaminar con ARA irrigado únicamente con agua, usado como control absoluto (CA); ese mismo suelo sin ARA y alimentado con SM, control relativo (CR); suelo contaminado con ARA sin

biorremediar o fitorremediar, control negativo (CN), y suelo impactado con ARA para su BR/FR.



**Figura 1.** Jarra de Leonard para la fitorremediación de suelo contaminado con aceite residual automotriz (García-González et al., 2005).

### b) Diseño experimental

**Tabla 1.** Diseño experimental para analizar la biorremediación de un suelo contaminado con 80,000 ppm de aceite residual automotriz por bioestimulación múltiple.

Suelo tratado con	Aceite residual Automotriz	Solución mineral	<i>Vicia sativa</i> (abono verde)
Solo agua (Control absoluto)	-	-	-
Sin bio ni fitorremediación (Control negativo)	+	-	-
Bioestimulación con ABS y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	+	+*	+

(+) =agregado (-) =no agregado, \*NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, n=6.

**Tabla 2.** Diseño experimental para analizar la biorremediación de un suelo contaminado con aceite residual automotriz vía bioestimulación múltiple y fitorremediación con *Sorghum vulgare*.

Suelo tratado con	80,000 ppm de aceite residual automotriz	Fitorremediación con <i>Sorghum vulgare</i>
Solo agua (Control absoluto)	-	+
Solución mineral (Control relativo) *	-	+
Sin bio ni fitorremediación (Control negativo)	+	-
<b><i>Sorghum vulgare</i> potenciado con</b>		
a) <sup>abc</sup> <i>Bacillus cereus</i> *	+	+
b) <sup>abc</sup> <i>Burkholderia cepacia</i> *	+	+
c) <sup>abc</sup> <i>B. cereus</i> y <i>B. cepacia</i> *	+	+
d) <sup>c</sup> Sin <i>B. cereus</i> y <i>B. cepacia</i>	+	+

(+) =agregado (-) = no agregado, \*NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>; a: etapa de bioestimulación/solución mineral/abono verde, b: etapa fitorremediación, n=6.

### *c) Propiedades fisicoquímicas del suelo*

En la Tabla 3 se reportan las propiedades fisicoquímicas del suelo; con base en ello se clasificó como franco-arcilloso-arenoso con un pH moderadamente ácido de 6.41, con un bajo contenido de materia orgánica de 4.30%; alta capacidad de intercambio catiónico de 32.45 cmol(+) Kg<sup>-1</sup>, de textura: arcilla 24%, limo 22% y arena 54% (Basumatary, Saikia, & Bordoloi, 2012; Millioli et al., 2009; NOM-021-SEMARNAT-2000, 2002), realizado en el Laboratorio de Edafología de la Facultad de Biología de la UMSNH.

**Tabla 3.** Propiedades fisicoquímicas iniciales del suelo empleado en este estudio.

<b>Parámetro</b>	<b>Valor</b>
Nitrógeno (g/%)	0.62
Fósforo (g/%)	0.30
pH (1:20)	6.41
Material orgánica (%)*	4.30
Capacidad de intercambio catiónico (cmol(+) Kg <sup>-1</sup> )	32.45
Textura (%)	24(Ac)-22(L)-54(Ar)
Densidad real (g/cm <sup>3</sup> )	2.04
Densidad aparente (g/cm <sup>3</sup> )	0.96
Porosidad** (%)	53.74
Porcentaje de saturación de humedad (%)	38
Capacidad de campo *** (%)	18.89
Humedad aprovechable (%)	9.45

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-REC/NAT-2000.

### *d) Determinación en suelo con aceite residual automotriz de la concentración óptima de ABS y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para su bioestimulación.*

Para ello en matraces tipo Bartha de 250 mL se colocaron 100 g de suelo previamente pulverizado y secado a 40°C por 24 h. Se prepararon soluciones de detergente comercial líquido y sólido: La Corona® al 1.0%, 2.0%, 3.0%, 4.0% (p/v y v/v), cuyo principio activo es el ABS, entonces por cada 100 g de suelo se tomó una alícuota de 10.0 mL de cada una de las soluciones detergentes referidas y se mezcló con 8.0 mL de ARA, volumen suficiente para mantener la humedad del suelo a capacidad de campo y se midió



la actividad microbiana por captación de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) en álcali (S. E. Agarry & Ogunleye, 2012; Asquith et al., 2012; Tsai, Kao, Surampalli, & Chien, 2009).

***e) Cuantificación de la producción de CO<sub>2</sub> en suelo contaminado con 80,000 ppm de aceite residual automotriz bioestimulado con ABS y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.***

La producción de CO<sub>2</sub> en suelo contaminado con 80,000 ppm de ARA se determinó por captación de CO<sub>2</sub> en álcali. En matraz Bartha con el suelo contaminado con 80,000 ppm de ARA, se agregó 10.0 mL de NaOH 0.1 N en el reservorio del matraz y una gota de fenolftaleína al 0.1% como indicador de pH. Se tapó la entrada del matraz y los reservorios con tapones de hule. El tapón para la boca del matraz tenía una trampa de CaCO<sub>3</sub> para el CO<sub>2</sub> atmosférico. Se tituló con NaOH 0.1 N cada tres días, se sustituyó el volumen de NaOH gastado en el reservorio del matraz en la siguiente cuantificación de CO<sub>2</sub>. Se realizaron los cálculos para determinar la cantidad de CO<sub>2</sub> desprendido por el suelo expresado en mg CO<sub>2</sub> 100 g<sup>-1</sup> de suelo seco (Abioye et al., 2012; Agamuthu et al., 2010; Margesin, 2000).

***f) Biorremediación del suelo con aceite residual automotriz por bioestimulación con solución mineral y Vicia sativa (abono verde).***

En la jarra de Leonard, la BR del suelo contaminado con 80,000 ppm de ARA se aplicó la BS primero con una SM con la siguiente composición química (g L<sup>-1</sup>): 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>, 1.0; NaCl, 0.1; CaCl<sub>2</sub>, 0.1; FeSO<sub>4</sub>; trazas y 10.0 mL L<sup>-1</sup> de solución de microelementos (g L<sup>-1</sup>): 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 6.8-7.0 (Abdulsalam & Omale, 2009; Vallejo et al., 2005), aplicada cada tres días por un mes. Así mismo se adicionaron 5.0 mL de una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comercial al 3.0% por Kg de suelo; luego se cuantificó la concentración del ARA

por Soxhlet y contenido de N total y  $\text{PO}_4^{-3}$  soluble, en el Laboratorio de Nutrición y Análisis de Alimentos de la FMVZ-UMSNH (Hernández-Espriú, Sánchez-León, Martínez-Santos, & Torres, 2013; Merkl, Schultze-kraft, & Infante, 2005).

En la segunda BS del suelo contaminado con ARA se inoculo *Vicia sativa* con *B. cereus* y/o *B. cepacia* luego se incorporó como AV. Se tomó una asada del medio de conservación con *B. cereus* en caldo nutritivo con la siguiente composición ( $\text{g L}^{-1}$ ): extracto de carne, 3.0; peptona de carne, 5.0, pH ajustado a 7.0 y se pasteurizo en baño María a  $72.5^\circ\text{C}$  por 12 min y baño de hielo por 5 min. Luego se cultivó en agar nutritivo de misma composición y con agar, 18.0 g. En tanto que *B. cepacia* se cultivó en caldo *Pseudomonas cepacia* ácido azaleico y triptamina (CPCAT) con la siguiente composición ( $\text{g L}^{-1}$ ): triptamina, 0.2; ácido azaleico, 2.0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 4.0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4.0; extracto de levadura, 0.02;  $\text{MgSO}_4$ , 0.2 y pH 6.7, y se resembro en medio PCAT de misma composición y agar, 18.0 g, ambas BPCV se incubaron a  $30^\circ\text{C}$  por 72 h. Entonces por cada 20 semillas de *V. sativa* se trataron con 1.0 mL de cada género de BPCV la suspensión bacteriana se ajustó a la solución patrón No. 0.5 del nefelómetro de McFarland equivalente a  $1.5 \times 10^8$  bacterias y se inocularon *B. cereus* y *B. cepacia* en relación 1:1 (v/v) de cada una a partir de la suspensión bacteriana (García-González et al., 2005). Luego se sembraron 6 semillas por jarra de Leonard de *V. sativa* tratado con las BPCV y dejo crecer hasta plántula equivalente a 25 días después de su siembra, se barbecho e incorporo al suelo y se dejó mineralizar por 30 días. Al finalizar la BS doble se midió la concentración de ARA remanente por Soxhlet, el N total y el  $\text{PO}_4^{-3}$  soluble (Romanus, Ikechukwu, Patrick, Goddey, & Helen, 2015).

**g) Fitorremediación del suelo contaminado con aceite residual automotriz con *Sorghum vulgare* potenciado con *Bacillus cereus* y *Burkholderia cepacia*.**

Para continuar en este mismo suelo con su FR con *S. vulgare* potenciado con *B. cereus* y *B. cepacia*, sus semillas se inocularon de acuerdo al procedimiento previamente descrito para *V. sativa* (Adam & Duncan, 2003; Njoku, Akinola, & Oboh, 2009). Se determinó el perfil de sensibilidad de *B. cereus* y *B. cepacia* en agar nutritivo con sensidiscos de antibióticos para géneros bacterianos Gram positivo y negativos se incubaron a 30°C por 48 h. Se seleccionó cefalotina (CF) y amikacina (AK) como los antibióticos al cual *B. cereus* y *B. cepacia* mostraron sensibilidad respectivamente. Para inducir una marca de resistencia a CF y AK se cultivaron en caldo nutritivo con 15 µg mL<sup>-1</sup> del antibiótico referido, cada 24 h se cultivaron en caldo nutritivo con incremento de la concentración de este antibiótico, primero de 5 en 5 µg mL<sup>-1</sup> y después de 2 en 2 µg mL<sup>-1</sup> hasta obtener cepas resistentes. Entonces por cada 20 semillas de *S. vulgare* se trataron con 1.0 mL de cada género de BPCV la concentración se ajustó a la solución patrón No. 0.5 del nefelómetro de Mc Farland. Se colectaron 10.0 g de suelo rizosférico de *S. vulgare* y por cuenta viable en placa (CVP) mediante diluciones de 1.0 g de suelo en tubos con solución salina al 0.85% estéril de 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup> hasta 10<sup>-8</sup>, posteriormente se tomaron 0.2 mL y se sembró en agar nutritivo con CF y AK, se determinó el crecimiento de *B. cereus* y *B. cepacia* resistentes a CF y AK respectivamente y el número de UFC g suelo seco<sup>-1</sup> (Ravanbakhsh Shirdam, Zand, Bidhendi, & Mehrdadi, 2008; Taneer & Akonye, 2009).

Cuando *S. vulgare* alcanza el nivel de plántula y floración, en suelo se cuantificó la concentración del ARA remanente (Dominguez-Rosado & Pichtel, 2004). Para medir la respuesta de *S. vulgare* se consideró: sus días y porcentaje de germinación, se midió su fenotípica: altura de planta (AP) y longitud radical (LR) y biomasa: peso fresco aéreo y radical y el peso seco: aéreo y radical (PFA/PFR) / (PSA/PSR) y finalmente en suelo se

midió el ARA restante y se cuantificó la concentración de N total y  $\text{PO}_4^{-3}$  soluble (Diab, 2008; Gerhardt, Huang, Glick, & Greenberg, 2009).

