



**Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo**



**Facultad de Químico Farmacobiología**

**Tesis:**

**Bioestimulación del suelo contaminado con 90,000 ppm de aceite residual  
automotriz y fitorremediación con *Sorghum vulgare* inoculado con *Aspergillus  
niger* y *Penicillium chrysogenum* endófitos**

**Que presenta:**

**Perla Guadalupe Mondragón Reynel**

**Para obtener el título de:**

**Químico Farmacobióloga**

**Asesor DC Juan Manuel Sánchez Yáñez**

**Laboratorio de Microbiología Ambiental**

**Instituto de Investigaciones Químico Biológicas B-3, UMSNH**

**Morelia, Mich. Julio del 2018**

**Éste trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología Ambiental del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la dirección del DC Juan Manuel Sánchez Yáñez.**

**Se agradece al proyecto 2.7 (2018) apoyado por la Coordinación de Investigación Científica-UMSNH y BIONUTRA S.A de CV, Maravatío, Mich, México**



## *Agradecimientos*

*Le agradezco a Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes.*

*A mi director de tesis el DC Juan Manuel Sánchez Yáñez, por confiar en mí, la paciencia, disciplina y apoyo. Por los consejos y la motivación a ser mejor cada día.*

*A mi familia por ser mi pilar y fuerza, a mis padres; Martin Mondragón Rojas y Perla Reynel Mendoza por darme la oportunidad de cumplir uno de mis sueños, por los valores que me han inculcado y confiar en mí.*

*A mis amigos y compañeros del Laboratorio de Microbiología Ambiental por su apoyo, amistad y momentos de felicidad.*

## Índice

Tabla 1. Lista de acrónimos.....	6
Resumen.....	7
Abstract.....	9
Introducción.....	11
Antecedente.....	13
Hipótesis.....	13
Objetivos .....	14
Materiales y métodos.....	14
Figura 1. Jarra de Leonard.....	16
Tabla 2. Diseño experimental para la bioestimulación de un suelo contaminado con 90,000 ppm de aceite residual automotriz.....	17
Tabla 3. Diseño experimental para la fitorremediación con <i>Sorghum vulgare</i> inoculado con <i>Aspergillus niger</i> y <i>Penicillium chrysogenum</i> de un suelo contaminado con 90,000 ppm de aceite residual automotriz.....	17
Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas del suelo sin aceite residual automotriz.....	18
Diagrama de bloques para la bioestimulación de un suelo contaminado por 90,000 ppm de aceite residual automotriz y fitorremediación mediante <i>Sorghum vulgare</i> inoculado con <i>Aspergillus niger</i> y <i>Penicillium chrysogenum</i> .....	19
Resultados.....	20
Figura 2. En suelo concentración de aceite residual automotriz derivado de la bioestimulación secuencial, complementaria y acumulativa con detergente al 0.5% y con lombricomposta al 3% por 30 días.....	20
Figura 3. Concentración de aceite residual automotriz derivado de la bioestimulación secuencial con solución mineral y complementaria por 30 días.....	21

Figura 4. Fenología de <i>Sorghum vulgare</i> potenciado con <i>Aspergillus niger</i> y <i>Penicillium chrysogenum</i> a plántula durante la fitorremediación de suelo contaminado con 34,771 ppm de aceite residual automotriz.....	22
Figura 5. Biomasa de <i>Sorghum vulgare</i> en la fitorremediación del suelo contaminado con 34,771 ppm de aceite residual automotriz.....	23
Figura 6. En suelo concentración final de aceite residual automotriz por la bioestimulación secuencial, complementaria y acumulativa con detergente al 0.5%, lombricomposta al 3%, solución mineral, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 0.05 % y fitorremediación mediante <i>Sorghum vulgare</i> inoculado con <i>Aspergillus niger</i> y <i>Penicillium chrysogenum</i> .....	24
Discusión.....	25
Conclusión.....	28
Bibliografía.....	29

Tabla 1. Lista de acrónimos de la bioestimulación del suelo contaminado con 90,000 ppm de aceite residual automotriz y fitorremediación con *Sorghum vulgare* inoculado con *Aspergillus niger* y *Penicillium chrysogenum*

<b>ACRÓNIMO</b>	<b>SIGNIFICADO</b>
<b>AHA</b>	Agar hueso aguacate
<b>AP</b>	Altura de la planta
<b>ARA</b>	Aceite residual automotriz
<b>BIR</b>	Biorremediación
<b>BIS</b>	Bioestimulación
<b>CA</b>	Control absoluto
<b>CN</b>	Control negativo
<b>CR</b>	Control relativo
<b>DEGE</b>	Detergente
<b>FITO</b>	Fitorremediación
<b>HICO</b>	Hidrocarburos
<b>LOCO</b>	Lombricomposta
<b>LR</b>	Longitud radical
<b>PFA</b>	Peso fresco aéreo
<b>PFR</b>	Peso fresco radical
<b>PSA</b>	Peso seco aéreo
<b>PSR</b>	Peso seco radical
<b>SOMI</b>	Solución mineral

## Resumen

El suelo contaminado por 90,000 ppm de aceite residual automotriz (ARA), es una concentración, que excede el límite máximo aceptado en ese ambiente de 4,400 ppm de hidrocarburos (HICO), según la NOM-138-SEMARNAT-2012, ésta concentración de ARA es un contaminante, impide el intercambio gaseoso, altera el equilibrio C:N (carbono:nitrógeno), inhibe la mineralización de la materia orgánica relacionada con los ciclos biogeoquímicos que sustentan la vida y en consecuencia disminuye la producción agrícola; por lo tanto una alternativa de solución, es la bioestimulación (BIS) que explota el potencial microbiano heterotrófico, mediante un detergente (DEGE) que solubiliza los HICO; además del enriquecimiento secuencial de un abono animal como la lombricomposta (LOCO), que enriquece el suelo con aminoácidos, proteínas, nucleótidos, ácidos nucleicos; urea y NH<sub>4</sub> (amonio), seguida de una BIS complementaria con una solución nutritiva a base de sales minerales como N (nitrógeno), P (fósforo), K (potasio) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrogeno) como una fuente de O<sub>2</sub> (oxígeno), e integración con la fitorremediación (FITO), con una gramínea tolerante a una relativa alta concentración de HICO como lo es *Sorghum vulgare* que puede ser potenciada con microorganismos promotores de crecimiento vegetal del tipo *A. niger* y/o *P. chrysogenum*, para mejorar la oxidación de lo HICO aromáticos y lograr reducir el ARA a un valor inferior al máximo establecido por la NOM-138-SEMARNAT-2012. Los objetivos de éste trabajo fueron: a) Bioestimulación secuencial, complementaria y acumulativa de suelo impactado por 90,000 ppm de ARA y posterior b) Fitorremediación mediante *Sorghum vulgare* inoculado con *Aspergillus niger* y *Penicillium chrysogenum* para decrecer la concentración de aceite residual automotriz a un nivel inferior al máximo permitido por la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012.

La variable-respuesta durante la BIS fue la concentración inicial y final del ARA, mientras que en la FITO con *S. vulgare* potenciado con *A. niger* y/o *P. chrysogenum* fue la fenología; altura de planta (AP) y longitud radical (LR), y la biomasa; peso fresco aéreo (PFA) y peso fresco radical (PFR), peso seco aéreo (PSA) y peso seco radical (PSR) a plántula. Los datos experimentales fueron analizados por ANOVA/Tukey HSD  $P < 0.05\%$  con Statgraphics Centurion.

