



UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

Facultad de Ingeniería Civil
Facultad de Biología
Facultad de Ingeniería Química
Maestría en Ciencias en Ingeniería Ambiental

Tesis

Bioestimulación de suelo contaminado con 60,000 ppm de aceite residual
automotriz con detergente, extracto fúngico, H₂O₂, solución mineral y
fitorremediación por *Sorghum vulgare* con *Penicillium chrysogenum* y *Aspergillus
niger*

Que presenta

I.B.Q. Blanca Celeste Saucedo Martínez

Para obtener el título de
Maestra en Ciencias en Ingeniería Ambiental

Asesor

Dr. Juan Manuel Sánchez-Yáñez
Laboratorio de Microbiología Ambiental

Coasesor

Dr. Rodolfo Farías Rodríguez
Laboratorio de Ecología Microbiana

Morelia, Michoacán. Noviembre 2016

Este trabajo fue dirigido por el Dr. Juan Manuel Sánchez-Yáñez en el laboratorio de Microbiología Ambiental Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mich, México, con el apoyo del Proyecto “Aislamiento y selección de microorganismos promotores de crecimiento vegetal de plantas nativas de bosque y desierto” (2016) de la CIC-UMSNH.



Agradecimientos

Al Dr. Rodolfo Farías Rodríguez por la coasesoría del trabajo en el Laboratorio de Ecología Microbiana del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Al Dr. Gustavo Santoyo Pizano por su colaboración en el Laboratorio de Diversidad Genómica del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Al proyecto “Aislamiento y selección de microorganismos promotores de crecimiento vegetal de plantas nativas de bosque y desierto” (2016) de la CIC-UMSNH.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 2014-2016 por el apoyo de la beca.

A BIONUTRA, S.A de CV, Maravatío, Mich, México, por financiar el trabajo.

A la facultad de Químico-Farmacobiología y a la facultad de Biología por los servicios prestados en sus instalaciones para el trabajo.

A la coordinación de la Maestría en Ciencias en Ingeniería Ambiental por la aceptación al programa.



Agradecimientos y dedicatoria

A Dios por ser mi guía, especialmente por permitirme llegar a ese momento, por ser mi fortaleza en momentos de dificultades y por darme mas amor de lo que merezco.

A mi familia, especialmente a mi mamá por ser mi inspiración y motivación para seguir adelante y ser mejor cada día. Por creer en mí y darme siempre el apoyo y amor para mi educación, formación personal y profesional, y la oportunidad de cumplir mis sueños. Las palabras nunca serán suficientes para agradecer lo que han hecho por mí.

A mi director de tesis el Dr. Juan Manuel Sánchez Yáñez, por confiar en mí para llevar a cabo este trabajo. Por su valiosa guía en este camino, por todo el tiempo prestado y paciencia ante mi inconsistencia. Por los consejos, motivación y disciplina impuesta en mí para ser mejor y diferente.

A mi codirector el Dr. Rodolfo Farías Rodríguez, por recibirme en su laboratorio de Ecología Microbiana, por todas las enseñanzas, consejos, paciencia y aportaciones para el trabajo. Además de siempre hacer amenos los momentos de trabajo con su amabilidad y buen humor.

Al Dr. Gustavo Santoyo Pizano y todo su equipo de investigación del Laboratorio de Diversidad Genómica del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, por recibirme amablemente y hacerme parte de ellos. Por todo el apoyo, enseñanzas, tiempo y esfuerzo invertido en mí para que

podiera aprender y entender todo lo necesario para fortalecer el trabajo de tesis.

A mis amigos y compañeros del Laboratorio de Microbiología Ambiental por su apoyo en las actividades en el trabajo experimental y siempre hacer mas satisfactorio el transcurso de la tesis con sus bromas y buen humor.

A mis amigos del Tecnológico por su amistad incondicional, por todos los buenos momentos que hemos pasado llenos de risas, consejos y aprendizajes. Por estar en todo momento que los he necesitado, sobre todo en los difíciles.

A todas aquellas personas que diariamente buscan la manera de cuidar, sanar y hacer un poco mejor el mundo.

A todos ustedes mi mayor reconocimiento y gratitud.

Celeste.

Contenido

Resumen	9
Abstract	10
1. Introducción y antecedentes.....	11
Tabla 1. Principales componentes de los aceites residuales.....	13
2. Hipótesis.....	15
3. Objetivos	15
4. Materiales y métodos	16
4.1 En suelo contaminado por aceite residual automotriz con y sin materia orgánica, determinación de las concentraciones de detergente y H ₂ O ₂ para emulsificar y mineralizar los HICO del ARA.	16
Tabla 2. Diseño experimental en suelo para la evaluación de la concentración y el mejor tipo de detergente en la solubilización del ARA medido por la producción de CO ₂ con control de la humedad a 80% capacidad de campo. ...	17
4.2 Caracterización fisicoquímica del suelo.....	17
4.3 Bioestimulación del suelo contaminado con 60,000 ppm ARA con detergente, H ₂ O ₂ , extracto fúngico crudo, solución mineral y control de la humedad a 80% de la capacidad de campo.....	17
Tabla 3. Diseño experimental de la bioestimulación de un suelo contaminado con 60,000 ppm de aceite residual automotriz.	19
4.3.1 Producción del extracto fúngico crudo de <i>Penicillium chrysogenum</i> ; medición de la actividad lacasa.	19
4.4 En suelo determinación de la concentración de aceite residual automotriz por Soxhlet.	20
4.5 En suelo concentración de PO ₄ ³⁻ (fosfatos) solubles.....	20
4.6 En suelo densidad de la población bacteriana oxidante de aceite residual automotriz, aislamiento <i>in vitro</i> e identificación de bacterias productoras de detergentes.....	21
4.6.1 Determinación de la síntesis de detergentes <i>in vitro</i> por la técnica “Drop-collapse” en bacterias oxidantes de aceite residual automotriz.....	22
4.6.2 Identificación molecular de las bacterias productoras de detergentes oxidantes de aceite residual automotriz.	22
4.7 Fitorremediación de suelo con ARA mediante <i>Sorghum vulgare</i> potenciado con <i>Penicillium chrysogenum</i> y <i>Aspergillus niger</i>	23
4.7.1 Activación de <i>P. chrysogenum</i> , <i>A. niger</i> e inoculación de semillas de <i>Sorghum vulgare</i> para la FITO del suelo con ARA.....	23
4.8 En suelo determinación de la concentración de aceite residual automotriz de la fitorremediación.	25

4.9 En suelo biorremediado y fitoremediado, concentración de PO ₄ ⁼ (fosfatos) solubles.	25
4.10 Análisis estadístico de los resultados	25
5. Resultados y discusión	26
Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas del suelo sin aceite residual automotriz... 26	
Figura 1. En suelo producción de CO ₂ derivado de la mineralización del aceite residual automotriz por bioestimulación con detergente dodecil sulfato de sodio/alcohol etoxilado, alcohol etoxilado, H ₂ O ₂ , solución mineral y control de la humedad a capacidad de campo al 80%.	28
Tabla 6. En suelo concentración de aceite residual automotriz producto de la bioestimulación con alcohol etoxilado/dodecil sulfato de sodio, alcohol etoxilado H ₂ O ₂ , solución mineral y control de la humedad a capacidad de campo al 80%.	29
Figura 2. En suelo con y sin materia orgánica contaminado con 60,000 ppm de aceite residual automotriz, producción de CO ₂ derivado de la bioestimulación con detergentes al 0.1% y 0.5%, H ₂ O ₂ al 0.1% y 0.5%, solución mineral y control de la humedad a capacidad de campo al 80%.	30
capacidad de campo al 80%.	30
Figura 3. Actividad lacasa de <i>Penicillium chrysogenum</i> en lignina residual de paja de trigo.	32
Tabla 7. En suelo concentración de aceite residual automotriz derivado de 8 semanas de bioestimulación con detergente ALEDOS (0.5%), H ₂ O ₂ (0.5%), extracto fúngico crudo, solución mineral y control de humedad a capacidad de campo al 80%.	33
Tabla 8. En suelo densidad de la población bacteriana oxidante de aceite residual automotriz.	34
Tabla 9. En suelo con 60,000 de aceite residual automotriz concentración de PO ₄ ⁼ derivado de la bioestimulación.	35
Tabla 10. Determinación de la síntesis de detergentes <i>in vitro</i> de actinomicetos, firmicutes y proteobacterias que mineralizan el aceite residual automotriz, por la técnica cualitativa “Drop-collapse”.	36
Tabla 11. Determinación de la síntesis de detergentes <i>in vitro</i> de actinomicetos, firmicutes y proteobacterias que mineralizan el aceite residual automotriz, por la técnica cuantitativa “Drop-collapse”.	38
Figura 4. <i>In vitro</i> producción de detergentes por técnica Drop-collapse. Control agua: negativo (a), <i>Staphylococcus hominis</i> SCARA6i: positivo (b y c).	40
Figura 5. <i>In vitro</i> producción de detergentes por técnica Drop-collapse. <i>Gordonia amicalis</i> SCARA8i: positivo (a), <i>Achromobacter insolitus</i> SCARA7i positivo (b y d), control agua negativo (c)	40
Figura 6. <i>Bacillus subtilis</i> SCARA3h1 formó un halo de solubilidad del aceite residual automotriz en agar (b), control (a).	41

Figura 8. Germinación de semillas de <i>Sorghum vulgare</i> potenciado con <i>Aspergillus niger</i> y <i>Penicillium chrysogenum</i> en la fitorremediación de suelo con 32,700 ppm de aceite residual automotriz	44
Figura 9. Altura de planta y longitud radicular de <i>Sorghum vulgare</i> potenciado con <i>Penicillium chrysogenum</i> y <i>Aspergillus niger</i> a plántula en la fitorremediación de suelo contaminado con 32,700 ppm de aceite residual automotriz.	46
Figura 10. Peso fresco aéreo y radicular de <i>Sorghum vulgare</i> potenciado con <i>Penicillium chrysogenum</i> y <i>Aspergillus niger</i> a plántula en la fitorremediación de suelo contaminado con 32,700 ppm de aceite residual automotriz	47
Figura 11. Peso seco aéreo y radicular de <i>Sorghum vulgare</i> potenciado con <i>Penicillium chrysogenum</i> y <i>Aspergillus niger</i> a plántula en la fitorremediación de suelo contaminado con 32,700 ppm de aceite residual automotriz	49
Tabla 12. Concentración de aceite residual automotriz en suelo bioestimulado con dodecil sulfato de sodio/alcohol etoxilado (0.5%), H ₂ O ₂ (0.5%), extracto fúngico, solución mineral, humedad a 80% de la capacidad de campo y fitorremediación mediante <i>Sorghum vulgare</i> a plántula potenciado con <i>Aspergillus niger</i> y <i>Penicillium chrysogenum</i>	49
Figura 12. Altura de planta y longitud de raíz de <i>Sorghum vulgare</i> potenciado con <i>Penicillium chrysogenum</i> y <i>Aspergillus niger</i> a prefloración en la fitorremediación de suelo contaminado con 32,700 ppm de aceite residual automotriz.	52
Figura 13. Peso fresco aéreo y de raíz de <i>Sorghum vulgare</i> potenciado por <i>Penicillium chrysogenum</i> y <i>Aspergillus niger</i> a prefloración en la fitorremediación de suelo contaminado con 32,700 ppm de aceite residual automotriz.	53
Figura 14. Peso seco aéreo y radicular de <i>Sorghum vulgare</i> potenciado con <i>Penicillium chrysogenum</i> y <i>Aspergillus niger</i> a prefloración en la fitorremediación de suelo contaminado 32,700 ppm de aceite residual automotriz.	55
Tabla 13. En suelo con 32,700 de aceite residual automotriz concentración de PO ₄ ⁼ soluble derivado de la bioestimulación y fitorremediación	55
Tabla 14. Concentración de aceite residual automotriz en suelo después de 90 días de fitorremediación mediante <i>Sorghum vulgare</i> potenciado con <i>Aspergillus niger</i> y <i>Penicillium chrysogenum</i>	57
6. Conclusión.....	59
7. Bibliografía.....	60

Resumen

La contaminación de suelo por 60,000 ppm de aceite residual automotriz (ARA) es un residuo peligroso (LEGEEPA, 2004) y excede la máxima concentración de 4,400 ppm según la NOM-138-SEMARNAT-SSAI-2012 (NOM-138). Una alternativa solución es la bioestimulación (BIS) y fitorremediación (FITO). La hipótesis de la investigación fue que la BIS del suelo con 60,000 ppm de ARA con detergente (DEGE), H₂O₂, extracto fúngico crudo (EFUC), solución mineral (SOMI), PO₄⁼ (fosfatos) solubles y control de humedad a 80%, seguida de FITO por *Sorghum vulgare* mediante *Penicillium chrysogenum* y *Aspergillus niger* reducirá el ARA a valor menor al máximo aceptado por la NOM-138. Los objetivos fueron: a) La BIS de suelo con 60,000 ppm de ARA, con DEGE, H₂O₂, EFUC, SOMI, PO₄⁼ soluble, control de humedad al 80%. b) Identificación de poblaciones bacterianas productoras de DEGE de suelo con ARA. c) FITO por *S. vulgare* con *P. chrysogenum* y *A. niger* para reducir el ARA a valor menor al máximo aceptado por la NOM-138. El suelo con ARA se bioestimulo y fitorremedio, el ARA remanente se midio por Soxhlet, se seleccionaron poblaciones bacterianas productoras de detergente en suelo con ARA y determinación de la fenología y biomasa del *S. vulgare* en la FITO. Resultados mostraron que la BIS de suelo con 60,000 ppm de ARA/8 semanas lo disminuyó 32,700 ppm. Se identificaron actinomicetos, firmicutes y proteobacterias productores de DEGE y la FITO mediante *S. vulgare* con *A. niger* y *P. chrysogenum* lo redujo de 32,700 ppm a 2,649 ppm valor menor al máximo señalado por la NOM-138. Esto demuestra que la integración de BIS y FITO en suelo con relativa alta concentración de ARA fue efectiva para remediarlo.

Palabras clave: detergente, solución mineral, extracto fúngico, *S. vulgare.*, *A.niger*

Abstract

Soil contaminated with 60,000 ppm of waste motor oil(WMO) is a hazardous waste (LEGEEPA, 2004) and exceeds the maximum concentration of 4,400 ppm according to NOM-138-SEMARNAT-SSAI-2012 (NOM-138) An alternative solution is the biostimulation (BIS) and phytoremediation (PHYTO). The hypothesis of the study was BIS of contaminated soil by 60,000 ppm of WMO with detergent (DEGE), H₂O₂, fungal extract crude (FUEX), mineral solution (MISO), soluble concentration of PO₄³⁻ (phosphates) and humidity control at 80% and FITO using *Sorghum vulgare* inoculated with *P. chrysogenum* y *A. niger* at value below the maximum permitted by NOM-138. The aims of the work were: a) BIS of contaminated soil by 60,000 ppm of WMO with DEGE, H₂O₂, FUEX, MISO, soluble concentration of PO₄³⁻ and humidity control at 80%. b) Identification of bacterial populations producing DEGE from soil with ARA. c) PHYTO using *S. vulgare* with *P. chrysogenum* and *A. niger* at value below the maximum permitted by NOM-138. The soil contaminated with WMO was treated by BIS and FITO, the residual WMO was quantified by Soxhlet, they were selected DEGE-producing bacterial populations in soil with WMO, phenology and biomass of *S. vulgare* were determined during PHYTO. Results showed that the BIS of soil which contains 60,000 ppm of WMO/8 weeks decreased to 32,700 ppm. Actinomycetes, firmicutes and proteobacteria DEGE-producing were identified. The subsequent PHYTO using *S. vulgare* with *A. niger* y *P. chrysogenum* decreased to 2,649 ppm value below the maximum permitted by NOM-138-SEMARNAT/SSAI-2012. This shows that the integration of the BIS and PHYTO of soil with relative high concentration of WMO is an effective remediation alternative.

Keys words: mineral solution, detergent, H₂O₂, fungal extract, *S. vulgare*.

1. Introducción y antecedentes

El ARA es un residuo peligroso porque contamina el ambiente (Rosales, 2008) de acuerdo con la Ley General de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente (LGEEPA, 2008) y que es un riesgo para la salud humana. El suelo contaminado con 60,000 ppm de aceite residual automotriz (ARA) es una concentración relativamente alta de hidrocarburos (HICO) de acuerdo al límite máximo permisible por la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2003 de 4,400 ppm (NOM-138). El ARA es mezcla de moléculas insolubles de HICO alifáticos de cadenas de entre C11-C20 y de C20-C35, al igual que de aromáticos, policíclicos, halogenados, (García, 2007) y aditivos (Tabla 1). El ARA se genera en los talleres mecánicos y en la maquinaria agrícola, cuando es vertido al suelo forma una película en la superficie que impide el intercambio de O₂ (oxígeno) e inhibe los ciclos biogeoquímicos que sustentan la vida, así como la difusión de agua y O₂ (Larenas & de Viana, 2005). Lo anterior limita la producción agrícola (Pardo *et al.*, 2004) además en suelo se infiltra hacia el agua subterránea y la contamina (Rosales, 2008; Cando, 2011).

