



**UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



MCIA
Maestría en Ciencias
en Ingeniería Ambiental
UMSNH

**FACULTAD DE BIOLOGÍA
FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN INGENIERÍA AMBIENTAL**

**Biorremediación de un suelo agrícola impactado con aceite
residual automotriz**

TESIS

que para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA AMBIENTAL

presenta la

I.B.Q. Lizbeth Pasaye Anaya

Director de Tesis:

Dr. Juan Manuel Sánchez Yáñez

***Laboratorio de Microbiología Ambiental del Instituto de
Investigaciones Químico-Biológicas, UMSNH***

Morelia, Michoacán, Enero del 2011

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Microbiología Ambiental del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas (IIBQ), dependiente de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), bajo la supervisión del Dr. Juan Manuel Sánchez-Yáñez.

DEDICATORIA

A mi madre, Lizbeth Anaya Lara,
por darme la vida, por ser padre y madre a la vez y
por brindarme su apoyo incondicional e infinito amor.

A mi abuelita, Aída Lara Valdespino,
por entregarme su amor e invaluables consejos.

A mi hermana, Aída Pasaye Anaya,
por ser mi fiel compañera en la vida.

A mis tíos,
Raúl Anaya Lara
Homero Anaya Lara
Edgar Anaya Lara
Marco Antonio Anaya Lara
Olimpo Anaya Lara
por todo el apoyo y por creer siempre en mí.

A Víctor, Christian, Verónica, Reina y Jaqueline
por ser parte de mi vida.

A todos GRACIAS!

AGRADECIMIENTOS

Al Proyecto 2.7 (2008-2010) de la Coordinación General de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Al laboratorio de Microbiología Ambiental del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

A la empresa BIONUTRA (2008-2010), S.A. de C.V.

A los integrantes del Comité Tutoral, Dr. Juan Manuel Sánchez Yáñez, Dra. María Alcalá de Jesús, Dra. Nabanita Dasgupta-Schubert, Dr. Héctor Javier Anselmo Villegas Moreno y Dra. Liliana Márquez Benavides, por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

Al Dr. Juan Manuel Sánchez Yáñez, por su entera disposición, su apoyo y su valioso tiempo.

ÍNDICE

Índice de cuadros	iii
Índice de figuras	iv
Índice de anexos	vi
Abreviaturas	vii
Resumen	ix
Capítulo I. Introducción	
1.1 El aceite residual automotriz: origen e impacto en el suelo	1
1.2 Biorremediación	4
1.2.1 Tipos de biorremediación	5
1.2.2 Factores que influyen en la biorremediación	6
1.2.3 Situación actual y ventajas de la biorremediación	8
Capítulo II. Antecedentes	10
Hipótesis	18
Objetivos	18
Capítulo III. Materiales y métodos	
3.1 Localización del área de estudio	19
3.2 Muestreo del suelo	19
3.3 Propiedades físicas y químicas del suelo	21
3.4 Diseño experimental	21
3.5 Variables-respuesta consideradas en la biorremediación vía bioestimulación de un suelo agrícola impactado con aceite residual automotriz	22
3.5.1 Determinación inicial y final de grasas y aceites totales	22
3.5.2 Aislamiento y cuantificación de poblaciones bacterianas mineralizadoras de aceite residual automotriz	22
3.5.3 Determinación de las propiedades físicas y químicas del suelo	
3.5.3.1 pH	22

3.5.3.2	Textura	22
3.5.3.3	Materia orgánica	22
3.5.3.4	Capacidad de intercambio catiónico	23
3.5.4	Determinación de la actividad biológica microbiana nativa: producción de CO ₂	23
3.6	Tratamientos empleados en el experimento de biorremediación de un suelo agrícola impactado con aceite residual automotriz	23
3.7	Análisis estadístico	24
Capítulo IV. Resultados y discusión		
4.1	Propiedades físicas y químicas del suelo	25
4.2	Efecto de la biorremediación vía bioestimulación en la eliminación de aceite residual automotriz del suelo	30
4.2.1	Bacterias mineralizadoras del aceite residual automotriz	30
4.2.2	Producción de CO ₂	35
4.2.3	Grasas y aceites totales	39
Conclusiones		41
Validación de objetivos		42
Validación de hipótesis		42
Referencias		43
Anexos		52

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Generación de aceite usado por el parque vehicular y la industria en México.	2
Cuadro 2. Composición química de los aceites lubricantes y residuales automotrices.	3
Cuadro 3. Combinación de variables físicas y químicas para analizar el efecto de la biorremediación vía bioestimulación en un suelo agrícola contaminado con aceite residual automotriz.	21
Cuadro 4. Composición química de la solución mineral para la biorremediación vía bioestimulación de un suelo agrícola impactado con aceite residual automotriz.	23
Cuadro 5. Propiedades físicas y químicas iniciales del suelo agrícola en el experimento de biorremediación	25
Cuadro 6. Propiedades físicas y químicas del suelo agrícola después de la biorremediación vía bioestimulación.	26
Cuadro 7. Efecto de la biorremediación vía bioestimulación con solución mineral, lombricomposta y abono verde sobre la mineralización del aceite residual automotriz en un suelo agrícola.	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tecnologías de remediación de suelos utilizadas en México por empresas autorizadas	8
Figura 2. Diagrama del experimento para analizar el efecto de la biorremediación vía bioestimulación con una solución mineral, lombricomposta y abono verde en un suelo agrícola impactado con aceite residual automotriz.	20
Figura 3. Efecto de la biorremediación vía bioestimulación con una solución mineral, lombricomposta y abono verde sobre la densidad bacteriana mineralizadora de aceite residual automotriz en un suelo agrícola.	30
Figura 4. Desviación estándar de la densidad bacteriana mineralizadora de aceite residual automotriz en el suelo bioestimulado con solución mineral.	32
Figura 5. Desviación estándar de la densidad bacteriana mineralizadora de aceite residual automotriz en el suelo bioestimulado con lombricomposta.	32
Figura 6. Desviación estándar de la densidad bacteriana mineralizadora de aceite residual automotriz en el suelo bioestimulado con abono verde.	33
Figura 7. Desviación estándar de la densidad bacteriana mineralizadora de aceite residual automotriz en el suelo empleado como control relativo.	33
Figura 8. Desviación estándar de la densidad bacteriana mineralizadora de aceite residual automotriz en el suelo empleado como control absoluto.	33

Figura 9. Tasa de crecimiento de la población bacteriana mineralizadora de aceite residual automotriz en el suelo bioestimulado con lombricomposta.	34
Figura 10. Efecto de la biorremediación vía bioestimulación con una solución mineral, lombricomposta y abono verde sobre la producción de CO ₂ de la población microbiana mineralizadora de aceite residual automotriz en un suelo agrícola.	35
Figura 11. Desviación estándar de la producción de CO ₂ en el suelo bioestimulado con solución mineral.	37
Figura 12. Desviación estándar de la producción de CO ₂ en el suelo bioestimulado con lombricomposta.	37
Figura 13. Desviación estándar de la producción de CO ₂ en el suelo bioestimulado con abono verde.	36
Figura 14. Desviación estándar de la producción de CO ₂ en el suelo empleado como control relativo.	37
Figura 15. Desviación estándar de la producción de CO ₂ en el suelo empleado como control absoluto.	37

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Determinación de grasas y aceites totales.	52
Anexo 2. Aislamiento y cuantificación de bacterias mineralizadoras de aceite residual automotriz.	54
Anexo 3. Determinación de las propiedades físicas y químicas del suelo.	
a) pH	55
b) Textura	55
c) Materia orgánica	56
d) Capacidad de intercambio catiónico	57
Anexo 4. Determinación de la actividad microbiana nativa: producción de CO ₂ .	58

ABREVIATURAS

AL = aceite lubricante

ARA = aceite residual automotriz

AV = abono verde

BA = bioaumentación

BaP = benzo [α] pireno

BR = biorremediación

BS = bioestimulación

CA = control absoluto

CCS = capacidad de campo del suelo

CG = cromatografía de gases

CG/DFI = cromatografía de gases acoplada a un detector de flama ionizada

CG/EM = cromatografía de gases acoplada a un espectrofotómetro de masas

CIC = capacidad de intercambio catiónico

CR = control relativo

CVP = cuenta viable en placa

EDTA = ácido etilendiaminotetraacético

EPA = Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América

EUA = Estados Unidos de América

FSA = fertilizante soluble en agua

GyA = grasas y aceites totales

HC = hidrocarburos

HTP = hidrocarburos totales del petróleo

IR = espectroscopia de infrarrojo

Kps = coeficiente de solubilidad

LC = lombricomposta

LGEEPA = Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente

MA = hongo micorrízico arbuscular

MI = mineralización

MO = materia orgánica

NMP = número más probable

NMX = Norma Mexicana

NOM = Norma Oficial Mexicana

PBMARA = población bacteriana mineralizadora de aceite residual automotriz

SEMARNAT = Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales

SM = solución mineral

UFC = unidades formadoras de colonias

RESUMEN

BIORREMEDIACIÓN DE UN SUELO AGRÍCOLA IMPACTADO CON ACEITE RESIDUAL AUTOMOTRIZ

Por

Lizbeth Pasaye Anaya

Enero del 2011

Maestra en Ciencias en Ingeniería Ambiental

El aceite residual automotriz (ARA) derivado del uso de automotores es una mezcla de hidrocarburos (HC) alifáticos, aromáticos y otros que en el suelo impide la actividad microbiana para el reciclaje de elementos esenciales para la vida. El objetivo de este trabajo fue analizar la biorremediación (BR) por bioestimulación (BS) de un suelo agrícola impactado con ARA. Para ello, el suelo contaminado con la mezcla de HC se biorremedió por BS con una solución mineral (SM), lombricomposta (LC) y abono verde (AV). Como variables-respuesta de la BR del suelo con ARA se cuantificó: el aumento en la densidad de la población bacteriana mineralizadora del ARA (PBMARA), la producción de CO₂ y la disminución de HC totales.

Los resultados señalaron que la BR vía BS por enriquecimiento del suelo con SM, LC y AV indujo un aumento en la densidad de la PBMARA, apoyada por la producción de CO₂ derivada de la oxidación de la mezcla de HC, así como 62% de mineralización de los HC alifáticos del ARA en el suelo que fue bioestimulado con LC, 56% en el bioestimulado con SM y 14% en el bioestimulado con AV; lo que contrastó con los suelos sin bioestimar empleados como control relativo y absoluto en donde la remoción de HC fue nula. El análisis estadístico con la prueba de Tukey demostró que la BR vía BS con SM, LC y AV favoreció la eliminación de los HC alifáticos del ARA y la LC fue el tipo de BS más adecuado para la recuperación del suelo.

Lo anterior sugiere que la BR vía BS es una estrategia conveniente para la eliminación de derivados del petróleo en suelo agrícola.

Palabras clave: contaminación, bacterias oxidantes de hidrocarburos, mineralización.

Dirigida por: Dr. Juan Manuel Sánchez-Yáñez*

* Laboratorio de Microbiología Ambiental del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, UMSNH.

I. INTRODUCCIÓN

La contaminación del suelo con petróleo y derivados, insolubles y de composición química compleja de HC alifáticos y aromáticos, afectan en forma negativa la fertilidad del suelo al evitar los procesos aerobios de mineralización de la materia orgánica y/o el reciclaje de los elementos básicos para la vida.

En países productores de petróleo existen suelos impactados con HC, por ejemplo, en Estados Unidos de América (EUA) se registran aproximadamente 34 mil sitios, en Alemania casi 50 mil y en la República Mexicana todavía se desconoce la dimensión real del problema, aunque por su importancia se supone una cifra alta. Petróleos Mexicanos (PEMEX) durante el año 2001 dio a conocer el derrame de 8 031 t de productos de los HC como el petróleo crudo, el diesel y la gasolina (Sánchez-Yáñez, 2008). La importancia de los efectos tóxicos de los HC en este ambiente depende de su concentración y composición química, que a su vez es función del tiempo de exposición en el sitio, de la extensión del derrame, de la sensibilidad de la microbiota nativa, de las propiedades físicas y químicas del suelo, y de las variables ambientales como la temperatura, la humedad y el nivel de oxígeno (Sánchez-Yáñez *et al.*, 2008).

1.1 El aceite residual automotriz: origen e impacto en el suelo

Los aceites lubricantes (AL) son HC sólidos, semisólidos o líquidos de origen animal, mineral o sintético que se utilizan en los motores de los automóviles para disminuir el desgaste y la fricción entre las piezas metálicas del motor.

Los AL minerales se obtienen de la refinación del petróleo, los de origen animal son grasas de vacas, cerdos, caballos y fauna marítima, en especial cetáceos, focas y lobos marinos, y los sintéticos son subproductos petrolíferos de elaboración más compleja, por lo tanto son más caros que los minerales (Hernández, 2007).

El ARA es cualquiera de los AL que por el uso reduce su calidad y debe ser remplazado. La Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente (LGEEPA) y la NOM-052-ECOL-93 de la SEMARNAT clasifica el ARA como residuo

peligroso y obliga a su reciclaje y confinamiento, lo que en general no se cumple (Leal, 2003; Sánchez-Yáñez *et al.*, 2008).

En México, de los 316 millones de litros de AL usados que se generan cada año, la mayoría derivan del uso de automotores, gran parte por los cambios de aceite realizados en los talleres mecánicos, los cuales constituyen la principal fuente de generación de ARA. Esto se observa en el Cuadro 1, en donde se muestran los resultados de un estudio realizado en 1992 para estimar la generación de los AL usados en México por entidad federativa: la cantidad de ARA generada es considerablemente mayor que la de aceite residual industrial.

Cuadro 1. Generación de aceite usado por el parque vehicular y la industria en México (miles de litros).