Los resultados mostraron que en el suelo impactado con 90,000 ppm de ARA y BIS con el DEGE al 0.5% y la LOCO al 3%, disminuyó la concentración hasta 88,000 ppm en 30 días, mientras que ese mismo suelo bioestimulado complementariamente con la SOMI y  $H_2O_2$  al 0.05 % decreció de 88,000 hasta 34,871 ppm de ARA en 30 días más. Seguida la FITO minimizó de 34,871 ppm hasta 3,292 ppm de ARA en 90 días a partir del día 60 del inicio de la BIS. Lo anterior apoya a que el enriquecimiento con nutrientes esenciales a base de N, P y K indujeron a la actividad microbiana heterotrófica aerobia a la mineralización de los HICO y finalmente la FITO que eliminó el ARA remanente de la BIS hasta un valor por debajo del límite máximo establecido por la NOM-138-SEMARNAT-2012.

Palabras clave: suelo, ARA, bioestimulación, fitorremediación, *A. niger*, *P. chrysogenum*

## Abstract

A contaminated soil by 90,000 ppm of residual automotive oil (ARA), is a concentration that exceed the maximum limit accepted in that environment of 4,400 ppm of hydrocarbons (HICO), according by NOM-138SEMARNAT-2012, this concentration of ARA is a pollutant, impede the gas interchange, alter the balance carbon-nitrogen (C:N), inhibit the mineralization of organic matter related with the biogeochemistry cycles that sustains life and in consequence decrease farming production; thus, one alternative of solution, is bioestimulation (BIS) that exploits the microbial heterotrophic potential, through a detergent (DEGE) that solubilize HICO's, also, in addition of a sequential enrichment of an animal compost like vermicompost (LOCO), that enrichment the soil with amino acids, proteins, nucleoids, nucleoids acids; urea and NH<sub>4</sub> (ammonium), this is follow by a complementary BIS with a nutritive solution based in mineral salts like N (nitrogen), P (phosphor), K (potassium) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (hydrogen peroxide) with and O<sub>2</sub> (oxygen) source, and a integration with a phytoremediation (FITO), using an adaptable grass to HICO concentration like it is *S. Vulgare*, that can be enhanced with microorganisms promoters of vegetal growth like *A. niger* a/o *P. chrysogenum*, favoring aromatic HICO's oxidation and achieving the ARA reduction to a value inferior to the established by NOM-138-SEMARNAT-2012.

The variable response trough the BIS was the initial and final ARA's concentration, while during the FITO with *S. vulgare* enhanced with *A. niger* a/o *P. chrysogenum* was the phenology; height's plant (AP) and radical length (LR), and for the biomass; aerial fresh weight (PFA), radical fresh weight (PFR), aerial dry weight (PSA) and radical dry weight (PSR) a seedling. The experimental data was analyzed by ANOVA/TUKEY HSD P<0.05% with Statgraphics Centurion.

The result showed that in impacted soils with 90,000 ppm with ARA and BIS with DEGE 0.5% and LOCO 3%, decreased concentration to 88,000 ppm in 30 days, while in the same soil biostimulated complementary with SOMI and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.05% decreased ARA of 88,000 to 34,871 ppm. This followed by FITO, minimizing ARA unto 3.292 ppm in 90 days from the 60<sup>th</sup> day of BIS initiation. Anterior supports that the enrichment with essential nutrients based on N, P and K induced aerial heterotrophic microbial activity to the mineralization of HICOs and finally, the FITO eliminated ARA's remant of BIS unto a value under the maximum limit established by NOM-132-SEMARNAT-2012.

Keywords: soil, ARA, bioestimulation, phytoremediation, *A. niger*, *P. chrysogenum*.

## Introducción

El aceite residual automotriz (ARA) es una mezcla de moléculas insolubles de hidrocarburos (HICO) alifáticos, aromáticos, policíclicos y trazas de metales pesados, es un residuo peligroso para el ser humano y contamina el suelo, de acuerdo con la Ley General de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente (LGEEPA, 2008). La contaminación de suelo por 90,000 ppm de ARA excede la máxima concentración de 4,400 ppm de HICO en el ambiente según la NOM-138-SEMARNAT-SSAI-2012, proviene de los talleres que realizan cambio de aceite automotriz, su inadecuada disposición final, provoca una derrama premeditada en el suelo afectando la estructura y reduce la fertilidad (Pardo *et al.*, 2004), forma una película en la superficie que impide el intercambio de O<sub>2</sub> (oxígeno) con la atmósfera e inhibe la actividad de las poblaciones microbianas heterotróficas, encargada de la eliminación de los HICO, en consecuencia disminuye la producción agrícola (Benavides *et al.*, 2006; Delgadillo-López *et al.*, 2011). Una alternativa ecológica es la bioestimulación (BIS) secuencial, complementaria y acumulativa, con un detergente (DEGE), que favorece a la solubilización de los HICO y se oxiden (Zacarías-Salinas *et al.*, 2013), si a ello se suma la BIS mediante la incorporación de una lombricomposta (LOCO), que enriquece el suelo con minerales esenciales como el N (nitrógeno) orgánico en forma de aminoácidos, proteínas, nucleótidos, ácidos nucleicos y urea e inorgánico como NH<sub>3</sub> (amoníaco) para inducir a su microbiota aerobia heterotrófica nativa a mineralizar los HICO alifáticos y enmendar el desequilibrio C:N (carbono-nitrógeno) (Maldonado-Chávez *et al.* 2010). La LOCO el mismo abono de origen animal, induce al coometabolismo, donde una amplia diversidad de microorganismos metabolizan HICO alifáticos que no usan como fuente de C, por lo que requieren de un azúcar como la glucosa que utilicen como fuente de energía y con ello oxidar HICO alifáticos y algunas fracciones aromáticas del ARA (Alexander, 1980).

Y luego continuar con la BIS complementaria con una solución mineral (SOMI) que agrega N en forma de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$  (nitratos) y P en forma de  $\text{PO}_4^{3-}$  (fosfatos), estos compuestos favorecen a la microbiota heterotrófica aerobia nativa a oxidar el ARA (Vallejo *et al.*, 2005, Gómez *et al.*, 2009), y para reestablecer el equilibrio C:N, causado por el exceso de ARA. Ésta BIS facilita la oxidación de los HICO por los microorganismos autóctonos aerobios heterotróficos y bioestimulando con el  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 0.05% como fuente de  $\text{O}_2$  en la oxidación del ARA (Pardo *et al.*, 2004). Finalmente para concluir con el decremento el ARA remanente de la BIS se aplica la fitorremediación (FITO) con una planta que tolera la fitotoxicidad del ARA, como *S. vulgare*; gramínea que posee un extenso sistema de raíces que favorecen la actividad oxidante de HICO que al tolerar fitotoxicidad del también degrada parte de los HICO aromáticos del ARA (Merkl *et al.*, 2005), potenciada con hongos del tipo: *Aspergillus* y *Penicillium*, con capacidad para degradar la fracción aromática del ARA (Leitão *et al.* 2009, Mohsenzadeh *et al.*, 2012;). Además de que estos microorganismos cuentan con una capacidad para transformar exudados de la raíz en sustancias promotoras del crecimiento vegetal (Sánchez-Yañez *et al.*, 2015) se acelera y mejora la degradación de ésta fracción.