Algunas alternativas de solución son, a concentraciones mayores de 50,000 ppm métodos químicos de remediación (Delgadillo-López *et al.*, 2011) con la desventaja de que generan residuos también contaminantes y de alto costo. Cuando la concentración de ARA fluctúa entre 10,000 y 50,000 ppm se han empleado biológicos como la bioestimulación (BIS) que explota el potencial microbiano nativo con minerales básicos de N (nitrógeno) y P (fosforo) que estimulan la mineralización

los HICO del ARA. La BIS requiere de diversas acciones para reducir el ARA a valores inferiores al máximo permisible por la NOM-138:

- 1) En suelo la emulsificación del ARA con detergente, pues la mezcla es insoluble. El detergente los solubiliza y permite que los microorganismos los mineralicen.
- 2) En suelo la adición de una fuente de O₂ como el H₂O₂ a baja concentración para la oxidación de los HICO del ARA (Pardo *et al.*, 2004).
- 3) Adición en el suelo de extracto fúngico crudo (EFUC) con lacasa de *Penicillium chrysogenum* (Benitez, 2015) que degrada los HICO aromáticos.
- 4) El enriquecimiento en suelo con solución mineral (SOMI) para la mineralización de los HICO (Pinto *et al.*, 2006) y para el restablecimiento del equilibrio C-N, causada por el exceso de ARA.
- 5) Asegurar el control de la humedad del suelo a 80% de la capacidad de campo para facilitar la aereación y la oxidación del ARA.

En suelo los puntos anteriores son esenciales para hacer eficiente la BIS de suelo con 60,000 ppm de ARA, a esa alta concentración y acelerar la fitorremediación (FITO) mediante *Sorghum vulgare* inoculado con *Aspergillus niger* y *Penicillium chrysogenum*, microorganismos promotores de crecimiento vegetal que en sus raíces mineralizan los HICO complejos del ARA (García, 2007).

Tabla 1. Principales componentes de los aceites residuales.

Composición promedio de un aceite residual	
Hidrocarburos totales (85-75%)	
Alcanos	45-76
Ciclo alcanos	13-45
Aromáticos	10-30
Aditivos (15-25%)	
Antioxidantes	Ditiofosfatos, fenoles, aminas
Detergentes	Sulfonatos, felonatos, fosfonatos
Anticorrosivos	Ditiofosfatos de zinc y bario, sulfonatos
Antiespumantes	Siliconas, polímeros sintéticos.

Rosales, 2008

Existen escasas investigaciones que emplean BIS o FITO de suelos contaminados con HICO por detergentes para su reducción como única estrategia, pero solo lo decrecen parcialmente sin tomar en cuenta que es insuficiente por si solo para eliminarlo por debajo de los 4400 ppm que es el límite máximo permisible de HICO en suelos señalado por la NOM-138 tal como lo reportan:

Merkl *et al.*, 2005, reportaron la FITO de un suelo contaminado con 50,000 ppm de petróleo por *Brachiaria brizantha* que lo redujo a 31,000 ppm, por su parte *Eleusine indica* lo disminuyó a 30,000 ppm después de 120 días, valores que no se encuentran por debajo del límite máximo de acuerdo a la NOM-138.

Mancera-López *et al.*, 2008, bioestimularon un suelo contaminado con 60,600 ppm de HICO totales del petróleo, por BIS con bagazo de caña y SOMI que contenía: $MgSO_4$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, $NH_4_2SO_4$ y KH_2PO_4 durante 35 días. Los resultados mostraron que la BIS de suelo redujo la concentración de HICO de 60,600 ppm a 41,972 ppm, mientras que en el suelo control con HICO sin BIS la atenuación natural lo minimizó 1,722 ppm. Lo que indica que la concentración de HICO aun está por encima del máximo establecido por la NOM-138.

Millioli *et al.*, 2009, bioestimularon un suelo contaminado con 50,000 ppm de petróleo por SOMI y un biosurfactante a base de ramnolipidos, que después de 45 días redujeron el petróleo a 20,000 ppm; valor evidentemente superior al máximo permitido por la NOM-138.

Tanee y Akonye, 2009, fitorremediaron un suelo contaminado con 50,000 ppm de petróleo por *Vigna unguiculata* que lo minimizó a 6,000 ppm después de 60 días, lo que señala que el suelo aun está contaminado ya que la concentración de petróleo no se redujo por debajo de la máxima permitida por la NOM-138.

Lo anterior sustenta que, debido a las mínimas investigaciones y opciones de solución a la contaminación del suelo, es necesario el mejoramiento de la integración de BIS de suelo con relativa elevada concentración de ARA con detergentes para su emulsificación, H_2O_2 como fuente de O_2 (oxígeno), EFUC, SOMI y control de la humedad a 80% de la capacidad de campo para reducir el ARA

para la FITO con una planta tolerante a altas concentraciones de HICO, potenciada con microorganismos promotores de crecimiento vegetal.

2. Hipótesis

La bioestimulación de suelo con 60,000 ppm de aceite residual automotriz por detergente, H₂O₂, extracto fúngico crudo, solución mineral, la concentración de PO₄⁼, control de la humedad a 80% de la capacidad de campo y la fitorremediación con *S. vulgare* potenciado con *P. chrysogenum* y *A. niger* reducirá el ARA a valor inferior al máximo aceptado por la NOM-138.

3. Objetivos

- a) La bioestimulación de un suelo contaminado con 60,000 ppm de ARA con detergente, H₂O₂, extracto fúngico crudo, solución mineral, concentración de PO₄⁼, control de la humedad a capacidad de campo al 80%.
- b) Aislar e identificar poblaciones bacterianas de un suelo con 45,000 ppm de ARA.
- c) Fitorremediación mediante *S. vulgare* con *P. chrysogenum* y *A. niger* para minimizar el ARA a un valor menor al máximo aceptado por la NOM-138.

4. Materiales y métodos

4.1 En suelo contaminado por aceite residual automotriz con y sin materia orgánica, determinación de las concentraciones de detergente y H₂O₂ para emulsificar y mineralizar los HICO del ARA.

Se realizaron pruebas en matraces Bartha (Leal, 2003) con 100 g de suelo pulverizado y tamizado contaminado con 60,000 ppm de ARA. La humedad se mantuvo a capacidad de campo del 80% y se bioestimuló de 1 a 2 veces a la semana con alcohol etoxilado/anioncio dodecil sulfato de sodio (ALEDOS), alcohol etoxilado (ALETO) y H₂O₂ respectivamente al 0.5% y 0.1% por 30 días (Tabla 2). En el suelo la mineralización del ARA se determinó por la captación de CO₂ (dióxido de carbono) en álcali, con 10 ml de NaOH 0.1 N en uno de los reservorios del matraz, 1 gota de fenolftaleína como indicador de pH, se tapó la entrada del matraz y los reservorios con tapones de hule. El matraz tuvo una trampa para el CO₂ atmosférico, mientras que el derivado de la BIS se tituló con HCl 0.1 N cada 3 días. En el suelo se calculó la cantidad de CO₂ desprendido por 100 g⁻¹ suelo seco (Ruiz, 2001). En suelo se repitió el experimento, pero sin materia orgánica, que se eliminó con H₂O₂ al 6% para descartar producción de CO₂ derivada de ella (Fernández *et al.*, 2006).

Tabla 2. Diseño experimental en suelo para la evaluación de la concentración y el mejor tipo de detergente en la solubilización del ARA medido por la producción de CO₂ con control de la humedad a 80% capacidad de campo.

Suelo + 60,000 ppm ARA	Detergente anionico: alcohol etoxilado		Detergente mixto iónico/anionico: alcohol etoxilado y dodecil sulfato de sodio		H ₂ O ₂	
	0.5%	0.1%	0.5%	0.1%	0.5%	0.1%
Control negativo	-	-	-	-	-	-
T1	+	-	-	-	+	-
T2	-	+	-	-	-	+
T3	-	-	+	-	+	-
T4	-	-	-	+	-	+
T5	-	-	-	-	+	-
T6	-	-	-	-	-	+

+ se agregó – no se agregó

4.2 Caracterización fisicoquímica del suelo.

El suelo se tamizó y se aplicaron las técnicas de caracterización físico-química del suelo como pH, materia orgánica, nitrógeno total, humedad, y fósforo aprovechable, de acuerdo a la: NOM-021-RECNAT-2000, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad, clasificación de suelos, estudios, muestreo y análisis.

4.3 Bioestimulación del suelo contaminado con 60,000 ppm ARA con detergente, H₂O₂, extracto fúngico crudo, solución mineral y control de la humedad a 80% de la capacidad de campo.

Se realizó en el sistema hidropónico de las jarras de Leonard con aproximadamente 900 g de suelo con 60,000 ppm de ARA con el tipo de detergente y H₂O₂ a las concentraciones adecuadas para favorecer la mayor solubilidad y oxidación de ARA

determinadas en la primera fase, EFUC, SOMI y control de humedad al 80% de la capacidad de campo. En la parte inferior de la jarra se bioestimuló el suelo con SOMI con la composición (g/L): NH_4Cl , 12.0; KH_2PO_4 , 3.0; K_2HPO_4 , 3.5; MgSO_4 , 1.5; CaCl_2 , 0.1; FeSO_4 , 0.5ml y una solución de oligoelementos, 1.5 ml/L, el pH se ajustó a 6.4-6.7 (Leal, 2003), y agua de la llave para el suelo sin ARA usado como control absoluto (CA) (García-González *et al.*, 2005).

Para la BIS con EFUC, se uso *Penicillium chrysogenum* de la colección de hongos del Laboratorio de Microbiología Ambiental del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la UMSNH. *P. chrysogenum* que se cultivó en caldo con lignina residual de paja de trigo (LIREPATO) como fuente de carbono y energía, con la siguiente composición (g/L): LIREPATO, 10,0; peptona de soya, 5.0; CuSO_4 , 0.01; MgSO_4 , 1.5; KH_2PO_4 , 1.5; K_2HPO_4 , 1.5; NaCl , 0.9; extracto de levadura, 1.0; detergente Roma® al 1%, 2.5 mL; solución de oligoelementos 0.001 mL; azul de bromotimol al 0.1%, 10,0 mL; pH ajustado a 5.5. Se incubaron por 20 días a 28°C en agitador (Thermo Scientific MaxQ 4000) a 150 rpm con pH 5.5 ± 0.2 . Se filtró el LIREPATO con los hongos con bomba de vacío (Power electric) para obtener EFUC y se ajustaron a pH de 6.5 ± 0.2 con potenciómetro HANNA instruments (Benítez, 2015). El extracto fúngico extraído se incorporó al suelo contaminado con 60,000 ppm de ARA, y posteriormente SOMI (Tabla 3).

Tabla 3. Diseño experimental de la bioestimulación de un suelo contaminado con 60,000 ppm de aceite residual automotriz.

Suelo	Aceite residual automotriz 60,000 ppm	Bioestimulación			
		Detergente no iónico (alcohol etoxilado)/anionico (dodecil sulfato de sodio) (0.5%)	H ₂ O ₂ al 0.5%,	Extracto fúngico crudo	Solución mineral
Control absoluto irrigado con agua	-	-	-	-	-
Control relativo solución mineral	-	-	-	-	-
Control negativo	+	-	-	-	-
T1	+	+	+	+	+
T2	+	+	+	+	+

+ se agregó – no se agregó

4.3.1 Producción del extracto fúngico crudo de *Penicillium chrysogenum*; medición de la actividad lacasa.

Las muestras con *P. chrysogenum* fueron centrifugadas a 8000 rpm a 4 °C por 15 minutos para eliminar el micelio. La actividad Lacasa se midió en espectrofotómetro (Hach DR 2500) mediante la oxidación del ácido 2.2'-acino-bis-3-etil benzotiazolin-6-sulfónico (ABTS) a 420 nm, 25 °C, con un coeficiente de extinción molar de $\epsilon_{420}=36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Se preparó una mezcla de reacción con 2.4 mL de buffer

acetato de sodio 25 mM, pH 3.0, 300 μ L de ABTS 10 mM y 300 μ L de la muestra (Palmieri *et al.*, 1997; Ibrahim *et al.*, 2011; Baltierra-Trejo *et al.*, 2016). La actividad lacasa se convirtió a unidades enzimáticas internacionales (IU) con la siguiente formula:

$$IU(1^{-1}) \frac{(\Delta A)(Vt)(10^6)}{(t)(\epsilon)(b)(Vm)}$$

Donde:

IU = actividad lacasa (μ mol min^{-1})

ΔA = absorbancia final - absorbancia inicial

Vt = Volumen total de la reacción (mL)

10^6 = conversión de mol a μ mol

t = Tiempo de reacción (min)

ϵ = Coeficiente de extinción molar ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

b = Trayectoria óptica (1.0 cm)

4.4 En suelo determinación de la concentración de aceite residual automotriz por Soxhlet.

Se realizó por Soxhlet antes y al final de la BIS del suelo con ARA como variable respuesta de su reducción (Infante *et al.*, 2010)

4.5 En suelo concentración de PO_4^{3-} (fosfatos) solubles.

Al finalizar la fase de la BIS se midió la concentración de fosfato soluble en el suelo como variable respuesta de la mineralización del ARA (NOM-021-RECNAT-2000)

El fósforo (P) es un elemento esencial para la vida, las plantas lo necesitan para crecer, además los fosfatos desempeñan un papel esencial en los procesos de transferencia de energía y el metabolismo (Salazar, 2005), sin embargo, el fosforo soluble es un compuesto limitado en el suelo (Hameeda et al., 2006; Bobadilla & Rincon, 2008).

4.6 En suelo densidad de la población bacteriana oxidante de aceite residual automotriz, aislamiento *in vitro* e identificación de bacterias productoras de detergentes.

Se tomó un gramo de suelo de cada tratamiento, se diluyó en solución salina con detergente (NaCl / detergente comercial al 0.1%). Se hicieron diluciones decimales 10^{-1} a 10^{-10} pero solo se usó de la 10^{-5} a 10^{-8} (Mercadé *et al.*, 1996; Walter *et al.*, 2010). Luego se tomó de 0.1 a 0.2 ml de muestra y se colocó en agar ARA (Willumsen & Karlson, 1997; Walter *et al.*, 2010) con la siguiente composición (g/L): peptona de caseína 5, extracto de levadura 1, KH_2PO_4 2.5, KHPO_4 2.5, MgSO_4 2.5, NaCl 1, solución de oligoelementos 1 ml, azul de bromotimol al 0.01% 5ml, aceite residual automotriz 10 ml, detergente al 0.5% 4 ml /100 ml ARA, pH ajustado a 7.0 incubado por 48 horas; las colonias que mostraron crecimiento con la dilución 10^{-6} fueron después resembradas en agar nutritivo y nuevamente en agar ARA para su purificación y extracción de ADN y su posterior identificación molecular (Villalba, 2013).

4.6.1 Determinación de la síntesis de detergentes *in vitro* por la técnica “Drop-collapse” en bacterias oxidantes de aceite residual automotriz.

Se realizó para determinar la producción de detergentes por las bacterias aisladas del suelo contaminado con ARA en microplacas de poliestireno de 96-micropozos (12.7 x 8.5 cm) con diámetro cada uno de 8 mm (Bodour *et al.*, 1998). Antes de usarse cada micropozo fue lavado tres veces con agua caliente, etanol, agua destilada y posteriormente secadas. Para la prueba cualitativa cada pozo fue cubierto con aceite de motor 10W-40 Pennzoil® (1.8 µL), para la cuantitativa se usaron 2 µL de aceite mineral y posteriormente se equilibraron por 1-2 horas. Para ambas pruebas fue introducida una alícuota de 5 µL de muestra en medio líquido ARA en el centro de cada microplaca a un ángulo de 45°. Para la prueba cualitativa los resultados fueron determinados visualmente después de 1 minuto. Si la gota mantuvo su forma, el resultado fue negativo de lo contrario el resultado fue positivo. Se realizaron tres repeticiones con un control que solo contenía agua. Para la cuantitativa después de 1 minuto se midió el diámetro de las gotas con un micrómetro calibrado (Bodour *et al.*, 2003).

4.6.2 Identificación molecular de las bacterias productoras de detergentes oxidantes de aceite residual automotriz.

Se realizó una extracción y purificación del ADN de los microorganismos que presentaron capacidad de sintetizar detergentes; después se procedió a su amplificación, con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), por amplificación de un fragmento del gen 16S rRNA a partir de cuya secuencia se obtiene la información filogenética y taxonómica de las bacterias oxidantes de ARA productoras de detergentes. Posteriormente se realizó electroforesis en gel de

agarosa del producto amplificado (Villalba, 2013) y finalmente se realizó la identificación molecular.

4.7 Fitorremediación de suelo con ARA mediante *Sorghum vulgare* potenciado con *Penicillium chrysogenum* y *Aspergillus niger*.

En el suelo contaminado con 60,000 ppm de ARA y bioestimulado con detergente ALEDOS, H₂O₂, EFUC, SOMI y con el control de la humedad a 80% de la capacidad de campo, se fitorremedió con *S. vulgare* inoculado con *P. chrysogenum* y *A. niger* en mezcla o individualmente para completar su remediación según se muestra en la Tabla 4, además el *S. vulgare* fue alimentado con solución mineral: (g/L): NH₄Cl, 12.0; KH₂PO₄, 3.0; K₂HPO₄, 3.5; MgSO₄, 1.5; CaCl₂, 0.1; FeSO₄, 0.5ml y una solución de oligoelementos, 1.5 ml/L, el pH se ajustó a 6.4-6.7 (Leal, 2003).