***h) En suelo cuantificación de la población microbiana heterotrófica oxidante de aceite residual automotriz inducida por la bioestimulación múltiple.***

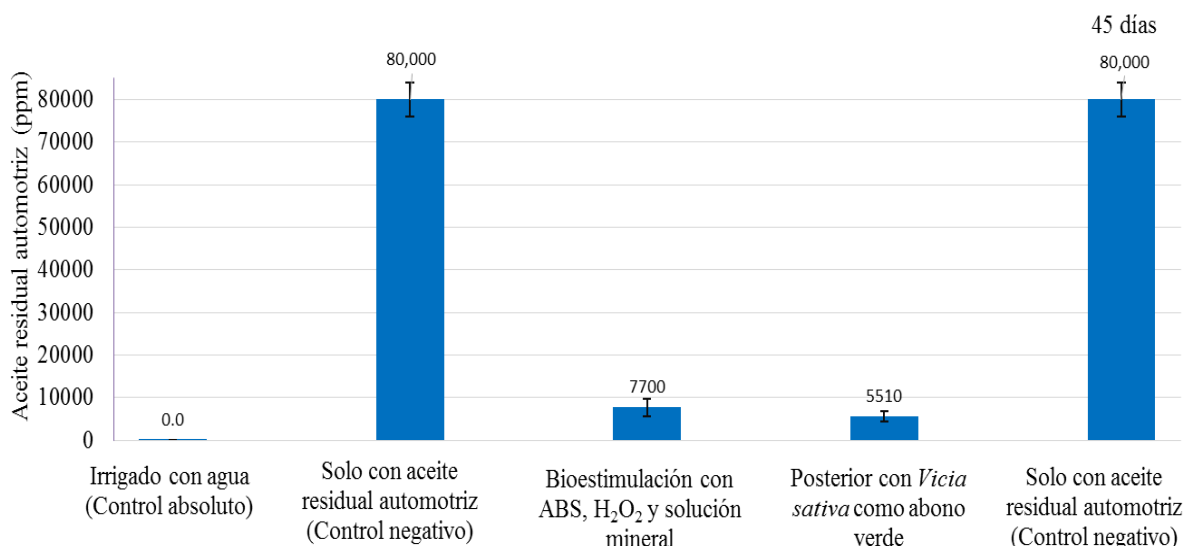
En suelo para la cuantificación de microorganismos heterotróficos oxidantes de ARA se empleó la técnica de CVP. Para ello, se pesó 1.0 g de suelo y se colocó en un tubo de ensaye con 9.0 mL de solución salina (NaCl 0.85%). Lo anterior constituyó la dilución  $10^{-1}$ . Se tomó 1.0 mL de la dilución anterior y añadió a otro tubo de ensaye con 9 mL de solución salina. Esta fue la dilución  $10^{-2}$ . Se repitió la operación anterior para obtener las diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-6}$ . Se transfirieron 0.2 mL de la dilución  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-6}$  a una caja de Petri con medio de cultivo base ARA de composición ( $\text{g L}^{-1}$ ): peptona de caseína, 5.0; extracto de levadura, 1.0;  $\text{H}_2\text{PO}_4$ , 2.5;  $\text{HPO}_4$ , 2.5;  $\text{MgSO}_4$ , 2.5; NaCl, 1.0; solución de oligoelementos,  $1.0 \text{ mL L}^{-1}$ , azul de bromotimol al 0.01%, 5.0 mL,  $10.0 \text{ mL L}^{-1}$  de ARA emulsificado con ABS al 4% (1:1) (4.0 mL detergente líquido por cada 100 mL de ARA); pH 7.0, agar, 18.0; incubación a  $30^\circ\text{C}$  por 48 h en triplicado. Luego se seleccionaron aquellas placas en donde aparecieron entre 30 y 300 colonias. Posteriormente se realizó el cálculo y reportó las UFC g de suelo (Bahadure, Kalia, & Chavan, 2013; Van Gestel, Mergaert, Swings, Coosemans, & Ryckeboer, 2003).

***i) Análisis estadístico***

Los datos experimentales se analizarán mediante análisis de varianza (ANOVA) y Tukey HSD al 0.05% con el paquete estadístico Statgraphics Centurion XVI.I (Hoffman & Nelson, 2004; Jasmine & Mukherji, 2014; Osaigbovo et al., 2013).

## 5. Resultados y Discusión

**Figura 2.** Biorremediación de suelo un contaminado con 80,000 ppm de aceite residual automotriz vía bioestimulación con ABS al 4%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, solución mineral y *Vicia sativa* integrado como abono verde, sobre su concentración después de 45 y 75 días.

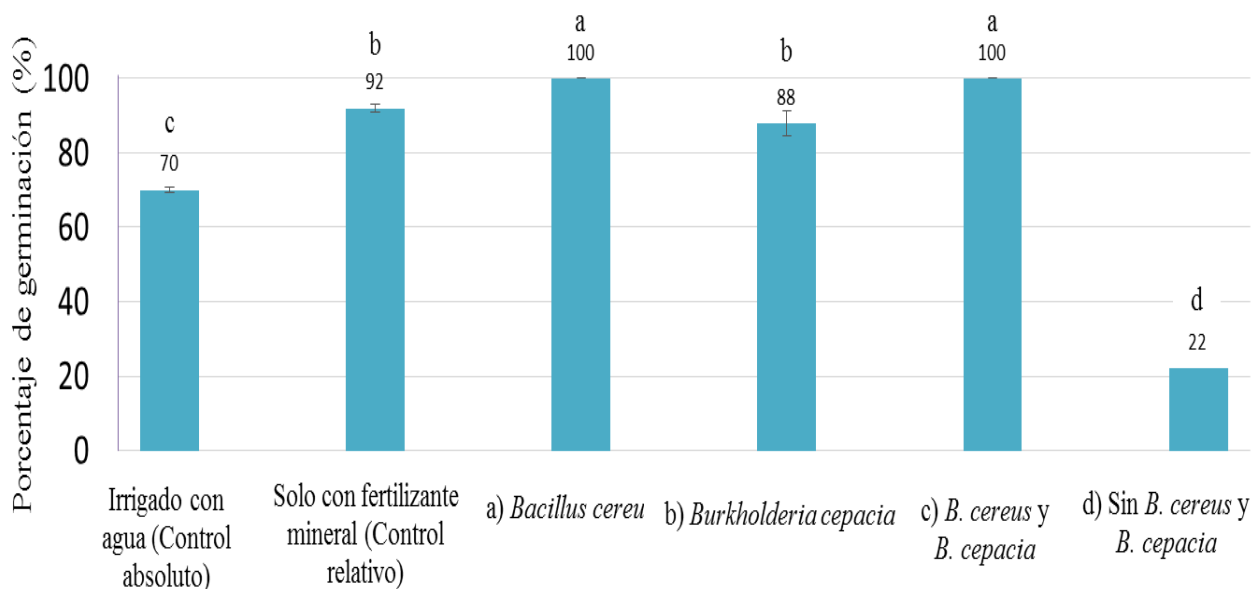


En el Figura 2, se reporta la BR del suelo contaminado con 80,000 ppm de ARA con el ABS al 4% y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la BS con SM durante los primeros 45 días del ensayo. En suelo la concentración inicial de ARA fue de 80,000 ppm, la BS con ABS al 4%, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la SM lo disminuyo hasta 7,700 ppm. Mientras que el mismo suelo contaminado con ARA sin biorremediar utilizado como CN la atenuación natural no cambio su concentración. Entre tanto la concentración de N total aumento de 0.63 g/% a 0.76 g/% y la de PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> soluble disminuyo de 0.30 g/% a 0.16 g/%. Lo anterior sugiere que en suelo la selección de detergente como forma de BS aumentó la emulsión del ARA, mejoro la distribución homogénea y susceptibilidad al ataque microbiano, además en suelo la oportuna adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como fuente alterna de O<sub>2</sub> incremento su disponibilidad, lo que aumento y acelero la actividad microbiana aerobia que acelero la oxidación de la fracción alifática y la aromática sencilla del ARA (Jagtap et al., 2014; T. C. Lin, Pan, & Cheng, 2010; Xu et

al., 2014). Mientras que la BS con la SM, las sales minerales equilibraron el desbalance nutricional que impide la actividad de mineralización de la microbiota heterotrófica aerobia nativa oxidante del ARA (Abid et al., 2014; Efe & Okpali, 2012; Kim, Choi, Sim, & Oh, 2005). Al respecto se reporta que en suelo impactado con mezclas de HC alifáticos como los del ARA y bioestimulado con nutrientes esenciales, se activa a la población aerobia que oxida en orden de complejidad los HC del ARA (P. O. Abioye et al., 2010; Agamuthu et al., 2010; Efe & Okpali, 2012).

En la Figura 2, se reporta la BS del suelo contaminado con 7,700 ppm de ARA remanente con *V. sativa* integrado como AV, que lo disminuyó hasta 5,510 ppm, luego de 75 días, comparado con el mismo suelo usado como CN sin bioestimar donde la concentración del ARA por la atenuación natural no cambió. Lo anterior indica que en suelo *V. sativa* integrado como AV incrementó la disponibilidad de compuestos especialmente de N y P, que mejoró el equilibrio y condición mineral del suelo, esto observado por el incremento de la concentración de N de 0.76 g/% a 0.84 g/% y en la concentración de  $\text{PO}_4^{-3}$  aumento de 0.16 g/% a 0.20 g/% (Osaigbovo et al., 2013). Se sugiere que en suelo luego de la incorporación de *V. sativa* como AV, incrementó la cantidad y disponibilidad de N tanto orgánico y como compuestos minerales que enriqueció el suelo para mantener la actividad de su microbiota a la mineralización de ambas fracciones del ARA (Caldwell, Tanner, & Suflita, 1999; Johannes & Majcherczyk, 2000).

**Figura 3.** En suelo contaminado con 5,510 ppm de aceite residual automotriz: porcentaje de germinación de *Sorghum vulgare* potenciado con *Bacillus cereus* y *Burkholderia cepacia*, para su fitorremediación.