Existen escasas investigaciones sobre la biorremediación (BIR) de un suelo contaminado con 90,000 ppm de ARA y biostimulado de forma secuencial, acumulativa y complementaria con DEGE, LOCO, SOMI,  $\text{H}_2\text{O}_2$  e integrada con una FITO mediante *S. vulgare* inoculado con *P. chrysogenum* y *A. niger* hasta decrecerlo a un valor inferior al máximo permitido en suelo por la NOM-138-SEMARNAT-2012.

## **Antecedente**

Balderas-León, & Sánchez-Yáñez, 2015. Bioestimularon un suelo contaminado con 75,000 ppm de ARA. La BIS con DEGE al 4%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% y SOMI seguido *Vicia sativa* como abono verde (AVE) y posterior FITO mediante *S. vulgare* potenciado *B. cereus* y *B. cepacia*. Los resultados muestran que la BIR vía BIS con SOMI redujo la concentración del suelo hasta un 32,500 ppm en 30 días al disminuir la concentración de ARA; esto favoreció a la germinación de frijol como AVE coinoculado con *B. cereus* y *B. cepacia*, el ARA disminuyó hasta un 11,000 ppm, después de 60 días, la FITO redujo la concentración de ARA hasta un 2,500 ppm cuando el *S. vulgare* llegó a floración inoculado con ambas bacterias lo redujo de 2,500 ppm hasta 800 ppm después de 6 meses del ensayo.

Lo anterior justifica que debido a la escasa información de BIR sobre un suelo contaminado con una relativa alta concentración, 90,000 ppm de ARA, una opción ecológica es la BIS secuencial, acumulativa y complementaria seguida de la FITO de un suelo con una relativa alta concentración de ARA, para decrecer el ARA a un valor menor al máximo aceptado por la NOM-138-SEMARNAT-2012.

## **Hipótesis**

La bioestimulación secuencial, complementaria y acumulativa de un suelo contaminado con 90,000 ppm de ARA con DEGE, LOCO, SOMI, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la integración con la FITO mediante *S. vulgare* potenciado con *A. niger* y *P. chrysogenum* disminuirá el ARA a una concentración por debajo del valor máximo permitido por la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012.

## Objetivos

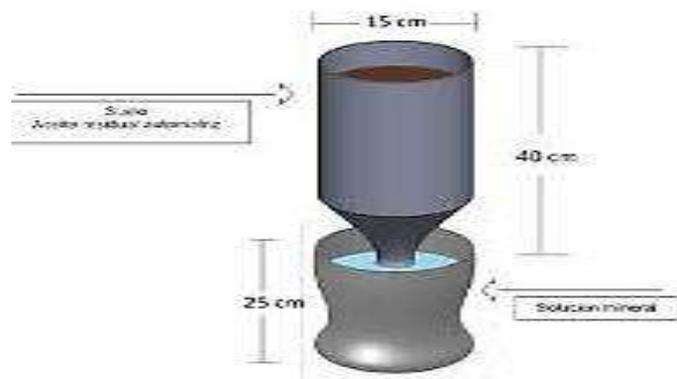
- a) Bioestimulación secuencial, complementaria y acumulativa de suelo impactado por 90,000 ppm de ARA.
- b) Fitorremediación mediante *S. vulgare* inoculado con *A. niger* y *P. chrysogenum* para decrecer la concentración de aceite residual automotriz a un nivel inferior al máximo permitido por la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012.

## Materiales y métodos

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 son: temperatura de 23.2 °C, luminosidad de 450  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y humedad relativa de 67%. El suelo se tamizó con una malla del No. 20 después se solarizó a 70°C/48 hrs para minimizar a las plagas y enfermedades, posteriormente se contaminó con 90,000 ppm de ARA proveniente de un taller mecánico automotriz, diluido en agua con un DEGE comercial (STANHOME ®) al 0.5% (v/v). Sucesivamente un 1.0 Kg de suelo se colocó en el contenedor superior de la jarra de Leonard mientras que en la parte inferior el agua o SOMI, ambas partes se conectaron por una tira de algodón de aproximadamente de 35 cm de largo; para permitir su movimiento por capilaridad al suelo, ver Figura 1 según el tratamiento especificado en la Tabla 1 con un diseño experimental de bloques al azar, en donde se describen 3 controles: el suelo sin contaminar con ARA irrigado solo con agua o control absoluto (CA); el suelo sin AR alimentado con la SOMI o control relativo (CR); el suelo impactado

por ARA, irrigado solo con agua sin BIS ni FITO o control negativo (CN); y el suelo contaminado por ARA, BIR por BIS y FITO.

El suelo contaminado con ARA se biestimulo con DEGE al 0.5% y después se enriqueció con la LOCO al 3% (p/p) y se dejó por 30 días, después se cuantificó la concentración del ARA por Soxhlet (Leal, 2003). En éste suelo, la BIS complementaria se realizó con SOMI con la siguiente composición química: g/L,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  10;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 2.5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2.0;  $\text{MgSO}_4$  0.5; NaCl, 0.1;  $\text{CaCl}_2$ , 0.1;  $\text{FeSO}_4$  y 1.0 ml/L de una solución de microelementos g/L:  $\text{H}_3\text{BO}_3$  2.86;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.22;  $\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.8, pH 6.8. La SOMI se aplicó cada 3 días por 30 días (Vallejo *et al.*, 2005) Simultáneamente se agregó el  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 0.05% como fuente de  $\text{O}_2$  para la oxidación del ARA; al terminar esta fase se cuantificó la concentración del ARA por Soxhlet (Hernández-Valencia & Mager 2003). Posteriormente, en el día 60 de la BIS se inició la FITO; se sembró *S. vulgare* inoculado con *A. niger* y *P. chrysogenum*; para lo cual los hongos se cultivaron en agar hueso de aguacate (AHA) g/L; hueso de aguacate 10, peptona caseína 5, extracto de levadura 1.3,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.17,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.61,  $\text{MgSO}_4$  1.5, NaCl 0.9,  $\text{CuSO}_4$  0.05, azul de bromotimol 10 ppm, 2.5 ml solución detergente al 10%, 1.0 ml solución de oligoelementos, agar 18.0 g, pH 5.5. Las semillas de *S. vulgare* se trataron con 1.0 mL de *A. niger* y/o *P. chrysogenum*, la semilla se inoculó con *A. niger* y *P. chrysogenum* en relación 1:1 (v/v)). La semilla de *S. vulgare* potenciada de forma individual y combinada con cada hongo, se sembró en suelo controles y biorremediado, después de 30 días se midió la concentración de ARA por Soxhlet (Domínguez-Rosado *et al.*, 2004b). Mientras que *S. vulgare* potenciado con *A. niger* y *P. chrysogenum*, cuando llego a nivel de plántula, a los 150 días se midió la fenología y biomasa. Posteriormente, se cuantificó la cantidad del ARA por Soxhlet (Domínguez-Rosado *et al.*, 2004b). Los resultados se validaron con ANOVA/Tukey HSD  $P < 0.05\%$  con el programa estadístico Statgraphics Centurion (Walpole *et al.*, 2007).



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

Tabla 2. Diseño experimental para la bioestimulación de un suelo contaminado con 90,000 ppm de aceite residual automotriz.