Estado	Autos	Camionetas	Camiones	Industria	Total	%
D.F.	29,657	6,281	5,941	15,890	57,769	18.3
México	9,953	3,704	6,475	13,937	34,069	10.8
Jalisco	6,157	2,240	7,139	5,064	20,600	6.5
Nuevo León	4,686	2,101	4,639	7,896	19,322	6.1
Veracruz	3,478	1,811	5,305	6,061	16,655	5.3
Chihuahua	4,225	1,727	7,298	2,635	15,885	5.0
Baja California	5,465	1,331	3,879	1,564	12,239	3.9
Tamaulipas	3,610	1,328	5,174	2,105	12,217	3.9
Puebla	3,288	1,189	3,518	2,942	10,937	3.5
Coahuila	2,314	1,233	3,799	3,201	10,547	3.3
Subtotal	72,833	22,945	53,167	61,925	210,240	67.0
Los demás	23,863	11,335	40,020	29,513	104,731	33.0
Total	96,696	34,278	93,187	90,808	314,969	100

(Ubiratan, 2002)

De acuerdo con la SEMARNAT en 1998 se consumieron en México 747 000 m³ de aceites de proceso, industriales y automotrices, de los cuales se estima que 67% (500 490 m³) corresponden a aceites automotrices. Terminada la vida útil de éstos, 65% del aceite consumido constituye un residuo, de manera que en 1998 se generaron más de 325 000 m³ de ARA (Ubiratan, 2002).

Los ARA se vierten al suelo y al drenaje municipal, lo cual afecta la vida vegetal, animal y humana (Depuroil, 1999; Azcona, 2001; Leal, 2003; Rosas *et al.*, 2006). En el Cuadro 2 se muestran los componentes principales de los AL y los ARA.

Cuadro 2. Composición química de los aceites lubricantes y residuales automotrices.

Metales pesados	Hidrocarburos	
	Clorados	Aromáticos
Aluminio	Diclorofluorometano	Benceno
Antimonio	Triclorotrifluoroetano	Tolueno
Arsénico	1,1,1-Tricloroetano	Xilenos
Bario	Tricloroetileno	Benzo- α -antraceno
Cadmio	Tetracloroetileno	Naftaleno
Calcio	Bifenilospoliclorados	Otros hidrocarburos aromáticos policíclicos
Cromo		
Cobalto		
Cobre		
Plomo		
Magnesio		
Manganeso		
Mercurio		
Níquel		
Zinc		

(Sánchez-Yáñez *et al.*, 2008)

En el suelo agrícola el ARA causa problemas cuando se arroja directamente o se mezcla con el agua de riego, pues por su insolubilidad se mantiene en la superficie e impide el intercambio gaseoso con la atmósfera, lo que impacta de manera negativa la actividad de la microbiota aerobia e inhibe los ciclos biogeoquímicos relacionados con la mineralización de la materia orgánica en el suelo, por lo tanto impide la regeneración del humus y al infiltrarse a las aguas subterráneas causa contaminación y pérdida de este recurso natural (Depuroil, 1999; FeuVert, 2000 a 2007; Benavides *et al.*, 2006; Sánchez-Yáñez *et al.*, 2008).

1.2 Biorremediación

La contaminación de suelos con HC se remedia por métodos físicos, químicos y biológicos, estos últimos son conocidos como BR.

La BR se basa en el empleo de microorganismos para mineralizar compuestos tóxicos en aerobiosis y/o anaerobiosis (Velasco y Volke, 2003) con base en el hecho de que éstos tienen la capacidad genética para oxidarlos y transformarlos en biomasa (Yonni, 2000; Lobo, 2004; Benavides *et al.*, 2006).

La mineralización (MI) desde el punto de vista bioquímico es la transformación de un compuesto complejo en otros simples como el CO₂ y el H₂O. Una población de microorganismos que consume HC como fuente de carbono y energía puede mineralizarlos u oxidarlos para su eliminación del ambiente (Alexander, 1977; Velasco y Volke, 2003; Álvarez y Díaz, 2005).

La BR integral implica realizar pruebas de fitotoxicidad en el suelo biorremediado. Para ello, se siembran plantas susceptibles a una baja concentración de HC y se realiza un análisis cualitativo y cuantitativo de algún parámetro fisiológico relevante en la planta como el índice de germinación, la elongación radicular, el contenido de clorofila o la tasa fotosintética (Cunningham y Philp, 2000; Benavides *et al.*, 2006; INE, 2006). El hecho de que las plantas se desarrollen y desempeñen sus funciones normalmente en el suelo tratado es indicativo de que la BR fue exitosa, tal como lo señaló Leal (2003) con el crecimiento de un pasto (*Lolium multiflorum* L.) en suelo biorremediado, y

Martínez-Prado *et al.* (2010) que evaluaron el proceso de germinación y elongación radicular de lechuga (*Lactuca sativa* L.) en suelo biorremediado y encontraron que la concentración final de los HC totales del petróleo (HTP) no resultó tóxica para las plantas.

1.2.1 Tipos de biorremediación

Existen dos tipos de BR: la bioaumentación (BA) y la BS.

La BA es la inoculación de microorganismos alógenos, seleccionados de manera natural o modificados por ingeniería genética, en el ambiente impactado con tóxicos como los HC para lograr su eliminación.

La BS consiste en el enriquecimiento del ambiente con nutrientes básicos que estimulan la actividad de la microbiota nativa para inducir la MI del tóxico (Cunningham y Philp, 2000; Velasco y Volke, 2003).

La BS es una de las mejores opciones para la destrucción de HC en el suelo. Según Alexander (1977) las poblaciones microbianas autóctonas del suelo son capaces de responder en forma natural al enriquecimiento mineral cuando las condiciones ambientales son favorables y en consecuencia consumen los HC. En cambio, la microbiota alóctona no tolera los cambios adversos y muere rápido, ya sea por factores bióticos como depredación o competencia de los microorganismos nativos del suelo, o abióticos como tipo de carbono orgánico, estrés nutricional e hídrico, pH y temperatura. Martínez-Alonso y Gaju (2005) señalaron la necesidad de utilizar la BS sobre la BA debido a que gran parte de la microbiota nativa del suelo no es cultivable en medios sintéticos. Por lo tanto, la BA sólo es recomendable cuando la actividad microbiana autóctona capaz de eliminar los HC es baja o nula (Crawford y Crawford, 1996; Swannell *et al.*, 1996; Balba *et al.*, 1998; Cunningham y Philp, 2000; Margesin y Schinner, 2001).

1.2.2 Factores que influyen en la biorremediación

Existe la idea errónea de que para biorremediar un ambiente impactado con HC es suficiente enriquecer con nutrientes básicos que estimulen a la microbiota nativa y/o a los microorganismos especializados en su eliminación. Esto es falso, la BR induce la MI de los HC que no fueron eliminados por acciones físicas y químicas, y siempre es una acción posterior a la limpieza mecánica y/o química de HC, la cual reduce su concentración hasta un nivel en el que es posible la acción biológica. Los principales factores físicos y químicos que limitan la actividad microbiana para la eliminación de los HC en suelos deben considerarse antes de iniciar la BR de un sitio contaminado, en orden de importancia estos factores son:

- 1) **Concentración del HC.** Cuando es alta impide la actividad oxidante de la microbiota nativa y es indispensable una previa remoción mecánica y/o química que reduzca su concentración al nivel que la microbiota los pueda utilizar como fuente de carbono y energía (Leahy y Colwell, 1990; Sánchez-Yáñez, 2008).
- 2) **Complejidad química de los HC.** La susceptibilidad de los HC a la MI disminuye al aumentar la complejidad de su estructura química en el siguiente orden: alifáticos > aromáticos > compuestos polares > asfaltenos (Sánchez-Yáñez *et al.*, 2008). Los alcanos lineales y los ramificados de cadena intermedia de entre C₁₀-C₂₀ son los más fácilmente mineralizables por los microorganismos del suelo, los alcanos de cadena larga (>C₂₀) son más difíciles de mineralizar por su baja solubilidad y alto peso molecular, los cicloalcanos y los aromáticos que contienen de dos a tres anillos aromáticos se mineralizan pero con mayor dificultad, mientras que los aromáticos con cuatro o más anillos son recalcitrantes, al igual que las resinas y asfaltenos de alto peso molecular (Alexander, 1977; Song *et al.*, 1990; Balba *et al.*, 1998; Cunningham y Philp, 2000; Viñas, 2005).
- 3) **Solubilidad.** Para la BR de un suelo contaminado con HC se recomienda aplicar detergentes químicos y biológicos que emulsifiquen y aumenten su disponibilidad

para la microbiota, lo cual implica menor tiempo de MI de los HC (Crawford y Crawford, 1996; Bruheim *et al.*, 1999; Harayama *et al.*, 1999; Colores *et al.*, 2000).

- 4) **Concentración de nutrientes esenciales.** La microbiota nativa del suelo utiliza los HC como una fuente de carbono y energía si existe la disponibilidad de N y P, que de manera natural son insuficientes para estimular el crecimiento microbiano, en consecuencia, la MI de HC no sucede. Crawford y Crawford (1996) mencionan que aproximadamente 150 mg de N y 30 mg de P se consumen en la conversión de 1 g de HC en material celular. Para equilibrar la concentración de estos nutrientes e inducir a la microbiota a la BR de los HC se bioestimula con fertilizantes inorgánicos, fórmulas minerales y diferentes abonos y compostas (Leahy y Colwell, 1990; Leal, 2003; Olguín *et al.*, 2007).

- 5) **Disponibilidad de oxígeno.** Los microorganismos que consumen HC usan oxigenasas, por lo cual el O₂ es un factor crítico para la oxidación de HC, más aún porque la solubilidad del gas en el agua es baja (8 mg L⁻¹). Para superar esta limitante se inyecta O₂ al ambiente contaminado, se aplica H₂O₂ que es siete veces más soluble que el O₂ (1 mol de H₂O₂ $\cong$ 0.5 moles de O₂) y cuya hidrólisis libera O₂ (Leal, 2003; Sánchez-Yáñez, 2008); o se realizan operaciones de labranza que mejoran la estructura y porosidad del suelo y favorecen el intercambio de gases (Alexander, 1977).

- 6) **Temperatura.** Influye en la naturaleza física, la composición química y la velocidad de BR de los HC, así como en la diversidad de las poblaciones microbianas responsables de la MI de estos compuestos de carbono. En general, la velocidad de BR del suelo contaminado con HC decrece con la disminución de la temperatura y viceversa, cuando es baja la viscosidad de los HC aumenta, la volatilización de los alcanos de cadena corta se reduce y su solubilidad en agua se incrementa; mientras que la variación estacional selecciona a la microbiota que utiliza los HC como fuente de carbono y energía (Alexander, 1977; Leahy y

Colwell, 1990; Eriksson *et al.*, 2001). La BR se favorece con temperatura entre 20 °C y 30 °C (Leahy y Colwell, 1990; Viñas, 2005).

1.2.3 Situación actual y ventajas de la biorremediación

Actualmente la BR se emplea a nivel mundial y es considerada una de las mejores opciones para el tratamiento de suelo contaminado con HC (Cunningham y Philp, 2000; Leal, 2003; Ferrera-Cerrato *et al.*, 2006). En México existen empresas nacionales e internacionales que ofrecen diferentes tecnologías para la remediación de sitios impactados con HC. En la Figura 1 se muestra que la BR es una de las tecnologías de mayor aplicación.

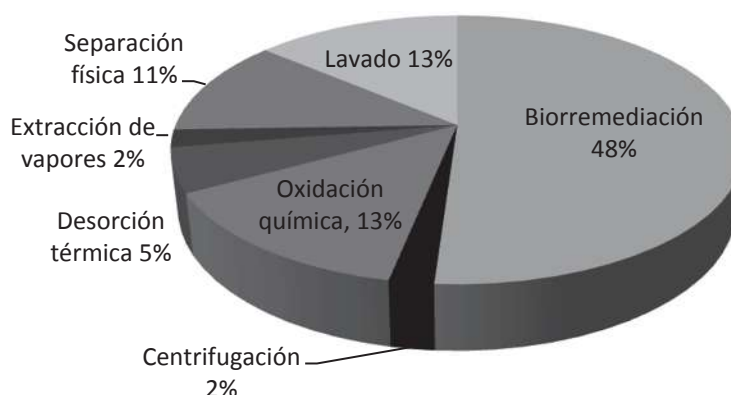


Figura 1. Tecnologías de remediación de suelos utilizadas en México por empresas autorizadas.

Los métodos físicos y químicos convencionales modifican las propiedades físicas y químicas del suelo y alteran o eliminan totalmente su microbiota autóctona con potencial de oxidación de HC, además no destruyen los contaminantes sino que los trasladan a otros ambientes.

Las ventajas de la BR en comparación con estas técnicas son: múltiples costos de operación, simplicidad, fácil aplicación, riesgos mínimos para la salud humana,

animal o vegetal y no requiere ningún tratamiento posterior (Balba *et al.*, 1998; Velasco y Volke, 2003; Viñas, 2005; Ferrera-Cerrato *et al.*, 2006).

II. ANTECEDENTES

Durante la limpieza del vertido del Exxon Valdez en 1989 se empleó la BR vía BS con fertilizantes orgánicos e inorgánicos. Se biorremediaron tres lugares afectados por el derrame: Snug Harbor, Passage Cove y tres sitios de la Isla Knight.

En Snug Harbor se establecieron seis transectos, dos se bioestimularon con el surfactante/fertilizante orgánico Inipol EAP 22, dos con el fertilizante inorgánico briquetas Woodace y dos se usaron como controles sin bioestimar. El suelo bioestimulado con Inipol EAP 22 mostró cambios en su superficie entre los 8 y 14 días, pero con una cantidad considerable de petróleo en el subsuelo, mientras que en los otros suelos no se observaron cambios. Los resultados en esta etapa variaron, pero la BS con Inipol EAP 22 favoreció la MI de los HC del petróleo.

En Passage Cove se establecieron cuatro transectos, los dos primeros se bioestimularon con Inipol EAP 22 y el fertilizante inorgánico Customblen, el tercero se bioestimuló con un fertilizante soluble en agua (FSA) y el cuarto se dejó sin bioestimar como control. Se detectó remoción de HC entre los 10 y 14 días y parches con HC luego de un mes en los suelos bioestimulados en contraste con los no bioestimulados, en donde no se registraron cambios. Para este sitio se señaló que la BS de los suelos con la mezcla Inipol EAP 22/Customblen indujo la MI de los HC del crudo por un factor de dos a tres y de cuatro a cinco para los suelos bioestimulados con el FSA.

De los tres sitios de la Isla Knight dos se bioestimularon con diferentes proporciones de Inipol EAP 22/Customblen y el otro sólo se bioestimuló con Customblen. La desaparición del crudo se evaluó mediante cromatografía de gases acoplada a un espectrofotómetro de masas (CG/EM), el consumo de O₂ y la estimación de la densidad microbiana mineralizadora de los HC por la técnica del número más probable (NMP). Los resultados mostraron que la BS de los suelos con Inipol EAP 22/Customblen permitió que la microbiota nativa mineralizara los HC del petróleo en comparación con los suelos sin bioestimar empleados como control, en donde no hubo cambios en la concentración de los HC.