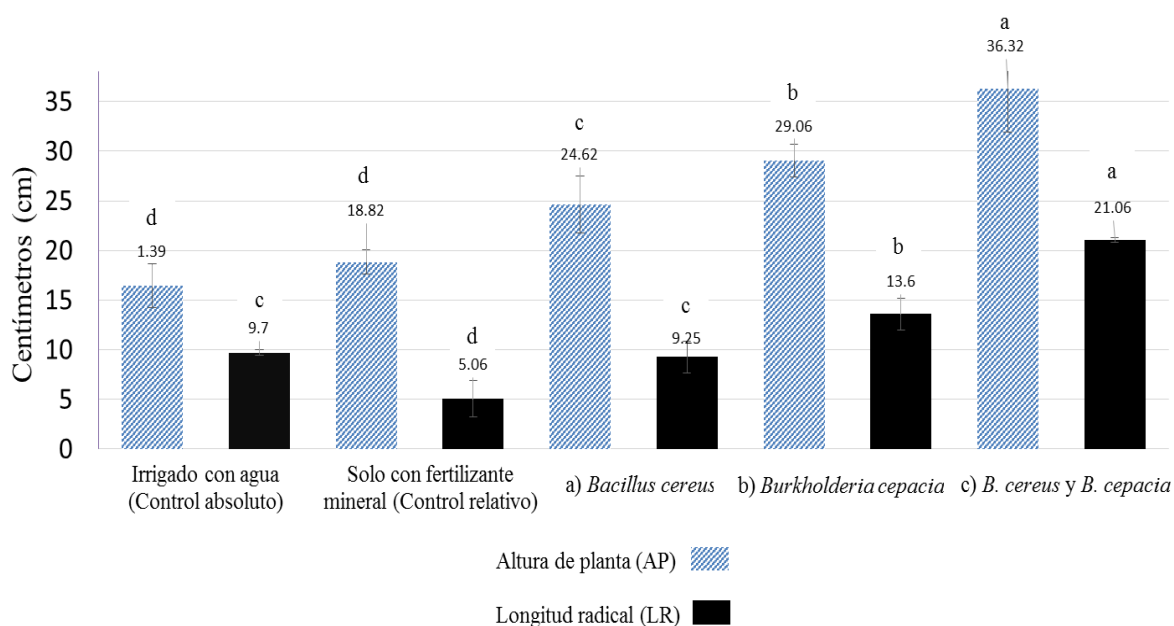


† En la columna medias seguidas por letras distintas son estadísticamente diferentes (ANOVA,  $P < 0.05$ , Tukey HSD),  $n = 6$ .

En la Figura 3, se muestra en suelo contaminado con 7,700 ppm de ARA, el por ciento de germinación de la semilla de *S. vulgare* potenciado con *B. cereus* y/o *B. cepacia* para su FR. La semilla de *S. vulgare* potenciada con *B. cereus* y la misma semilla de *S. vulgare* potenciada con ambas BPCV sembradas en el suelo contaminado con ARA registraron un 100% de germinación, con diferencia estadística comparado con el 92% de germinación en ese mismo suelo sin ARA en la semilla de *S. vulgare* usada como CR a su vez sin diferencia estadística comparado con el 88% de germinación de la semilla de *S. vulgare* inoculada solo con *B. cepacia*. Esto indica que en suelo con 7,700 ppm de ARA remanente la semilla de *S. vulgare* no fue afectada por la toxicidad del ARA, se sugiere que la difusión de agua y  $O_2$  en la semilla no fue inhibida por la acción hidrófoba del ARA (Asiabadi, Mirbagheri, Najafi, & Moatar, 2014; Tanee & Akonye, 2009), se sugiere que *B. cereus* y *B. cepacia* convirtieron los exudados de la semilla en germinación de *S.*

*vulgare* en fitohormonas o sustancias promotoras de crecimiento vegetal (SPCV) para contrarrestar el efecto tóxico del ARA (Magdalene, Ufuoma, & Gloria, 2009; Ogbo, Zibigha, & Odogu, 2009). En contraste la semilla de *S. vulgare* sin las BPCV y sembrada en el suelo contaminado con 80,000 ppm de ARA y sin ninguna forma de BS se registró un 22% de germinación, se ha reportado que los HC del ARA forman una cubierta hidrofóbica en la semilla bloquea la entrada de agua y su respiración lo que inhibe la actividad enzimática de asimilación del almidón, lo que retarda o inhibe su germinación (Sharifi et al., 2007).

**Figura 3a.** En suelo contaminado con 5,510 ppm de aceite residual automotriz: fenología de *Sorghum vulgare* a plántula potenciado con *Bacillus cereus* y *Burkholderia cepacia*, para su fitorremediación.

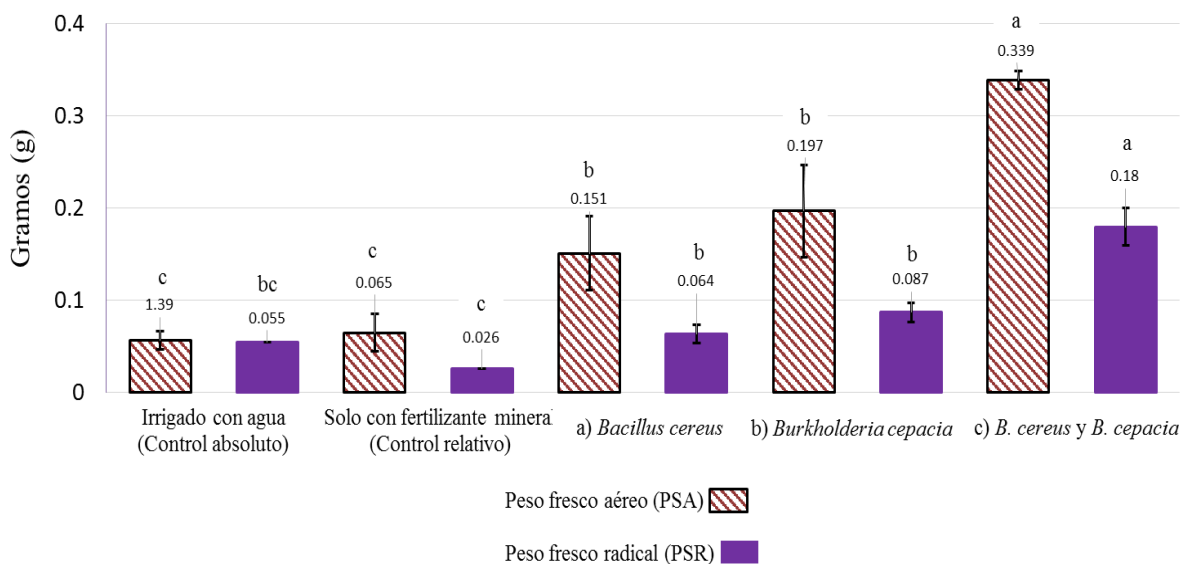


Así mismo, en la Figura 3a se reporta la tolerancia a la toxicidad del ARA remanente, el *S. vulgare* potenciado con *B. cereus* y *B. cepacia* registro una AP de 36.32 cm, valor con diferencia estadística comparado con los 29.06 cm de AP del *S. vulgare* potenciado solo con *B. cepacia* y con los 24.62 cm de AP de *S. vulgare* potenciado individualmente con



*B. cereus*, ambos valores numéricos estadísticamente diferentes comparados con la AP de 18.82 cm de *S. vulgare* en suelo sin contaminar con ARA empleado como CR y los 16.42 cm de AP de *S. vulgare* en suelo sin ARA e irrigado solo con agua o CA. Lo anterior sugiere que el efecto rizosférico de *S. vulgare* y la promoción de crecimiento vegetal de *B. cereus* y *B. cepacia* aumentaron la síntesis de fitohormonas o SPCV a partir de sus exudados radicales y potenciaron su tolerancia a la fitotoxicidad del ARA (). Mientras que en suelo con ARA el *S. vulgare* inoculado con ambas BPCV reportó la mayor LR de 21.06 cm, valor estadísticamente diferente comparado con los 13.60 cm de longitud radical de *S. vulgare* potenciado solo con *B. cepacia* a su vez estadísticamente diferente comparado con los 9.25 cm de LR de *S. vulgare* potenciado individualmente con *B. cereus*, estos valores numéricos estadísticamente diferentes comparados los 9.70 cm y 5.06 cm de LR de *S. vulgare* crecido en suelo sin ARA empleado como CA y CR respectivamente, lo anterior sugiere que en suelo *B. cereus* y *B. cepacia* por síntesis de fitohormonas o SPCV a partir de exudados radicales aumentaron en *S. vulgare* su LR y mejoro así su tolerancia a la toxicidad del ARA y capacidad de penetración al suelo con ARA (García, Ferrera, Almaráz, Rodríguez, & García, 2013; Quiñones-Aguilar et al., 2003).

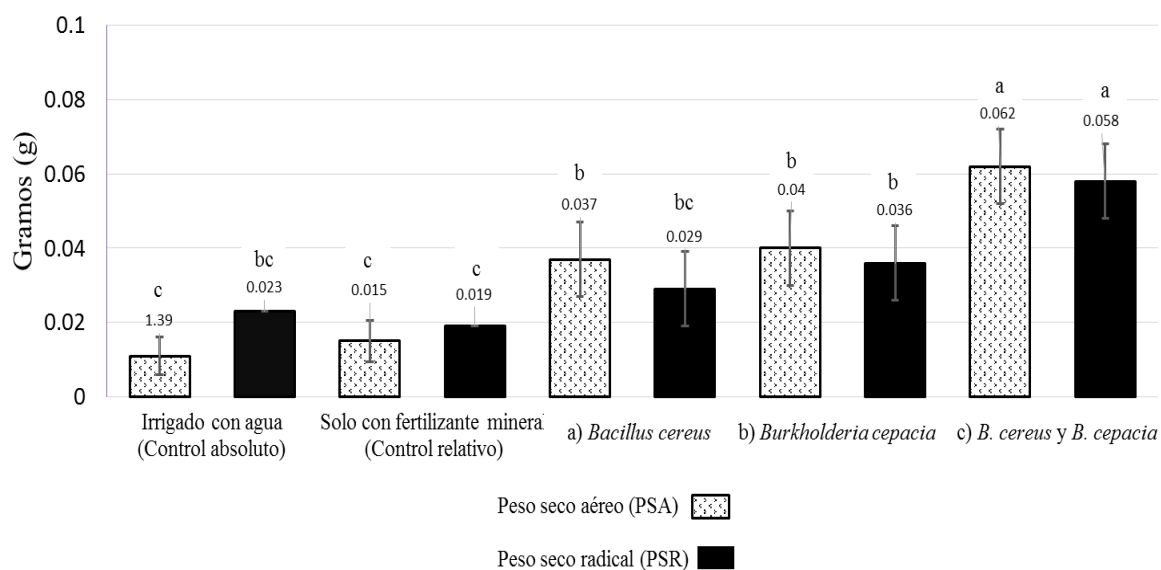
**Figura 3b.** En suelo contaminado con 5,510 ppm de aceite residual automotriz: biomasa de *Sorghum vulgare* a plántula potenciado con *Bacillus cereus* y *Burkholderia cepacia*, para su fitorremediación.



Durante la FR del suelo el mayor PFA fue 0.339 g de *S. vulgare* potenciado con ambas BPCV (Figura 3b), valor estadísticamente diferente comparado con el PFA de 0.197 g de *S. vulgare* inoculado con individualmente *B. cepacia* y con los 0.151 cm de *S. vulgare* tratado solo con *B. cereus*, lo anterior sugiere que ambas BPCV y microorganismos rizosféricos juegan un papel importante para potenciar la tolerancia y asimilación de *S. vulgare* y disminuir su sensibilidad a los HC recalcitrantes del ARA y enzimas de *S. vulgare* relacionadas con el metabolismo de la lignina que mineraliza las fracciones aromáticas del ARA más tóxicas, estos valores con diferencia estadística comparada con el valor del PFA de 0.057 g de *S. vulgare* empleado como CA crecido en suelo sin ARA, valores estadísticamente diferentes comparados con 0.065 g de PFA de *S. vulgare* referido como CR en suelo sin ARA y alimentado con el fertilizante mineral (Huang, El-Alawi, Penrose, Glick, & Greenberg, 2004; Ismail, Ijah, Riskuwa, Allamin, & Isah, 2014).