*Suelo	Aceite residual automotriz	Lombricomposta al 3%	Solución mineral	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 0.05%
<b>Control absoluto</b>	-	-	-	-
<b>Control relativo</b>	-	-	+	-
<b>Control negativo</b>	+	-	-	+
<b>Bioestimulación</b>	+	+	+	+

\*n (número de repeticiones) = 3 (+) = agregado, (-) = no agregado,

Tabla 3. Diseño experimental para la fitorremediación con *Sorghum vulgare* inoculado con *Aspergillus niger* y *Penicillium chrysogenum* de un suelo contaminado con 90,000 ppm de aceite residual automotriz.

	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<b>Suelo sin ARA <i>S. vulgare</i> irrigado con agua (CA)</b>	-	-
<b>En suelo sin ARA <i>S. vulgare</i> con SOMI (CR)</b>	-	-
<b>En suelo con ARA <i>S. vulgare</i> irrigado con agua (CN)</b>	-	-
<b>En suelo con ARA <i>S. vulgare</i> con <i>Aspergillus niger</i></b>	-	+
<b>En suelo con ARA <i>S. vulgare</i></b>	+	-
<b>En suelo con ARA <i>S. vulgare</i></b>	+	+
<b>En suelo con ARA <i>S. vulgare</i></b>	-	-

\* n = 3 (+) = agregado, (-) = no agregado,

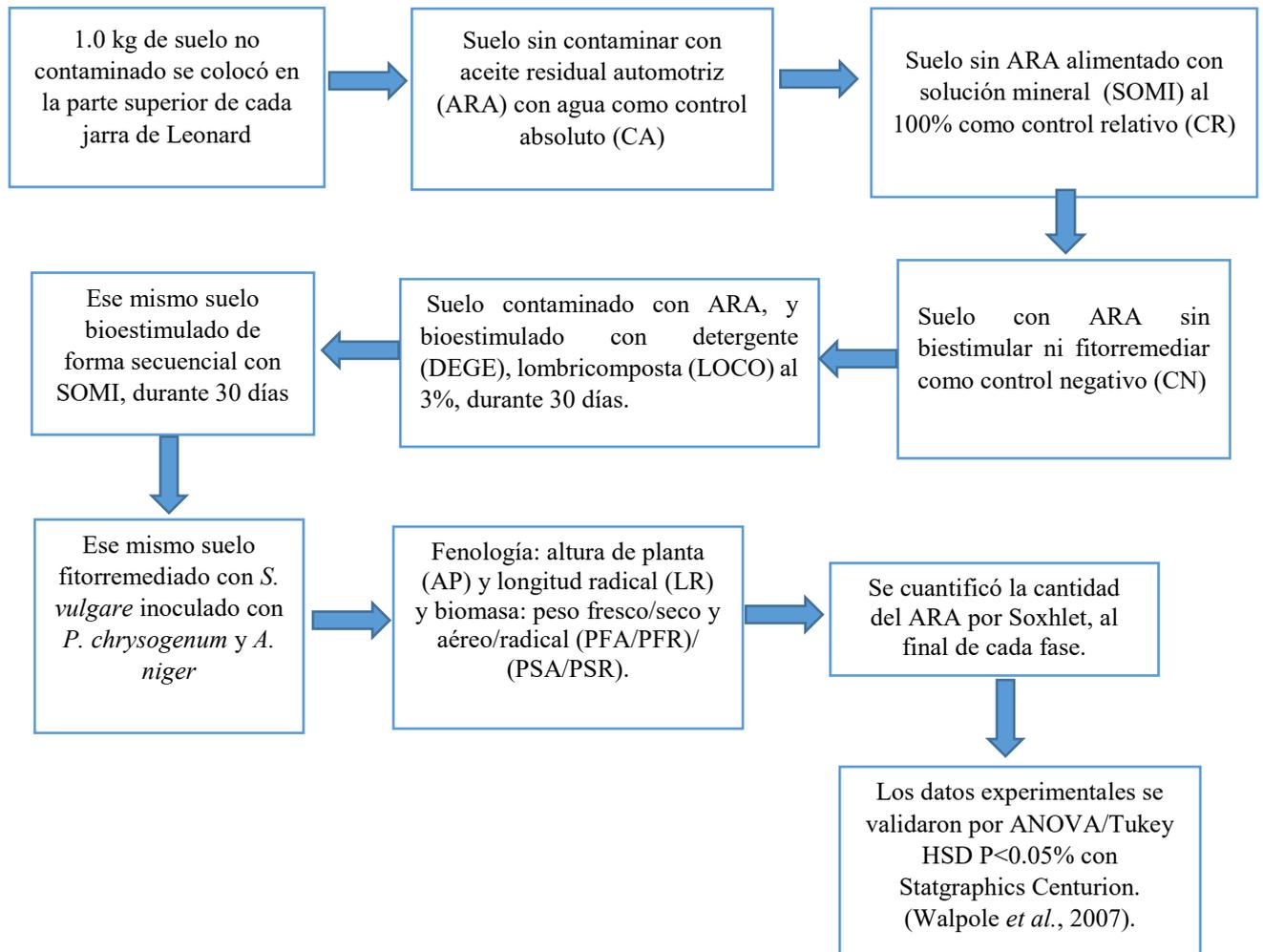
Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas del suelo sin aceite residual automotriz.

<b>Parámetro</b>	<b>Valor</b>
pH (1:20)	6.02
Materia orgánica (%)	3.58
Capacidad de intercambio iónico (Cmol(+) Kg <sup>-1</sup> )	26.64
Textura (%)	50 (Ac)-7(L)-43 (Ar)
Densidad real (g/cm <sup>3</sup> )	2.22
Densidad aparente (g/cm <sup>3</sup> )	1.05
Porosidad (%)	47.5
Capacidad de campo (%)	54

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 arcillosos NOM-021-RECNAT-2000.

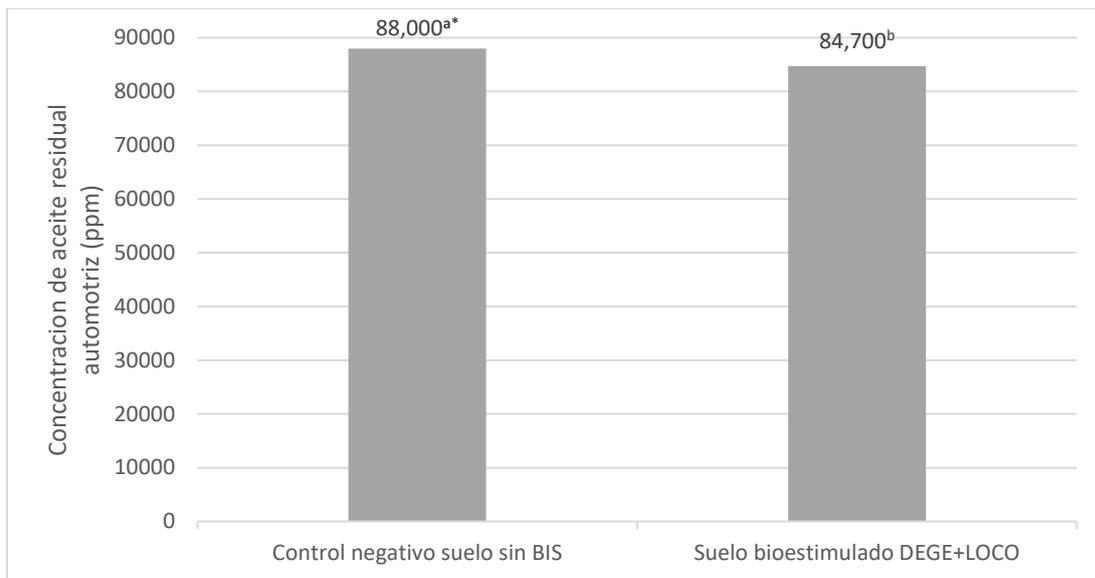
La tabla 4 muestra las propiedades fisicoquímicas del suelo sin ARA: se detectó un pH ligeramente ácido de 6.02, con un bajo contenido de materia orgánica de 3.58%; alta capacidad de intercambio iónico de 26.64 C mol (+) Kg<sup>-1</sup>; con una textura: arcilla de 50%, limo 7% y arena 43% de un suelo clasificado como arcilloso, los cuales tienen una baja tasa de contenido de O<sub>2</sub>, por lo que los microorganismos tienden a tener deficiencia de éste gas (Alexander, 1980).