El análisis estadístico de los resultados avaló que la BR vía BS incrementó la MI del petróleo en el suelo de dos a cuatro veces más en comparación con las áreas sin bioestimular usadas como control (ExploreNorth, 1999; Swannell *et al.*, 1996).

Song y Bartha (1990) evaluaron la BS con fertilizantes inorgánicos en un suelo impactado con combustible para avión. En el diseño experimental emplearon vasos de precipitado y columnas empacadas con suelo contaminado y bioestimulado con fertilizantes inorgánicos. Las variables-respuesta del experimento fueron: la densidad de la población heterotrófica aerobia por cuenta viable en placa (CVP), las poblaciones mineralizadoras del HC por NMP con caldo Bushnell-Hass con combustible para avión, la actividad microbiana que se determinó por hidrólisis del diacetato de fluoresceína y la concentración del HC en el suelo por extracción Soxhlet y cromatografía de gases (CG).

Los resultados se analizaron estadísticamente y mostraron que la BR vía BS incrementó la actividad y densidad de la población microbiana del suelo para la MI de los HC de tres a cuatro órdenes de magnitud en comparación con el suelo sin bioestimular usado como control.

Song *et al.* (1990) valoraron la BR vía BS con fertilizantes inorgánicos en suelos contaminados con gasolina, combustible para avión, petróleo para calefacción, diésel y bunker C (combustible para motores de gran tamaño y baja velocidad como buques). El diseño del experimento consistió en columnas de vidrio empacadas con suelo contaminado con las diferentes mezclas de HC que se bioestimuló con fertilizantes nitrogenados y fosforados. La disminución del combustible para avión, el petróleo para calefacción y el diésel en el suelo se midió por extracción Soxhlet y CG; la del bunker C por extracción Soxhlet y determinación del peso residual de los HC y la de la gasolina por extracción con freón 11 frío y CG.

Los resultados indicaron que los suelos contaminados con combustible para avión, petróleo para calefacción y diésel respondieron satisfactoriamente a la BR vía BS al disminuir su concentración inicial, en la gasolina hubo remoción de HC alifáticos de entre C₁₀-C₁₁ y el bunker C fue recalcitrante. El estadístico de los resultados se mostró a favor de la BR vía BS que superó a lo observado en los suelos sin bioestimular.

Kanally *et al.* (1997) investigaron el efecto de la BS con una solución mineral (SM) en el cometabolismo de la microbiota nativa de un suelo impactado con benzo [a] pireno (BaP). Para el diseño experimental se emplearon cinco lotes de suelo contaminado con [^{14}C]BaP + BaP + petróleo crudo que fueron bioestimulados con la SM y otro lote con [^{14}C]BaP usado como control sin bioestimar. La BR del suelo con BaP se valoró a partir de la producción de CO_2 derivada de la MI del HC y la concentración del HC determinada por CG/EM y centelleo líquido.

El análisis estadístico de los resultados demostró que la BS del suelo con la SM facilitó el cometabolismo de la microbiota nativa e indujo la MI de 95% del BaP.

Cunningham y Philp (2000) analizaron la BR vía BS con fertilizantes inorgánicos y estiércol de caballo en suelos contaminados con diésel. Para ello, construyeron dos biopilas estáticas y dos en movimiento, una biopila de cada tipo se bioestimuló con un fertilizante que contenía 7% de N, P y K, y las demás se bioestimularon con estiércol de caballo. Se realizaron cuentas viables de la población microbiana mineralizadora del HC por NMP y análisis gravimétricos para determinar el contenido de grasas y aceites totales.

De acuerdo con los resultados del análisis estadístico no hubo diferencias significativas entre el tipo de biopila ni la forma de BS utilizada, pero se reportó que la BS favoreció la MI del HC, pues en los suelos bioestimulados se mineralizó 95.1% del diésel, en contraste con los suelos sin bioestimar usados como controles, en donde la MI fue 8.4%.

Margesin y Schinner (2001) evaluaron la BR vía BS con nutrientes esenciales en un suelo contaminado con diésel. En el diseño experimental emplearon seis lisímetros con suelo contaminado, tres se bioestimularon con un FSA que contenía 15% de N inorgánico, 15% de P_2O_5 y 15% de K_2O , los lisímetros restantes no se bioestimularon y se usaron como controles. Para monitorear la BR del suelo contaminado con diésel se midieron los HTP por espectroscopia de infrarrojo (IR), la liberación de CO_2 y se realizaron conteos de los microorganismos mineralizadores del diésel por CVP con el HC como única fuente de carbono.

Los resultados analizados estadísticamente mostraron que la eliminación del diésel por la BS del suelo con minerales esenciales fue de 70% y sin bioestimular 50%.

Röling *et al.* (2002) analizaron la BS con nutrientes inorgánicos en sedimentos de playa contaminados con petróleo. Utilizaron microcosmos con los sedimentos en contacto con agua marina sintética mezclada con petróleo dos veces por día y se bioestimularon con una SM en diferentes concentraciones de N. Para medir los cambios en la composición química del petróleo se usó CG/EM, cromatografía de gases acoplada a un detector de flama ionizada (CG/DFI) y la liberación de CO₂ por IR.

El análisis estadístico de resultados demostró que la BR vía BS redujo la concentración de los alcanos de entre C₁₁-C₃₅ en 98% y la de los HC aromáticos en 92% durante 28 días, contrario a lo sucedido con los sedimentos empleados como control sin biorremediar vía BS, en donde la MI de HC fue nula.

Leal (2003) investigó la BR de un suelo agrícola impactado con ARA por BS con un detergente, las SM1, SM2 y SM3 y H₂O₂. En microcosmos tipo Bartha el suelo contaminado con ARA se bioestimuló con la SM1 o la SM2, cuya composición química fue K₂HPO₄, KH₂PO₄, MgSO₄, NH₄NO₃, CaCO₃, KCl, ZnSO₄, CuSO₄ y FeSO₄ en diferente concentración; mientras que en un microcosmo de vidrio rectangular el suelo con ARA se bioestimuló con la adición del detergente, el H₂O₂ y la SM3, constituida por NaHPO₄, KH₂PO₄, MgSO₄·7H₂O, NH₄Cl, NH₄MoO₄ y FeCl₃·6H₂O. Se empleó un suelo como control estéril en los matraces Bartha y dos como controles relativo y absoluto en los microcosmos rectangulares. Las variables-respuesta de la remoción de HC en el suelo fueron la producción de CO₂ por la BR de los HC que se midió cada 48 h mediante técnicas respirométricas, y el contenido de grasas y aceites totales en el suelo por extracción Soxhlet.

Se reportó que de acuerdo con los resultados del análisis estadístico, la combinación de la SM3, una fuente de oxígeno y un detergente causó la mayor estimulación de la microbiota del suelo que mineralizó 85.6% del ARA, mientras que en el suelo sin bioestimular no hubo MI de la mezcla de HC.

Chénier *et al.* (2003) reportaron la BR de biopelículas de agua contaminada con hexadecano por BS con nutrientes esenciales en función de la variación estacional. Para el experimento se tomaron muestras de agua de un río durante las cuatro estaciones del año. De cada estación se cultivaron tres biopelículas cuya agua se bioestimuló con una SM que contenía NH_4Cl , KH_2PO_4 , N y P; el agua de otras tres biopelículas no se bioestimuló y se usaron como controles. Posteriormente, las biopelículas se colocaron en microcosmos y se bioestimularon con agua del río mezclada con la SM anteriormente utilizada. La variable respuesta fue la producción de $^{14}\text{CO}_2$ derivada de la oxidación del $[^{14}\text{C}]$ hexadecano que se midió por respirometría combinada con espectrometría de centelleo líquido.

Los resultados señalaron que con base en el análisis estadístico, las biopelículas del agua bioestimulada en otoño mostraron un incremento en su densidad y una mayor MI del hexadecano que aquellas en donde el agua no se bioestimuló.

Viñas (2005) valoró el efecto de la BS con nutrientes inorgánicos (tratamiento N), aireación y agua (tratamiento B), nutrientes inorgánicos + tensioactivo (tratamiento NS) y nutrientes inorgánicos + glucosa (tratamiento NG) en un suelo impactado con HTP. El diseño experimental se basó en el uso de microcosmos aireados mecánicamente y bioestimulados como se mencionó anteriormente durante 360 días; como controles se usaron dos microcosmos con suelo contaminado sin bioestimar. La concentración de los HTP en el suelo se determinó por extracción Soxhlet seguida de un análisis gravimétrico y CG/DFI.

El autor encontró que la BS del suelo con NS y NG favoreció la MI de los HTP en 59% y 79%, respectivamente, mientras que en el suelo bioestimulado con B y N la MI de los HTP fue 54%, lo cual se confirmó con el análisis estadístico de los resultados.

Hamamura *et al.* (2006) estimaron la BR vía BS con una SM en siete tipos de suelo de EUA contaminados con petróleo crudo y hexadecano. El experimento se realizó en botellas de suero en donde se agregó el suelo contaminado con petróleo crudo y $[^{14}\text{C}]$ hexadecano, posteriormente los suelos fueron bioestimulados con la SM que contenía $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 , KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , KOH , H_2SO_4 , MgCl_2 , CaCl_2 y

FeCl₂; como controles se usaron suelos contaminados estériles. Se pasó por las botellas aire humidificado libre de CO₂ para mantener el sistema aerobio y atrapar el ¹⁴CO₂. La desaparición de los HC del suelo se determinó por CG/EM y la MI del [¹⁴C]hexadecano mediante la cuantificación del ¹⁴CO₂ atrapado en la corriente de aire más el ¹⁴C residual del suelo generado por combustión total.

Los resultados se sometieron a un análisis estadístico que demostró que la BS de la microbiota de cada suelo indujo más de 80% de la MI del petróleo y la eliminación del hexadecano varió de 40% a 70% en función del tipo de suelo después de 50 días.

García-Hernández *et al.* (2007) evaluaron la respuesta de la microbiota nativa del agua doméstica a la BS con una SM para eliminar el ARA. En microcosmos Bartha agregaron agua doméstica impactada con ARA que se bioestimuló con una SM que contenía K₂HPO₄, KH₂PO₄, MgSO₄, NH₄NO₃, CaCO₃, KCl, ZnSO₄, CuSO₄, FeSO₄, EDTA y detergente. Como control relativo se utilizó un microcosmo con agua + ARA, como absoluto uno con agua destilada + SM y uno con agua + ARA + SM como estéril. Las variables-respuesta fueron la liberación de CO₂ y la desaparición de los HC del ARA en el agua doméstica por CG/EM.

Los resultados validados por la estadística reportaron la BR del agua al eliminar los HC alifáticos del ARA de entre C₁₁-C₂₀ hasta 96% en 21 días en comparación con el agua sin bioestimular.

Rojas-Avelizapa *et al.* (2007) reportaron la BR vía BS con una composta de residuos agroindustriales en un suelo contaminado con lodos de perforación base diésel. Para el diseño experimental construyeron cuatro biopilas, tres se bioestimularon con la composta de residuos agroindustriales y una se dejó sin bioestimular como control. La variable-respuesta usada fue la desaparición del diésel del suelo para lo cual se usó CG.

El análisis estadístico de los resultados mostró que en los suelos bioestimulados hubo 94% de remoción de HTP en 180 días, en contraste con los suelos sin bioestimular utilizados como control, en donde no se eliminaron los HC.

Romaniuk *et al.* (2007) estimaron la BR por BS con un producto comercial de formulación reservada en suelo contaminado con diésel o aceite de cárter. El diseño experimental constó de seis tratamientos: suelo sin contaminar (T), suelo + diésel (G), suelo + aceite de cárter (A), suelo + diésel + producto (G+X), suelo + aceite de cárter + producto (A+X) y suelo + producto (T+X). Como variables-respuesta se determinaron los HTP por el método EPA 418.1 y la generación de CO₂.

Los resultados avalados por la estadística indicaron que la MI de los HC del diésel y el aceite de cárter en el suelo bioestimulado con el producto comercial (G+X y A+X) fue de 96% a los 180 días, en tanto que en los suelos sin bioestimar (G, A, T y T+X) la MI fue más lenta y menos efectiva.

Acuña *et al.* (2008) analizaron la BS con fertilizantes inorgánicos en un suelo impactado con HTP. Para ello, usaron tres microcosmos con suelo contaminado, el primero se bioestimuló con un fertilizante compuesto de N, P y K (K_2HPO_3 + $(NH_4)_2SO_4$), el segundo con P y K (K_2HPO_3) y el tercero no se bioestimuló como control. Para evaluar el efecto de la BS se midió la generación de CO₂ y la concentración inicial y final de los HTP por extracción Soxhlet y cromatografía en columna de silica gel.

Los resultados analizados estadísticamente señalaron que la BR vía BS del suelo con N, P y K indujo la MI de 54% de los HTP, de 33% en el suelo bioestimulado con P y K y de 9% en el suelo no bioestimulado.

Martínez-Prado *et al.* (2010) demostraron a nivel piloto el efecto positivo de la BR vía BS con agua, fertilizante inorgánico y lodos compostados en un suelo contaminado con diésel, aceite y grasas. Se utilizaron tres unidades experimentales, en la primera sólo se agregó agua, la segunda se bioestimuló con agua + lodos compostados + $(NH_4)_2SO_4$ como fertilizante y en la tercera se agregó agua + vermiculita como agente corrector de la densidad. La MI de los HTP en el suelo se cuantificó por CG/DFI.

Los resultados del análisis estadístico indicó la eliminación de 67% de los HTP en donde sólo se adicionó agua, de 66% en donde se agregó agua + vermiculita y de 58% en donde se bioestimuló con fertilizante + agua + lodos compostados, en comparación con los controles que no presentaron cambios a los 75 días. Los autores

atribuyeron la diferencia en el porcentaje de remoción de HTP a que los microorganismos nativos del suelo contaminado están adaptados a la presencia de HC y por lo tanto, tuvieron una capacidad mayor para oxidarlos que los presentes en los lodos compostados.

HIPÓTESIS

Naturalmente existen microorganismos en el suelo con potencial para oxidar hidrocarburos alifáticos del aceite residual automotriz, siempre y cuando se les bioestime con nutrientes esenciales para lograr la eliminación de esta mezcla de hidrocarburos.