Mientras que en el mayor PFR fue 0.180 g de *S. vulgare* potenciado con ambas BPCV, valor estadísticamente diferente comparado con el PFR de 0.087 g de *S. vulgare* inoculado con individualmente *B. cepacia* y con los 0.064 g de *S. vulgare* tratado solo con *B. cereus*. Lo anterior sugiere que, en ese suelo contaminado con ARA, fitorremediado con *S. vulgare* potenciado con *B. cereus* y *B. cepacia*, hubo una conversión de sus exudados radicales en SPCV que favorecieron el incremento de su PFR y al mismo tiempo la mineralización del ARA (Baruah, Baruah, & Deka, 2013; Peng, Zhou, Cai, & Zhang, 2009), estos valores numéricos sin diferencia estadística comparada con el valor del PFR de 0.055 g de *S. vulgare* empleado como CA crecido en suelo sin ARA, pero valores estadísticamente diferentes comparados con los 0.026 g de PFR de *S. vulgare* referido como CR en suelo sin ARA y alimentado con la SM.

**Figura 3c.** En suelo contaminado con 5,510 ppm de aceite residual automotriz: biomasa de *Sorghum vulgare* a plántula potenciado con *Bacillus cereus* y *Burkholderia cepacia*, para su fitorremediación.



En la Figura 3c se muestra que, en suelo con ARA, el PSA de 0.062 g de *S. vulgare* potenciado con ambos géneros de BPCV valor estadísticamente diferente comparado con el PSA de 0.040 g de *S. vulgare* potenciado solo con *B. cepacia* y con los 0.037 g de PSA de *S. vulgare* potenciado con *B. cereus* ambos valores con diferencia estadística comparados con el PSA de 0.015 g y 0.011 g de *S. vulgare* usado como CR y CA respectivamente. Se sugiere que en *S. vulgare* la actividad promotora de crecimiento vegetal de *B. cereus* y *B. cepacia* a partir de los exudados radicales de *S. vulgare* aumentaron la síntesis de fitohormonas o SPCV, además de mejorar la tolerancia de *S. vulgare* a la fitotoxicidad del ARA y al mismo tiempo incrementaron la actividad de radical de absorción mineral al estrés causado por la contaminación del ARA en suelo (R Shirdam, Zand, Nabibidhendi, & Mehrdadi, 2009; Ravanbakhsh Shirdam et al., 2008)

Mientras que en el mayor PSR fue 0.058 g de *S. vulgare* potenciado con ambas BPCV, valor estadísticamente diferente comparado con el PSR de 0.036 g de *S. vulgare* inoculado con individualmente *B. cepacia* y con los 0.029 g de *S. vulgare* tratado solo con *B. cereus*, este valor sin diferencia estadística comparada con el valor del PSR de 0.023 g de *S. vulgare* empleado como CA crecido en suelo sin ARA, valores estadísticamente diferentes comparados con 0.019 g de PSR de *S. vulgare* referido como CR en suelo sin ARA y alimentado con el fertilizante mineral, lo anterior sugiere que en el suelo contaminado con ARA, *S. vulgare* desarrolló más raíces secundarias para incrementar la absorción de minerales y facilitar la difusión del agua y el O<sub>2</sub> en el suelo (Iwamoto & Nasu, 2001; Lee, Kang, & Cho, 2011). Se reporta que durante la fitodegradación de HC aromáticos del ARA, se inducen enzimas relacionadas con el anabolismo y catabolismo de lignina como la lacasa para su crecimiento y que disminuyen la fitotoxicidad del ARA al romper anillos aromáticos para que posteriormente sean mineralizados por *B. cereus* y

*B. cepacia* y por los microorganismos heterotróficos aerobios del suelo (Jagtap et al., 2014; Johannes & Majcherczyk, 2000).

**Tabla.** En suelo cuantificación de la población microbiana heterotrófica oxidante de aceite residual automotriz inducida por la bioestimulación con el ABS al 4%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solución mineral y *Vicia sativa* o abono verde.

Suelo tratado con	UFC g de suelo seco <sup>-1</sup>		
	0 días	45 días	75 días
Irrigado solo con agua (Control absoluto)	25.5x10 <sup>6</sup> ±1.64 <sup>b†</sup>	100.5x10 <sup>6</sup> ±1.58 <sup>b</sup>	158.5x10 <sup>6</sup> ±1.46 <sup>b</sup>
Solo con aceite residual automotriz (Control negativo)	24.5x10 <sup>6</sup> ±2.91 <sup>b</sup>	93x10 <sup>6</sup> ±1.57 <sup>c</sup>	45.3x10 <sup>6</sup> ±2.19 <sup>c</sup>
Suelo contaminado con aceite residual automotriz y bioestimulado con	<b>Inicial</b>	<b>Detergente liquido La Corona® al 4%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y solución mineral</b>	<b>Segunda y secuencial bioestimulación con <i>Vicia sativa</i> (abono verde)</b>
	55.5x10 <sup>6</sup> ±4.45 <sup>a</sup>	162x10 <sup>6</sup> ±0.20 <sup>a</sup>	211x10 <sup>6</sup> ±0.20 <sup>a</sup>

† En la columna medias seguidas por letras distintas son estadísticamente diferentes (ANOVA, P<0.05, Tukey HSD) (-) no evaluado, n=6.

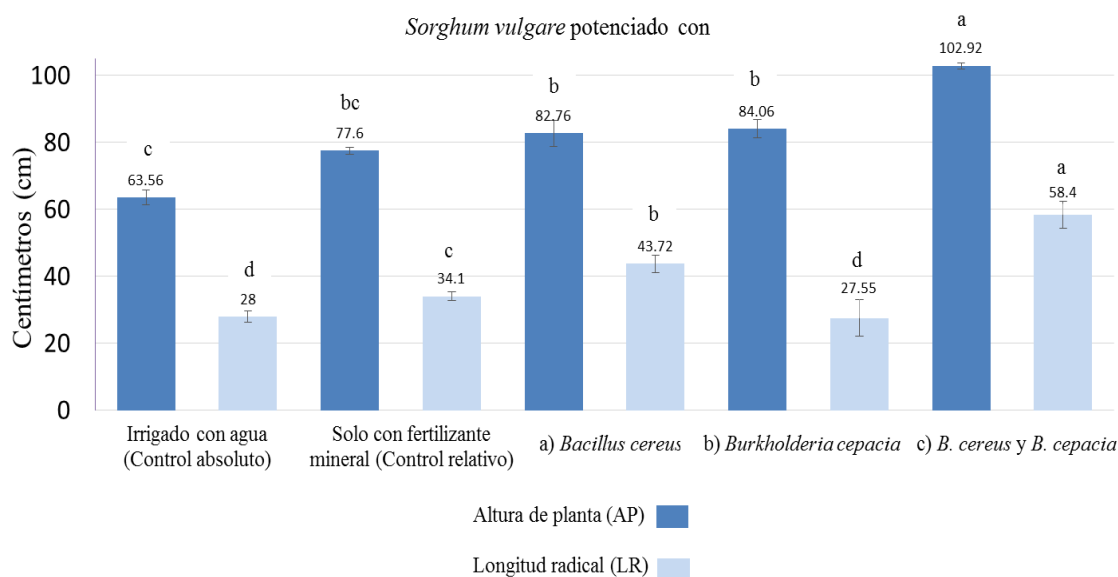
En la Tabla 7 se reporta en suelo la cuantificación de la población microbiana heterotrófica aerobia y oxidante de ARA inducida por los factores; el ABS al 4%, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la SM y el AV. Durante los primeros 45 días, lo cual se reflejó en el incremento de su densidad microbiana de 55.5x10<sup>6</sup> a 162x10<sup>6</sup> UFC g<sup>-1</sup> de suelo seco, cuando el mismo suelo con la segunda BS con *V. sativa* (AV) la población microbiana heterotrófica aerobia oxidante de ARA aumentó a 211x10<sup>6</sup> UFC g<sup>-1</sup>, luego de 75 días, esto sugiere que la mayor disponibilidad de nutrientes esenciales de N y P influyeron positivamente en la actividad de esa población para oxidar los HC del ARA (Popoviciu & Bercu, 2014). Estos valores con diferencia estadística comparado con el mismo suelo sin contaminar con ARA usado como CA que se registró un incremento de 25.5x10<sup>6</sup> hasta 158.5x10<sup>6</sup> UFC g<sup>-1</sup> en los 75 días, y ese mismo suelo contaminado con ARA usado como CN se reportaron 45.3x10<sup>6</sup> UFC g<sup>-1</sup>, se sugiere que en suelo la alta concentración de ARA y el desequilibrio mineral, la atenuación es insuficiente para permitir una diversidad microbiana oxidante de HC

(Margesin, 2000; Radwan, Al-Awadhi, Sorkhoh, & El-Nemr, 1998; J. Tang, Wang, Niu, & Zhou, 2010; Wang et al., 2012).

**Tabla 8.** Fitorremediación del suelo contaminado con 5,510 ppm de aceite residual automotriz remanente, con *Sorghum vulgare* potenciado con *Bacillus cereus* y *Burkholderia cepacia* a nivel de plántula y a 60 días de su crecimiento.

En la Tabla 8 muestra la FR del suelo contaminado con 5,510 ppm de ARA con *S. vulgare* a los 60 días de crecimiento, donde el ARA se redujo de 5,510 ppm hasta 1,440 ppm en especial cuando *S. vulgare* se potencio con *B. cereus*; en tanto cuando en ese mismo suelo *S. vulgare* se trató con *B. cepacia* el ARA disminuyo hasta 2,030 ppm, mientras que en ese suelo fitorremediado con *S. vulgare* inoculado con ambas de BPCV, el ARA decreció de 5,510 ppm a 1,540 ppm comparado con el mismo suelo sin fitorremediar usado como el CN sin cambio en la concentración de ARA y en ese suelo con 80,000 ppm de ARA sembrado con *S. vulgare* sin inocular las BPCV murió, y ahí la concentración de ARA no cambio. Lo anterior sugiere que en suelo contaminado con ARA la FR con *S. vulgare*, la promoción de crecimiento y la capacidad de mineralización de ARA de *B. cereus* y *B. cepacia* fue determinante en la reducción del ARA y potenciar la tolerancia *S. vulgare* a los HC para luego eliminarlos (Escalante-Espinosa, Gallegos-Martínez, Favela-Torres, & Gutiérrez-Rojas, 2005; Nwoko, Okeke, Agwu, & Akpan, 2007; Rezek, in der Wiesche, Mackova, Zadrazil, & Macek, 2008). Además, esto indica que tanto los compuestos de N y P son determinantes para la suplir la demanda nutricional microbiana del suelo y fue suficiente para la demanda mineral de *S. vulgare* necesaria para un crecimiento sano y que además en suelo elimino la toxicidad del ARA (Bech, Abreu, Pérez-Sirvent, & Poschenrieder, 2012; Olson et al., 2003).