4.7.1 Activación de *P. chrysogenum*, *A. niger* e inoculación de semillas de *Sorghum vulgare* para la FITO del suelo con ARA.

Para la FITO del suelo con el ARA remanente las cepas de *P. chrysogenum* y *A. niger* se cultivaron en agar y caldo dextrosa y papa (ADP) con la fórmula: g/L: 4.0 de infusión de papa, 20.0 de dextrosa y 15.0 de agar, ajustado a pH de 5.6. El agar ADP se incubó a 30°C por 24 horas; después por cada 48 semillas de *S. vulgare* se inocularon con 5.0 mL de *P. chrysogenum* y *A. niger* individual/o en mezcla, se empleó la relación 1:1, la concentración bacteriana se ajustó con el tubo No. 1 del nefelómetro de Mc Farland equivalente a 3x10⁸ bacterias/mL (Roselene, 2014). Además, se agregó solución salina detergente y solución de azúcar al 30% en

agitación por 20 minutos, y se sembraron 4 semillas en cada jarra. (Sánchez-Yáñez, 2007).

Tabla 4. Diseño experimental de la fitorremediación de un suelo contaminado con 32,700 ppm de aceite residual automotriz remanente mediante *Sorghum vulgare* potenciado con *Penicillium chrysogenum* y *Aspergillus niger*.

Suelo	Aceite residual automotriz 60,000ppm	Aceite residual automotriz (remanente)	Fitorremediación por 3 meses		
			<i>Sorghum vulgare</i>	<i>P. chrysogenum</i>	<i>A. niger</i>
Control absoluto irrigado con agua	-	-	+	-	-
Control relativo alimentado con solución mineral	-	-	+	-	-
Control negativo	+	-	-	-	-
Extracto fúngico crudo/ solución mineral(T1)	-	+	+	+	-
Extracto fúngico crudo/ solución mineral (T2)	-	+	+	-	+
Extracto fúngico crudo/ solución mineral (T3)	-	+	+	+	+
Extracto fúngico crudo/ solución mineral (T4)	-	+	+	-	-

+ se agregó – no se agregó

Las variables respuestas de la FITO del suelo con ARA con *S. vulgare* fueron: el porcentaje de germinación a los 11 días; la fenotipia en plántula y prefloración. Se

midió la altura de la planta (AP) y longitud de raíz. (LR), su biomasa aérea y radicular: peso fresco (PFA), (PFR) y peso seco (PSA), (PSR). Del sorgo se pesó su parte aérea y la raíz total, para el peso fresco total; posteriormente ambas se secaron en un horno a 70°C/48 h para el peso seco (Boshchini, & Amador 2000). En cada estadio fisiológico del sorgo, se comparó su crecimiento con *S. vulgare* usado como control relativo (CR) en un suelo sin ARA, y alimentado con SOMI al 100%.

4.8 En suelo determinación de la concentración de aceite residual automotriz de la fitorremediación.

En el suelo cuando *S. vulgare* alcanzó la madurez fisiológica después de 90 días, se determinó la concentración de ARA por Soxhlet como variable respuesta de la eliminación del ARA (García-Hernández *et al.*, 2007).

4.9 En suelo biorremediado y fitoremediado, concentración de PO_4^{3-} (fosfatos) solubles.

Después del primer mes y al finalizar la fase de FITO se midió la concentración de fósforo disponible en el suelo que normalmente su disponibilidad en el suelo es baja y es un factor limitante en la degradación microbiana de hidrocarburos (Pardo *et al.*, 2004), como variable respuesta de la mineralización del ARA en suelo, que se hizo de acuerdo a la NOM-021-RECNAT-2000.

4.10 Análisis estadístico de los resultados

Los datos experimentales se analizaron por Tukey HSD al 0.05% y uso del programa Statgraphics Centurion XVI.II (Walpole *et al.*, 2007)

5. Resultados y discusión

Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas del suelo sin aceite residual automotriz.

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

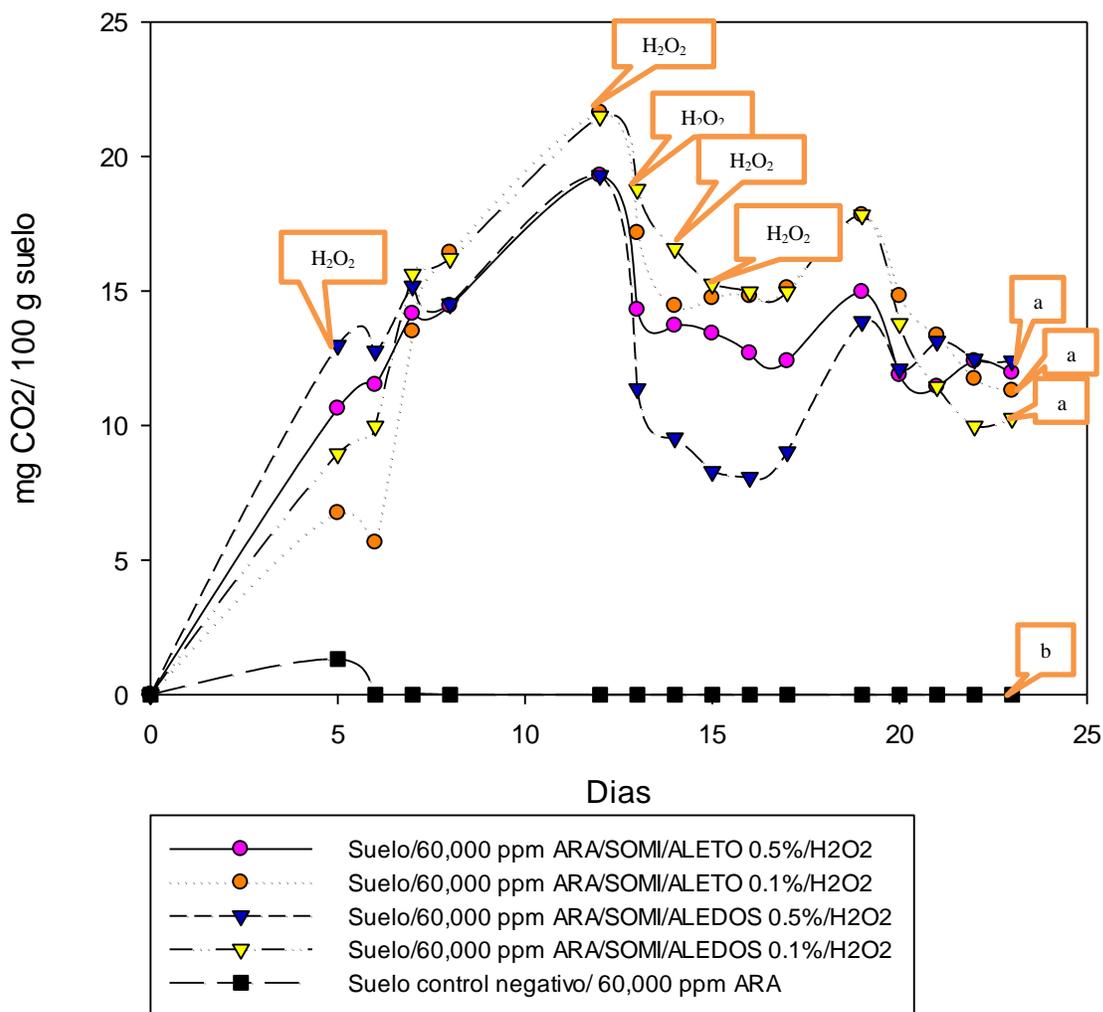
En la Tabla 5 se muestran las propiedades fisicoquímicas del suelo sin ARA, con un pH moderadamente ácido de 6.41, un bajo contenido de materia orgánica de 4.30%; alta capacidad de intercambio catiónico de 32.45 Cmol(+) Kg⁻¹, con una textura: arcilla 24%, limo 22% y arena 54% que corresponden a un suelo clasificado como franco-arcilloso-arenoso (Banks *et al.*, 2003; Basumatary *et al.*, 2012).

En la figura 1 se indica la BIS del suelo contaminado con 60,000 ppm de ARA por ALEDOS, ALETO y H₂O₂ al 0.5% y 0.1%, ahí se observó la generación de CO₂ con diferencia estadística comparado con la misma variable respuesta en el suelo control negativo (CN) con ARA con la atenuación natural sin cambio. El H₂O₂ al 0.1% y 0.5% en el día 5 contribuyó al aumento en la mineralización del ARA y con producción de CO₂ hasta el día 12; en la segunda BIS con H₂O₂ al 0.5% y 0.1%, se observó un decremento en la generación de CO₂, lo que sugiere el consumo de la fracción alifática del ARA (Pinto *et al.*, 2006). Lo anterior indica que la BIS con

ALEDOS, ALETO, H₂O₂ y el control de humedad al 80% de la capacidad de campo; indujo que inicialmente se mineralizaran los HICO alifáticos sencillos y posteriormente los ramificados, luego los aromáticos, en consecuencia, hubo al final disminución de la cantidad de CO₂ generado (Pinto *et al.*, 2006). Posteriormente la BIS con H₂O₂ al 0.5% y 0.1% en los días 13, 14 y 15 sin registro del incremento en la producción de CO₂.

La Tabla 6 demuestra que la BIS de suelo con ALEDOS y H₂O₂ al 0.5% redujo el ARA de 60,000 ppm a 27,204 ppm y con ALETO a 28,104 ppm, ambos valores fueron estadísticamente diferentes en comparación al mismo suelo con ARA bioestimulado con ALEDOS y H₂O₂ al 0.1%, ahí el ARA disminuyó a 30,204 ppm, valor estadísticamente diferente registrado en el suelo CN con la atenuación natural que solo lo disminuyó 8,800 ppm de ARA. Lo anterior indica que los detergentes solubilizaron los HICO por sorción en las superficies del suelo y después por la formación de micelas (Zhon-Yi *et al.*, 2013) para que los microorganismos autóctonos mineralizaran el ARA (Riojas *et al.*, 2010).

Figura 1. En suelo producción de CO₂ derivado de la mineralización del aceite residual automotriz por bioestimulación con detergente dodecil sulfato de sodio/alcohol etoxilado, alcohol etoxilado, H₂O₂, solución mineral y control de la humedad a capacidad de campo al 80%.



*Tukey (0.025) Letras iguales= sin diferencia estadística. ALETO: alcohol etoxilado. ALEDOS: dodecil sulfato de sodio/alcohol etoxilado.

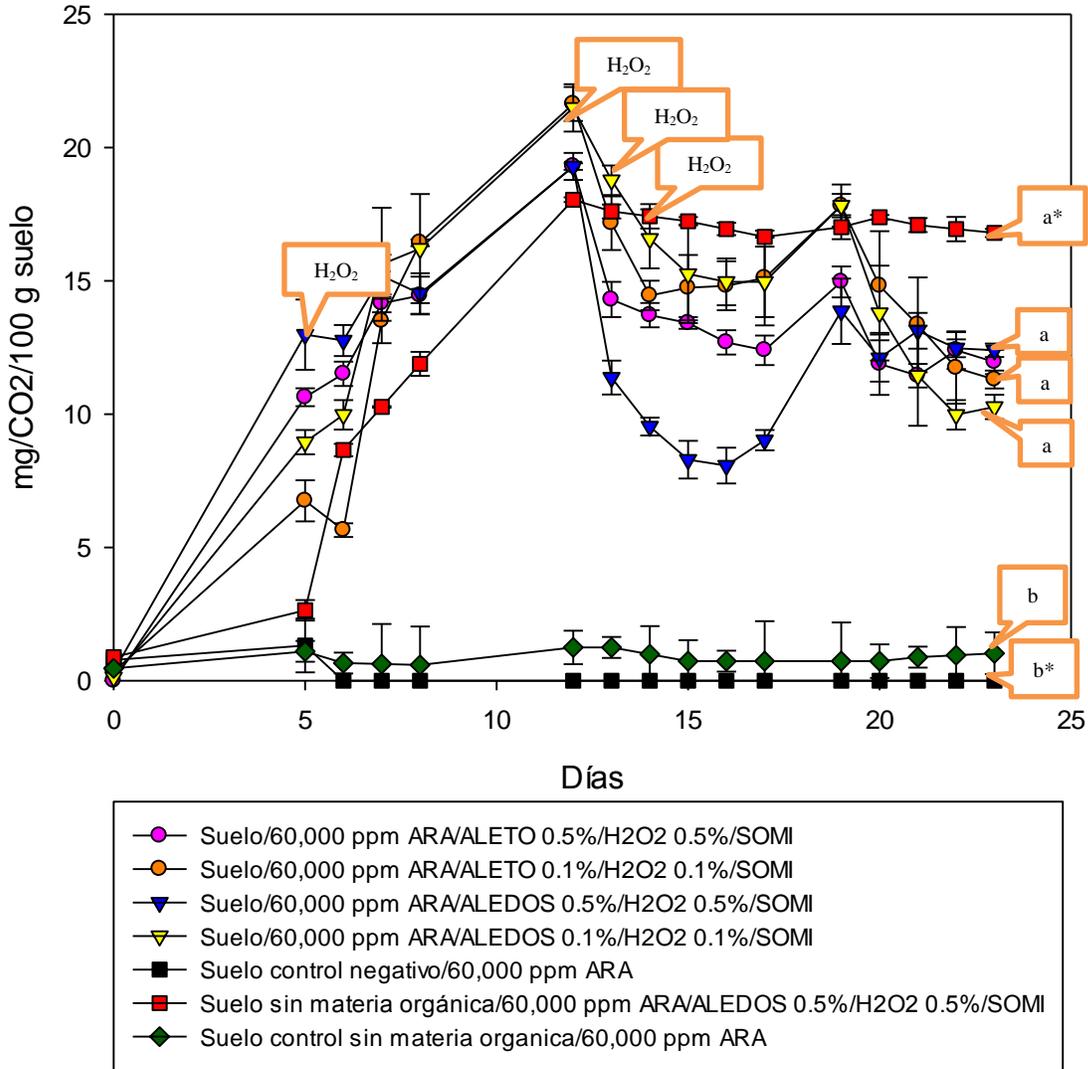
Tabla 6. En suelo concentración de aceite residual automotriz producto de la bioestimulación con alcohol etoxilado/dodecil sulfato de sodio, alcohol etoxilado H₂O₂, solución mineral y control de la humedad a capacidad de campo al 80%.

Suelo + 60,000 ppm de aceite residual automotriz	Aceite residual automotriz (ppm) en el suelo después de 23 días de bioestimulación
Control negativo	52,200 ^d
ALETO y H ₂ O ₂ , 0.1%	32,100 ^c
ALETO y H₂O₂ 0.5%	28,100^a
ALEDOS y H ₂ O ₂ 0.1%	30,200 ^b
ALEDOS y H₂O₂ 0.5%	27,200^{a*}

ALETO: alcohol etoxilado, ALEDOS: alcohol etoxilado/dodecil sulfato de sodio *Tukey (0.025): Letras iguales= sin diferencia estadística

En suelo, los detergentes mixtos mezclas aniónicos y no iónicos como el ALEDOS fueron eficaces para la desorción de los HICO del ARA en comparación con las mezclas de detergentes aniónicos y catiónicos o de catiónicos y no iónicos comúnmente empleados en la solubilización de HICO (Fujii *et al.*, 1986; Altmajer, 2004). El detergente no iónico ALETO con alcohol etoxilado, solubilizó el ARA mejor que los aniónicos como lo reportaron Pinto *et al.*, (2006) que bioestimuló un suelo contaminado con 5561 ppm de diésel con Tween 80 y lo emulsificó para disminuirlo a 3030.74 ppm. En suelo con ARA las concentraciones del detergente al 0.5% y 0,1% emulsificaron los HICO por una acción atribuida a la mayor formación de micelas disponibles para su solubilización (Shi *et al.*, 2013), además la adición de H₂O₂ a esas concentraciones mineralizaron el ARA (Asquith *et al.*, 2012). Lo anterior apoya que la BIS del suelo con un detergente adecuado debe emulsificar las fracciones alifáticas y luego las aromáticas para su oxidación (Riojas *et al.*, 2010).

Figura 2. En suelo con y sin materia orgánica contaminado con 60,000 ppm de aceite residual automotriz, producción de CO₂ derivado de la bioestimulación con detergentes al 0.1% y 0.5%, H₂O₂ al 0.1% y 0.5%, solución mineral y control de la humedad a capacidad de campo al 80%.