OBJETIVO GENERAL

Analizar la biorremediación vía bioestimulación de un suelo agrícola impactado con aceite residual automotriz.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Cuantificar la población bacteriana mineralizadora de aceite residual automotriz.
2. Medir la actividad microbiana nativa mineralizadora de aceite residual automotriz.
3. Determinar la concentración de aceite residual automotriz consumido por la microbiota nativa del suelo.

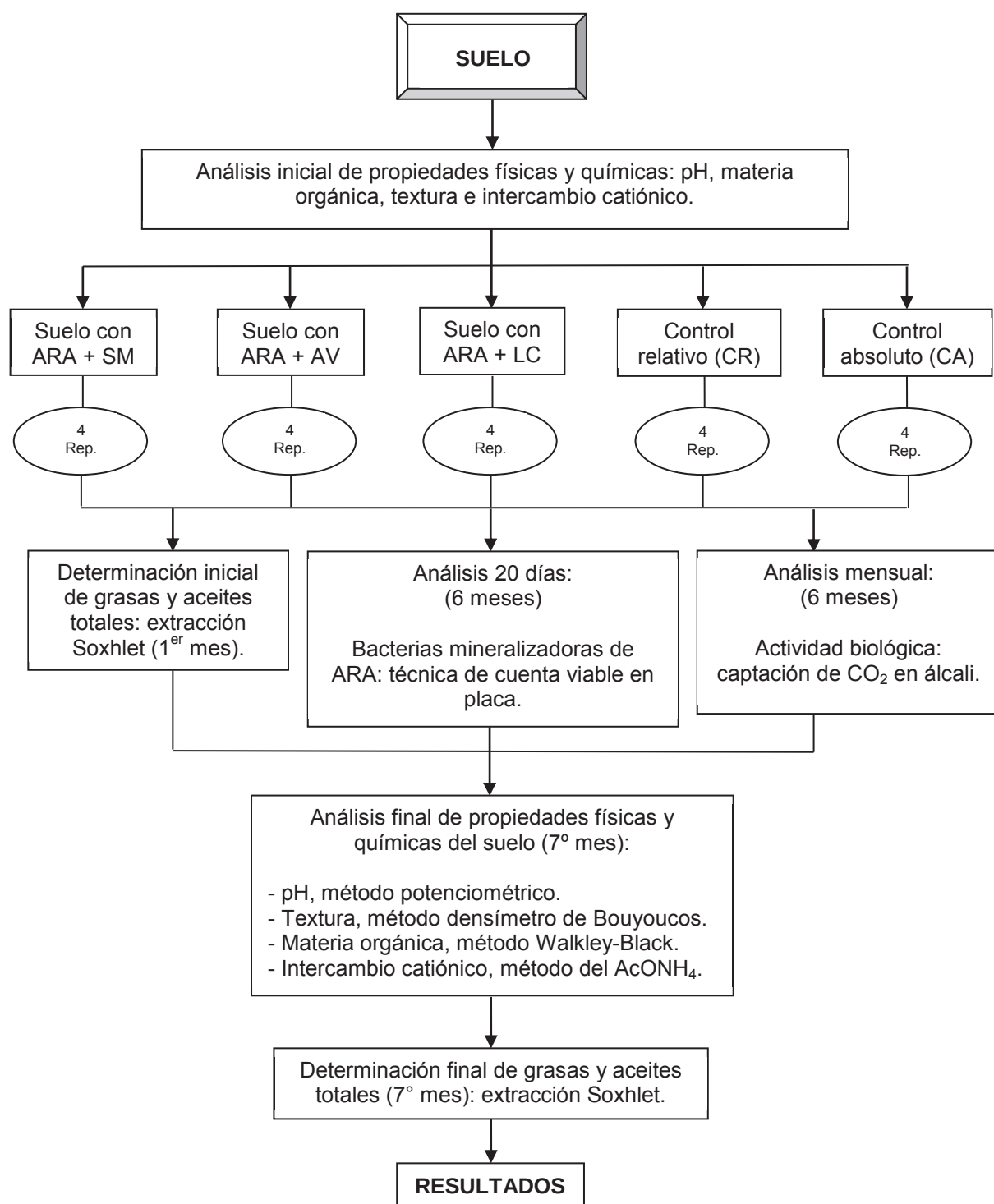
III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización del área de estudio

El área de estudio se localiza en un terreno de uso agrícola (cultivo de maíz), ubicado detrás de una gasolinera en Zapata, municipio de Morelia, Mich., México, en el Km 5 de la carretera Morelia-Pátzcuaro, entre las coordenadas geográficas 19°39'10" latitud norte y 101°13'30" longitud oeste.

3.2 Muestreo del suelo

El suelo para realizar el presente estudio se tomó de un terreno de uso agrícola al que se dividió en transectos de 2 m x 4 m en una superficie de media ha. De cada transecto se tomaron de 10 a 20 muestras al azar entre los 20 cm y 30 cm de profundidad, las cuales se mezclaron para obtener la submuestra. La colecta de las muestras se realizó con barrenas de tipo tubo o taladro (Sánchez-Yáñez et al., 2007), se desecaron al aire y se pasaron a través de una criba de 2 mm de luz (Soriano y Pons, 2004) para su posterior análisis físico y químico y para el montaje de los experimentos, como se muestra en la Figura 2.



ARA = aceite residual automotriz, SM = solución mineral, LC = lombricomposta, AV = abono verde, CR = control relativo, CA = control absoluto, Rep = repetición

Figura 2. Diagrama del experimento para analizar el efecto de la biorremediación vía bioestimulación con una solución mineral, lombricomposta y abono verde en un suelo agrícola impactado con aceite residual automotriz.

3.3 Propiedades físicas y químicas del suelo

Se realizó un análisis previo al experimento y al final de éste sobre las propiedades físicas y químicas del suelo empleado durante la fase experimental: pH, materia orgánica, textura e intercambio catiónico. El objetivo de estos análisis fue conocer la variación de tales propiedades después de la BS del suelo con la SM, la LC y el AV.

3.4 Diseño experimental

Se usaron muestras de 2.5 kg de suelo con cuatro repeticiones que se biorremediaron vía BS como se muestra en el Cuadro 3, y posteriormente se colocaron en macetas de 3 kg de capacidad. Los suelos se mantuvieron en estas condiciones durante seis meses.

Cuadro 3. Combinación de variables físicas y químicas para analizar el efecto de la biorremediación vía bioestimulación en un suelo agrícola contaminado con aceite residual automotriz.

Variables	Tratamientos				
	1	2	3	CR	CA
SM	+	-	-	-	-
LC	-	+	-	-	-
AV	-	-	+	-	-
ARA	+	+	+	+	-
Agua*	+	+	+	+	+

(+) = se agregó, (-) = no se agregó, SM = solución mineral, LC = lombricomposta, AV = abono verde, ARA = aceite residual automotriz (3%), CR = control relativo, CA = control absoluto, * Para mantener el nivel de humedad hasta la capacidad de campo del suelo (húmedo, sin llegar a la saturación)¹.

¹ El agua utilizada para conservar el nivel de humedad del suelo se tomó del laboratorio de Microbiología Ambiental de Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas (IIBQ) de la UMSNH (pH=7.5).

3.5 Variables-respuesta consideradas en la BR vía BS de un suelo impactado con ARA

El avance en la remoción de los HC se valoró mediante la evaluación de las siguientes variables-respuesta:

- a) Concentración inicial y final de grasas y aceites totales (GyA).
- b) Actividad microbiana nativa mineralizadora de ARA: producción de CO₂, mensual.
- c) Cuantificación de PBMARA cada 20 días.

3.5.1 Determinación inicial y final de GyA. Se utilizó el método de extracción de Soxhlet (NMX-AA-005-SCFI-2000) descrito en el Anexo 1.

3.5.2 Aislamiento y cuantificación de PBMARA. Para esta variable se empleó una modificación del método estándar de CVP (Suárez y Ramírez, 2000; Leal, 2003) (Anexo 2).

3.5.3 Determinación de las propiedades físicas y químicas del suelo

3.5.3.1 pH, método potenciométrico (NMX-AA-025-1984) (Anexo 3a).

3.5.3.2 Textura, método del densímetro de Bouyoucos (Soriano y Pons, 2004) (Anexo 3b).

3.5.3.3 Materia orgánica, método de Walkey y Black (Soriano y Pons, 2004) (Anexo 3c).

3.5.3.4 Capacidad de intercambio catiónico, método del acetato de amonio (Soriano y Pons, 2004) (Anexo 3d).

3.5.4 Determinación de la actividad biológica microbiana nativa: producción de CO_2 , mediante la técnica de captación de CO_2 en álcali (Balba *et al.*, 1998; Leal, 2003; Sánchez-Yáñez, 2007) (Anexo 4).

3.6 Tratamientos empleados en el experimento de biorremediación de un suelo agrícola impactado con aceite residual automotriz

SM para la BR vía BS

La composición química de este tratamiento se muestra en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Composición química de la solución mineral para la biorremediación vía bioestimulación de un suelo agrícola impactado con aceite residual automotriz.

Reactivo	Concentración g L^{-1}	Reactivo	Concentración g L^{-1}
K_2HPO_4	10.0	KCl	2.0
KH_2PO_4	8.0	ZnSO_4	0.5
MgSO_4	6.0	CuSO_4	0.5
$\text{NH}_4(\text{NO}_3)_2$	15.0	FeSO_4	0.2
CaCO_3	1.0		

(Leal, 2003)

AV para la BR vía BS

Como AV se utilizó el frijol común *Phaseolus vulgaris* L. Para la obtención de éste se inocularon las semillas con la bacteria del género *Rhizobium* y propágulos del hongo micorrízico arbuscular (MA) del género *Glomus*, el primero ayuda a la fijación de nitrógeno en la planta y el segundo aumenta la absorción de fosfatos, ambos básicos para el sano crecimiento del frijol. Éste se sembró en el suelo irrigado con agua hasta su capacidad de campo (CCS) y cuando alcanzó una altura entre 10 cm y 15 cm se barbechó e incorporó al suelo para su conversión en AV, el cual es una fuente de nutrientes para la actividad microbiana que involucra reproducción y que en la BR vía BS implica la eliminación de HC. El nivel de humedad se mantuvo a CCS y se removió cada tres o cuatro días durante un mes (Infoagro, 2002; SAGARPA, 2008; Olvera y Sánchez, 2008).

LC para la BR vía BS

La LC fue el producto de la digestión de la lombriz *Eisenia foetida* L. que transformó los compuestos complejos de la materia orgánica en moléculas orgánicas e inorgánicas sencillas necesarias para el crecimiento microbiano (Rodríguez, 2005; Rojas, 2009). Feliú-Mójer (2006) señaló que la lombricomposta contiene cinco veces más N, siete veces más P, cinco veces más K y dos veces más Ca que el material orgánico que ingirieron.

3.7 Análisis estadístico

Los resultados se analizaron estadísticamente mediante la prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0.05.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Propiedades físicas y químicas del suelo

Los resultados sobre las propiedades físicas y químicas del suelo al inicio y después de la BR se presentan en los Cuadros 5 y 6.

Cuadro 5. Propiedades físicas y químicas iniciales del suelo agrícola en el experimento de biorremediación.

Parámetro	Valor	Interpretación
pH ^{1 *}	7.2 ± 0.06	Ligeramente alcalino
Intercambio catiónico ^{2 **}	23.4 ± 0.00 meq 100 g ⁻¹	Media
Textura ^{3 ***}		
Arena	68 ± 0.00%	Franco arenoso
Limo	22 ± 0.00%	
Arcilla	10 ± 0.00%	
Materia orgánica ^{4 ****}	4 ± 0.08%	Rico

N = número de repeticiones, * N = 3, ** N = 2, *** N = 2, **** N = 3

^{1, 3, 4} Sánchez-Yáñez (2007)

² Pavón (2003)

Cuadro 6. Propiedades físicas y químicas del suelo agrícola después de la biorremediación vía bioestimulación.

Parámetro	Valor	Interpretación
pH ^{1 *}		
CA	7.2 ± 0.03	Ligeramente alcalino
CR	7.5 ± 0.06	
SM	7.5 ± 0.06	
LC	7.7 ± 0.06	
AV	7.5 ± 0.06	
Intercambio catiónico ^{2 **}	(meq 100 g ⁻¹)	
CA	23.4 ± 0.00	Media
CR	32.8 ± 0.00	Alta
SM	28.0 ± 0.00	
LC	27.4 ± 0.00	
AV	29.4 ± 0.00	
Textura ^{3 ***}		
CA		Franco arenoso
Arena	53 ± 0.71%	
Limo	19 ± 0.71%	
Arcilla	29 ± 0.00%	
CR		
Arena	31 ± 0.51%	
Limo	21 ± 0.20%	
Arcilla	48 ± 0.71%	

Parámetro	Valor	Interpretación
Textura ^{3 ***}		
SM		
Arena	31 ± 0.51%	
Limo	21 ± 0.20%	
Arcilla	48 ± 0.71%	
LC		
Arena	50 ± 0.00%	Franco arenoso
Limo	22 ± 0.00%	
Arcilla	28 ± 0.00%	
AV		
Arena	50 ± 0.00%	
Limo	22 ± 0.00%	
Arcilla	28 ± 0.00%	
Materia orgánica ^{4 ****}		
CA	4 ± 0.08%	Rico
CR	6.2 ± 0.00%	
SM	6.2 ± 0.2%	Extremadamente rico
LC	8.2 ± 0.4%	
AV	8.2 ± 0.4%	

CA = control absoluto (suelo + agua), CR = control relativo (suelo + ARA + agua), SM = suelo bioestimulado con solución mineral, LC = suelo bioestimulado con lombricomposta, AV = suelo bioestimulado con abono verde, ARA = aceite residual automotriz.

N = número de repeticiones, * N = 3, ** N = 2, *** N = 2, **** N = 3

^{1, 3, 4} Sánchez-Yáñez (2007)

² Pavón (2003)

El análisis estadístico de las propiedades físicas y químicas del suelo antes y después de la BR vía BS indica que no hubo diferencia estadísticamente significativa, lo cual se debe a que seis meses es un tiempo relativamente corto para detectar cambios sustanciales. Como se muestra en el Cuadro 6, la reacción del suelo fue ligeramente alcalina y la textura franco arenosa, las propiedades que muestran un cambio aunque leve fueron el contenido de materia orgánica (MO) y la capacidad de intercambio catiónico (CIC).