**Figura 4.** En suelo contaminado con 5,510 ppm de aceite residual automotriz: fenología de *Sorghum vulgare* a floración potenciado con *Bacillus cereus* y *Burkholderia cepacia*, para su fitorremediación.

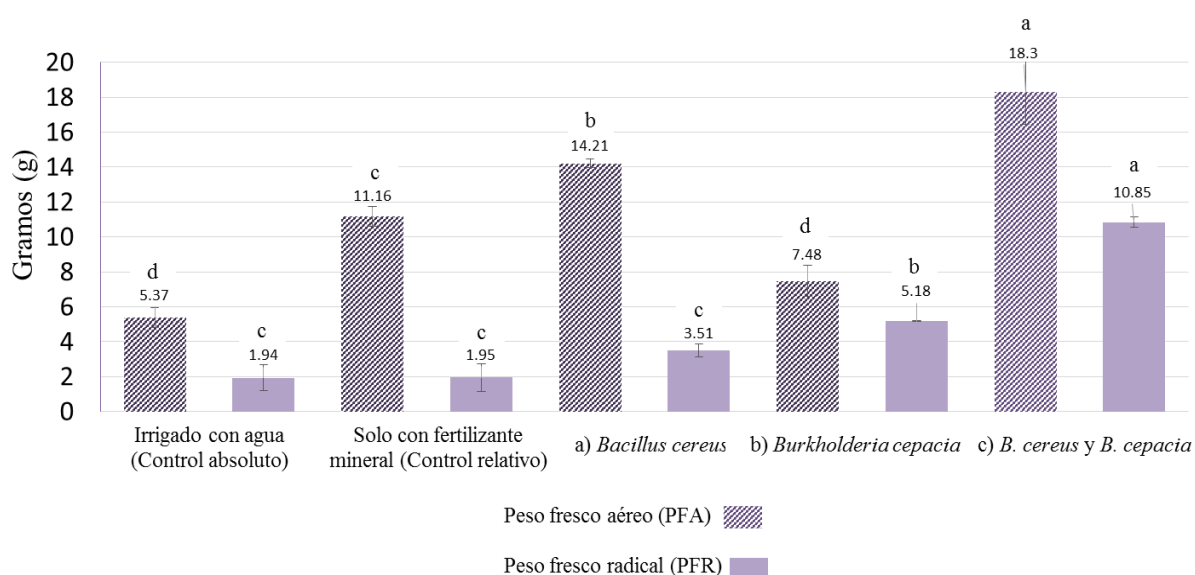


† En la columna medias seguidas por letras distintas son estadísticamente diferentes (ANOVA,  $P < 0.05$ , Tukey HSD),  $n=6$ .

En la Figura 4, se reporta en suelo contaminado con 5,510 ppm de ARA remanente, la fenología y biomasa de *S. vulgare* potenciado con *B. cereus* y/o *B. cepacia* para su FR a nivel de floración. El *S. vulgare* potenciado con ambos géneros de BPCV registro la mayor AP de 102.92 cm, valor con diferencia estadística comparado con los 84.06 cm de AP del *S. vulgare* potenciado solo con *B. cepacia* y con los 82.76 cm de AP de *S. vulgare* potenciado individualmente con *B. cereus*, ambos valores numéricos sin diferencia estadística comparados con la AP de 77.6 cm de *S. vulgare* en suelo sin contaminar con ARA empleado como CR. Lo anterior sugiere que en suelo el efecto rizosférico de *S. vulgare* y la promoción de crecimiento vegetal de *B. cereus* y *B. cepacia* aumentaron la síntesis de fitohormonas a partir de sus exudados radicales y potenciaron su crecimiento, a este nivel de concentración de ARA ya no fue tóxico para su crecimiento (Cheema et al., 2010; Kechavarzi, Pettersson, Leeds-Harrison, Ritchie, & Ledin, 2007; Uwaila,

2013). Mientras que en ese mismo suelo con ARA el *S. vulgare* inoculado con ambas BPCV reportó la mayor LR de 58.40 cm, valor estadísticamente diferente comparado con los 43.72 cm de LR de *S. vulgare* potenciado e con *B. cereus* y con los 27.55 cm de LR de *S. vulgare* potenciado solo con *B. cepacia* a su vez sin diferencia estadística comparados los 28 cm y 34.10 cm de LR de *S. vulgare* crecido en suelo sin ARA empleado como CA y CR respectivamente, lo anterior sugiere que el suelo el ARA ya no es tóxico, además *B. cereus* y *B. cepacia* por síntesis de fitohormonas o SPCV a partir de sus exudados radicales aumentaron en *S. vulgare* su LR y mejoró su capacidad de penetración y exploración al suelo con ARA (Banks et al., 2003; Quiñones-Aguilar et al., 2003).

**Figura 4b.** En suelo contaminado con 5,510 ppm de aceite residual automotriz: biomasa de *Sorghum vulgare* a floración potenciado con *Bacillus cereus* y *Burkholderia cepacia*, para su fitorremediación.

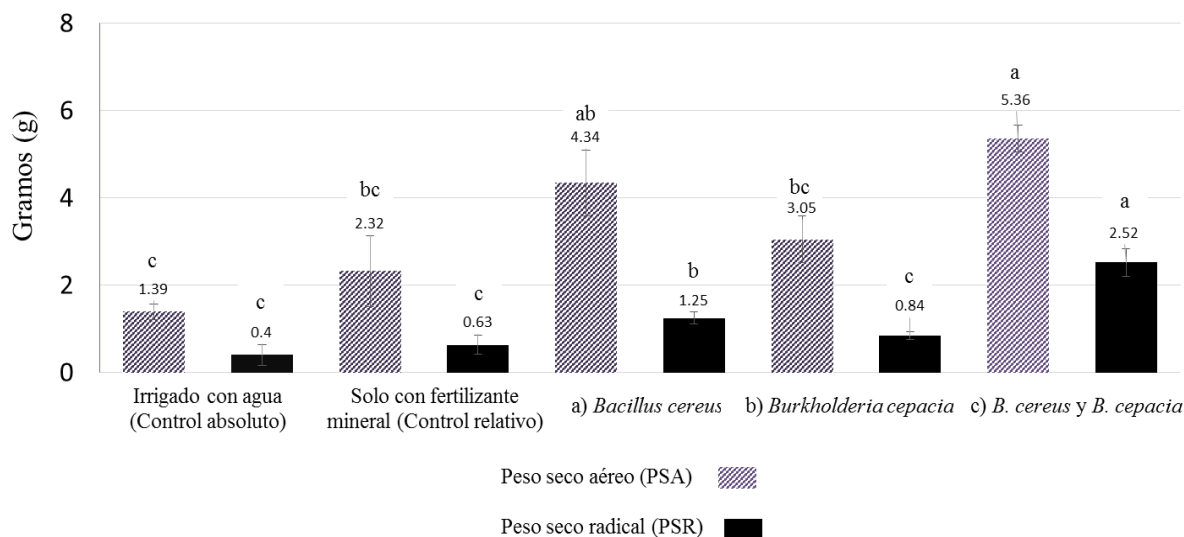




Durante la FR del suelo el mayor PFA fue 18.30 g de *S. vulgare* potenciado con ambas BPCV (Figura 4b), valor estadísticamente diferente comparado con el PFA de 7.48 g de *S. vulgare* inoculado con individualmente *B. cepacia* y con los 14.21 g de *S. vulgare* tratado solo con *B. cereus*, lo anterior sugiere que ambas BPCV y microorganismos rizosféricos juegan un papel importante para potenciar la tolerancia y asimilación de *S. vulgare* y disminuir su sensibilidad a los HC recalcitrantes del ARA y enzimas de *S. vulgare* relacionadas con el metabolismo de la lignina que mineraliza las fracciones aromáticas del ARA más tóxicas, estos valores con diferencia estadística comparada con el valor del PFA de 5.37 g de *S. vulgare* empleado como CA crecido en suelo sin ARA, valores estadísticamente diferentes comparados con 11.16 g de PFA de *S. vulgare* referido como CR en suelo sin ARA y alimentado con la SM en balance (Abid et al., 2014).

Mientras que en el mayor valor de PFR fue 10.85 g de *S. vulgare* potenciado con ambas BPCV, valor estadísticamente diferente comparado con el PFR de 5.18 g de *S. vulgare* inoculado con individualmente *B. cepacia* y con los 3.51 g de *S. vulgare* tratado solo con *B. cereus*. Lo anterior sugiere que, en ese suelo contaminado con ARA, fitorremediado con *S. vulgare* potenciado con *B. cereus* y *B. cepacia*, hubo una conversión de sus exudados radicales en fitohormonas que favorecieron el incremento de su PFR y al mismo tiempo la mineralización del ARA a un nivel no tóxico para su crecimiento (Baruah et al., 2013), estos valores numéricos con diferencia estadística comparada con el valor del PFR de 1.94 g de *S. vulgare* empleado como CA crecido en suelo sin contaminar con ARA y con los 1.95 g de PFR de *S. vulgare* referido como CR en suelo sin ARA y alimentado con la SM (Mandri & Lin, 2007).

**Figura 4c.** En suelo contaminado con 5,510 ppm de aceite residual automotriz: biomasa de *Sorghum vulgare* a floración potenciado con *Bacillus cereus* y *Burkholderia cepacia*, para su fitorremediación.



En suelo con ARA (Figura 4c), el PSA de 5.63 g de *S. vulgare* potenciado con ambos géneros de BPCV valor sin diferencia estadística comparado con los 4.34 g de PSA de *S. vulgare* potenciado con *B. cereus* a su vez este valor sin diferencia estadística comparado con el PSA de 3.05 g de *S. vulgare* potenciado solo con *B. cepacia* este valor sin diferencia estadística comparado con el PSA de 2.32 g de *S. vulgare* usado como CR, en suelo sin ARA. Se sugiere que en *S. vulgare* la actividad promotora de crecimiento vegetal de *B. cereus* y *B. cepacia* a partir de los exudados radicales de *S. vulgare* aumentaron la síntesis de fitohormonas o SPCV, además de mejorar la tolerancia de *S. vulgare* a la fitotoxicidad del ARA y al mismo tiempo incrementaron la actividad de radical de absorción mineral al estrés causado por la contaminación del ARA en suelo (Alrumman, Standing, & Paton, 2015; Andreolli et al., 2013; Q. Lin & Mendelsohn, 2009).

Mientras que en el mayor PSR fue 2.52 g de *S. vulgare* potenciado con ambas BPCV, valor estadísticamente diferente comparado con los 1.25 g de *S. vulgare* tratado solo con

*B. cereus* y diferente comparado con el PSR de 0.84 g de *S. vulgare* potenciado con individualmente *B. cepacia*. Lo anterior sugiere que en el suelo el nivel de concentración de ARA según la NOM-138 ya fue tóxico, en ese sentido *S. vulgare* desarrolló más raíces secundarias para incrementar la absorción mineral y facilitar la difusión del agua y el O<sub>2</sub> al suelo (Almansoori, Idris, Abdullah, & Anuar, 2014; White, Wolf, Thoma, & Reynolds, 2006), este valor sin diferencia estadística comparado con el valor del PSR de 0.40 g de *S. vulgare* empleado como CA crecido en suelo sin ARA y con los 0.63 g de PSR de *S. vulgare* usado como el CR en suelo sin ARA y alimentado con la SM. Se reporta que durante la fitodegradación de HC aromáticos del ARA, se inducen enzimas relacionadas con el metabolismo de lignina para en su crecimiento y que disminuyen la fitotoxicidad del ARA para que posteriormente sean mineralizados por *B. cereus* y *B. cepacia* y por los microorganismos heterotróficos aerobios del suelo, lo que aumenta la capacidad de FR de *S. vulgare* que logro un crecimiento igual o mejor que el de *S. vulgare* cultivado en suelo sin contaminar con ARA usado como CA y CR (Kim et al., 2005; Radwan et al., 1998).