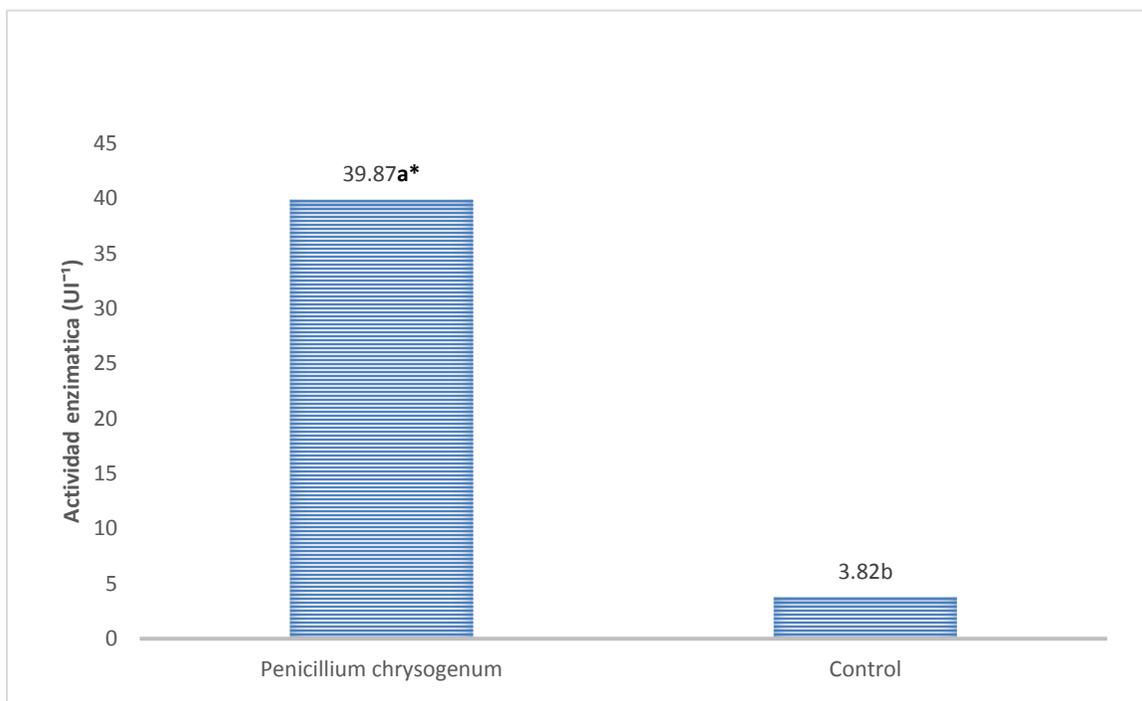


*Tukey (0.025) Letras iguales= sin diferencia estadística. ALETO: alcohol etoxilado. ALEDOS: dodecil sulfato de sodio/alcohol etoxilado.

En la Figura 2 se muestra la BIS de suelo contaminado con 60,000 ppm de ARA, con y sin materia orgánica por ALEDOS, ALETO y H₂O₂ al 0.5% y SOMI, con H₂O₂ al inicio y posteriormente cada 7 días.

Se observó que, en la BIS del suelo con ARA, el detergente generó la mayor producción de CO₂ del día 2 hasta el 11, por la solubilización de los HICO con la eliminación de la tensión superficial para su oxidación (Zacarías-Salinas *et al.*, 2013) y mineralización de los HICO del ARA. Similarmente Fujii *et al.*, 1986; Altmajer, 2004 reportaron en suelo contaminado por HICO, el detergente no iónico/anionico como el ALEDOS fue mejor para desorción de HICO; en comparación con las mezclas de anionicos y catiónicos o mezclas de catiónicos y no iónicos. El H₂O₂ facilitó la oxidación del ARA, mientras que la SOMI con las sales de N, P, y K reestablecieron el equilibrio C: N (Alexander, 1980) resultado de la contaminación por el ARA (Vallejo *et al.*, 2005). Lo anterior indica que en el suelo inicialmente se mineralizaron los HICO alifáticos entre los días 2 y 11 con la mayor producción de CO₂ para luego decrecer por la aromática del ARA (Riojas *et al.*, 2010).

Figura 3. Actividad lacasa de *Penicillium chrysogenum* en lignina residual de paja de trigo.



*Tukey (0.025) Letras iguales= sin diferencia estadística

En la figura 3 se observa la actividad lacasa de *P. chrysogenum* antes de aplicarlo al suelo para bioestimular la degradación del ARA, ahí se registró la actividad lacasa de 39.8 UI⁻¹ valor estadísticamente diferente al control sin hongo sin generación de actividad lacasa. Ello indica que la lacasa producida por *P. chrysogenum* despolimeriza la lignina en compuestos aromáticos que posteriormente se transforman en ácidos orgánicos. (Baltierra-Trejo *et al.*, 2016). La lignina tiene una estructura similar a los compuestos aromáticos de los HICO, lo que supone que ocurre el mismo mecanismo con el ARA al fraccionarse en HICO mas sencillos.

Tabla 7. En suelo concentración de aceite residual automotriz derivado de 8 semanas de bioestimulación con detergente ALEDOS (0.5%), H₂O₂ (0.5%), extracto fúngico crudo, solución mineral y control de humedad a capacidad de campo al 80%.

Suelo + 60,000 ppm de aceite residual automotriz	Aceite residual automotriz (ppm) en el suelo después de 8 semanas de BIS
Control negativo:	60,000 ppm ^b
ALEDOS (0.5%) + H₂O₂ (0.5%) + extracto fúngico crudo + solución mineral + control de humedad a 80% capacidad de campo.	32,700 ppm^a

*Tukey (0.025) Letras iguales= sin diferencia estadística. ALEDOS: dodecil sulfato de sodio/alcohol etoxilado

La tabla 7 muestra la BIS de suelo contaminado con 60,000 ppm de ARA por ALEDOS, H₂O₂, EFUC y SOMI que lo decrecieron a 32,700 ppm, valor estadísticamente diferente al mismo suelo control negativo sin BIS, donde la reducción fue nula. En suelo bioestimulado con ALEDOS se solubilizó el ARA, (Mohamed y Mahfoodh, 2006; Parekh *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2012), dicho detergente con una molécula de sulfato de sodio en su estructura desorbió los HICO alifáticos y así se solubulizaron (Piña, 2012). ALEDOS contiene un surfactante no iónico alcohol etoxilado que forma puentes de hidrogeno con el agua, esto facilita que las micelas de detergente se transporten en la fase acuosa del suelo y permite una eficaz solubilización del ARA (Riojas-González *et al.*, 2011). Mientras que la aplicación semanal de O₂ por H₂O₂ facilitó la oxidación de los HICO del ARA (Pinto *et al.*, 2006). El control de la humedad a 80% de la capacidad de campo fue importante para facilitar la circulación del agua y gases a través de los poros del suelo, necesarios para la mineralización aeróbica de los HICO (Jaramillo, 2002). Mientras que la lacasa del EFUC degradó los HICO aromáticos del ARA y la SOMI

que contiene compuestos inorgánicos de N y P, facilitaron la oxidación del ARA por los microorganismos autóctonos aerobios heterotróficos (Riojas *et al.*, 2010).

Tabla 8. En suelo densidad de la población bacteriana oxidante de aceite residual automotriz.

Suelo	UFC x 10 ⁶ /g suelo seco
Suelo sin aceite residual automotriz (Control absoluto)	40 ^{b*}
Suelo con 60,000 ppm de aceite residual automotriz	268 ^a

*Tukey (0.025) Letras distintas= con diferencia estadística

En la Tabla 8, en suelo se muestra la densidad de la población bacteriana oxidante de ARA, que con 60,000 ppm de ARA se registró de 268 UFC X 10⁶/g suelo, valor estadísticamente diferente a la misma población del suelo control absoluto sin ARA con 40 UFC X 10⁶/g suelo. Resultados similares fueron reportados por Zamora *et al.*, 2012 que registraron un aumento significativo en la densidad de bacterias en el suelo con HICO de crudo mediano respecto al mismo suelo control. Garzon *et al.*, 2011 mostraron el incremento en la densidad microbiana de un suelo con HICO totales del petróleo, respecto al mismo suelo CA, donde la población oxidante de HICO metaboliza primero las fracciones mas sencillas de los HICO. Resultados similares han sido reportados por Venosa y Zhu en el 2003, quienes determinaron

que la degradación de HICO genera compuestos intermediarios mas sencillos que son mineralizados por diferentes grupos de microorganismos del suelo.

Tabla 9. En suelo con 60,000 de aceite residual automotriz concentración de $PO_4^{=}$ derivado de la bioestimulación.

Suelo + 60,000 ppm aceite residual automotriz	Fosfato soluble (%)
Control absoluto	0.30 ^{a*}
Detergente alcohol etoxilado y dodecil sulfato de sodio (0.5%) + H_2O_2 (0.5%) + extracto fúngico crudo + solución mineral + control de la humedad al 80% de la capacidad de campo.	0.18 ^b

*Tukey (0.025) Letras iguales= sin diferencia estadística

En la tabla 9 se indica en suelo con 60,000 ppm de ARA bioestimulado con ALEDOS, H_2O_2 , EFUC, SOMI, y el control de la humedad a 80% de la capacidad de campo, la concentración $PO_4^{=}$ solubles como variable respuesta de la mineralización del ARA, donde se reportó un valor de 0.18% que fue estadísticamente diferente al mismo suelo sin ARA usado como CA con 0.3%, esta disminución respecto al CA se debe a que fueron consumidos al aumentar su disposición en el suelo por la BIS del suelo contaminado, que activa la microbiota del suelo para solubilizar los fosfatos mediante la producción de ácidos orgánicos (Alexander, 1980). Resultados similares reportados por Trujillo-Narcia *et al.*, en el 2012, donde el $PO_4^{=}$ soluble fue menor en suelo contaminado con petróleo crudo comparado con el mismo suelo sin petróleo.

Tabla 10. Determinación de la síntesis de detergentes *in vitro* de actinomicetos, firmicutes y proteobacterias que mineralizan el aceite residual automotriz, por la técnica cualitativa “Drop-collapse”.

Actinomicetos oxidantes de aceite residual automotriz	Síntesis de detergente en caldo aceite residual automotriz	Proteobacterias oxidantes de aceite residual automotriz	Síntesis de detergente en caldo aceite residual automotriz
<i>Arthrobacter nicotinovorans</i> SCARA2h	+	<i>Achromobacter</i> sp SCARA6	+
<i>Gordonia amicalis</i> SCARA2f1	+	<i>Achromobacter</i> sp SCARA8	+
<i>Gordonia amicalis</i> SCARA1g2	+	<i>Achromobacter</i> sp SCARA1a	+
<i>Gordonia amicalis</i> SCARA2g	+	<i>Achromobacter</i> sp SCARA2a	+
<i>Gordonia amicalis</i> SCARA3g	+	<i>Achromobacter</i> sp SCARA3a	+
<i>Gordonia amicalis</i> SCARA5g	+	<i>Achromobacter</i> sp SCARA4a	+
<i>Gordonia amicalis</i> SCARA5g1	+	<i>Achromobacter</i> sp SCARA1d	+
<i>Gordonia amicalis</i> SCARA6g	+	<i>Achromobacter</i> sp SCARA2d	+
<i>Gordonia amicalis</i> SCARA8i	+	<i>Achromobacter</i> sp SCARA5d	+
<i>Janibacter limosus</i> SCARA4g	+	<i>Achromobacter</i> sp SCARA3f1	+
<i>Janibacter limosus</i> SCARA7g	+	<i>Achromobacter</i> sp SCARA6f1	+
<i>Streptomyces</i> sp SCARA1h	+	<i>Achromobacter</i> sp SCARA6f2	+
Firmicutes oxidantes de aceite residual automotriz	Síntesis de detergente en caldo aceite residual automotriz	<i>Achromobacter</i> sp SCARA2i	-
<i>Bacillus horneckiae</i> SCARA1 ₁	-	<i>Achromobacter</i> sp SCARA4i	+
<i>Bacillus horneckiae</i> SCARA 1 ₂	+	<i>Achromobacter</i> sp SCARA7i	+
<i>Bacillus safensis</i> SCARA6d	+	<i>Achromobacter</i> sp SCARA3j	+
<i>Bacillus safensis</i> SCARA7d2	+	<i>Acinetobacter ursingii</i> SCARA3f2	+
<i>Bacillus safensis</i> SCARA8d2	+	<i>Cupriavidus</i> sp SCARA4	+
<i>Bacillus subtilis</i> SCARA1f1	+	<i>Cupriavidus</i> sp SCARA5	+
<i>Bacillus subtilis</i> SCARA3h1	+	<i>Cupriavidus</i> sp SCARA7	+
<i>Bacillus subtilis</i> SCARA3h2	+	<i>Cupriavidus</i> sp SCARA4f1	+
<i>Staphylococcus hominis</i> SCARA1g1	+	<i>Cupriavidus</i> sp SCARA5f1	+
<i>Staphylococcus hominis</i> SCARA6i	+	<i>Cupriavidus</i> sp SCARA1i	-
Control (agua)	-	<i>Cupriavidus</i> sp SCARA4j	+
		<i>Cupriavidus</i> sp SCARA5j	+

Producción detergente +: positivo -: negativo

En la Tabla 10 se presenta la producción de detergentes por los 12 actinomicetos (AC), 10 firmicutes (FIR) y 25 proteobacterias (PRO) aislados del suelo contaminado con ARA durante la BIS que crecieron en agar con ARA donde se observa que de los 47 aislados, 44 de ellos como *Achromobacter* sp SCARA2a, *Gordonia amicalis*

SCARA5g1, *Achromobacter* sp y *Bacillus subtilis* SCARA3h2, fueron positivos para la prueba cualitativa de síntesis de detergentes, debido a que posiblemente se rompieron las fuerzas de tensión superficial entre la gota y la superficie hidrófoba del aceite, esto debido a que sintetizan detergentes cuando la fuente de carbono es parcialmente soluble o insoluble en agua como el ARA, de esta manera están obligados a sintetizar moléculas con propiedades tensoactivas que favorezcan la biodegradación del ARA (Supaphol *et al.*, 2011; Yáñez-Ocampo & Wong-Villareal., 2013). En cambio, en el control que únicamente contenía agua, la gota se mantuvo estable ya que las moléculas del agua son polares y fueron repelidas por la superficie hidrofóbica del aceite (Jain *et al.*, 1991; Walter *et al.*, 2010). Resultados análogos se reportaron por Mercade *et al.*, 1996, que aislaron cepas productoras de detergentes de suelo contaminado con HICO del petróleo cuando usaron aceite lubricante como fuente de C, donde de las 44, solo 5 sintetizaron detergentes. Mientras que Willumsen y Karlson (1997) aislaron 57 microorganismos de suelo contaminado con HICO aromáticos policíclicos. Los resultados mostraron que de los 57, 38 fueron capaces de formar emulsiones estables con aceite diésel, debido a la posible síntesis de detergentes. Se sugiere que *Bacillus horneckiae* SCARA 11, *Cupriavidus* sp SCARA1i y *Achromobacter* sp SCARA2i, no mostraron producción de detergentes porque tal vez utilizaron otros mecanismos para solubilizar HICO como su adherencia a través de lípidos, proteínas y oligosacáridos de la membrana celular (Abbasnezhad *et al.*, 2011); o usaron sus propios compuestos bacterianos como biosurfactantes con alta hidrofobicidad (Hommel, 1994; Thavasi *et al.*, 2011). Por su parte Tugrul y Cansunar (2005) reportaron que *Pseudomonas*

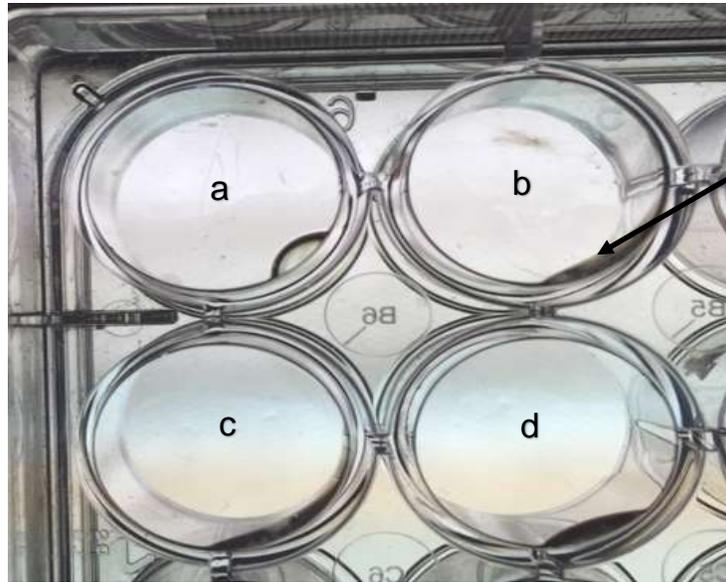
aeruginosa y *Candida* tras el ensayo Drop-collapse fueron positivos para sintetizar detergentes.

Tabla 11. Determinación de la síntesis de detergentes *in vitro* de actinomicetos, firmicutes y proteobacterias que mineralizan el aceite residual automotriz, por la técnica cuantitativa “Drop-collapse”.