**Diagrama de la bioestimulación de un suelo contaminado por 90,000 ppm de aceite residual automotriz y fitorremediación mediante *Sorghum vulgare* inoculado con *Aspergillus niger* y *Penicillium chrysogenum***



## Resultados:

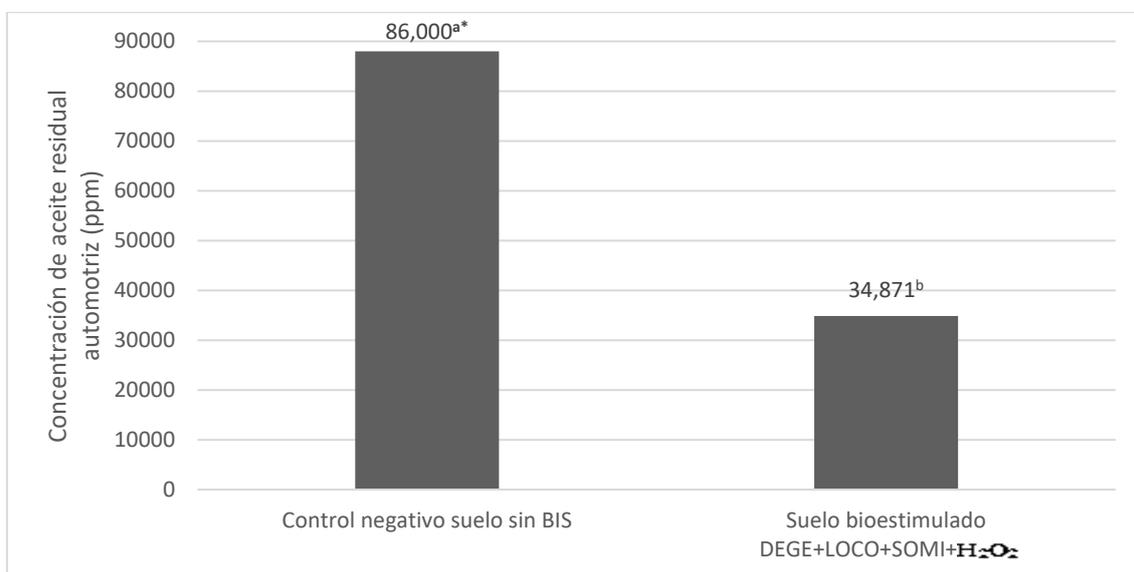
**Figura 2. En suelo concentración de aceite residual automotriz derivado de la bioestimulación acumulativa con detergente al 0.5% y secuencial con una lombricomposta al 3% por 30 días.**



\*Letras distintas: indican diferencia estadística (ANOVA/TUKEY al 0.05%)

En la figura 2 se observa en suelo la concentración de ARA derivado de la BIS con DEGE al 0.5 %, y secuencial con LOCO al 3 % luego de 30 días, ahí se registró una disminución desde 90,000 ppm hasta 84,700 ppm, valor numérico con diferencia estadística comparado con el suelo con ARA empleado como CN donde disminuyó de 90,000 ppm hasta 88,000 ppm por la atenuación natural.

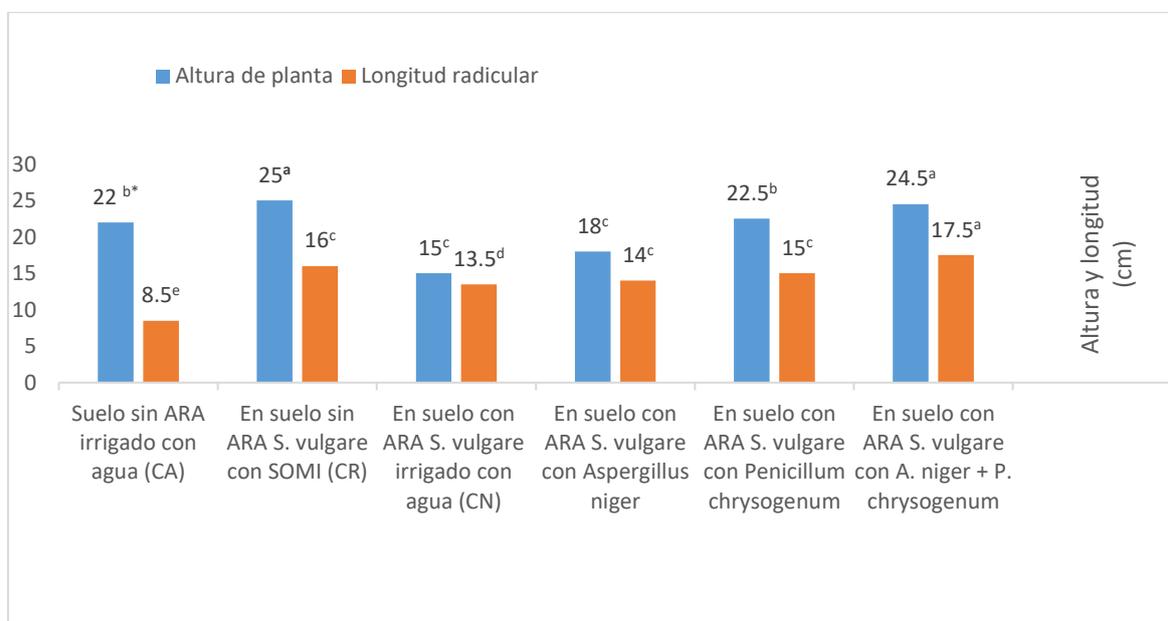
**Figura 3. Concentración de aceite residual automotriz derivado de la bioestimulación secuencial con solución mineral y complementaria con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 30 días.**



\*Letras distintas: indican diferencia estadística (Software ANOVA/TUKEY al 0.05 %)

En la figura 3 se muestra en suelo la concentración de ARA derivado de la BIS complementaria con la SOMI y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.05 % luego de 30 días posteriores a los 30 días de la BIS con DEGE al 0.5% y la LOCO al 3%, a una humedad al 80% de la capacidad de campo lo que causó una disminución de ARA desde 84,700 ppm hasta 34,871 ppm, valor con diferencia estadística comparado con la concentración de ARA en el suelo utilizado como CN que se redujo de 88,000 a 86,000 por la atenuación natural.