**Tabla 10.** Fitorremediación del suelo contaminado con de aceite residual automotriz remanente a la segunda bioestimulación con *Vicia sativa* como abono verde, con *Sorghum vulgare* a floración.

Suelo tratado con*	Aceite residual automotriz remanente (ppm)	Nitrógeno (g/%)	Fosforo (g/%)
Irrigado solo con agua (Control absoluto)	0,00	0.82±0.2	0.22±0.1
Solo con aceite residual automotriz (Control negativo)	80,000±0.4†		
<b><i>S. vulgare</i> a floración inoculado con*</b>			
a) <i>Bacillus cereus</i>	700±0.1‡		
b) <i>Burkholderia cepacia</i>	1,700±0.4‡		
c) <i>B. cereus</i> y <i>B. cepacia</i>	500±0.3‡		
d) Sin <i>B. cereus</i> y <i>B. cepacia</i>	80,000±0.4		

† En la columna medias seguidas por letras distintas son estadísticamente diferentes (ANOVA, P<0.05, Tukey HSD) (-) sin crecimiento, n=6. ‡ valor por debajo del límite máximo permisible por la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012.

Luego de 90 días en suelo el ARA se redujo hasta 700 ppm cuando *S. vulgare* potenciado con *B. cereus*; en ese mismo suelo *S. vulgare* potenciado con *B. cepacia*; el ARA disminuyó hasta 1,700 ppm, mientras que en el mismo suelo fitorremediado con *S. vulgare* potenciado con ambas BPCV, el ARA decreció a 500 ppm; valor inferior al total máximo permisible por la NOM-138 en cuyo caso se considera remediado, en comparación con el mismo suelo con 80,000 ppm de ARA sin fitorremediar referido como CN, sin cambio en la concentración de ARA y con el mismo suelo con 80,000 ppm de ARA fitorremediado con *S. vulgare* sin inocular las BPCV, que murió, ahí la concentración de ARA no cambió por efecto de la atenuación natural (Corona-Ramírez & Iturbe-Argüelles, 2005; Lee et al., 2011; Thangarajan, Adetutu, Moore, Ogunbanwo, & Ball, 2011). Lo anterior sugiere que en suelo contaminado con ARA la combinación de la FR con *S. vulgare* potenciado con *B. cereus* y *B. cepacia* que promovieron su crecimiento y potencializaron la mineralización de ARA (Izinyon & Seghosime, 2013); lo que fue determinante en su reducción a una concentración de HC menor la máxima permisible por la NOM-138.

## 6. Conclusión

La BR de un suelo contaminado con relativamente alta concentración de 80,000 ppm de ARA, fue mejorada y acelerada mediante su BS con ABS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, con SM y *V. sativa* como AV y facilitó la FR con *S. vulgare* potenciado con *B. cereus* y *B. cepacia*. La combinación de estas estrategias fue útil para reducir la concentración final de ARA por debajo del máximo establecido por la NOM-138 SEMARNAT/ISS-2003 de 4,400 ppm. Además, el crecimiento de *Lactuca sativa* bioindicador de la desaparición del ARA indicó que el suelo quedó biorestaurado.

## 7. Bibliografía

- 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. <http://doi.org/10.1590/S1516-89132009000300027>
- Abid, A., Zaafour, K., Aydi, A., Manai, I., Trabesli, A. B. H., Messaoud, C., & Hamdi, M. (2014). Feasibility of a Bioremediation Process Using Biostimulation with Inorganic Nutrient NPK for Hydrocarbon Contaminated Soil in Tunisia. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 5(4), 1–6. <http://doi.org/10.4172/2155-6199.1000224>
- Abioye, O. P., Agamuthu, P., & Abdul, A. R. (2012). Biodegradation of used motor oil in soil using organic waste amendments. *Biotechnology Research International*, 2012, 8. <http://doi.org/10.1155/2012/587041>
- Abioye, P. O., Abdul Aziz, a., & Agamuthu, P. (2010). Enhanced biodegradation of used engine oil in soil amended with organic wastes. *Water, Air, and Soil Pollution*, 209(1-4), 173–179. <http://doi.org/10.1007/s11270-009-0189-3>
- Adam, G., & Duncan, H. (2003). The effect of diesel fuel on common vetch (*Vicia sativa* L.) plants. *Environmental Geochemistry and Health*, 25(1), 123–130. <http://doi.org/10.1023/A:1021228327540>
- Adibarata, T. H., & Achibana, S. T. (2009). Microbial Degradation of Crude Oil by Fungi Pre-Grown on Wood Meal. *Interdisciplinary Studies On Environmental Chemistry*, (5-1-2009), 317–322. <http://doi.org/10.1109/ICASSP.2006.1660063>
- Agamuthu, P., Abioye, O. P., & Aziz, A. A. (2010). Phytoremediation of soil contaminated with used lubricating oil using *Jatropha curcas*. *Journal of Hazardous Materials*, 179(1-3), 891–894. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.03.088>
- Agarry, S. E., & Ogunleye, O. O. (2012). Box-Behnken design application to study enhanced bioremediation of soil artificially contaminated with spent engine oil using biostimulation strategy. *International Journal of Energy and Environmental Engineering*, 3(1), 31. <http://doi.org/10.1186/2251-6832-3-31>
- Agarry, S., & Latinwo, G. (2015). Biodegradation of Diesel Oil in Soil and Its Enhancement By Application of Bioventing and Amendment With Brewery Waste Effluents As Biostimulation-Bioaugmentation Agents. *Journal of Ecological Engineering*, 16(2), 82–91. <http://doi.org/10.12911/22998993/1861>
- Almansoor, A. F., Idris, M., Abdullah, S. R. S., & Anuar, N. (2014). Plant-microbe interaction of *Serratia marcescens* and *Scirpus mucronatus* on phytoremediation of gasoline contaminated soil. *International Journal of ChemTech Research*, 6(1), 556–564. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84893490947&partnerID=tZOtx3y1>
- Alrumman, S. A., Standing, D. B., & Paton, G. I. (2015). Effects of hydrocarbon contamination on soil microbial community and enzyme activity. *Journal of King Saud University - Science*, 27(1), 31–41. <http://doi.org/10.1016/j.jksus.2014.10.001>
- Andreolli, M., Lampis, S., Poli, M., Gullner, G., Biró, B., & Vallini, G. (2013). Endophytic *Burkholderia fungorum* DBT1 can improve phytoremediation efficiency of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chemosphere*, 92(6), 688–694.

<http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.04.033>

- Asiabadi, F., Mirbagheri, S., Najafi, P., & Moatar, F. (2014). Phytoremediation of Petroleum-Contaminated Soils Around Isfahan Oil Refinery (Iran) by Sorghum and Barley. *Current World Environment Journal*, 9(1), 65–72. <http://doi.org/10.12944/CWE.9.1.10>
- 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*, 1(5), 637–650.
- Bahadure, S., Kalia, R., & Chavan, R. (2013). Comparative Study of Bioremediation of Hydrocarbon Fuels. *International Journal of Biotechnology and Bioengineering Research*, 4(7), 677–686.
- 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.
- Baruah, P., Baruah, P. P., & Deka, S. (2013). Removal of Hydrocarbon from Crude oil Contaminated Soil. *Bulletin of Environment. Pharmacology and Life Sciences*, 2(6), 123–130.
- Basumatary, B., Saikia, R., & Bordoloi, S. (2012). Phytoremediation of crude oil contaminated soil using nut grass, *Cyperus rotundus*. *J Environ Biol*, 33(5), 891–896. Retrieved from [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=23734455](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23734455)
- Bech, J., Abreu, M. M., Pérez-Sirvent, C., & Poschenrieder, C. (2012). Phytoremediation of polluted soils. *Journal of Geochemical Exploration*, 123, 1–2. <http://doi.org/10.1016/j.gexplo.2012.11.001>
- Caldwell, M. E., Tanner, R. S., & Suflita, J. M. (1999). Microbial Metabolism of Benzene and the Oxidation of Ferrous Iron under Anaerobic Conditions: Implications for Bioremediation. *Anaerobe*, 5, 595–603. <http://doi.org/10.1006/anae.1999.0193>
- Cheema, S. A., Imran Khan, M., Shen, C., Tang, X., Farooq, M., Chen, L., ... Chen, Y. (2010). Degradation of phenanthrene and pyrene in spiked soils by single and combined plants cultivation. *Journal of Hazardous Materials*, 177(1-3), 384–389. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.12.044>
- Corona-Ramírez, L., & Iturbe-Argüelles, R. (2005). Atenuación natural en suelos contaminados con hidrocarburos. *Ing. Inv. Y Tec*, 1(2), 119–126. Retrieved from <http://www.ejournal.unam.mx/ict/vol0602/ICT06203.pdf>
- Diab, E. a. (2008). Phytoremediation of Oil Contaminated Desert Soil Using the Rhizosphere Effects. *Global Journal of Environmental Research*, 2(2), 66–73.
- Dominguez-Rosado, E., & Pichtel, J. (2004). Phytoremediation of Soil Contaminated with Used Motor Oil: II. Greenhouse Studies. *Environmental Engineering Science*, 21(2), 169–180. <http://doi.org/10.1089/109287504773087345>
- Efe, S. I., & Okpali, A. E. (2012). Management of Petroleum Impacted Soil with Phytoremediation and Soil Amendments in Ekpan Delta. *Journal of Environmental Protection*, 3(May), 386–393. <http://doi.org/10.4236/jep.2012.35048>
- EPA. Measurement PAHs sediments solis (1992). United States.