Actinomicetos oxidantes de aceite residual automotriz	Diámetro de síntesis de detergente en caldo aceite residual automotriz (mm)	Proteobacterias oxidantes de aceite residual automotriz	Diámetro de síntesis de detergente en caldo aceite residual automotriz (mm)
<i>Arthrobacter nicotinovorans</i> SCARA2h	3.66 ^b	<i>Achromobacter</i> sp SCARA6	4 ^b
<i>Gordonia amicalis</i> SCARA2f1	4.33 ^b	<i>Achromobacter</i> sp SCARA8	4.33 ^b
<i>Gordonia amicalis</i> SCARA1g2	3.5 ^b	<i>Achromobacter</i> sp SCARA1a	3.5 ^b
<i>Gordonia amicalis</i> SCARA2g	4 ^b	<i>Achromobacter</i> sp SCARA2a	3.66 ^b
<i>Gordonia amicalis</i> SCARA3g	4.16 ^b	<i>Achromobacter</i> sp SCARA3a	3.75 ^b
<i>Gordonia amicalis</i> SCARA5g	4.16 ^b	<i>Achromobacter</i> sp SCARA4a	3.66 ^b
<i>Gordonia amicalis</i> SCARA5g1	3.83 ^b	<i>Achromobacter</i> sp SCARA1d	4.16 ^b
<i>Gordonia amicalis</i> SCARA6g	4.16 ^b	<i>Achromobacter</i> sp SCARA2d	4.33 ^b
<i>Gordonia amicalis</i> SCARA8i	5.16^{a*}	<i>Achromobacter</i> sp SCARA5d	4.5 ^b
<i>Janibacter limosus</i> SCARA4g	4.83 ^b	<i>Achromobacter</i> sp SCARA3f1	3.66 ^b
<i>Janibacter limosus</i> SCARA7g	4 ^b	<i>Achromobacter</i> sp SCARA6f1	3.83 ^b
<i>Streptomyces</i> sp SCARA1h	5.16^{a*}	<i>Achromobacter</i> sp SCARA6f2	3.66 ^b
Firmicutes oxidantes de aceite residual automotriz	Diámetro de síntesis de detergente en caldo aceite residual automotriz (mm)	<i>Achromobacter</i> sp SCARA2i	3.66 ^b
<i>Bacillus horneckiae</i> SCARA1 ₁	3 ^c	<i>Achromobacter</i> sp SCARA4i	3 ^c
<i>Bacillus horneckiae</i> SCARA 1 ₂	4.33 ^b	<i>Achromobacter</i> sp SCARA7i	4.33 ^b
<i>Bacillus safensis</i> SCARA6d	3.16 ^c	<i>Achromobacter</i> sp SCARA3j	3.33 ^b
<i>Bacillus safensis</i> SCARA7d2	3.66 ^b	<i>Acinetobacter ursingii</i> SCARA3f2	4 ^b
<i>Bacillus safensis</i> SCARA8d2	3.5 ^b	<i>Cupriavidus</i> sp SCARA4	3.66 ^b
<i>Bacillus subtilis</i> SCARA1f1	4.5 ^b	<i>Cupriavidus</i> sp SCARA5	4 ^b
<i>Bacillus subtilis</i> SCARA3h1	4.33 ^b	<i>Cupriavidus</i> sp SCARA7	3.5 ^b
<i>Bacillus subtilis</i> SCARA3h2	4.16 ^b	<i>Cupriavidus</i> sp SCARA4f1	4.5 ^b
<i>Staphylococcus hominis</i> SCARA1g1	3.83 ^b	<i>Cupriavidus</i> sp SCARA5f1	3.33 ^b
<i>Staphylococcus hominis</i> SCARA6i	4 ^b	<i>Cupriavidus</i> sp SCARA1i	3 ^c
Control (agua)	2 ^e	<i>Cupriavidus</i> sp SCARA4j	4 ^b
		<i>Cupriavidus</i> sp SCARA5j	2.66 ^d

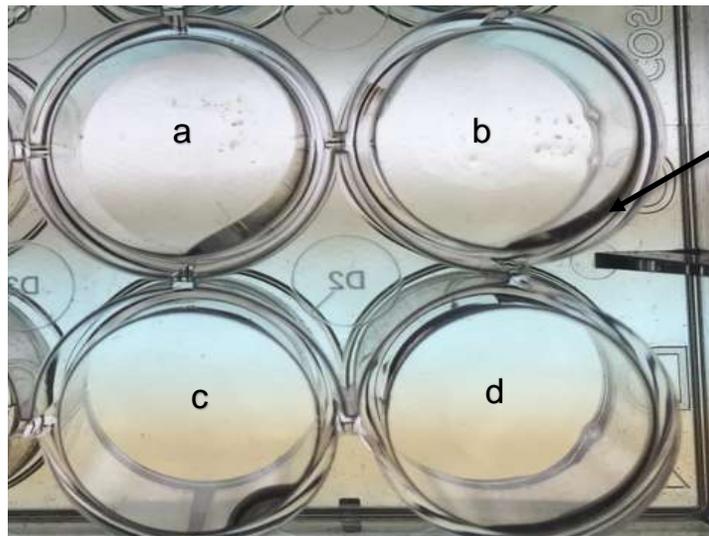
*Tukey (0.025) Letras diferentes = con diferencia estadística

En la Tabla 11 se muestra el diámetro de gota de aceite mineral medido en la producción de detergentes por AC, FIR y PRO aislados de suelo contaminado con 60,000 ppm de ARA por el método Drop-collapse. Ahí se registró que *Streptomyces* sp SCARA1h y *Gordonia amicalis* SCARA8i mostraron mayor diámetro de gota de 5.16 mm, lo que indica que sintetizaron mayor cantidad de detergentes; estos valores fueron estadísticamente diferentes a los de *B. subtilis* SCARA3h1 y *S. hominis* SCARA6i con 4.33, y 4 mm de diámetro de gota. *B. subtilis* SCARA3h1 (Figura 6) que es una bacteria que produce un detergente que consiste en un lipopetido cíclico que puede ser comparable con el surfactante comercial surfactin en aplicación para BIS de suelos contaminados con HICO (Tugrul y Cansunar, 2005; Sousa *et al.*, 2014). *S. hominis* SCARA6i (Figura 4) se ha reportado que produce biosurfactantes fosfolipopetidos con alto grado de emulsificación (Rajeswari *et al.*, 2016). Se sugiere que las bacterias aisladas del suelo con ARA produjeron detergentes con dos finalidades, la primera fue romper la tensión superficial e interfacial entre el ARA y el detergente, y la segunda fue la formación de micelas donde son solubilizados los HICO del ARA (Yañez-Ocampo & Wong-Villareal, 2013). *Acinetobacter ursingii* SCARA3f2 registró un diámetro de gota de 4 mm, lo que se corrobora con Cisneros de la Cueva *et al.*, 2016 que la reportaron como productora de detergentes. Todos los valores anteriores estadísticamente superiores al control que solo contenía agua donde el diámetro de gota fue solo de 2 mm sin evidencia de producción de biosurfactante.



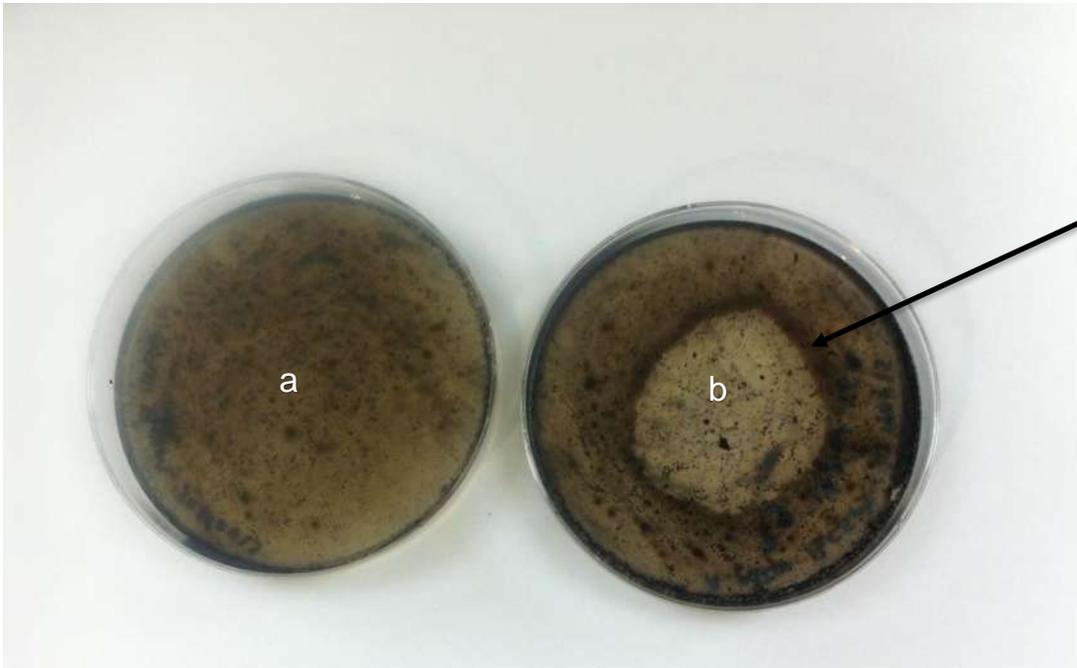
Producción de detergente por *Staphylococcus hominis* SCARA6i

Figura 4. *In vitro* producción de detergentes por técnica Drop-collapse. Control agua: negativo (a), *Staphylococcus hominis* SCARA6i: positivo (b y c).



Producción de detergente por *Achromobacter insolitus* SCARA7i

Figura 5. *In vitro* producción de detergentes por técnica Drop-collapse. *Gordonia amicalis* SCARA8i: positivo (a), *Achromobacter insolitus* SCARA7i positivo (b y d), control agua negativo (c)



Halo de solubilidad del ARA producido por *Bacillus subtilis* SCARA3h1

Figura 6. *Bacillus subtilis* SCARA3h1 formó un halo de solubilidad del aceite residual automotriz en agar (b), control (a).

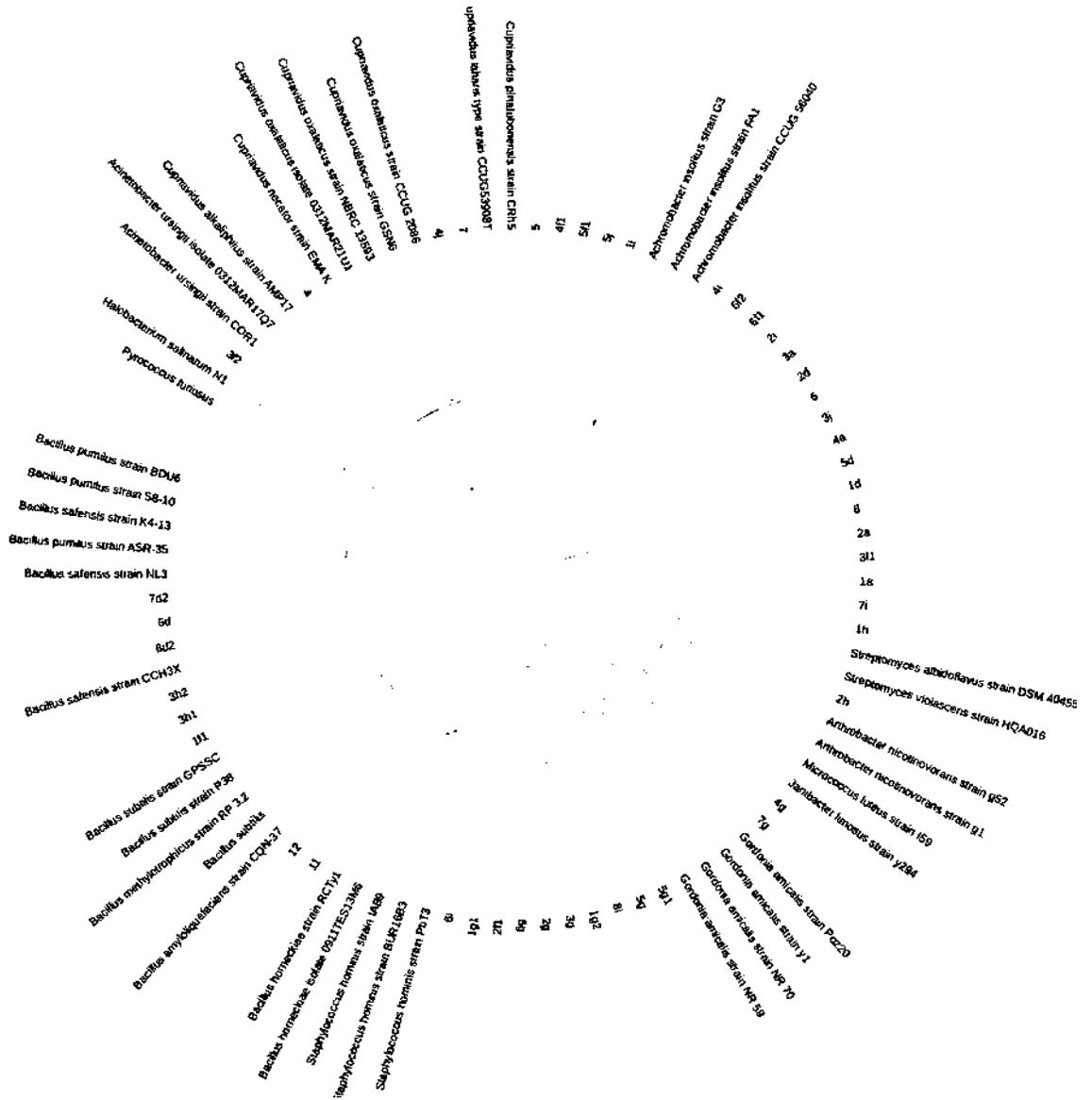
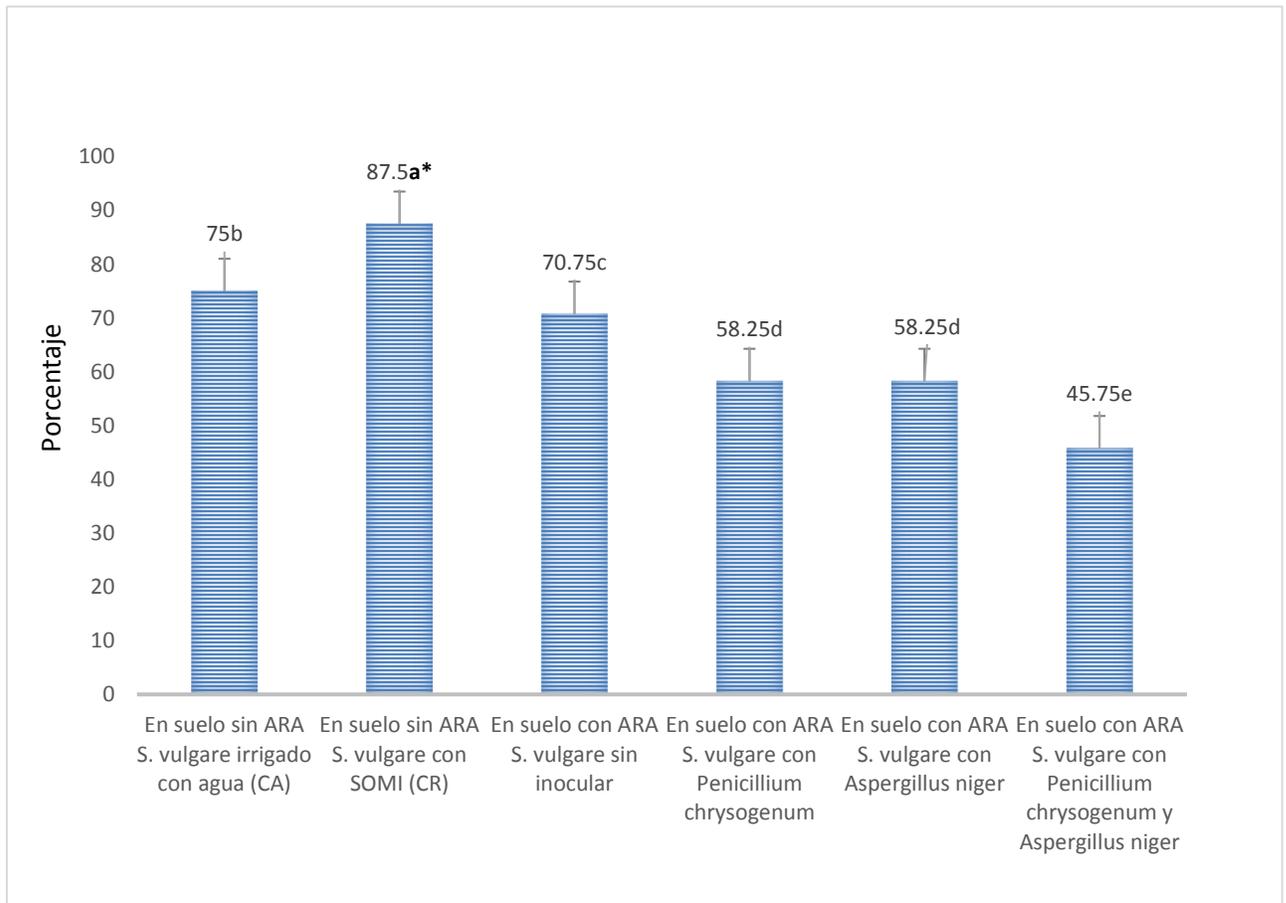


Figura 7. Árbol filogenético basado en las secuencias parciales de los genes 16S rRNA de bacterias aisladas de un suelo contaminado con 45,000 ppm de aceite residual automotriz.