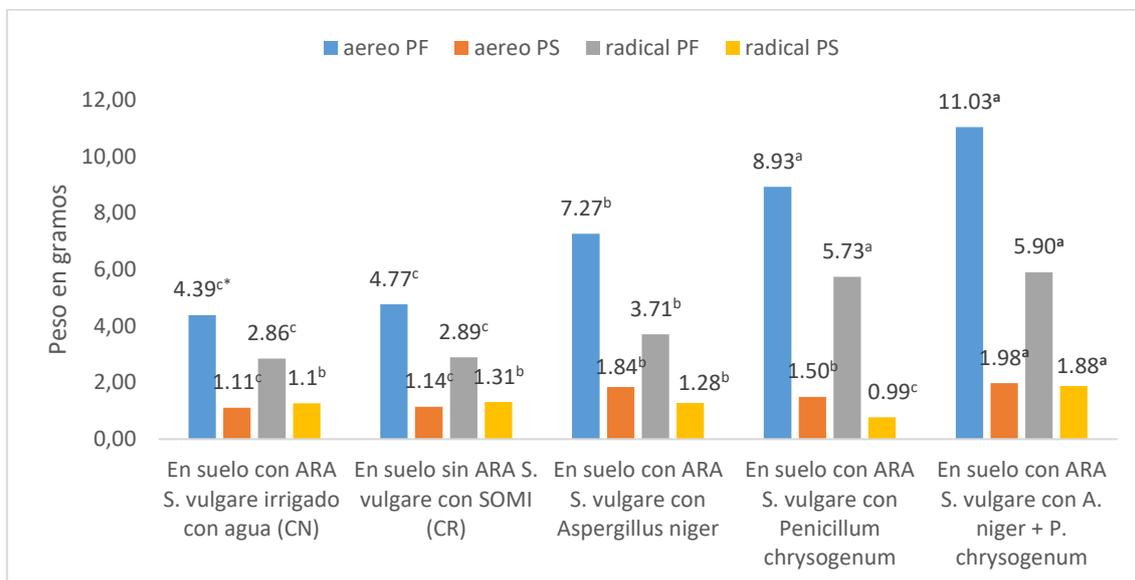
**Figura 4. Fenología de *Sorghum vulgare* potenciado con *Penicillium chrysogenum* y *Aspergillus niger* a plántula durante la fitorremediación de suelo contaminado con 34,771 ppm de aceite residual automotriz.**



\*Letras distintas: indican diferencia estadística (Software ANOVA/TUKEY al 0.05 %)

En la figura 4 se observa la altura de planta (AP) y longitud radical (LR) de *S. vulgare* potenciado con *P. chrysogenum* y *A. niger* a plántula durante la FITO del suelo impactado por 34,771 ppm de ARA, donde se registró la AP de 24.5 cm y LR de 17.5 cm, valores numéricos con diferencia estadística en comparación con el valor de la AP de 25.0 cm y LR de 16.0 cm de *S. vulgare* sembrado en suelo sin ARA y alimentado con la SOMI o CR; valores numéricos con diferencia estadística, en comparación con una AP de 15.0 cm y LR 13.5 cm de la misma planta sembrada en suelo contaminado con ARA, irrigada solo con H<sub>2</sub>O o CN, valores numéricos con diferencia estadística.

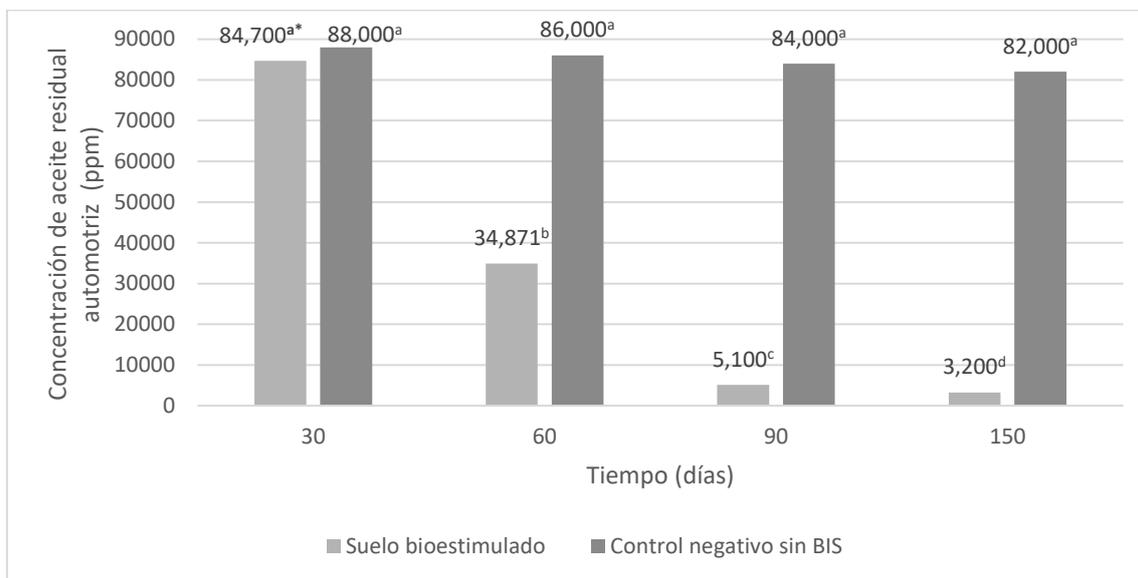
**Figura 5. Biomasa de *Sorghum vulgare* en la fitorremediación de un suelo contaminado con 34,771 ppm de aceite residual automotriz.**



\*Letras distintas: indican diferencia estadística (Software ANOVA/TUKEY al 0.05 %)

En la figura 5 se reporta la biomasa de *S. vulgare* inoculada con ambos hongos en la FITO de un suelo contaminado por 34,771 ppm de ARA, donde a nivel de plántula registró un PFA de 11.03 g; valor numérico con diferencia estadística comparado con la misma gramínea o CR que con un PFA de 4.77 y con el PFA de 4.39 g de *S. vulgare* utilizado como CN, en contraste con el PFR de 5.90 g de *S. vulgare* en suelo biorremediado, valor numérico estadísticamente diferente comparado con el PFR de 2.89 g. de *S. vulgare* usado como CR y del PFR de 2.86 g de *S. vulgare* utilizado como CN. Por su parte en *S. vulgare* en suelo biorremediado el PSA fue de 1.98 g, en comparación con el PSA de 1.14 g de *S. vulgare* empleado como CR y el PSA de 1.11 g de la misma gramínea usado como CN; valores numéricos con diferencia estadística comparado con el PSR de 1.88 g de *S. vulgare* inoculado con *A. niger* y *P. chrysogenum*, con el PSR de 1.31 g del CR y el PSR de 1.10 g de *S. vulgare* utilizado como CN.