- Escalante-Espinosa, E., Gallegos-Martínez, M. E., Favela-Torres, E., & Gutiérrez-Rojas, M. (2005). Improvement of the hydrocarbon phytoremediation rate by *Cyperus laxus* Lam. inoculated with a microbial consortium in a model system. *Chemosphere*, *59*(3), 405–413. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.10.034>
- Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., & Banat, I. M. (2010). (Bio)surfactant and Bioremediation, Successes and Failures. *Research Signpost*, *661*(2), 145–156.
- García, E., Ferrera, R., Almaráz, J. J., Rodríguez, R., & García, E. (2013). Biodegradación de queroseno en la rizósfera de gramíneas en condiciones de invernadero, *37*(2), 125–134.
- 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.
- Gerhardt, K. E., Huang, X. D., Glick, B. R., & Greenberg, B. M. (2009). Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. *Plant Science*, *176*(1), 20–30. <http://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.09.014>
- Hernández-Espriú, A., Sánchez-León, E., Martínez-Santos, P., & Torres, L. (2013). Remediation of a diesel-contaminated soil from a pipeline accidental spill: enhanced biodegradation and soil washing processes using natural gums and surfactants. *Journal of Soils and Sediments*, *13*(1), 152–165. <http://doi.org/10.1007/s11368-012-0599-5>
- Hoffman, K. M., & Nelson, Y. M. (2004). Phytostimulation of hydrocarbon biodegradation by Arroyo Willows in laboratory microcosms., (June).
- Huang, X. D., El-Alawi, Y., Penrose, D. M., Glick, B. R., & Greenberg, B. M. (2004). A multi-process phytoremediation system for removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. *Environmental Pollution*, *130*(3), 465–476. <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2003.09.031>
- Ighovie Efe, S. (2012). Management of Petroleum Impacted Soil with Phytoremediation and Soil Amendments in Ekpan Delta State, Nigeria. *Journal of Environmental Protection*, *03*(05), 386–393. <http://doi.org/10.4236/jep.2012.35048>
- Ismail, H. Y., Ijah, U. J. J., Riskuwa, M. L., Allamin, I. A., & Isah, M. A. (2014). Assessment of phytoremediation potentials of legumes in spent engine oil contaminated soil, *2*(2), 59–64.
- Iwamoto, T., & Nasu, M. (2001). Current bioremediation practice and perspective. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *92*(1), 1–8. <http://doi.org/10.1263/jbb.92.1>
- 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. Retrieved from <http://www.iiste.org/Journals/index.php/CER/article/view/4630>  
<http://www.iiste.org/Journals/index.php/CER/article/download/4630/4710>  
<http://www.iiste.org/Journals/index.php/CER/article/view/4630/4710>
- Jagtap, S. S., Woo, S. M., Kim, T. S., Dhiman, S. S., Kim, D., & Lee, J. K. (2014). Phytoremediation of diesel-contaminated soil and saccharification of the resulting biomass. *Fuel*, *116*, 292–298. <http://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.08.017>
- Jasmine, J., & Mukherji, S. (2014). Evaluation of bioaugmentation and biostimulation

- effects on the treatment of refinery oily sludge using 2(n) full factorial design. *Environmental Science, Processes & Impacts*, 16(8), 1889–96. <http://doi.org/10.1039/c4em00116h>
- Johannes, C., & Majcherczyk, A. (2000). Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2), 524–528. <http://doi.org/10.1128/AEM.66.2.524-528.2000>
- Kechavarzi, C., Pettersson, K., Leeds-Harrison, P., Ritchie, L., & Ledin, S. (2007). Root establishment of perennial ryegrass (*L. perenne*) in diesel contaminated subsurface soil layers. *Environmental Pollution*, 145(1), 68–74. <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.03.039>
- Kim, S. J., Choi, D. H., Sim, D. S., & Oh, Y. S. (2005). Evaluation of bioremediation effectiveness on crude oil-contaminated sand. *Chemosphere*, 59(6), 845–852. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.10.058>
- Lee, E. H., Kang, Y. S., & Cho, K. S. (2011). Bioremediation of diesel-contaminated soils by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation employing *Rhodococcus* sp. EH831. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(1), 86–92.
- Ley General de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente (LGEEPA). LEY GENERAL DEL EQUILIBRIO ECOLÓGICO Y LA PROTECCIÓN AL AMBIENTE (2012). México: Diario Oficial de la Federación. Retrieved from <http://www.conacyt.mx/cibiogem/images/cibiogem/protocolo/LGEEPA.pdf>
- Lin, Q., & Mendelssohn, I. a. (2009). Potential of restoration and phytoremediation with *Juncus roemerianus* for diesel-contaminated coastal wetlands. *Ecological Engineering*, 35(1), 85–91. <http://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.09.010>
- Lin, T. C., Pan, P. T., & Cheng, S. S. (2010). Ex situ bioremediation of oil-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 176(1-3), 27–34. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.10.080>
- Magdalene, O. E., Ufuoma, A., & Gloria, O. (2009). Screening of four common Nigerian weeds for use in phytoremediation of soil contaminated with spent lubricating oil. *Plant Science*, 3(5), 102–106.
- Mandri, T., & Lin, J. (2007). Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. *African Journal of Biotechnology*, 6(1), 23–27. <http://doi.org/10.4314/ajb.v6i1.56086>
- Margesin, R. (2000). Potential of cold-adapted microorganisms for bioremediation of oil-polluted Alpine soils. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 46(1), 3–10. [http://doi.org/10.1016/S0964-8305\(00\)00049-4](http://doi.org/10.1016/S0964-8305(00)00049-4)
- Merkel, N., Schultze-kraft, R., & Infante, C. (2005). Phytoremediation of Petroleum-Contaminated Soils. *Water, Air, and Soil Pollution*, 165(1), 195–209.
- 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. *Technology*, 11(2), 181–188.
- Minoui, S., Minai-Tehrani, D., & Shahriari, M. H. (2015). Phytoremediation of Crude Oil-Contaminated Soil by *Medicago sativa* (Alfalfa) and the Effect of Oil on its Growth. In M. Öztürk, M. Ashraf, A. Aksoy, & M. S. A. Ahmad (Eds.), *Phytoremediation for Green Energy SE - 8* (pp. 123–129). Springer Netherlands. [http://doi.org/10.1007/978-94-007-7887-0\\_8](http://doi.org/10.1007/978-94-007-7887-0_8)



- Njoku, K. L., Akinola, M. O., & Oboh, B. O. (2009). Phytoremediation of crude oil contaminated soil the effect of growth of Glycine max on the physico-chemistry and crude oil contents of soil. *Nature and Science*, 7(10), 79–87.
- NOM-021-SEMARNAT-2000. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. (2002). México: Diario Oficial de la Federación.
- NOM-138-SEMARNAT/SS. Límites máximos permisibles hidrocarburos en suelo y especificaciones caracterización y remediación (2012). México: Diario Oficial de la Federación.
- Nwoko, C. O., Okeke, P. N., Agwu, O. O., & Akpan, I. E. (2007). Performance of *Phaseolus vulgaris* L. in a soil contaminated with spent-engine oil. *African Journal of Biotechnology*, 6(16), 1922–1925.
- Ogbo, E. M., Zibigha, M., & Odogu, G. (2009). The effect of crude oil on growth of the weed ( *Paspalum scrobiculatum* L .) – phytoremediation potential of the plant. *Science And Technology*, 3(9), 229–233. <http://doi.org/10.5897/AJEST09.067>
- Oladapo T. Okareh,. (2012). Hydrocarbon-degrading bacteria isolation and surfactant influence on the growth of organisms: A case study in Ibadan, Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, 11(63), 12657–12663. <http://doi.org/10.5897/AJB12.1455>
- Olson, P. E., Castro, A., Joern, M., DuTeau, N. M., Pilon-Smits, E. a H., & Reardon, K. F. (2003). Comparison of plant families in a greenhouse phytoremediation study on an aged polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. *Journal of Environmental Quality*, 36(5), 1461–1469. <http://doi.org/10.2134/jeq2006.0371>
- Osaigbovo, A. U., Law-Ogbomo, K., & Agele, S. O. (2013). 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. <http://doi.org/10.4314/bajopas.v6i1.15>
- Peng, S., Zhou, Q., Cai, Z., & Zhang, Z. (2009). Phytoremediation of petroleum contaminated soils by *Mirabilis Jalapa* L. in a greenhouse plot experiment. *Journal of Hazardous Materials*, 168(2), 1490–1496. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.036>
- Popoviciu, D. R., & Bercu, R. (2014). Effects of nutrients and hydrogen peroxide on hydrocarbon biodegradation in marine sandy sediment microcosms. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 19(1), 27–31. <http://doi.org/10.ANN/RSCB-2014-0001>
- Quiñones-Aguilar, E. E., Ferrera-Cerrato, R., Gavi-Reyes, F., Fernández-Linares, L., Rodríguez-Vázquez, R., & Alarcón, A. (2003). Emergence and growth of maize in a crude oil polluted soil. *Agrociencia*, 37(6), 585–594.
- Radwan, S. S., Al-Awadhi, H., Sorkhoh, N. a., & El-Nemr, I. M. (1998). Rhizospheric hydrocarbon-utilizing microorganisms as potential contributors to phytoremediation for the oil Kuwaiti desert. *Microbiological Research*, 153(3), 247–251. [http://doi.org/10.1016/S0944-5013\(98\)80007-4](http://doi.org/10.1016/S0944-5013(98)80007-4)
- Rezek, J., in der Wiesche, C., Mackova, M., Zadrazil, F., & Macek, T. (2008). The effect of ryegrass (*Lolium perenne*) on decrease of PAH content in long term contaminated soil. *Chemosphere*, 70(9), 1603–1608. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.08.003>

- Romanus, A. A., Ikechukwu, E. F., Patrick, A. S., Goddey, U., & Helen, O. (2015). Efficiency of Plantain Peels and Guinea Corn Shaft for Bioremediation of Crude Oil Polluted Soil. *Journal of Microbiology Research*, 5(1), 31–40. <http://doi.org/10.5923/j.microbiology.20150501.04>
- 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. <http://doi.org/10.1007/BF03325982>
- 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. <http://doi.org/10.7202/000379ar>
- Shirdam, R., Zand, A. D., Nabibidhendi, G. R., & Mehrdadi, N. (2009). Rhizoremediation of Total Petroleum Hydrocarbons ( Tphs ) Under the Effect of Plant Species in Iran, (September), 3–5.
- Southam, G., Whitney, M., & Knickerbocker, C. (2001). Structural characterization of the hydrocarbon degrading bacteria-oil interface: Implications for bioremediation. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 47(4), 197–201. [http://doi.org/10.1016/S0964-8305\(01\)00051-8](http://doi.org/10.1016/S0964-8305(01)00051-8)
- Tanee, F. B. G., & Akonye, L. A. (2009). Effectiveness of *Vigna Unguiculata* as a Phytoremediation Plant in the remediation of Crude Oil polluted soil for Cassava ( *Manihot Esculenta* ; Crantz ) Cultivation. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 13(1), 43 – 47.
- Tang, J. C., Wang, R. G., Niu, X. W., Wang, M., Chu, H. R., & Zhou, Q. X. (2010). Characterisation of the rhizoremediation of petroleum-contaminated soil: effect of different influencing factors. *Biogeosciences*, 7(12), 3961–3969. <http://doi.org/10.5194/bg-7-3961-2010>
- Tang, J., Wang, R., Niu, X., & Zhou, Q. (2010). Enhancement of soil petroleum remediation by using a combination of ryegrass (*Lolium perenne*) and different microorganisms. *Soil and Tillage Research*, 110(1), 87–93. <http://doi.org/10.1016/j.still.2010.06.010>
- Thangarajan, R., Adetutu, E. M., Moore, R. B., Ogunbanwo, S. T., & Ball, A. S. (2011). Comparison between different bio-treatments of a hydrocarbon contaminated soil from a landfill site. *African Journal of Biotechnology*, 10(67), 15151–15162. <http://doi.org/10.5897/AJB10.1705>
- Tsai, T. T., Kao, C. M., Surampalli, R. Y., & Chien, H. Y. (2009). Enhanced Bioremediation of Fuel-Oil Contaminated Soils: Laboratory Feasibility Study. *Journal of Environmental Engineering*, 135(9), 845–853. [http://doi.org/10.1061/\(ASCE\)EE.1943-7870.0000049](http://doi.org/10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0000049)
- Uwaila, A. (2013). Growth Response of *Alternanthera brasiliana* ( L . ) Kuntze in a Waste Engine Oil-Polluted Soil Corresponding Author : Ikhajiagbe , B, 4(2), 322–327.
- Vaca, M., Flores, M. A., Bandala, E. R., & Torres, L. G. (2013). Surfactant-Enhanced Washing of Soils Contaminated with Wasted-Automotive Oils and the Quality of the Produced Wastewater. *Journal of Environmental Protection*, 4(12), 1495–1501.
- Vallejo, V., Salgado, L., & Roldan, F. (2005). Evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de TPHs en suelos contaminados con petróleo -Bioestimulation process during the biodegradation of TPH in oil contaminated soil. *Revista*

*Colombiana de Biotecnología*, 7(2), 67–78.