En la figura 7 se muestra la identificación de bacterias de un suelo con 40,000 ppm de ARA que se realizó basado en las secuencias parciales de los genes 16S rRNA donde de los 47 se pudo detectar tres grandes grupos: 12 AC, 10 FIR y 25 PRO, donde se observa que la mayoría de los están reportadas como degradadores de HICO o productores de detergentes, como los AC *Streptomyces sp* SCARA1h

(Cheng *et al.*, 2015) y *Gordonia amicalis* SCARA8i (Figura 5) (Hao *et al.*, 2008) que ha sido aislada de suelos contaminados con altas concentraciones de HICO y produce al menos dos tipos de tensioactivos: bioemulsificantes extracelulares que son sintetizados en presencia de HICO y en fuentes de carbono solubles en agua y biosurfactantes glicolípidos unidos a las células que se producen solo en presencia de HICO (Franzetti *et al.*, 2008) que se corroboraron en el ensayo de la Tabla 11 como mayores productoras de detergentes. Así como el FIR *B. subtilis* que es productora de biosurfactantes bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas facultativas (Makkar *et al.*, 2011; Yañez-Ocampo & Wong-Villareal, 2013), que mostró en la Figura 6 un halo de solubilidad en agar con ARA. Por su parte en las PRO se encontró gran abundancia de nuevas especies que no han sido reportadas de *Achromobacter* (Figura 7) que de acuerdo a la Tabla 11 produjeron detergentes, mientras que las PRO del género *Acinetobacter* producen complejos de lípidos-polisacarados como detergentes para reducir la tensión superficial entre la fase agua-aceite (Youssef *et al.*, 2004). Los resultados anteriores suponen que las bacterias aisladas pueden ser posibles candidatos en su uso en la BIS de suelos contaminados con ARA.

Figura 8. Germinación de semillas de *Sorghum vulgare* potenciado con *Aspergillus niger* y *Penicillium chrysogenum* en la fitorremediación de suelo con 32,700 ppm de aceite residual automotriz



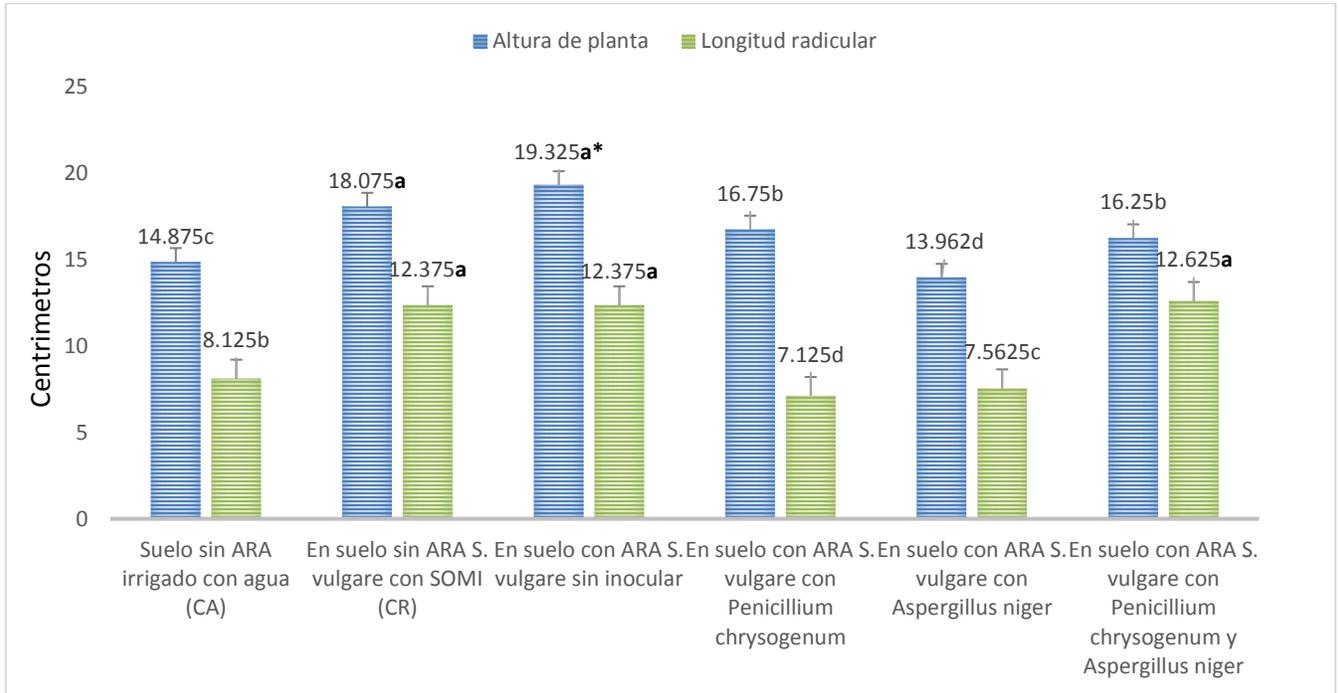
ARA: aceite residual automotriz, CA: control absoluto, CR: control relativo, SOMI: solución mineral. *Tukey (0.025) Letras iguales= sin diferencia estadística

En la figura 8 se muestra que en suelo con ARA remanente de la BIS, el porcentaje de germinación de *S. vulgare* sin y con inoculación individual o en mezcla con *A. niger* y *P. chrysogenum* mostraron diferentes porcentajes de germinación de 70.75, 58.25, 58.25 y 45.75% respectivamente, todos valores estadísticamente diferentes al porcentaje de germinación de la semilla sembrada en suelo sin ARA usado como CR *S. vulgare* con 87.5%, lo anterior indica que la elevada concentración de ARA bloqueó la entrada de agua a la semilla de *S. vulgare* en suelo (Agamuthu *et al.*,

2010; Balderas-León *et al.*, 2015) mientras su hidrofobicidad impidió el intercambio de gases e inhibió la germinación (Tanee & Akonye, 2009; Maldonado-Chávez *et al.*, 2010).

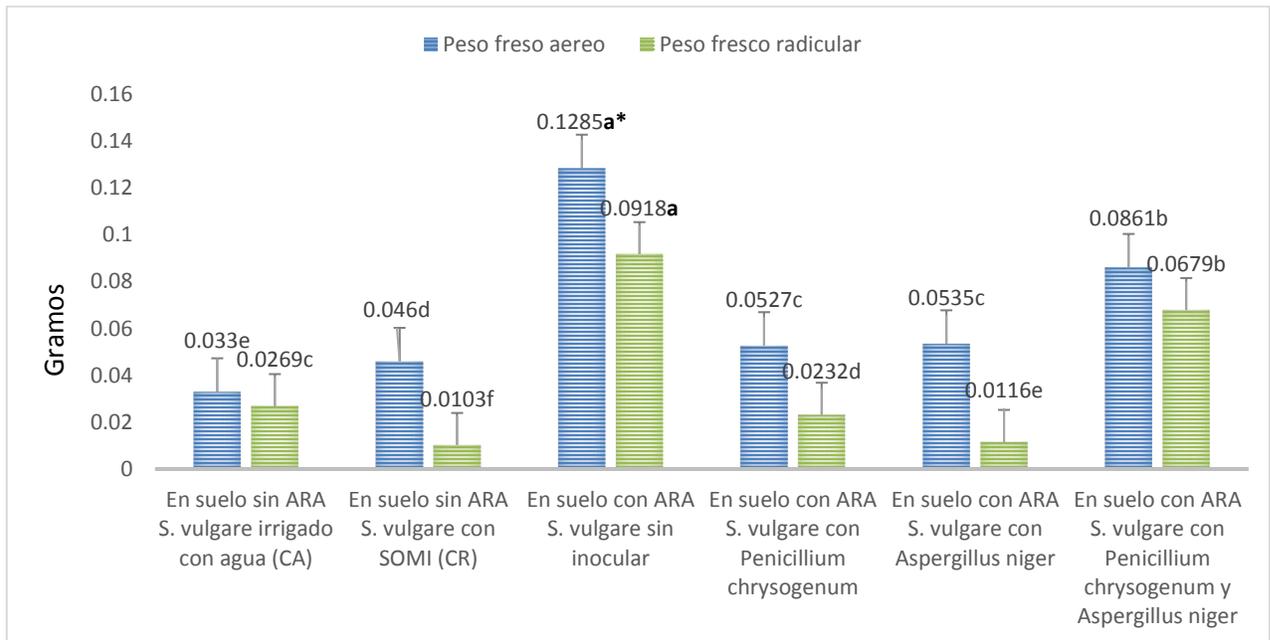
En la Figura 9 se muestra en suelo la altura de planta (AP) y longitud de raíz (LR) de *S. vulgare* durante la FITO del suelo con ARA. Se registró la mayor AP con 19.325 cm y LR de 12.375 cm en *S. vulgare* sin inocular, estos valores no tuvieron diferencia estadística con los 18.075 cm de AP en *S. vulgare* sembrado en suelo sin ARA CR y con los 12.375 cm de LR. Estos valores anteriores fueron estadísticamente diferentes y superiores a *S. vulgare* potenciado con *A. niger* en suelo con ARA para su FITO que registró 13.962 cm de la AP y 7.5625 cm de LR; esto indica que en suelo la relativa alta concentración de ARA impidió la infiltración de agua y difusión de O₂, lo que afectó la germinación de *S. vulgare* (Tsao, 2003). Estos resultados se asocian con lo reportado por Ferrera-Cerrato *et al.*, 2007 donde en suelo la presencia de combustóleo inhibió el crecimiento de *Phaseolus coccineus*.

Figura 9. Altura de planta y longitud radicular de *Sorghum vulgare* potenciado con *Penicillium chrysogenum* y *Aspergillus niger* a plántula en la fitorremediación de suelo contaminado con 32,700 ppm de aceite residual automotriz.



ARA: aceite residual automotriz, CA: control absoluto, CR: control relativo, SOMI: solución mineral. *Tukey (0.025) Letras iguales= sin diferencia estadística

Figura 10. Peso fresco aéreo y radicular de *Sorghum vulgare* potenciado con *Penicillium chrysogenum* y *Aspergillus niger* a plántula en la fitorremediación de suelo contaminado con 32,700 ppm de aceite residual automotriz

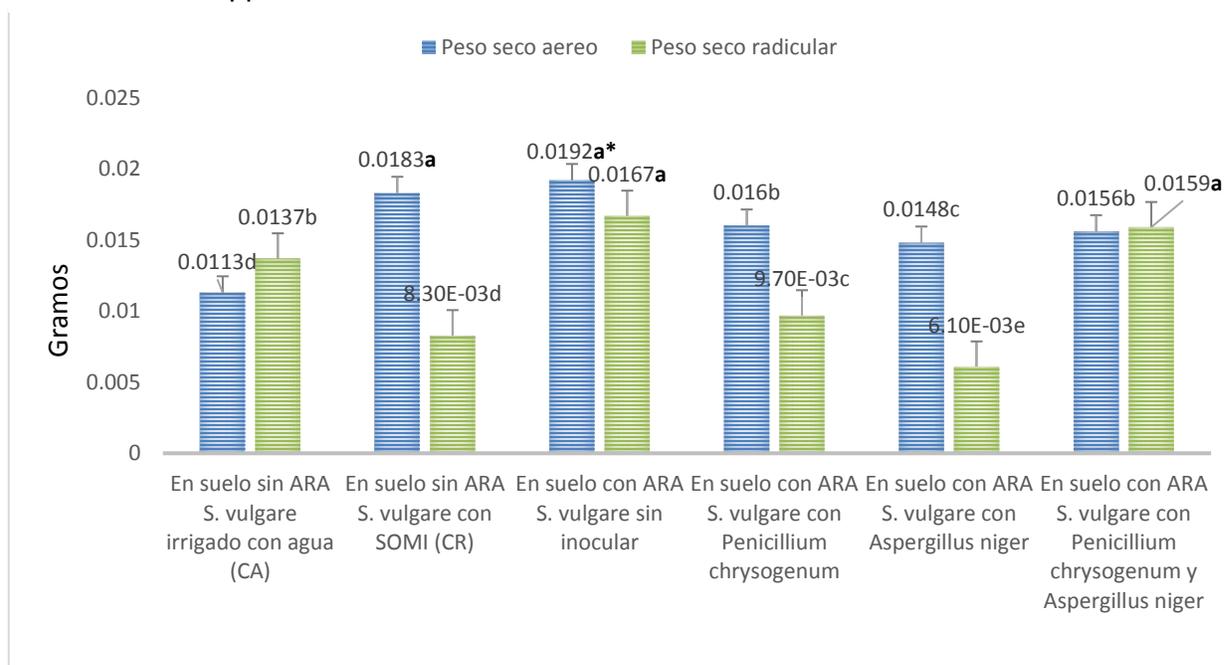


ARA: aceite residual automotriz, CA: control absoluto, CR: control relativo, SOMI: solución mineral *Tukey (0.025) Letras iguales= sin diferencia estadística

En la Figura 10 se muestra la BIS de suelo con 60,000 ppm de ARA con ALEDOS, H₂O₂, SOMI, EFUC y control de la humedad a 80% de la capacidad de campo, seguida de la FITO mediante *S. vulgare* potenciada con *A. niger* y *P. chrysogenum* a plántula, con un PFA y PFR de 0.1285 g y 0.0919 g respectivamente, valores similares a lo registrado en *S. vulgare* inoculado con ambos hongos en suelo con ARA de 0.0861 g de PFA y 0.0679 g de PFR, valores estadísticamente diferentes a los de *S. vulgare* en suelo sin ARA usado como CR con 0.0460 g de PFA y 0.0103 g de PFR. Lo anterior debido a que se ha reportado que algunas especies como *Aspergillus* y *Penicillium* degradan HICO como los del ARA y son tolerantes a altas concentraciones de HICO (Mohsenzadeh *et al.*, 2012).

En la figura 11, en suelo con ARA al comparar los valores del peso seco aéreo (PSA) y radicular (PSR) de *S. vulgare* a plántula en suelo contaminado bioestimulado con ARA ALEDOS, H₂O₂, SOMI, EFUC y control de la humedad a 80% de la capacidad de campo y luego fitorremediado por *S. vulgare* sin inocular mostró 0.0192 g de PSA valor estadísticamente similar a *S. vulgare* en suelo CR con 0.0183 g de PSA. Por su parte *S. vulgare* potenciado con *A. niger* y *P. chrysogenum* tuvo 0.0156 g de PSA y 0.0159 de PSR en suelo bioestimulado con ALEDOS, H₂O₂, SOMI, EFUC y control de la humedad a 80% de la capacidad de campo. Los resultados anteriores coinciden con lo reportado por Pérez-Armendariz *et al.*, (2011) que demostraron que la fitotoxicidad de los HICO provocan decremento en la biomasa aérea y radicular. Por su parte Peña-Castro *et al.*, (2006) mostraron que el exceso de HICO lisa las células vegetales lo que se limita su crecimiento porque se impide la captación de agua y O₂.

Figura 11. Peso seco aéreo y radicular de *Sorghum vulgare* potenciado con *Penicillium chrysogenum* y *Aspergillus niger* a plántula en la fitorremediación de suelo contaminado con 32,700 ppm de aceite residual automotriz



ARA: aceite residual automotriz, CA: control absoluto, CR: control relativo, SOMI: solución mineral. *Tukey (0.025) Letras iguales= sin diferencia estadística

Tabla 12. Concentración de aceite residual automotriz en suelo bioestimulado con dodecil sulfato de sodio/alcohol etoxilado (0.5%), H₂O₂ (0.5%), extracto fúngico, solución mineral, humedad a 80% de la capacidad de campo y fitorremediación mediante *Sorghum vulgare* a plántula potenciado con *Aspergillus niger* y *Penicillium chrysogenum*.