Al inicio del experimento (Cuadro 5) el suelo era rico en MO y después de la BS (Cuadro 6) sólo el CA no cambió, mientras que el CR y los bioestimulados con SM, LC y AV aumentaron la concentración de MO, por lo que se clasificaron como extremadamente ricos. Este aumento sugiere que el método de Walkey-Black para la determinación de esta propiedad (Anexo 3c) se basa en la destrucción del carbono en el suelo con H_2SO_4 . El suelo usado como CR y el bioestimulado con SM estaban contaminados con ARA que constituyó una fuente de carbono adicional al que naturalmente existe, razón por la cual la concentración de MO incrementó con respecto al CA, mientras que en los suelos bioestimulados con LC y AV contaminados con ARA, estos abonos constituyeron otra fuente de MO, lo que aumentó aún más el nivel en relación con el CA (Alexander, 1977).

Se observó un aumento estadístico significativo en la CIC de los suelos posterior a la BS, excepto en el CA (Cuadro 6), por lo que la clasificación de la CIC cambió de media a alta. Esta propiedad está relacionada en forma directa con la MO en el suelo, es decir, al aumentar el contenido de MO la CIC fue mayor, además de que en la mayoría de los suelos aumenta cuando el pH se incrementa (INE, 2006).

En los casos del suelo bioestimulado con LC y con AV, la adición de composta proporcionó gran cantidad de cationes intercambiables (Rodríguez, 2005), lo cual se intensificó por efecto de la humidificación del suelo que provocó la hidrólisis lenta de la MO existente (Ambriz, 2007) y por la fluctuación de pH en respuesta a la adición de MO que modificó el coeficiente de solubilidad (Kps) de los iones (Acuña *et al.*, 2006). La

adición de MO de origen animal vuelve el suelo más alcalino debido a la descomposición de residuos animales que genera productos ricos en nitrógeno como la urea, mientras que la MI de la MO vegetal disminuye el pH por la formación de ácidos orgánicos, los cuales solubilizan compuestos precipitados en el suelo o metales del ARA (Alexander, 1977). El aumento de la CIC del suelo bioestimulado con la SM y el utilizado como CR fue resultado de su humidificación, que al hidrolizar la MO libera cationes intercambiables (Ambriz, 2007).

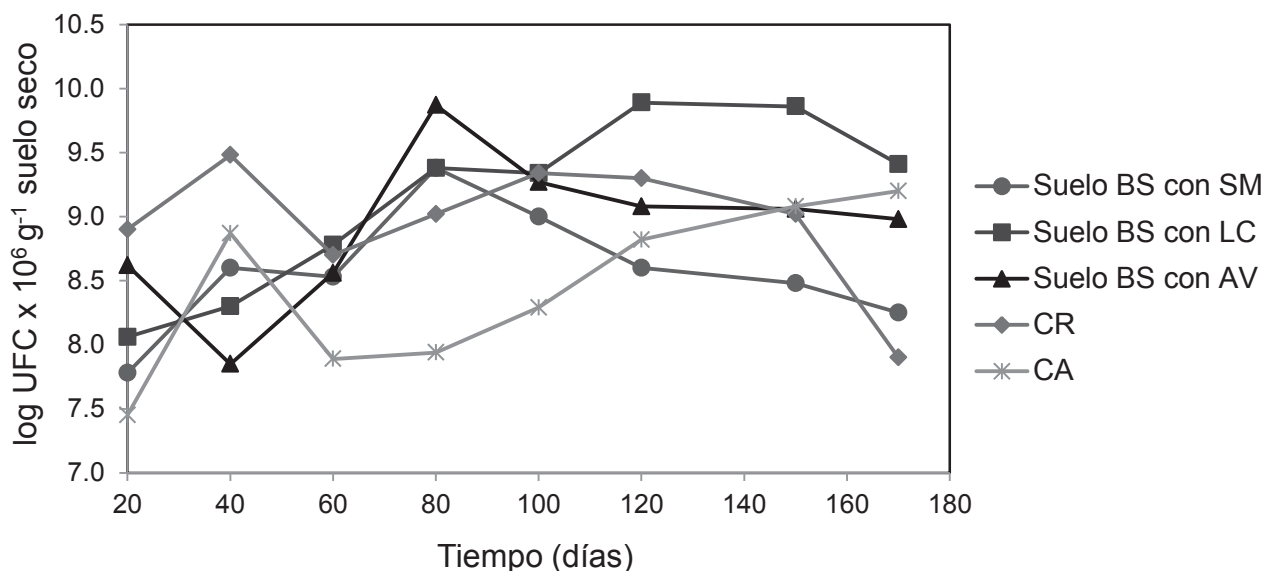
La textura del suelo no cambió, pero se observó un aumento en la proporción de arcillas y una disminución en la de arenas. De acuerdo con Porta *et al.* (2003), Ambriz (2007) y Ambriz *et al.* (2010) la MO induce la formación de agregados conocidos como pseudoarenas, la adición de agua al suelo produjo una hidrólisis lenta de la MO existente y ocasionó que los agregados se rompieran, por lo que la proporción de arcillas se incrementó (Ambriz, 2007). Acorde con esto, la proporción de arenas fue mayor y la de arcillas menor en el suelo bioestimulado con LC y con AV por la adición de MO, en comparación con el suelo bioestimulado con SM y el empleado como CR. Además, este tipo de BS propició un aumento en la densidad bacteriana del suelo cuyas excreciones y material celular ayudaron a la formación de agregados (Alexander, 1977; Tate, 2000; Ambriz, 2007).

4.2 Efecto de la BR vía BS en la eliminación de ARA del suelo

Se observó un efecto positivo de la BR vía BS sobre la microbiota del suelo contaminado con ARA y bioestimulado con la SM, la LC y el AV, reflejado tanto en la densidad de la PBMARA como en la generación de CO₂ producto de la oxidación de los HC alifáticos del ARA, en comparación con el suelo sin bioestimar empleado como CR y CA.

4.2.1 Bacterias mineralizadoras de aceite residual automotriz

La cuantificación de las PBMARA mediante la CVP determinó indirectamente el potencial biológico de BR en el suelo impactado con ARA (INE, 2006; Camacho *et al.*, 2009). La comparación de los datos obtenidos en este análisis se muestra en la Figura 3.



BS = bioestimulación, SM = solución mineral, LC = lombricomposta, AV = abono verde, CR = control relativo (suelo + ARA + agua), CA = control absoluto (suelo + agua), UFC = unidades formadoras de colonias, ARA = aceite residual automotriz.

Figura 3. Efecto de la biorremediación vía bioestimulación con una solución mineral, lombricomposta y abono verde sobre la densidad bacteriana mineralizadora de aceite residual automotriz en un suelo agrícola.

La PBMARA respondió positivamente a la BS del suelo con la SM y el AV en los primeros dos meses, lo cual se reflejó en el incremento de su densidad (Figura 3), la PBMARA en el suelo bioestimulado con la SM alcanzó un valor de 24×10^8 UFC g⁻¹ suelo seco, en el bioestimulado con AV fue de 74×10^8 UFC g⁻¹ suelo seco y en el bioestimulado con LC aumentó hasta 78×10^8 UFC g⁻¹ suelo seco en los primeros cuatro meses, esto sugiere que la mayor disponibilidad de nutrientes esenciales influyeron en la capacidad de esa población para oxidar los HC del ARA. Macnaughton *et al.* (1999) señalan que en un derrame experimental de petróleo en una costa de Delaware, EUA se observó un incremento en la densidad bacteriana al bioestimar con una SM y García-Hernández *et al.* (2007) también reportan que en agua doméstica impactada con ARA y bioestimulada con una SM, la MI de los HC alifáticos del ARA fue superior al 95%. En los suelos bioestimulados con SM, LC y AV se detectó una disminución de la PBMARA al segundo mes, pero en el suelo bioestimulado con LC la población fue superior y se mantuvo en crecimiento por más tiempo que la del suelo bioestimulado con SM y AV. Al final del experimento, la PBMARA en el suelo bioestimulado con SM fue de 18×10^7 UFC g⁻¹ suelo seco y en el bioestimulado con AV de 96×10^7 UFC g⁻¹ suelo seco, ambos valores inferiores a la PBMARA del suelo bioestimulado con LC de 26×10^8 UFC g⁻¹ suelo seco.

En contraste con lo anterior, en el suelo sin bioestimar usado como CR la ausencia de nutrientes esenciales para la PBMARA ocasionó una disminución en su densidad de 30×10^8 UFC g⁻¹ suelo seco a 80×10^6 UFC g⁻¹ suelo seco, mientras que en el empleado como CA la PBMARA fue de 28×10^6 UFC g⁻¹ suelo seco, pero aumentó hasta 16×10^8 UFC g⁻¹ suelo seco en respuesta a la adición de agua y a la ausencia de ARA (Leal, 2003; García-Hernández *et al.*, 2007; Sánchez-Yáñez *et al.*, 2008).

El rango de variación de cada curva de la Figura 3 se presenta de manera individual en las Figuras 4 a la 8, y se modificó la escala del eje correspondiente al log UFC x 10⁶ 100 g⁻¹ suelo seco con el objeto de una mejor apreciación.

Nota: se tomó N = 3 para calcular la desviación estándar de la PBMARA en cada suelo. El número total de muestras tomadas fue cinco, pero debido a limitaciones de material para el análisis se tomaron dos grupos de dos muestras como una sola, dando el total de tres repeticiones.

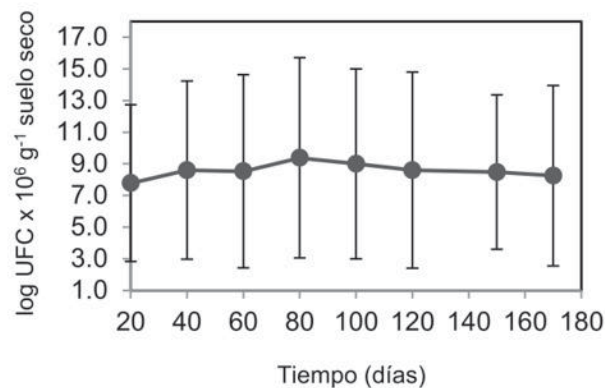


Figura 4. Desviación estándar de la densidad bacteriana mineralizadora de aceite residual automotriz en el suelo bioestimulado con solución mineral.

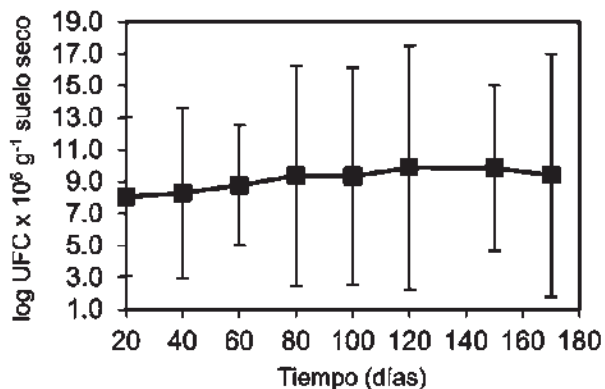


Figura 5. Desviación estándar de la densidad bacteriana mineralizadora de aceite residual automotriz en el suelo bioestimulado con lombricomposta.

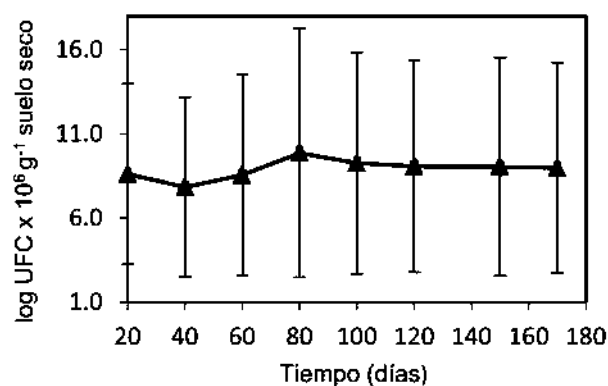


Figura 6. Desviación estándar de la densidad bacteriana mineralizadora de aceite residual automotriz en el suelo bioestimulado con abono verde.

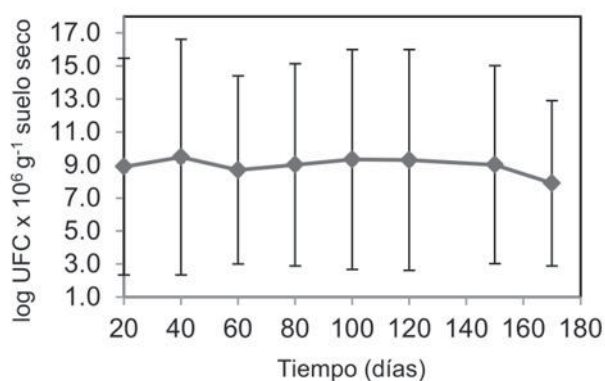


Figura 7. Desviación estándar de la densidad bacteriana mineralizadora de aceite residual automotriz en el suelo empleado como control relativo.

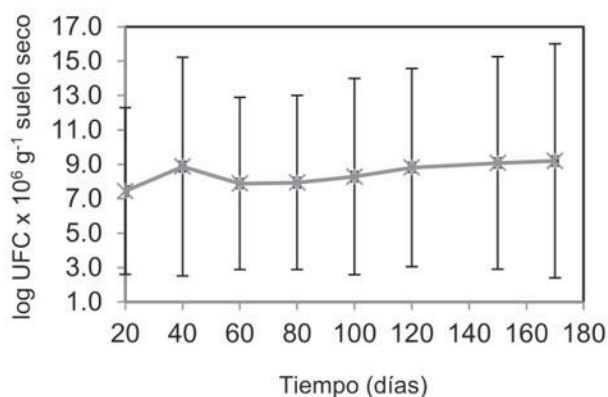


Figura 8. Desviación estándar de la densidad bacteriana mineralizadora de aceite residual automotriz en el suelo empleado como control absoluto.

De los tres tipos de BS aplicados al suelo contaminado con ARA, la LC indujo una mayor PBMARA, cuyo crecimiento fue exponencial. Mediante una regresión lineal (Figura 9) se encontró que la tasa de crecimiento de estas poblaciones fue de $0.026 \text{ UFC} \times 10^6 \text{ g}^{-1} \text{ suelo seco}$.