**Figura 6. En suelo concentración final de aceite residual automotriz por la bioestimulación con lombricomposta al 3%, solución mineral y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.05% y fitorremediación mediante *S. vulgare* inoculado con *A. niger* y *P. chrysogenum***



\*Letras distintas: indican diferencia estadística (Software ANOVA/TUKEY al 0.05 %)

En la figura 6 se muestra en suelo la concentración de ARA derivado de la BIS con DEGE al 0.5% y secuencial con LOCO al 3% después de 30 días de un suelo contaminado con 90,000 ppm de ARA; la concentración disminuyó a 84,700 ppm, valor numérico con diferencia estadística, comparado con el suelo CN, donde decreció de 90,000 ppm a 88,000 ppm; cuando el suelo se bioestimuló complementariamente con una SOMI y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.05% durante 30 días posteriores a la BIS con DEGE y la LOCO, se oxidó el ARA desde 84,700 ppm hasta 34,871 ppm valores numéricos con diferencia estadística, en comparación con el suelo usado como CN que decreció hasta 86,000 ppm; posteriormente se aplicó la FITO en el suelo bioestimulado, después de 30 días se midió su concentración de ARA que fue de 5,100 ppm, valor por encima de la NOM-138; por lo tanto se siguió con la FITO durante 60 días más y se cuantificó la concentración que se redujo hasta

3,292 ppm en comparación en el suelo utilizado como CN donde disminuyó a 82,000 ppm por atenuación natural.

## **Discusión**

En la figura 2 se muestra el resultado registrado con el suelo contaminado por 90,000 ppm de ARA y BIS con el DEGE al 0.5%, ya que emulsificó los HICO alifáticos y facilitó su disponibilidad ante los microorganismos autóctonos de ese ambiente para esa oxidación, seguida de la BIS secuencial con la LOCO al 3 % por 30 días, que al enriquecerlo solucionó la demanda nutricional del suelo al aportar N orgánico en forma de aminoácidos, proteínas, nucleótidos, ácidos nucleicos y urea e inorgánico como  $\text{NH}_3$  para inducir a la microbiota aerobia heterotrófica nativa a mineralizar el ARA, complementando las deficiencias nutricionales de manera que se reestableció el desbalance C:N que se vio afectado por la alta concentración de ARA (Maldonado-Chávez *et al.* 2010). Esto mejoró las condiciones del suelo e indujo el coometabolismo de una amplia diversidad de microorganismos, para oxidar algunos HICO alifáticos (Alexander, 1980). La oxidación de HICO demanda una gran cantidad de  $\text{O}_2$  por ello se mantuvo la capacidad de campo al 80% en el suelo (Jaramillo, 2002).

En la figura 3 se observa en suelo la concentración de ARA producto de la BIS secuencial, complementaria y acumulativa con el DEGE al 0.5%, la LOCO al 3%, la SOMI y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 0.05%, que enriqueció en el suelo compuestos de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$  y de  $\text{PO}_4^{3-}$  para reestablecer el equilibrio C:N e inducir una parte de la microbiota heterotrófica aerobia nativa a oxidar primero los HICO de cadena corta y bajo peso molecular (Vallejo *et al.*, 2005, Gómez *et al.*, 2009), causado por el exceso de ARA, donde hubo una disminución de 84,700 ppm hasta 34,871 ppm del ARA (Pinto *et al.*, 2007). Además de la BIS con el

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.05 % aporta el suficiente O<sub>2</sub>, ya que es un proceso de oxidación y demanda una alta concentración de dicho gas potenciado con *P. chrysogenum* y *A. niger*. La BIS mediante la adecuada combinación del DEGE, la LOCO, la SOMI y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.05 % estimuló a los microorganismos del suelo a mineralizar el ARA. En comparación con el suelo utilizado como CN en donde la atenuación natural fue insuficiente debido a la deficiencia nutricional, el exceso de C orgánico que desequilibró la relación C:N, mientras que la capa hidrofobia del ARA bloqueó el intercambio de gases causado por el exceso del ARA (Vallejo *et al.*, 2005, Gómez *et al.*, 2009).

En la Figura 4 se muestra la AP y LR de *S. vulgare* potenciado con *P. chrysogenum* y *A. niger* a plántula durante la FITO de un suelo contaminado con 34,871 ppm de ARA. Los valores registrados fueron estadísticamente diferentes y superiores que en *S. vulgare* sembrado en suelo usado como CN. Esto indica que en el suelo contaminado con ARA bioestimulado y posterior fitorremediado la planta tuvo un mayor crecimiento ya que *S. vulgare* es una gramínea tolerante al estrés causado por la fitotoxicidad, por el extenso sistema radical que permitió la acción de *P. chrysogenum* y *A. niger* para eliminar el ARA (Banks *et al.*; 2003; Basumatary *et al.*, 2012). A esto sumando la inoculación con *A. niger* y *P. chrysogenum* que promovieron su crecimiento y la capacidad para mineralizar los HICO aromáticos y transformar los exudados de la raíz en sustancias promotoras del crecimiento vegetal, oxidaron parte de la fracción aromática y facilitaron el crecimiento de *S. vulgare*, en comparación con la respuesta de *S. vulgare* sembrado en suelo utilizado como CN donde la AP y la LR así como el PFA/PFR/PSA/PSR en parte porque no se potenció mediante *A. niger* y *P. chrysogenum* (Tsao, 2003).

En la figura 5 se muestran los resultados de la biomasa de *S. vulgare* potenciado con *A. niger* y *P. chrysogenum* en la FITO del suelo por 34,500 ppm de ARA remanente de la BIS secuencial, complementaria y acumulativa que reestableció el equilibrio mineral e

indujo la actividad de la microbiota aerobia heterotrófica y al mismo tiempo favoreció el crecimiento vegetal del *S. vulgare* planta tolerante a altas concentraciones de ARA y potenciada mediante: *A. niger* y *P. chrysogenum*, mejoró a la oxidación del ARA, en consecuencia causó en la biomasa de *S. vulgare* similar a la observada cuando la gramínea se cultivó en suelo sin ARA o CR (Mohsenzadeh *et al.*, 2012), en comparación con lo registrado de esta misma gramínea en suelo utilizado CN, afectada por el exceso de ARA que fue fitotóxico (Peña-Castro *et al.*, 2006, Pérez-Armendariz *et al.*, 2011.).

En la figura 6 se muestra en suelo la concentración final del ARA remanente de la BIS secuencial, complementaria y acumulativa con DEGE, la LOCO, la SOMI y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e integral con la FITO mediante *S. vulgare* inoculado con *A. niger* y *P. chrysogenum*, donde se apoya la BIS por DEGE que emulsificó los HICO, haciéndolos disponibles ante los microorganismos oxidantes de ARA, mientras que la BIS secuencial con la LOCO enriqueció el suelo con N orgánico como aminoácidos, proteínas, nucleótidos, ácidos nucleicos y urea e inorgánico en forma de NH<sub>3</sub> para inducir a la actividad de la microbiota aerobia heterotrófica nativa oxidante de la fracción alifática del ARA y con ello arreglar la relación C:N. en tanto que la BIS mediante la SOMI con sales de: NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>, equilibraron el desbalance nutricional para mejorar la actividad de la microbiota heterotrófica aerobia nativa oxidante del ARA y la BIS con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que aportó O<sub>2</sub> para la oxidación de ARA (Pinto *et al.*, 2006) previo a la FITO, se reporta que *A. niger* y *P. chrysogenum* degradan aromáticos de la lignina similares a los del ARA (Leitão, 2009) y *S. vulgare* tiene un sistema radicular extenso, fibroso y voluminoso que explora una mayor área de suelo para la captación de minerales y agua que tolera una relativa elevada concentración de ARA (Juárez-Cisneros & Sánchez-Yáñez., 2014). Por lo que la FITO

mediante *S. vulgare* potenciado con *A. niger* y *P. chrysogenum*, ayudaron en la eliminación de la concentración de 34,500 ppm hasta 3,292 ppm, valor numérico inferior al máximo establecido de la NOM-138.