Suelo	Concentración de ARA remanente en suelo (ppm)
Suelo con ARA (Control negativo)	45,003 ^e
Suelo con ARA bioestimulado	37,300 ^d
Suelo con ARA bioestimulado y fitorremediado con <i>Sorghum vulgare</i>	35,800 ^d
Suelo con ARA fitorremediado con <i>Sorghum vulgare</i> potenciado con: <i>Aspergillus niger</i>	27,800^{a*}
<i>Penicillium chrysogenum</i>	33,300 ^c
<i>Aspergillus niger</i> + <i>Penicillium chrysogenum</i>	30,100 ^b

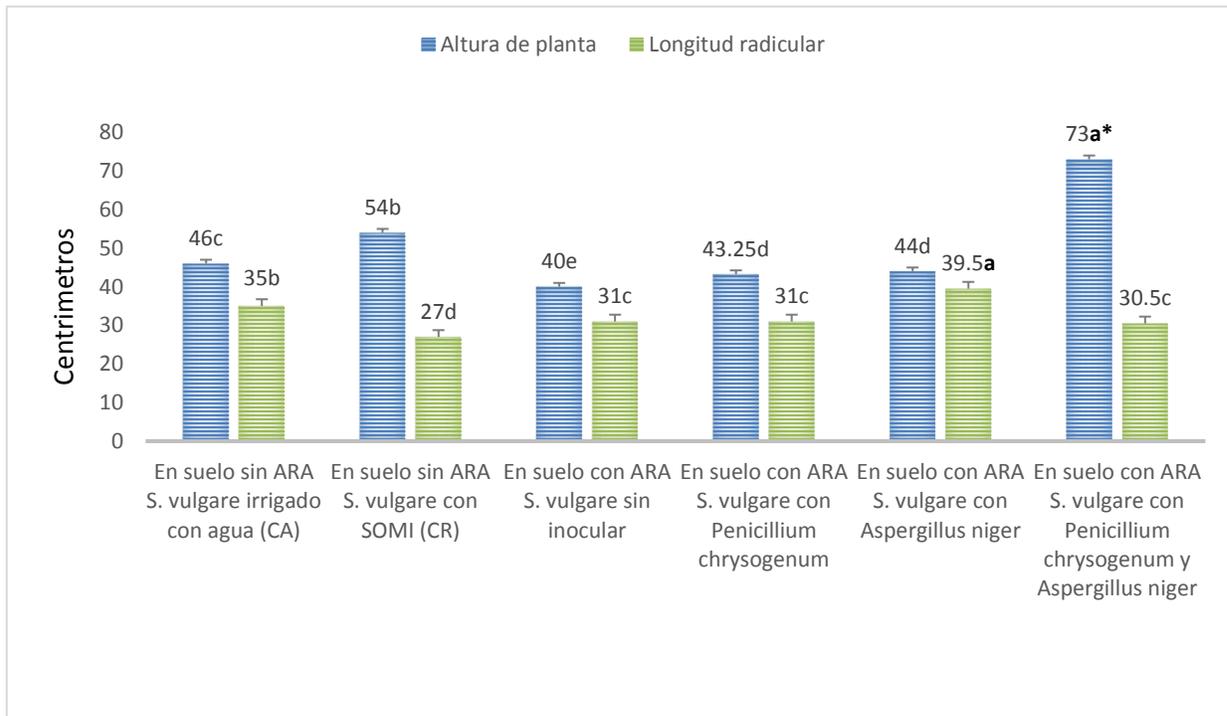
ARA: aceite residual automotriz. *Tukey (0.025) Letras iguales= sin diferencia estadística

En la tabla 12 se presenta la concentración de ARA remanente de la BIS en suelo con ALEDOS (0.5%), H₂O₂ (0.5%), EFUC, SOMI y su FITO con *S. vulgare* en plántula inoculado con *A. niger* y *P. chrysogenum*. En suelo con ARA fitorremediado mediante *S. vulgare* con *A. niger* se registró la mayor disminución del ARA con 27,800 ppm, valor estadísticamente superior al mismo suelo fitorremediado con *S. vulgare* con *A. niger* y *P. chrysogenum* con 30,100 ppm valor estadísticamente diferente al registrado en el mismo suelo sin BIS ni FITO sin cambio en la concentración del ARA por la atenuación natural. Estos resultados indican que ALEDOS al 0.5%, emulsificó el ARA lo que facilitó su mineralización (Ni *et al.*, 2014). Además de se comprobó que la inoculación de *Sorghum vulgare* con los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* potencializa su capacidad de FITO de suelos contaminados con HICO ya que se encuentran entre los principales microorganismos que los degradan (Salinas-Martínez *et al.*, 2010).

En la figura 12 se muestra la BIS de suelo con 60,000 ppm de ARA con ALEDOS, H₂O₂, SOMI, EFUC y control de la humedad a 80% de la capacidad de campo por 8 semanas, seguida de la FITO mediante *S. vulgare* potenciado con *A. niger* y *P. chrysogenum* a prefloración, con una AP de 73 cm, valor estadísticamente diferente a los 54 cm de la AP de *S. vulgare* en el mismo suelo sin ARA como CR, lo que indica que a este estadio los HICO no inhibieron su crecimiento, resultados similares fueron reportados por Ferrera-Cerrato *et al.*, 2007 que mostraron que la AP de *P. coccineus* fue mejorada después de 90 días de BIS con fertilizante comparada con *P. coccineus* usada como control. Además *A. niger* y *P. chrysogenum* utilizan los HICO como fuente de carbono y energía. *Aspergillus* y *Penicillium* tienen alto

potencial en la BIO de suelo con alta concentración de HICO como los del ARA. (Mohsenzadeh *et al.*, 2012). Mientras que *S. vulgare* (Figura 8) tuvo una LR de 39.5 cm en suelo bioestimulado con ALEDOS, H₂O₂, SOMI, EFUC y control de la humedad a 80% de la capacidad de campo y posterior, luego fitorremediado por *S. vulgare* con *A. niger*, este valor numérico fue estadísticamente diferente a los 27 cm de LR de *S. vulgare* sembrado en suelo sin ARA alimentado con SOMI usado como CR, ambos valores fueron estadísticamente diferentes a los 31 cm de LR de *S. vulgare* sin inocular en suelo con ARA bioestimulado con ALEDOS, H₂O₂, SOMI, EFUC y control de la humedad a 80% de la capacidad de campo y luego fitorremediado. Esto apoya que las gramíneas como *S. vulgare* son eficaces para usarse en la FITO ya que poseen un extenso sistema de raíces que favorece la actividad oxidante de HICO de las poblaciones microbianas degradadoras por medio de sus exudados radiculares (Merkl *et al.*, 2005).

Figura 12. Altura de planta y longitud de raíz de *Sorghum vulgare* potenciado con *Penicillium chrysogenum* y *Aspergillus niger* a prefloración en la fitorremediación de suelo contaminado con 32,700 ppm de aceite residual automotriz.

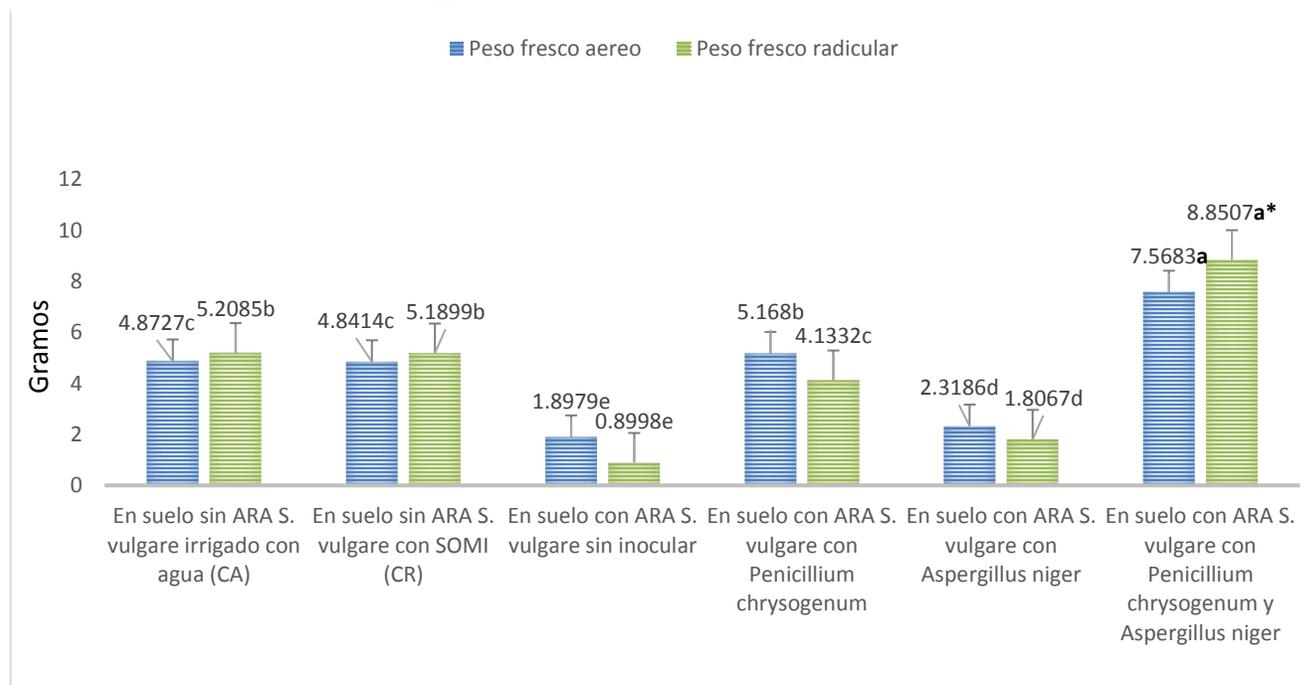


ARA: aceite residual automotriz, CA: control absoluto, CR: control absoluto, SOMI: solución mineral. *Tukey (0.025) Letras iguales= sin diferencia estadística

En la figura 13 se observa la BIS de un suelo con 60,000 ppm de ARA después de 8 semanas de BIS con ALEDOS, H₂O₂, SOMI, EFUC y control de la humedad a 80% de la capacidad de campo y su posterior FITO mediante *S. vulgare* en prefloración potenciado con *A. niger* y *P. chrysogenum* tuvo un PFA de 7.56 g y 8.85 g de PFR valor estadísticamente similar al de *S. vulgare* inoculado con *P. chrysogenum* en suelo con ARA donde tuvo 5.16 g de PFA y 4.13 g de PFR. Los valores anteriores fueron estadísticamente diferentes a *S. vulgare* en suelo sin ARA usado como CR con 4.84 g de PFA y 5.18 g de PFR, lo que sugiere que en este estadio de *S. vulgare*, en sus raíces sus microorganismos y enzimas asociadas pueden absorber, transformar, degradar o estabilizar los contaminantes del suelo, ya que son utilizados como una fuente alternativa de carbono y energía (Mager y

Hernandez-Valencia, 2013). Además de que se reportó que los géneros de *Aspergillus* y *Penicillium* son microorganismos degradadores de HICO (Braibant, 2004).

Figura 13. Peso fresco aéreo y de raíz de *Sorghum vulgare* potenciado por *Penicillium chrysogenum* y *Aspergillus niger* a prefloración en la fitorremediación de suelo contaminado con 32,700 ppm de aceite residual automotriz.

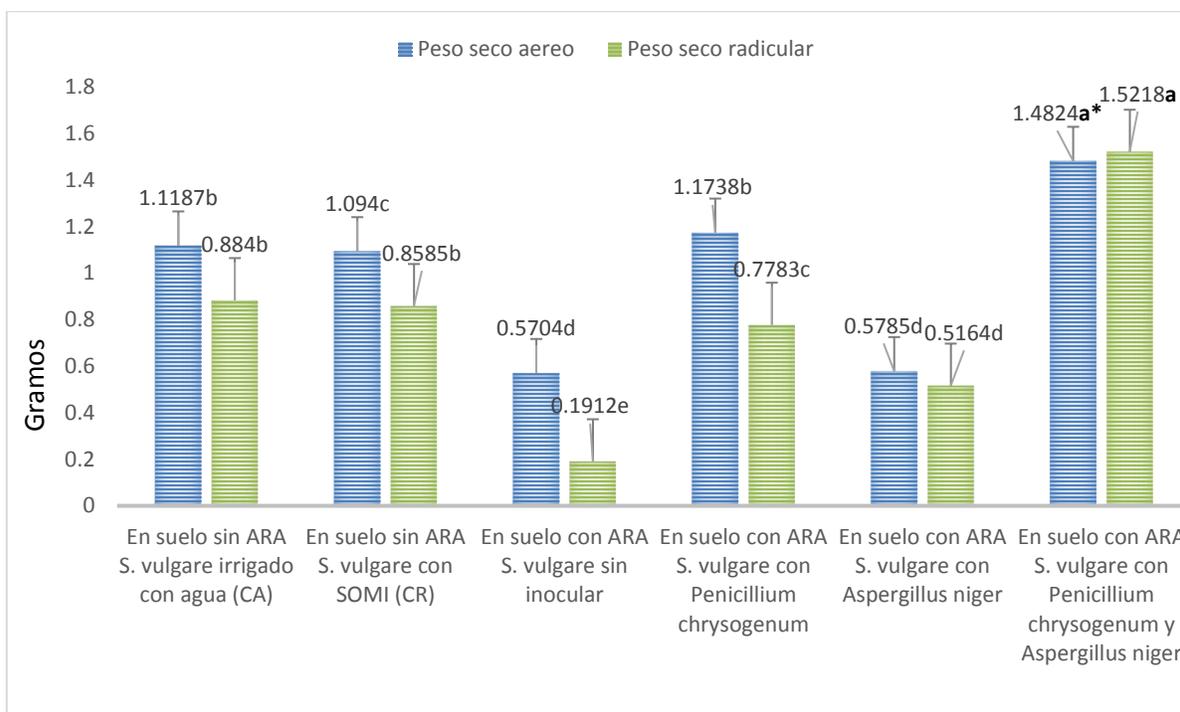


ARA: aceite residual automotriz, CA: control absoluto, CR: control relativo, SOMI: solución mineral. *Tukey (0.025) Letras iguales= sin diferencia estadística

En la figura 14 se puede ver la BIS de suelo con 60,000 ppm de ARA bioestimulado con ALEDOS, H₂O₂, SOMI, EFUC y control de la humedad a 80% de la capacidad de campo y luego su FITO con *S. vulgare* en prefloración coinoculado con *P. chrysogenum* y *A. niger* reportó PSA de 1.48 g y 1.52 g de PSR. Mientras que, en suelo con ARA, *S. vulgare* inoculado con *P. chrysogenum* el PSA fue de 1.17 g y 0.77 de PSR. Los valores anteriores fueron estadísticamente diferentes a *S. vulgare* en suelo sin ARA (CR) con 1.09 g de PSA y 0.85 g de PSR. Resultados similares

fueron mostrados por Liao *et al.*, en el 2016 donde *Zea mays* sembrado en suelo con HICO para su FITO, no mostró inhibición en su crecimiento por la presencia de los HICO en suelo y por la adición de un surfactante no iónico Tween 80 para su FITO. En cambio, Gao *et al.*, (2008) mostraron que la biomasa de *Trifolium pretense* L. en presencia de HAP aumentó su biomasa pero disminuyó con la adición del Tween 80 y que sugieren que a bajas concentraciones de surfactante no ionico mejoran la absorción de los HICO en el suelo a través de las raíces de la planta de manera que se mejora la efectividad de la FITO (Gao *et al.*, 2008). Por su parte Gao *et al.*, (2007) sugirieron que la presencia de algunos tensioactivos no iónicos que incluyen monooleato de polioxietilensorbitán (Tween 80) y polioxietileno dodecanol (Brij35) a concentraciones relativamente bajas generan efectos positivos en la FITO de suelos contaminados con HICO.

Figura 14. Peso seco aéreo y radicular de *Sorghum vulgare* potenciado con *Penicillium chrysogenum* y *Aspergillus niger* a prefloración en la fitorremediación de suelo contaminado 32.700 ppm de aceite residual automotriz.



ARA: aceite residual automotriz, CA: control absoluto, CR: control relativo, SOMI: solución mineral. *Tukey (0.025) Letras iguales= sin diferencia estadística

Tabla 13. En suelo con 32,700 de aceite residual automotriz concentración de PO_4^{3-} soluble derivado de la bioestimulación y fitorremediación

Suelo + 60,000 ppm aceite residual automotriz	Fosfato soluble (%)
Suelo con ARA (CN)	0.40 ^b
Suelo con ARA bioestimulado	0.36 ^c
Suelo bioestimulado y fitorremediado con <i>Sorghum vulgare</i> a plántula	0.44 ^a
Suelo fitorremediado con <i>Sorghum vulgare</i> en plántula potenciado con: <i>Aspergillus niger</i>	0.41 ^b
<i>Penicillium chrysogenum</i>	0.38 ^c
<i>Aspergillus niger</i> + <i>Penicillium chrysogenum</i>	0.45 ^{a*}

*Tukey (0.025) Letras iguales= sin diferencia estadística

En la tabla 13 se muestra en suelo contaminado con 32,700 ppm de ARA bioestimulado con ALEDOS, H₂O₂, EFUC, SOMI, y control de la humedad a 80% de la capacidad de campo, y su FITO con *S. vulgare* potenciada con *A. niger* y *P. chrysogenum* la concentración de PO₄⁼ soluble como variable respuesta de la mineralización del ARA. En los suelos la disponibilidad del fósforo es esencial para el crecimiento vegetal porque constituye más de 0.2% del peso seco de la planta (Banerjee *et al.*, 2010), en el suelo con ARA bioestimulado y fitorremdiado con *S. vulgare* coinoculado con *Aspergillus niger* + *Penicillium chrysogenum* presentó 0.45% de PO₄⁼ soluble, valor estadísticamente superior al mismo suelo con 32,700 ppm de ARA, pero fitorremdiado con *S. vulgare* inoculado con *A. niger* con 0.41%. Resultados anteriores estadísticamente superiores al mismo suelo contaminado, pero solo bioestimulado que registró 0.36% de PO₄⁼ soluble. Lo anterior evidencia la capacidad solubilizadora de PO₄⁼ por los hongos *Aspergillus* y *Penicillium* (Khan *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2010, Zaidi *et al.*, 2009), estos microorganismos usan diferentes mecanismos de solubilización, como la producción de ácidos orgánicos, que solubilizan dichos fosfatos insolubles en la zona rizosférica. Los fosfatos solubles son absorbidos por la planta, lo cual mejora su crecimiento y productividad (Beltrán, 2014).

Tabla 14. Concentración de aceite residual automotriz en suelo después de 90 días de fitorremediación mediante *Sorghum vulgare* potenciado con *Aspergillus niger* y *Penicillium chrysogenum*.