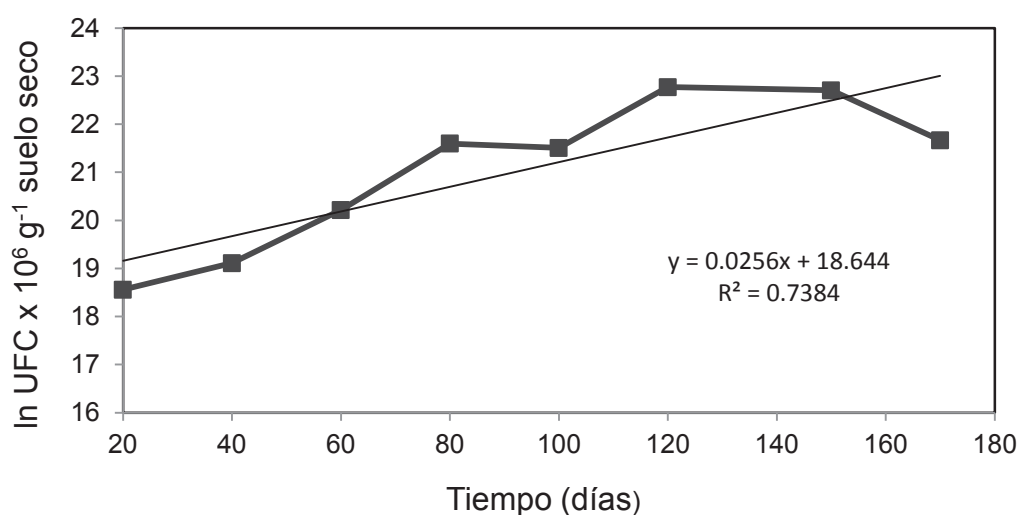
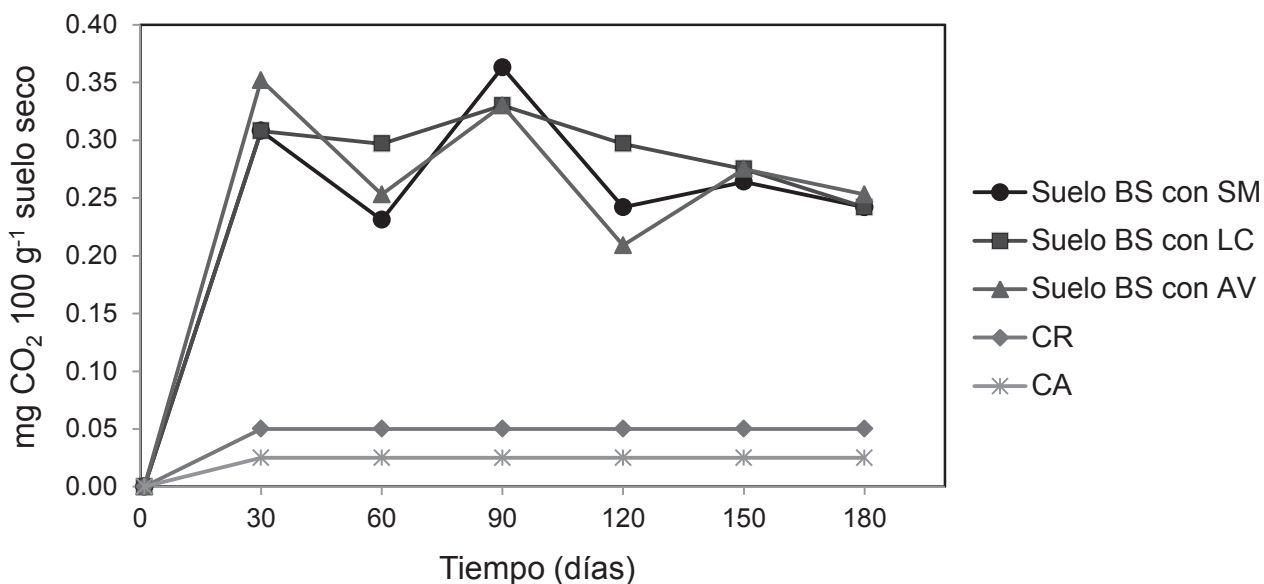


Figura 9. Tasa de crecimiento de la población bacteriana mineralizadora de aceite residual automotriz en el suelo bioestimulado con lombricomposta.

4.2.2 Producción de CO₂

El CO₂ fue el producto del metabolismo microbiano derivado del consumo de los HC alifáticos del ARA durante la BR del suelo, su liberación se usó como una medida de la actividad oxidante de HC (García-Izquierdo *et al.*, 2003). La comparación de los datos obtenidos se muestra en la Figura 10.



BS = bioestimulación, SM = solución mineral, LC = lombricomposta, AV = abono verde, CR = control relativo (suelo + ARA + agua), CA = control absoluto (suelo + agua), ARA = aceite residual automotriz.

Figura 10. Efecto de la biorremediación vía bioestimulación con una solución mineral, lombricomposta y abono verde sobre la producción de CO₂ de la población microbiana mineralizadora de aceite residual automotriz en un suelo agrícola.

Se muestra el efecto de la BR vía BS en el suelo contaminado con ARA con la SM, la LC y el AV sobre la microbiota oxidante de HC (Figura 10), que activó la generación de CO₂ en el suelo bioestimulado con SM hasta un valor máximo de 0.363 mg CO₂ 100 g⁻¹ suelo seco y de 0.33 mg CO₂ 100 g⁻¹ suelo seco en el bioestimulado con la LC al tercer mes, mientras que en el bioestimulado con el AV fue de 0.352 mg CO₂ 100 g⁻¹ suelo seco el primer mes, aunque en el suelo bioestimulado con la LC se

liberó más CO₂ que en los bioestimulados con SM y AV; esto significa que el enriquecimiento del suelo con una amplia diversidad de nutrientes esenciales estimuló a la microbiota a la MI de los HC alifáticos del ARA, como señalan Barquín *et al.* (2010) que al BS con sales inorgánicas suelos contaminados con diésel observaron un incremento significativo en la liberación de CO₂ respecto a los usados como control. En esta figura se observa que la producción de CO₂ incrementó y disminuyó continuamente y la amplitud de los picos aumentó con el tiempo, esto sugiere que la microbiota nativa del suelo mineralizó los HC alifáticos del ARA en comparación con el suelo sin bioestimar (Sánchez-Yáñez, 2007); el primer pico indicó la oxidación de los HC más sencillos del ARA, el segundo pico la utilización de HC más complejos y así sucesivamente. La generación de CO₂ fue función directa de la complejidad del sustrato, por lo que la producción disminuyó con el tiempo debido al consumo de los HC del ARA en comparación con el suelo usado como CR (Alexander, 1977; Song *et al.*, 1990; García-Hernández *et al.*, 2007).

En el suelo sin bioestimar utilizado como CR se detectó un valor constante de 0.05 mg CO₂ 100 g⁻¹ suelo seco porque no hubo oxidación de HC del ARA por la falta de nutrientes esenciales que limitó la actividad microbiana autóctona. El CA no generó CO₂ y mantuvo un valor de 0.025 mg CO₂ 100 g⁻¹ suelo seco por la ausencia de ARA (Leal, 2003; García-Hernández *et al.*, 2007).

El rango de variación de cada curva de la Figura 10 se presenta de manera individual en las Figuras 11 a la 15, y se modificó la escala del eje correspondiente a los $\text{mg CO}_2 \text{ } 100 \text{ g}^{-1}$ suelo seco con el objeto de una mejor apreciación.

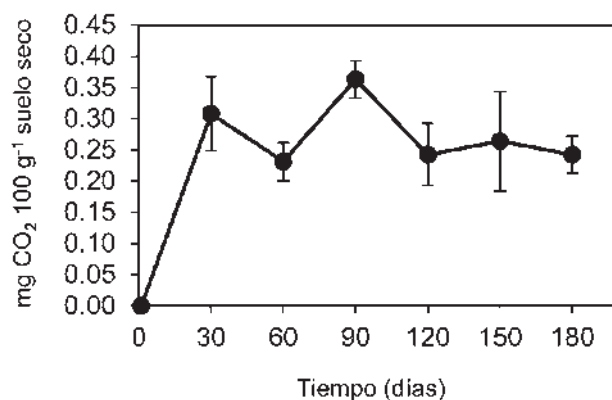


Figura 11. Desviación estándar de la producción de CO_2 en el suelo bioestimulado con solución mineral (N = 4).

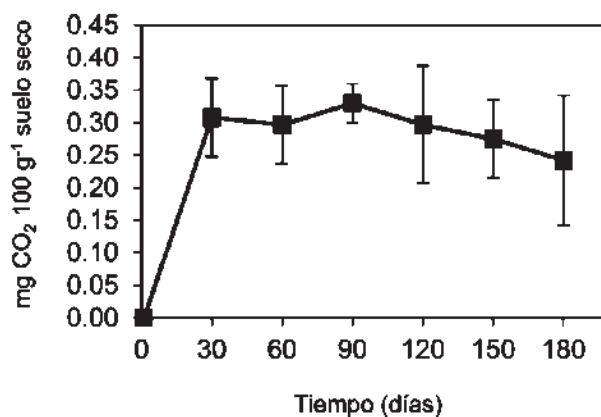


Figura 12. Desviación estándar de la producción de CO_2 en el suelo bioestimulado con lombricomposta (N = 4).

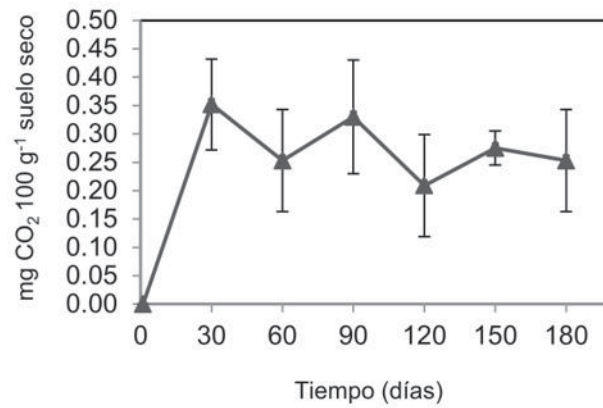


Figura 13. Desviación estándar de la producción de CO₂ en el suelo bioestimulado con abono verde (N = 4).

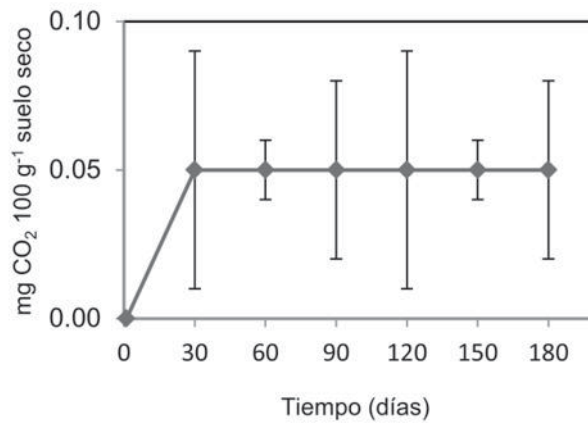


Figura 14. Desviación estándar de la producción de CO₂ en el suelo empleado como control relativo (N = 4).

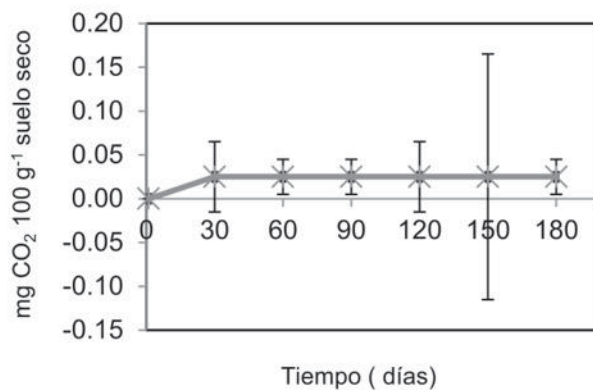


Figura 15. Desviación estándar de la producción de CO₂ en el suelo empleado como control absoluto (N = 4).

4.2.3 Grasas y aceites totales

La determinación de las GyA indicó la concentración del ARA en el suelo. Los datos obtenidos de este análisis se muestran en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Efecto de la biorremediación vía bioestimulación con solución mineral, lombricomposta y abono verde sobre la mineralización del aceite residual automotriz en un suelo agrícola.

	% HC del ARA		% eliminación ARA	ARA remanente
	Inicial	Final		
Suelo + SM	1.71±0.00 ^a	0.75±0.00 ^{c*}	56.14 ^b	43.86 ^c
Suelo + LC	1.71±0.00 ^a	0.64±0.00 ^d	62.34 ^a	37.66 ^d
Suelo + AV	1.71±0.00 ^a	1.47±0.00 ^b	14.04 ^c	85.96 ^b
CR	1.71±0.00 ^a	1.71±0.00 ^a	0 ^d	100.0 ^a
CA	0.15±0.00 ^b	0.15±0.00 ^e	--	--

SM = solución mineral, LC = lombricomposta, AV = abono verde, CR = control relativo (suelo + ARA + agua), CA = control absoluto (suelo + agua), ARA = aceite residual automotriz, HC = hidrocarburos,

* Tukey (letras iguales = no existen diferencias significativas, letras diferentes = existen diferencias significativas).

Respecto a los porcentajes de eliminación del ARA de acuerdo con el tipo de BS, se observa que de los tres tipos de enriquecimiento la LC indujo la mayor MI de los HC alifáticos del ARA. Al relacionar estos resultados con los que se muestran en la Figura 10 fue evidente que cuando el suelo fue bioestimulado hubo mayor producción de CO₂

que coincidió con la desaparición de los HC alifáticos del ARA, lo que contrasta con el suelo sin bioestimar empleado como CR en donde no hubo liberación de CO₂ y el porcentaje de remoción de HC fue nulo (Alexander, 1977; Leal, 2003; García-Hernández *et al.*, 2007).