Con base en lo anterior la suma de las acciones de la BIS/FITO, decreció en menor tiempo la mayor cantidad de ARA hasta una concentración inferior al máximo permitido por la NOM-138-SEMARNAT-2012.

### **Conclusión**

La BIS suelo contaminado con una relativa alta concentración de 90,000 ppm de ARA fue posible la disminución mediante una BIS secuencial con el DEGE que disolvió los HICO, la BIS complementaria y acumulativa con la LOCO, la SOMI, y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seguido de la FITO mediante *S. vulgare* inoculado con *P. chrysogenum* y *A. niger*, mejoró y aceleró la mineralización del ARA en 150 días desde 90,000 ppm hasta 3,292 ppm , valor numérico inferior al máximo permitido por la NOM-138-SEMARNAT-2012 lo que aseguro la biorremediación del suelo.

## **Bibliografía**

1. \_Alexander M. 1980. Introducción a la microbiología del suelo. Transformaciones microbianas del fósforo. pag 355-361. AGT Editor, S. A. Cd. México.
2. \_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
3. \_Banks, MK; P Kulakow; AP Schwab; Z Chen & K Rathbone. 2003. Degradation of Crude Oil in the Rhizosphere of *Sorghum bicolor*. International Journal Phytoremediation 5 (3):225-234.
4. \_Basumatary, B; S Bordoloi & H Sarma. 2012. Crude Oil-Contaminated Soil Phytoremediation by Using *Cyperus brevifolius* Rottb. Hassk. Water, Air, & Soil Pollution. 22 (3):3373-3383.
5. \_Benavides LJ, Quintero G, Guevara VAL, Jaimes CDC, Gutiérrez RSM, Miranda JG. 2006. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. NOVA (2) 82-90.
6. \_Delgadillo-López AE, González-Ramírez CA, Prieto-García F, Villagómez-Ibarra JR, Acevedo-Sandoval O. 2011. Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación. Tropical and Subtropical Agroecosystems.14:597-612.
7. \_Domínguez-Rosado, E., Pichtel, J., & Coughlin, M. 2004. Phytoremediation of soil contaminated with used motor oil: I. Enhanced microbial activities from laboratory and growth chamber studies. Environmental Engineering Science, 21:2: 157-168.

8. \_Domínguez-Rosado, E., & Pichtel, J. 2004. Phytoremediation of soil contaminated with used motor oil: II. Greenhouse studies. *Environmental Engineering Science* 21:2:169-180.
9. \_García-González, M.M., Farías-Rodríguez, R.; Peña-Cabriales, J.J.; Sánchez-Yáñez, J.M. 2005. Inoculación del trigo var. Pavón con *Azospirillum* spp. y *Azotobacter beijerinckii*. *Terra Latinoamericana* 23:65-72.
10. \_Gómez W., Gaviria J., Cardona S., 2009. Evaluación de la bioestimulación frente a la atenuación natural y la bioaumentación en un suelo contaminado con una mezcla de gasolina – diésel. *Dyna* 76:83-93.
11. \_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.
12. \_Jaramillo Jaramillo. 2002. Introducción a la ciencia del suelo. D.F. Editor, S. A. Cd. México.
13. \_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
14. \_Leal C. M. 2003. Biorremediación de un suelo agrícola contaminado con aceite residual automotriz. Postgrado Interinstitucional de Ciencias Agrícolas y Forestales. Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad de Colima. (Inédita) Disponible en [http://digeset.ucol.mx/tesis\\_posgrado/Pdf/Maribel%20Leal%20Castillo.pdf](http://digeset.ucol.mx/tesis_posgrado/Pdf/Maribel%20Leal%20Castillo.pdf)

15. \_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 2012.
16. \_LGEEPA 2008. "Ley general del equilibrio ecológico y la protección al ambiente". Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión, Última reforma DOF 15/05/2008, México, D. F., Disponible en: <http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/ref/lgeepa.htm>
17. \_Leitão, A. L. 2009. Potential of *Penicillium* species in the bioremediation field. International Journal of Environmental Research and Public Health. 6 (4):1393-1417.
18. \_Maldonado-Chávez E, Rivera-Cruz MC, Izquierdo-Reyes F, Palma-López DJ. 2010. Effects of rizosphere, microorganisms and fertilization on bioremediation and phytoremediation of soils with new and weathered crude oil. Universidad y Ciencia.; 26:2:121-136.
19. \_Merkl, N., Schultze-kraft, R., & Infante, C. 2005. Assessment of tropical grasses and legumes for phytoremediation of petroleum-contaminated soils. Water, Air, and Soil Pollution. 165: 195:209.
20. \_Mohsenzadeh F., Chehregani R. A., Akbari M. 2012. Evaluation of oil removal efficiency and enzymatic activity in some fungal strains for bioremediation of petroleum-polluted soils. Iranian Journal of Environmental Health Sciences & Engineering. 9:26.
21. \_"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.
22. \_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.

23. \_Peña-Castro J. M., Barrera-Figueroa B. E., Ruiz-Medrano r., Xoconostle-Cázares B. 2006. Bases moleculares de la fitorremediación de hidrocarburos totales del petróleo. *Terra Latinoamericana*, 24:529-539.
24. \_Pérez-Armendáriz, B., Castañeda-Antonio, D., Castellanos, G., Jiménez-Salgado, T., Tapia-Hernández, A., & Martínez-Carrera, D. 2011. Anthracene effect on stimulation of growth of maize and kidney bean. *Terra Latinoamericana*. 29 (1): 95–102.
25. \_Pinto M. A., Galdes K. A., De Franceschi D. D., Marcos B. D. 2007. Laboratory study on the bioremediation of diésel oil contaminated soil from a petrol station. *Brazilian Journal of Microbiology* 38:346-353.
26. \_Sánchez-Yáñez J. M., Alonso-Bravo J. N., Dasgupta-Schuber Nabanital Márquez-Benavides Liliana. 2015. Biorremediación de suelo contaminado con 55000 y 65000 de aceite residual automotriz y fitorremediación con *Sorghum bicolor* inoculado con *Burkholderia cepacia* y *Penicillium chrysogenum*. *Journal of the Selva Andina Research Society* 2015, 3(2):86-94.
27. \_Tsao D. 2003. *Phytoremediation de Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer Germany. (78):51-75.
28. \_Vallejo V, Salgado L, Roldan F. 2005. Evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de TPH en suelos contaminados con petróleo. *Revista Colombiana Biotecnología*. 2:67-78.
29. \_Walpole E.R., Myers R., Myers LS. 2007. *Probabilidad & Estadística para Ingeniería & Ciencias*. Ed. Pearson, 8ª, ISBN: 13:978-970-26-0936-0. México.
30. \_Zacarias-Salinas M., García-Peña E. I & Torres L. G. 2013. Treatment of wastewaters generated by surfactant-enhanced washing of soil in an aerobic biofilter inoculated with a consortium of hydrocarbon degraders. *British Biotechnology Journal*, 3:471-484.