- Van Gestel, K., Mergaert, J., Swings, J., Coosemans, J., & Ryckeboer, J. (2003). Bioremediation of diesel oil-contaminated soil by composting with biowaste. *Environmental Pollution*, 125(3), 361–368. [http://doi.org/10.1016/S0269-7491\(03\)00109-X](http://doi.org/10.1016/S0269-7491(03)00109-X)
- Wang, Z.-Y., Xu, Y., Wang, H.-Y., Zhao, J., Gao, D.-M., Li, F.-M., & Xing, B. (2012). Biodegradation of Crude Oil in Contaminated Soils by Free and Immobilized Microorganisms. *Pedosphere*, 22(5), 717–725. [http://doi.org/10.1016/S1002-0160\(12\)60057-5](http://doi.org/10.1016/S1002-0160(12)60057-5)
- White, P. M., Wolf, D. C., Thoma, G. J., & Reynolds, C. M. (2006). Phytoremediation of alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons in a crude oil-contaminated soil. *Water, Air, and Soil Pollution*, 169(1-4), 207–220. <http://doi.org/10.1007/s11270-006-2194-0>
- Xu, Y., Sun, G. D., Jin, J. H., Liu, Y., Luo, M., Zhong, Z. P., & Liu, Z. P. (2014). Successful bioremediation of an aged and heavily contaminated soil using a microbial/plant combination strategy. *Journal of Hazardous Materials*, 264, 430–438. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.10.071>
- Zhao, W. L. Y. X. R. S. Z. D. W. Y. G. (2011). Identification and characterization of the endophytic plant growth promoter. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(2), 567–575. <http://doi.org/10.1590/S1517-838220110002000022>

## 8. Anexos

**Cuadro 1.** Perfil de sensibilidad para el marcaje de *Bacillus cereus* como referencia en la dinámica de colonización de la rizósfera de *Sorgum vulgare* para fitorremediación de suelo con aceite residual automotriz.

Antibiótico	Concentración (µg)	Sensibilidad <i>Bacillus cereus</i>
Pefloxacina (PEF)	5	S
Cefuroxima (CXM)	30	R
Gentamicina (GE)	10	S
Cefotaxima (CTX)	30	R
Trimetoprim-sulfametoxazol (SXT)	25	S
Tetracilcina (TE)	30	S
Ampicilina (AM)	10	R
Eritromicina (E)	15	S
Ceftazidima (CAZ)	30	R
Cefalotina (CF)	30	S
Penicilina (PE)	10 U	R
Dicloxacilina (DC)	1	R

R: resistente; S: sensible.

**Cuadro 2.** Perfil de sensibilidad para el marcaje de *Burkholderia cepacia* como referencia en la dinámica de colonización de la rizósfera de *Sorgum vulgare* para fitorremediación de suelo con aceite residual automotriz.

Antibiótico	Concentración (µg)	Sensibilidad <i>Burkholderia cepacia</i>
Amikacina (AK)	30	S
Ampicilina (AM)	10	R
Carbenicilina (CB)	100	R
Cefalotina (CF)	30	S
Cefotaxima (CTX)	30	S
Ceftriaxona (CRO)	30	S
Cloranfenicol (CL)	30	S
Gentamicina (GE)	10	S
Netilmicina (NET)	30	S
Nitrofurantoina (NF)	300	S
Pefloxacina (PEF)	5	S
Trimetoprim-sulfametoxazol (SXT)	25	S

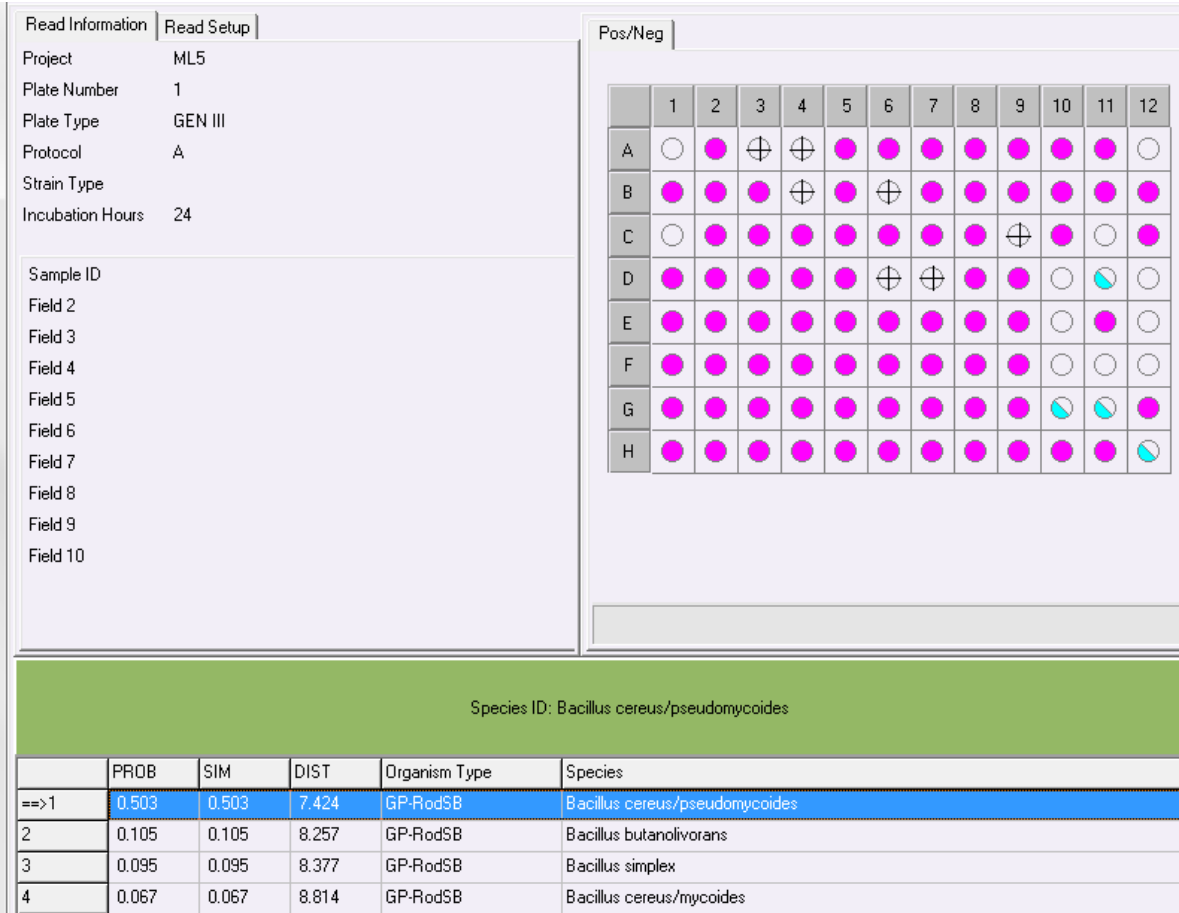
R: resistente; S: sensible.

resultado de los análisis de los aislamientos de “*Burkholderia cepacea*” y “*Bacillus cereus*” recibidos en el Laboratorio de Bacteriología para corroborar su identificación.

Las muestras recibidas se sembraron por estría cruzada en medios PDA, BK y LB, se observaron a las 24 hr y para la identificación bioquímica de las bacterias desarrolladas se empleó el Sistema de identificación BIOLOG GENIII. Se preparó una suspensión bacteriana de las cepas 1 y 2, al 85% de transmitancia empleando el fluido de inoculación IFA posteriormente la placa fue incubada a 28°C por 24 hrs. Las pruebas se realizaron por duplicado. Cada una de las placas se evaluaron y se registró la reacción de color que

nos indica el empleo de los sustratos para cada una de las cepas. Posteriormente se capturaron los resultados en la base de datos, obteniendo los siguientes resultados:

Fig. 2: Identificación bioquímica de la cepa 2 (“Bacillus cereus”). Dando como resultado B. cereus

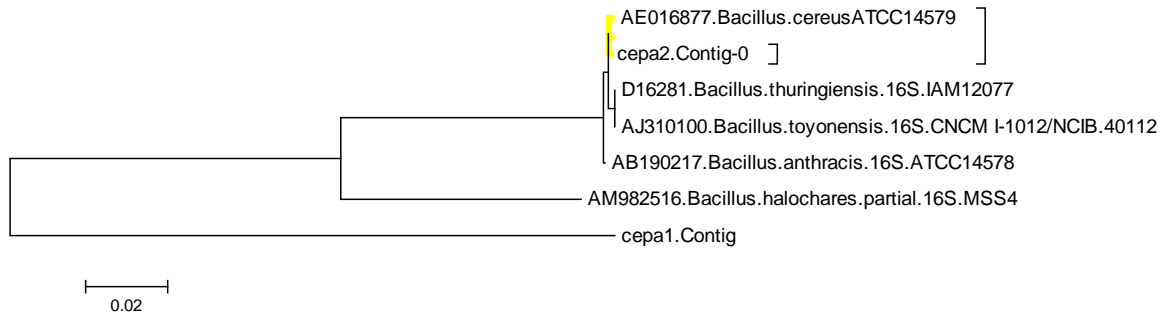


Para la caracterización molecular se realizó extracción de DNA de las cepas 1 y 2, empleando el protocolo de CTAB modificado. Posteriormente se evaluó la calidad y concentración de DNA por espectrofotometría. Se amplificó el gen 16s DNA ribosomal empleando los iniciadores 8f y 1492. Posteriormente este fragmento fue enviado a secuenciar. A continuación, se muestra la secuencia del gen 16S y la inferencia Filogenética.

>cepa2.Contig

```
TGCAGTCGAGCGATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAA
CACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGAT
AATATTTTGAAGTGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGAC
CCGCGTTCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGAC
CTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC
AGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAG
GCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCAC
CTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT
AGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCT
GATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAG
AAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAG
TGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACTGACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGAGCAAAC
AGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTC
```

GCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTG  
AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGC  
AACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCT  
TCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTT  
AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGG  
TGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATG  
ACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAG  
CTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGG  
AATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACC  
GCCCCGCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGGGGTAAC



**Arreglo filogenético del gene 16S DNA ribosomal de la cepa 2 está estrechamente relacionada con *Bacillus cereus*.**