La LC estimuló mejor a la PBMARA e indujo una mayor MI de la mezcla de HC alifáticos del ARA en relación con el efecto de la SM y el AV por la mayor diversidad de compuestos orgánicos e inorgánicos de origen animal presentes en ella, que estimularon mejor a la microbiota, seguida de la SM cuyos componentes sólo inorgánicos limitaron la actividad bacteriana en comparación con la LC, pero fue la simplicidad de su composición química lo que favoreció que los microorganismos la asimilaran más fácilmente para la producción de sus componentes celulares en comparación con el AV, que aunque fue más complejo y diverso que la SM también fue más difícil de metabolizar por la PBMARA, probablemente porque tenía una gran cantidad de compuestos complejos que requerían catabolizarse antes de ser anabolizados, lo que limitó la capacidad de los microorganismos para oxidar los HC del ARA en CO₂ (Alexander, 1977; Velasco y Volke, 2003; Rodríguez, 2005; García-Hernández *et al.*, 2007). De manera que de entre los tipos de enriquecimiento utilizados para la BS de la microbiota del suelo impactado con ARA, la LC representó la mejor opción y esto se corroboró con el análisis estadístico que estableció una verdadera diferencia a su favor.

De acuerdo con lo anterior, la eficiencia de la BR fue función del tipo de BS que se aplicó al suelo, y esto no sólo dependió de la diversidad de los componentes del material utilizado para la BS, sino también de su potencial para ser asimilados por los microorganismos.

La estadística de los resultados probó que la BR vía BS fue adecuada para la recuperación del suelo agrícola y tanto la LC como la SM fueron eficaces para la oxidación de los HC alifáticos del ARA.

CONCLUSIONES

1. Es posible recuperar un suelo impactado con ARA si se bioestimula con SM, LC o AV.
2. El enriquecimiento del suelo con nutrientes esenciales potencia la capacidad bioquímica de la microbiota nativa de eliminar los HC alifáticos del ARA al utilizarlos como fuente de carbono y energía.
3. Cuando el suelo no se bioestimula, el desequilibrio nutricional ocasiona que la MI del ARA no suceda aunque exista microbiota con potencial para oxidarlo.

VALIDACIÓN DE OBJETIVOS

Objetivo general:

Analizar la biorremediación vía bioestimulación de un suelo agrícola impactado con aceite residual automotriz.

Objetivos particulares:

1. Cuantificar la población bacteriana mineralizadora de aceite residual automotriz.
✓ OBJETIVO CUMPLIDO a través de la técnica de cuenta viable en placa.
2. Medir la actividad microbiana nativa mineralizadora de aceite residual automotriz.
✓ OBJETIVO CUMPLIDO mediante la técnica de captación de CO₂ en álcali.
3. Determinar la concentración de aceite residual automotriz consumido por la microbiota nativa del suelo.
✓ OBJETIVO CUMPLIDO con el método de extracción Soxhlet.

VALIDACIÓN DE HIPÓTESIS

Naturalmente existen microorganismos en el suelo con potencial para oxidar hidrocarburos alifáticos del aceite residual automotriz, si se les bioestimula con nutrientes esenciales para lograr la eliminación de esta mezcla de hidrocarburos.

- ✓ HIPÓTESIS VALIDADA para los suelos que fueron BS con la SM, la LC y el AV.

REFERENCIAS

1. Acuña, A. J.; Pucci, O. H.; Pucci, G. N. 2008. Caracterización de un proceso de biorremediación de hidrocarburos en deficiencia de nitrógeno en un suelo de Patagonia Argentina. *Ecosistemas: Revista Científica y Técnica de Ecología y Medio Ambiente*. 17: 85-93. www.revistaecosistemas.net.
2. Acuña, O.; Peña, W.; Serrano, E.; Pocasangre, L.; Rosales, F.; Delgado, E.; Trejos, J.; Segura, A. 2006. La importancia de los microorganismos en la calidad y salud de suelos. www.fontagro.org/Projects/04_110_Suelos/.../OAcuña-Article.pdf.
3. Alexander, M. 1977. *Ecología microbiana, el ciclo del carbono*; ed. 2ª, Ed. AGT, en: *Introducción a la Microbiología del Suelo*; I: 11-46, II: 127-240. Traducción 1980. México. ISBN: 968-462-002-0.
4. Álvarez González, J. A.; Díaz Díaz, M. A. 2005. Alternativas para la remediación de ecosistemas contaminados por hidrocarburos. Recopilación bibliográfica. Centro de Investigaciones del petróleo. La Habana, Cuba. www.monografias.com.
5. Ambriz Parra, J. E. 2007. Efecto de la interacción *Alnus-Glomus-Pisolithus*; *Fraxinus-Glomus-Pisolithus* en el crecimiento de la planta y formación de agregados del suelo. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Tesis Doctoral (inédita).
6. Ambriz, E.; Báez-Pérez, A.; Sánchez-Yáñez, J. M.; Moutoglis, P.; Villegas, J. 2010. *Fraxinus-Glomus-Pisolithus* symbiosis: plant growth and soil aggregation effects. *Pedobiologia - International Journal of Soil Biology*. 53: 369-373.

-
7. Azcona, J. P. 2001. Origen y composición del petróleo. Instituto Argentino del Petróleo y del Gas (IAPG). Argentina. www.monografias.com/trabajos11/cuadun/cuadun.shtml.
 8. Balba, M. T.; Al-Awadhi, N.; Al-Daher, R. 1998. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *Journal of Microbiological Methods*. 32: 155-164.
 9. Barquín, M. L.; Pucci, O. H.; Pucci, G. N. 2010. Biodegradación de hidrocarburos en tres suelos patagónicos por microorganismos esporulados. www.cuc.edu.co/publicaciones/mesdelaingenieria2010.pdf.
 10. Benavides, L. de M. J.; Quintero, G.; Guevara, V. A. L.; Jaimes, C. D. C.; Gutiérrez, R. S. M.; Miranda, G. J. 2006. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *NOVA: Publicación científica en ciencias biomédicas*. 4: 1-116.
 11. Bruheim, P.; Bredholt, H.; Eimhjellen, K. 1999. Effects of surfactant mixtures, including corexit 9527, on bacterial oxidation of acetate and alkanes in crude oil. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 1658-1661.
 12. Camacho, A.; Giles, M.; Ortegón, A.; Palao, M.; Serrano B.; Velázquez O. 2009. Cuenta en placa de bacterias; ed. 2ª, Ed. UNAM, en: Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. México. depa.pquim.unam.mx/.../TecnicaBasicas-Cuenta-en-placa_6527.pdf.
 13. Chénier, M. R.; Beaumier, D.; Roy, R.; Driscoll, B. T.; Lawrence, J. R.; Greer, C. W. 2003. Impact of seasonal variations and nutrient inputs on nitrogen cycling and degradation of hexadecane by replicated river biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 5170-5177.

-
14. Colores, G. M.; Macur, R. E.; Ward, D. M.; Inskeep, W. P. 2000. Molecular analysis of surfactant-driven microbial population shifts in hydrocarbon-contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 2959-2964.
 15. Crawford, R. L.; Crawford, D. L. 1996. Engineering of bioremediation processes: needs and limitations, bioremediation in soil: influence of soil properties on organic contaminants and bacteria, bioremediation of petroleum contamination; Ed. Cambridge University Press, en: *Biorremediation: principles and applications*; I: 13-34, II: 35-60, IV: 100-124. England. ISBN: 0-521-47041-2.
 16. Cunningham, C. J. and Philp, J. C. 2000. Comparison of bioaugmentation and biostimulation in *ex situ* treatment of diesel contaminated soil. *Land Contamination and Reclamation*. 8: 261-269.
 17. Del Lobo Bedmar, M. del C. 2004. Descontaminación de suelos. Instituto Madrileño de Investigación Agraria y Alimentaria, Boletín Ambiental de Argentina, Alcalá de Henares, Madrid.
www.estrucplan.com.ar/Articulos/verarticulo.asp?IDArticulo=750.
 18. Depuroil, S.A. 1999. Riesgos medio ambientales de los aceites industriales.
www.euskalnet.net/depuroilsa/Riesgosmedioambiente.html.
 19. Eriksson, M.; Ka, J.; Mohn, W. W. 2001. Effects of low temperature and freeze-thaw cycles on hydrocarbon biodegradation in arctic tundra soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 5107-5112.
 20. ExploreNorth, 1999. The Exxon Valdez oil spill disaster. Alaska.
xplorenorth.com/library/weekly/aa032499.htm.
 21. Feliú-Mójer, M. 2006. Lombricomposta: nueva práctica para ayudar a conservar nuestros suelos. CienciaPR (on line). www.cienciapr.org/news_view.php?id=97.

-
22. Ferrera-Cerrato, R.; Rojas- Avelizapa, N.G.; Poggi-Varaldo, H.M.; Alarcón, A.; Cañizares-Villanueva, R.O. 2006. Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 48: 179-187.
23. García-Hernández, D.; Sosa-Aguirre, C. R.; Sánchez-Yáñez, J. M. 2007. Biorremediación de agua doméstica contaminada con aceite residual automotriz. *Ingeniería Hidráulica en México*. XXII: 113-118.
24. García-Izquierdo, C.; Gil-Sotres, F.; Hernández-Fernández, T.; Trasar-Cepeda, C. 2003. Métodos de medida de la respiración del suelo; Ed. Mundiprensa, en: *Técnicas de Análisis de Parámetros Bioquímicos en Suelos: Medida de Actividad Enzimática y Biomasa Microbiana*, XV: 311-342. España. ISBN: 84-8476-154-1.
25. Grupo FeuVert. 2000-2007. Gestión de residuos. www.feuvert.es/user/medioambiente.php?id=3.
26. Hamamura, N.; Olson, S. H.; Wars, D. M.; Inskeep, W. P. 2006. Microbial population dynamics associated with crude-oil biodegradation in diverse soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 72: 6316-6324.
27. Harayama, S.; Kishira, H.; Kasai, Y.; Shutsubo, K. 1999. Petroleum biodegradation in marine environments. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 1: 63-70.
28. INE. 2006. Análisis microbiológicos, análisis toxicológicos de muestras de suelos; Ed. Instituto Nacional de Ecología (INE), en: *Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados*. VI: 117-123, VII: 161-173. México. ISBN: 9684890397.

-
29. Infoagro. 2002. Abonos verdes.
www.abcagro.com/fertilizantes/abonos_verdes.asp.
30. Kanaly, R.; Bartha, R.; Fogel, S.; Findlay, M. 1997. Biodegradation of [^{14}C]benzo[α]pyrene added in crude oil to uncontaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 4511-4515.
31. Leahy, J. G. and Colwell, R. R. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*. 54: 305-315.
32. Leal Castillo, M. 2003. Biorremediación de un suelo agrícola contaminado con aceite residual automotriz. Universidad de Colima. Colima, México. Tesis Doctoral (inédita).
33. Macnaughton, S. J.; Stephen, J. R.; Venosa, A. D.; Davis, G. A.; Chang, Y.; White, D. C. 1999. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 3566-3574.
34. Margesin, R. and Schinner, F. 2001. Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 3127-3133.
35. Martínez-Alonso, M.; Gaju, N. 2005. El papel de los tapetes microbianos en la biorrecuperación de zonas litorales sometidas a la contaminación por vertidos de petróleo. *Ecosistemas*. 14:79-91.
36. Martínez-Prado, A.; Osorio-Rodríguez, A. L.; Pérez-López, Ma. E.; Pinto-Espinoza, J. 2010. Biorremediación a nivel piloto de suelo contaminado con hidrocarburos. *Memorias del XXXI Encuentro Nacional de la Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química (AMIDIQ)*. Pp. 3438-3440. México. ISBN: 978-970-764-976-7.

-
37. Norma Oficial Mexicana NMX-AA-005-SCFI-2000. Determinación de Grasas y Aceites recuperables en Aguas Naturales, Residuales y Residuales Tratadas. México.
38. Norma Oficial Mexicana NMX-AA-025-1984. Determinación del pH-Método Potenciométrico. México.
39. Olguín, E. J.; Hernández, M. E.; Sánchez-Galván, G. 2007. Contaminación de manglares por hidrocarburos y estrategias de biorremediación, fitorremediación y restauración. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 23: 139-154.
40. Olvera y Sánchez, Eduardo. 2008. El cultivo del guaje (leucaena). Establecimiento, producción y utilización. www.monografias.com/.../cultivo-guaje2.shtml.
41. Pavón Chocano, A. B. 2003. Análisis de suelo, en: Instalación de riego por goteo en una parcela de maíz. www.uclm.es/area/ing.../BibliotecaProyectos.htm.
42. Pelczar, M. J.; Reid, R. D.; Chan, E. C. S. 1999. Características de las bacterias; ed. 2ª, Ed. McGraw-Hill, en: *Microbiología*; II: 102-115. México. ISBN: 0-07-049229-8.
43. Porta Casanellas, J.; López-Acevedo Reguerin, M.; Roquero, C. 2003. Textura del suelo; ed. 3ª, Ed. Mundi-Prensa, en: *Edafología para la agricultura y el medio ambiente*; VI: 91-109. ISBN: 84-8476-148-7.
44. Rodríguez Lozano, G. 2005. Potencial reproductivo de *Eisenia foetida* (Savigny 1826) en diferentes sustratos de materia orgánica. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Michoacán, México. Tesis de Maestría (inédita).

-
45. Rojas Alba, J. D. 2009. Lumbricultura sustentable; ed. 5ª, Ed. UAM, en: Tecnologías para el desarrollo sustentable serie No. 1; Pp: 6-67. México. Universidad Autónoma Metropolitana. Distrito Federal, México (inédito).
46. Rojas-Avelizapa, N. G.; Roldán-Carrillo, T.; Zegarra-Martínez, H.; Muñoz-Colunga, A.M.; Fernández-Linares, L. C. 2007. A field trial for an ex-situ bioremediation of a drilling mud-polluted site. *Chemosphere*. 66:1595-1600.
47. Röling, W. F. M.; Milner, M. G.; Jones, D. M.; Lee, K.; Daniel, F.; Swannell, R. J. P.; Head, I. M. 2002. Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 5537-5548.
48. Romaniuk, R.; Brandt, J. F.; Ríos, P. R.; Giuffré, L. 2007. Atenuación natural y remediación inducida en suelos contaminados con hidrocarburos. *Ciencia del suelo*. 25: 139-149.
49. Rosas Jaramillo, J. A.; Rodríguez Martínez, N.; Silva Rodríguez, A. F. 2006. Los aceites lubricantes automotrices. www.ref.pemex.com/octanaje/21nues.htm.
50. SAGARPA. 2008. Abonos verdes. www.sagarpa.gob.mx/desarrolloRural/.../Abonos%20Verdes.pdf.
51. Sánchez-Yáñez, J. M. 2007. Ciclo del carbono; ed. 1ª, Ed. CIDEM, en: Breve Tratado de Microbiología Agrícola, Teoría y Práctica; IV: 118-119. Morelia, Michoacán, México. ISBN: 978-970-95424-1-7.
52. Sánchez-Yáñez, J. M. 2008. Estrategias de biorremediación de hidrocarburos en agua superficial, subterránea y suelo. Minirrevisión. www.monografias.com/Ingenieria/more6.shtml.

-
53. Sánchez-Yáñez, J. M.; Márquez-Benavides, L.; Villegas Moreno, J.; Carrillo Amezcua, J. C. 2008. Biorremediación: acción biológica de restauración de ambientes contaminados con hidrocarburos aromáticos, importancia de los hidrocarburos lineales y aromáticos policíclicos en la salud humana y el ambiente, eliminación biológica de aceites y lubricantes; alternativas de restauración en ambientes impactados con hidrocarburos; ed. 1ª, Ed. UMSNH/CIDEM, en: Biorremediación (Antología); I: 11-32, II: 33-56, III: 57-79. Morelia, Michoacán, México. ISBN: 978-970-95424-2-4.
54. Song, H. and Bartha, R. 1990. Effects of jet fuel spills on the microbial community of soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 56: 646-651.
55. Song, H.; Wang, X.; Bartha, R. 1990. Bioremediation potential of terrestrial fuel spills. *Applied and Environmental Microbiology*. 56: 652-656.
56. Soriano Soto, M. D.; Pons Martí, V. 2004. Preparación de la muestra en el laboratorio, determinación de la textura de un suelo, determinación de la materia orgánica, capacidad de cambio catiónico; ed. 1ª, Ed. Alfaomega, en: *Prácticas de Edafología y Climatología*; 1: 19-20, 10: 43-50, 17: 70-72, 18: 74-76. México. ISBN: 970-15-0880-7.
57. Suárez Camacho, Ma. del C.; Ramírez Mares, M. V. 2000. Preparación y dilución de la muestra, cuenta de bacterias mesofílicas aerobias; en: *Manual de prácticas de Microbiología Sanitaria*; Pp: 6-12. Instituto Tecnológico de Morelia. Morelia, Michoacán, México (inédito).
58. Swannell, R. P. J.; Lee, K.; McDonagh, M. 1996. Field evaluations of marine oil spill bioremediation. *Microbiological Reviews*. 60: 342-365.
59. Tate III, R. L. *The Micro-Ecosystem*; ed. 2ª, Ed. John Wiley & Sons, Inc., en: *Soil Microbiology*; I: 12-29. USA. ISBN: 0-471-31791-8.

-
60. Ubiratan Escorel de Azevedo, P. 2002. Revisión y análisis de las experiencias de Argentina, Brasil, Colombia, Ecuador y México respecto a los cinco elementos claves para el manejo ambiental de lubricantes usados. São Paulo, Brasil. www.bvsde.ops-oms.org/bvsare/e/lubricantes-vfinal.pdf.
61. Velasco, J. A.; Volke Sepúlveda, T. L. 2003. El composteo: una alternativa tecnológica para la biorremediación de suelos en México. Gaceta Ecológica. Instituto Nacional de Ecología. Distrito Federal, México. 66: 41-53.
62. Viñas Canals, M. 2005. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica. Universidad de Barcelona. Barcelona, España. Tesis doctoral. www.tdr.cesca.es/TESIS UB/.../TESIS MVIÑAS CANALS.pdf.
63. Yonni, F. 2000. Biorremediación: el empleo de hongos que crecen en la madera. Boletín Ambiental de Argentina (on line). Argentina. www.estrucplan.com.ar/Articulos/verarticulo.asp?IDArticulo=603.

ANEXOS

1. Determinación de grasas y aceites totales

Esta determinación se llevó a cabo por el método de extracción de Soxhlet. Este método no mide una sustancia específica sino un grupo de sustancias con las mismas características fisicoquímicas (solubilidad) y se basa en la adsorción de grasas y aceites en tierra de diatomeas, las cuales son extraídas en un Soxhlet empleando hexano como disolvente. Una vez terminada la extracción se evapora el hexano y se pesa el residuo que ha quedado en el recipiente, siendo este valor el contenido de grasas y aceites. El procedimiento es el siguiente:

- 1) Medir el pH de las muestras el cual debe ser menor de 2, si no tiene este valor acidificar con ácido clorhídrico 1:1 ó ácido sulfúrico 1:1.
- 2) Para muestras con un pH menor de 8 unidades es suficiente adicionar 5 mL de ácido clorhídrico 1:1 ó 2 mL de ácido sulfúrico 1:1.
- 3) Preparar los matraces de extracción introduciéndolos a la estufa a una temperatura entre 103 °C y 105 °C, enfriar en desecador y pesarlos, repetir el procedimiento hasta obtener el peso constante de cada uno de los matraces.
- 4) Preparar el material filtrante colocando un papel filtro en el embudo Büchner y éste en un matraz Kitazato, y agregar 100 mL de la suspensión de tierra de diatomeas-sílice sobre el filtro, aplicar vacío y lavar con 100 mL de agua.
- 5) Transferir el total de la muestra acidificada al embudo Büchner preparado aplicando vacío hasta que cese el paso de agua. Medir el volumen de la muestra.
- 6) Con ayuda de unas pinzas, transferir el material filtrante a un cartucho de extracción. Limpiar las paredes internas del embudo y el frasco contenedor de la muestra, así como la parte interna de la tapa del frasco con trozos de papel filtro previamente impregnados de disolvente (hexano), tener cuidado en remover la

película de grasa y los sólidos impregnados sobre las paredes; colocar los trozos de papel en el mismo cartucho.

- 7) Secar el cartucho en una estufa entre 103 °C y 105 °C por un período de 30 min. Transcurrido este tiempo colocar en el equipo Soxhlet.
- 8) Adicionar el volumen adecuado de hexano al matraz de extracción previamente puesto a peso constante y preparar el equipo Soxhlet. Evitar tocar con las manos el cartucho y el matraz de extracción, para ello utilizar pinzas ó guantes de látex.
- 9) Colocar el equipo de extracción sobre la parrilla de calentamiento, controlar la temperatura del reflujo y extraer a una velocidad de 20 ciclos por hora durante un período de 4 h.
- 10) Una vez terminada la extracción, retirar el matraz del equipo Soxhlet y evaporar el disolvente.
- 11) El matraz de extracción libre de disolvente se coloca en el desecador hasta que alcance la temperatura ambiente.
- 12) Pesar el matraz de extracción y determinar la concentración de grasas y aceites recuperables. Analizar un blanco de reactivo bajo las mismas condiciones de la muestra.

2. Aislamiento y cuantificación de bacterias mineralizadoras de aceite residual automotriz

Para esta determinación se empleó una modificación al método estándar de CVP, el cual se realizó de la siguiente forma:

- 1) Pesar 1 g de suelo y colocarlo en un tubo de ensaye que contenga 9 mL de solución salina (NaCl 0.85%). Lo anterior constituye la dilución 10^{-1} .
- 2) Agitar durante 1-2 minutos.
- 3) Tomar 1 mL de la dilución anterior y añadir a otro tubo de ensaye con 9 mL de solución salina. Esta será la dilución 10^{-2} .
- 4) Repetir la operación anterior para obtener las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} .
- 5) Con una micropipeta transferir 5 μ L de la dilución 10^{-4} a una caja de Petri con agar ARA. Realizar esta acción por triplicado.
- 6) Repetir la operación anterior para las diluciones 10^{-5} y 10^{-6} .
- 7) Incubar las cajas a temperatura entre 30 °C y 35 °C y revisarlas a las 8, 12 y 24 h.
- 8) Una vez transcurrido este tiempo, seleccionar aquellas placas en donde aparezcan entre 30 y 300 colonias. La cifra obtenida del conteo se multiplicará por la inversa de la dilución que se trate. Este número será equivalente a la cantidad de inóculo agregado en la placa. Posteriormente realizar el cálculo por mL y reportar como colonias/mL o colonias/g.

3. Determinación de las propiedades físicas y químicas del suelo

3a) pH. Se determinó mediante el método potenciométrico, el cual se basa en la actividad de los iones hidrógeno presentes en una solución acuosa de residuos sólidos al 10%. El procedimiento es el siguiente:

- 1) Calibrar el potenciómetro con las soluciones amortiguadoras de pH=4, pH=7 y pH=11, según sea el tipo de residuo sólido por analizar.
- 2) Pesar 10 g de muestra y transferirlos a un vaso de precipitado de 250 cm³. La determinación se realiza por duplicado.
- 3) Añadir 90 cm³ de agua destilada.
- 4) Mezclar por medio de un agitador durante 10 min.
- 5) Dejar reposar la solución durante 30 min.
- 6) Determinar la temperatura de la solución. Sumergir los electrodos en la solución y hacer la medición de pH.
- 7) Sacar los electrodos y lavar con agua destilada.
- 8) Sumergir los electrodos en un vaso de precipitados con agua destilada.

3b) Textura. Para determinar la textura del suelo se empleó el método del densímetro de Bouyoucos, basado en la ecuación de Stokes que expresa la relación entre el tiempo de sedimentación y el diámetro de las partículas. El procedimiento se cita a continuación:

- 1) Pesar 40 g de suelo y colocarlo en un vaso de 600 mL.
- 2) Añadir 100 mL de solución acuosa al 5% de hexametáfosfato sódico como reactivo dispersante y 200 mL de agua destilada, y dejar que se empape durante un mínimo de 10 min.
- 3) Llevar la suspensión al vaso dispersador del agitador usando el chorro de un frasco lavador con agua destilada para arrastrar toda la muestra.

-
- 4) Agitar durante 5 min, transferir a una probeta y enrasar con agua destilada hasta los 1000 mL.
 - 5) Colocar la probeta en el banco de sedimentación y anotar la temperatura de la suspensión cuando se estabilice.
 - 6) Mezclar bien la suspensión con un émbolo y sacarlo inclinándolo ligeramente sobre la superficie de la suspensión para dejar caer las gotas adheridas. Anotar de inmediato el tiempo cero. Si la superficie estuviese cubierta con espuma, añadir una gota de alcohol amílico y mezclar de nuevo en caso de ser necesario.
 - 7) Introducir el densímetro con cuidado en la suspensión y después de 30 s a partir del tiempo cero leer la escala y anotar la lectura. Hacer otra lectura a los 60 s, ambas lecturas sin sacar el densímetro.
 - 8) Después de realizar las dos lecturas anteriores, sacar el densímetro con cuidado, enjuagarlo y secarlo con un paño.
 - 9) Volver a introducir el densímetro con cuidado en la suspensión unos 10 s antes de cada medida y hacer lecturas a los 3, 10, 30 y 90 min, y otra muestra en un tiempo superior a 8 h para determinar la fracción arcilla.

3c) Concentración de materia orgánica. El método usado fue el de Walkey y Black, que consiste en la oxidación del carbono orgánico con dicromato potásico utilizando el calor de reacción del ácido sulfúrico y valorando el exceso con sulfato de hierro. El procedimiento se muestra a continuación:

- 1) Pesar 1 g de tierra fina y colocarlo en un matraz Erlenmeyer de 250 mL.
- 2) Añadir 10 mL de dicromato potásico 1 N, agitar la mezcla unos minutos y agregar 20 mL de ácido sulfúrico concentrado, mezclando el contenido.
- 3) Dejar en reposo durante 30 min.
- 4) Añadir 200 mL de agua destilada y agitar unos minutos para evitar el sobrecalentamiento global.
- 5) Dejar enfriar.

-
- 6) Añadir 10 mL de H_3PO_4 y agitar.
 - 7) Agregar de cuatro a cinco gotas del indicador ortofenantrolina ferrosa o ferroína 0.025 M y valorar con sulfato ferroso amónico seis hidrato 0.5 N (sal de Mohr) hasta que el color cambie de verde a rojo vino.

3d) Capacidad de Intercambio catiónico. Para determinar la capacidad de intercambio catiónico (CIC) del suelo se utilizó el método del acetato de amonio (AcONH_4), cuyo fundamento consiste en el desplazamiento de los cationes del complejo de cambio, mediante una solución de una sal con pH regulado, eliminación del exceso de sal por lavado con un disolvente exento de electrolitos y desplazamiento del catión saturante con otra sal, también con pH regulado, y valoración de la concentración del catión desplazado. El procedimiento es el siguiente:

- 1) Pesar 4 g de suelo, colocarlo en un tubo de centrifuga y añadir 33 mL de acetato sódico.
- 2) Agitar el tubo tapado durante 5 min en el agitador mecánico.
- 3) Destapar y centrifugar hasta que el líquido sobrenadante esté claro. Normalmente esto se consigue en 5 min.
- 4) Decantar el líquido sobrenadante tan completamente como sea posible, y repetir la operación tres veces.
- 5) Preparar una suspensión de 33 mL de etanol al 95% y repetir las mismas operaciones anteriores. Lavar de esta forma con etanol durante tres veces, midiendo la conductividad del líquido sobrenadante procedente del tercer lavado, la cual debe ser inferior a $40 \mu\text{mhos cm}^{-1}$.
- 6) Realizar de la misma forma el desplazamiento del sodio absorbido en la muestra con tres porciones de acetato amónico.
- 7) Determinar la concentración de sodio en los extractos obtenidos después de haber diluido y mezclado en 100 mL de acuerdo con el método para determinar el sodio por el fotómetro de llama.

4. Determinación de la actividad microbiana nativa: producción de CO₂

La actividad biológica se determinó mediante la captación de CO₂ en álcali. El procedimiento es como sigue:

- 1) Colocar 100 g de suelo en un matraz tipo Bartha de 250 mL, adicionar 3% de ARA y 20 g de AV, de LC ó SM hasta la CCS.
- 2) Agregar 5 mL de NaOH 0.1 N en uno de los reservorios del matraz y 1 gota de fenolftaleína como indicador.
- 3) Tapar la entrada del matraz y los reservorios con tapones de hule. El tapón para la boca del matraz deberá contar previamente con una trampa para el CO₂ atmosférico.
- 4) Mantener el nivel de humedad y titular con NaOH 0.1 N cada mes, sustituyendo el NaOH 0.1 N en el reservorio del matraz para la siguiente determinación de CO₂.
- 5) Realizar los cálculos de la cantidad de CO₂ desprendido por el suelo, expresando los resultados como mg CO₂ 100 g⁻¹ suelo seco.