Suelo	ARA remanente en suelo (ppm)
Suelo con ARA (Control negativo)	45,003 ^{f*}
Suelo con ARA bioestimulado	13,057 ^e
Suelo con ARA bioestimulado y fitorremediado con <i>Sorghum vulgare</i>	4,143 ^{d*}
Suelo con ARA fitorremediado con <i>Sorghum vulgare</i> en plántula potenciado con: <i>Aspergillus niger</i>	2, 649^a
<i>Penicillium chrysogenum</i>	3,317 ^{b*}
<i>Aspergillus niger</i> + <i>Penicillium chrysogenum</i>	3,890 ^{c*}

ARA: aceite residual automotriz, ALEDOS: alcohol etoxilado/dodecil sulfato de sodio *Tukey (0.025) Letras iguales= sin diferencia estadística, *valores por debajo del máximo permitido por la NOM-138SEMARTNT/2003.

En la tabla 14 se muestra la BIS de suelo contaminado con 60,000 ppm de ARA por BIS con ALEDOS, H₂O₂, EFUC, SOMI, y control de la humedad a 80% de la capacidad de campo en 60 días que redujo el ARA a 32,000 ppm y posterior FITO mediante *S. vulgare* inoculado con *A. niger* durante 90 días donde se registro la mayor reducción de 2,649 ppm, valor estadísticamente diferente al registrado en ese mismo suelo cuando *S. vulgare* se potenció con *P. chrysogenum* que lo disminuyó hasta 3,317 ppm, valores estadísticamente diferentes al del mismo suelo con ARA bioestimulado con ALEDOS, H₂O₂, EFUC, SOMI, y control de la humedad a 80% de la capacidad de campo y luego fitorremediado con *S. vulgare* coinoculado con *A. niger* y *P. chrysogenum* que lo redujo hasta 3,890 ppm, mientras que con *S. vulgare* sin inocular lo redujo a 4,143 ppm, valores de concentración inferiores a la máxima permitida por la NOM-138 y que fueron estadísticamente diferentes al mismo suelo con ARA pero solo bioestimulado ALEDOS, H₂O₂, EFUC, SOMI y control de la humedad a 80% de la capacidad de campo, donde únicamente lo

redujo a 13,057 ppm y que fue estadísticamente diferente al mismo suelo con ARA usado como CN, donde disminución de ARA fue prácticamente nula por el exceso de ARA (Corona-Ramírez & Iturbide-Argüelles, 2005). Lo anterior sugiere que la bioestimulación del suelo con ARA por ALEDOS, H₂O₂, EFUC, SOMI, y control de la humedad a 80% de la capacidad de campo favorecieron facilitaron la posterior FITO con *S. vulgare* donde *A. niger* promovió su crecimiento y la mayor mineralización de la concentración de ARA (Izinyon & Seghosime, 2013) a una concentración por debajo de la máxima aceptada por la NOM-138. Estos resultados coinciden con lo reportado por Lotfinasabas *et al.*, (2012) quienes demostraron que *A. niger* mostró la mayor velocidad de degradación de HICO de diésel en suelo con 20.55% comparado con *Penicillium* con 16.45%. Además, estos géneros de hongos poseen alto potencial en la BIO de suelos contaminados con HICO (Mohsenzadeh *et al.*, 2012) ya que son capaces de tolerar altas concentraciones de HICO para utilizarlos como fuente de carbono y energía, y que sus enzimas como la lacasa degrada los HICO aromáticos (Eibes *et al.*, 2006; Naranjo *et al.*, 2007; Ali *et al.*, 2012; Ameen *et al.*, 2016). Por su parte Pernia *et al.*, (2012) encontraron que *A. niger* fue de los géneros con mayor capacidad de degradación de HICO totales del petróleo con 52%. Mientras que Saratale *et al.*, (2007) demostraron que, en suelo con keroseno, *A. niger* lo redujo un 84% comparado con el mismo suelo control negativo donde la reducción fue nula por atenuación natural.

6. Conclusión

La BIS de un suelo contaminado con una alta concentración de ARA de 60,000 ppm con la modificación de las condiciones fisicoquímicas adecuadas fue eficaz para reducirlo por la emulsificación de la mezcla de HICO del ARA con el detergente ALEDOS, lo que favoreció la oxidación de los HICO con la adición de H₂O₂, el EFUC que degradó la fracción aromática, mientras que el enriquecimiento del suelo con la SOMI involucró la incorporación de PO₄⁼ solubles y finalmente el control de la humedad al 80% de la capacidad de campo que permitió el intercambio de gases, bajo esta situación la mineralización del ARA por la microbiota nativa estimuló a la que solubiliza los PO₄⁼, se aceleró y disminuyó la concentración de ARA en comparación con el mismo suelo sin la BIS múltiple .

La FITO con *S. vulgare* fue potenciada por la adaptación natural de esta gramínea a los HICO del ARA para evitar la fitotoxicidad, en tanto que la asociación con *A. niger* y *P. chrysogenum* aumentó su tolerancia a la fitotoxicidad por la síntesis de sustancias promotoras de crecimiento vegetal y además que estos géneros y especies de hongos degradan HICO.

La suma de las acciones BIS/FITO, dio como resultado menor tiempo para que la mayor cantidad de ARA se haya mineralizado a una concentración inferior al máximo permitido por la NOM-138. Con base en lo anterior, la hipótesis de esta investigación fue válida.

7. Bibliografía.

1. Abbasnezhad H., Gray M., Foght J. M. (2011). Influence of adhesión on aerobic biodegradation and bioremediation of liquid hydrocarbons. *Appl Microbiol Biotechnol.* 92:653-675.
2. Agamuthu, P., Abioye, O. P., & Aziz, A. A. (2010). Phytoremediation of soil contaminated with used lubricating oil using *Jatropha curcas*. *Journal of Hazardous Materials*, 179(1-3):891-894.
3. Alexander M. (1977). *Introducción a la microbiología del suelo*. Transformaciones microbianas del fósforo. 355-361. AGT Editor, S. A. México D.F.
4. Ali, M., Khalil, N.M., Abd El-Ghany, M., (2012). Biodegradation of some polycyclic aromatic hydrocarbons by *Aspergillus terreus*. *African Journal of Microbiology Research.* 6(16): 3783-3790.
5. Altmajer D. V. (2004) Formulaciones Detergentes Biodegradables: Ensayos de Lavado. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. España Facultad de Ciencias Departamento de Ingeniería Química. (Inédita). Disponible en línea en <http://hera.ugr.es/tesisugr/15847093.pdf>
6. Ameen, F., Moslem, M., Hadi, S., Al-Sabri, A. E. (2016). Biodegradation of diesel fuel hydrocarbons by mangrove fungi from Red Sea Coast of Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences* 23: 211–218
7. Asquith E. A, Geary P. M., Nolan A. L, Evans C. A. (2012). Comparative Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Soil by

Biostimulation, Bioaugmentation and Surfactant Addition. Journal of Environmental Science and Engineering 1: 637-650.

8. Balderas-León I., Dasgupta-Schubert N., Sánchez-Yañez J. M. (2015). Phytoremediation of soil contaminated with 35,000 ppm of waste motor oil. *Ingeniería Agrícola y Biosistemas*, 7(2):75-87.
9. Baltierra-Trejo E., Silva-Espino E., Márquez-Benavides L., Sánchez-Yañez J. M. (2016). Inducción de la degradación de lignina de paja de trigo en aromáticos por *Aspergillus* spp. y *Penicillium chrysogenum*. *Journal Selva Andina Research Society*. 7(1):10-19.
10. Banerjee S, Palit R, Sengupta C, Standing, D. (2010). Stress induced phosphate solubilization by *Arthrobacter* sp. and *Bacillus* sp. isolated from tomato rhizosphere. *Australian Journal of crop science* 4:378-383.
11. Banks, MK; P Kulakow; AP Schwab; Z Chen & K Rathbone. (2003). Degradation of Crude Oil in the Rhizosphere of *Sorghum bicolor*. *International Journal Phytoremediation* 5(3):225-234.
12. Basumatary, B; S Bordoloi & H Sarma. (2012). Crude Oil-Contaminated Soil Phytoremediation by Using *Cyperus brevifolius* (Rottb.) Hassk. *Water, Air, & Soil Pollution*. 223: 3373-3383.
13. Beltran P. M. E. (2014). La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Corpoica Ciencia Tecnología Agropecuaria*. 15: 101-113.
14. Benitez R. G., 2014. Biorremediación de un suelo contaminado con gasolina 10,000 ppm por bioestimulación con extracto fúngico crudo, lombricomposta y fitorremediación con *Zea mays* L y *Azotobacter vinelandii*. Tesis de

Licenciatura en Químico Farmacobiología, Laboratorio de Microbiología Ambiental. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia. Mich. México (Inédita).

15. Bobadilla H. C. & Rincón V. S. C. (2008). Aislamiento y evaluación de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de compost obtenido de residuos plaza. Trabajo de grado de Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D. C. (Inédita). Disponible en línea en <http://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis130.pdf>
16. Bodour A. Miller-Maier R. (1998). Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*. 32(3):273-280.
17. Bodour A. Miller-Maier R. (2003). Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(6):3280-3287.
18. Boschini C. F., & Amador A. R., (2000). Fenología productiva y nutricional de maíz para la producción de forraje. *Agronomía Mesoamericana* 11:171-177.
19. Braibant C. (2004). Estudio del potencial de degradación de los hidrocarburos por *Acinetobacter* sp. y *Pseudomonas putida* para su aplicación en la biorremediación de suelos contaminados. Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Ingeniería en Biotecnología. Informe práctica de especialidad. Disponible en línea en http://bibliodigital.itcr.ac.cr/bitstream/handle/2238/206/potencial_degradacion_hidrocarburos.pdf?sequence=1&isAllowed=y

20. Cando R. M., (2011), Determinación y análisis de un proceso de biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos. Tesis de licenciatura de Ingeniero Ambiental. Universidad Politécnica Salesiana Sede-Cuenca (Inédita).
21. Cheng K., Rong X., Pinto-Tomás A., Fernández-Villalobos M., Murillo-Cruz C., Huang Y. (2015). Population Genetic Analysis of *Streptomyces albidoflavus* Reveals Habitat Barriers to Homologous Recombination in the Diversification of Streptomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*. 81(3):966-975.
22. Cisneros de la Cueva S., Hernández R. C., Soto C. N. O., Rojas C. J. A., López M. J. (2016). Changes in Bacterial Populations During Bioremediation of Soil Contaminated With Petroleum Hydrocarbons. *Water Air Soil Pollution*. 227:91.
23. Corona-Ramírez L, Iturbide-Argüelles R. (2005) Atenuación natural en suelos contaminados con hidrocarburos. *Ingeniería Investigación y Tecnología*. 6:119-26
24. Delgadillo-López, A. E., González-Ramírez. C. A., Prieto-García, F., Villagómez-Ibarra, J. R., Acevedo-Sandoval, O. (2011). Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 14: 597-612.
25. Eibes, G., Cajthaml, T., Moreira, M., Feijoo, G., Lema, J. (2006). Enzymatic degradation of anthracene, dibenzothiophene and pyrene by manganese peroxidase in media containing acetone. *Chemosphere* 64: 408–414.
26. Ferrera-Cerrato R., Alarcón A., Mendoza-López M. R., Sangabriel W., Trejo-Aguilar D., Cruz-Sánchez J., López-Ortiz C., Delgadillo-Martínez J. (2007).

Phytoremediation of a fuel oil-polluted soil with *Phaseolus coccineus* using organica or inorganic fertilization. *Agrociencia*, 41:817-826.

27. Fernández L. L. C., Rojas A. N. G., Roldán C. T. G., Ramírez I. M. E., Zegarra M. H. G., Uribe H. R., Reyes Á. R. J., Flores H. D., Arce O. J. M. (2006). *Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados*. Editorial del Deporte Mexicano. México D.F.
28. Franzetti A., Bestetti G., Caredda P., La Colla P., Tamburini E. (2008). Surface-active compounds and their role in the access to hydrocarbons in *Gordonia* strains. *FEMS Microbiol Ecol* 63:238-248.
29. Fujii T., Tatara T., Minagawa M. (1986). Studies on Application of Lipolytic Enzyme in Detergency I. Effect of Lipase from *Candida cylindracea* on Removal of Olive Oil from Cotton fabric. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 63:796-799.
30. Gao, Y.Z., Ling, W.T., Zhu, L.Z., Zhao, B.W., Zheng, Q.S. (2007). Surfactant-enhanced phytoremediation of soils contaminated with hydrophobic organic contaminants: potential and assessment. *Pedosphere* 17: 409–418.
31. Gao, Y., Shen Q., Ling W., Ren L. (2008). Uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Trifolium pretense* L. from water in the presence of a nonionic surfactant. *Chemosphere* 72 :636–643
32. García-González, M.M., Farías-Rodríguez, R.; Peña-Cabriales, J.J.; Sánchez-Yáñez, J.M. (2005). Inoculación del trigo var. Pavón con *Azospirillum spp.* y *Azotobacter beijerinckii*. *Terra Latinoamericana* 23:65-72.

33. García H. D, (2007), Biorremediación de agua domestica contaminada con aceite residual automotriz. Tesis de Doctorado en Ciencias en Biología Experimental, Laboratorio de Microbiología Ambiental. Instituto de Investigaciones Químico Biologicas, Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo. Morelia, Mich, México. (Inédita).
34. Garzón, L., Roldán, F. & García. E. (2011). Evaluación de la bioestimulación (nutrientes) en suelos contaminados con hidrocarburos utilizando respirometría. *Acta Biológica Colombiana*. 16:195-208.
35. Hameeda B., Harini G., Rupela O., Wani P., Reddy G. (2006). Growth promotion of Maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from compost and macrofauna. *Microbial Research*. 2:234-242.
36. Hao D. H., Lin J. Q., Song X., Lin J. Q., Su Y. J., Qu Y. B. (2008). Isolation, Identification and Performance Studies of a Novel Paraffin-degrading Bacterium of *Gordonia Amicalis* LH3. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 13:61-68.
37. Hommel R. K. (1994). Formation and function of biosurfactants for degradation of wáter-insoluble substrates. *Biochemistry of Microbial Degradation*. 3:63-87.
38. Infante C., Ortega C., Morales F., Ehrmann U., Hernández-Valencia I., Pérez R. (2010). Efecto del potasio en la biorremediación de un suelo contaminado con un crudo liviano. *Bioagro*. 22: 145-152.
39. Izinyon, O. C., & Seghosime, A. (2013). Assessment of Show Star Grass (*Melampodium Paludosum*) for Phytoremediation of Motor Oil Contaminated Soil. *Civil and Environmental Research*. 3:19-28.

40. Jain D., Collins-Thompson D., Lee H., Trevors J T. (1991). A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganism. *Journal of Microbiological Methods*. 13(4):271-279.
41. Khan, M. S.; Zaidi, A. and Wani, P. (2007). Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture – a review. *Agronomy for Sustainable Development*. 27: 29- 43.
42. Khan, M.S.; Zaidi, A.; Ahemad, M.; Oves, M.; Wani, P.A. (2010). Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi – current perspective. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 56:73–98.
43. Larenas, G & M de Viana. (2005). Germinación y supervivencia del pasto cubano *Tithonia tubaeformis* (Asteraceae) en suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo. *Ecología Austral*. 15 (2):177-181.
44. Leal C. M. (2003). Biorremediación de un suelo agrícola contaminado con aceite residual automotriz. Postgrado Interinstitucional de Ciencias Agrícolas y Forestales. Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad de Colima. (Inédita) Disponible en http://digeset.ucol.mx/tesis_posgrado/Pdf/Maribel%20Leal%20Castillo.pdf
45. LGEEPA (2008) "Ley general del equilibrio ecológico y la protección al ambiente". Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión, Última reforma DOF 15/05/2008, México, D. F., Disponible en: <http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/ref/lgeepa.htm>
46. Liao C., Xu W., Lu G., Deng F., Liang X., Guo C., Dang X. (2016). Biosurfactant-enhanced phytoremediation of soils contaminated by crude oil using maize (*Zea mays* L.) *Ecological Engineering*. 92: 10–17.

47. Lotfinasabasl S., Gunale V. R., Rajurkar N. S. (2012). Assessment of petroleum hydrocarbon degradation from soil and tarball by fungi. *Bioscience Discovery*. 3 (2):186-192.
48. Lu, S.H., J. Wu, and P. Somasundaran. (2012). Micellar evolution in mixed nonionic/anionic surfactant systems. *Journal of Colloid and Interface Science*. 367:272–79.
49. Mager, D., & Valencia, I. H. (2013). Actividad microbiana durante la fitorremediación de un suelo contaminado con un crudo liviano. *Revista de la Facultad de Agronomía*. 30(1): 52-71.
50. Makkar R, Cameotra S & Banat I (2011) Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express* 1:5.
51. Maldonado-Chávez E., Rivera-Cruz M. C., Izquierdo-Reyes F., Palma-López D J. (2010). Efectos de rizosfera, microorganismos y fertilización en la biorremediación y fitorremediación de suelos con petróleo crudo nuevo e intemperizado. *Universidad y Ciencia* 26(2):121-136.
52. Mancera-Lopez M. E., Esparza-Garcia F., Chavez-Gomez B., Rodríguez-Vazquez R., Saucedo-Castañeda G., Barrera-Cortes J. (2008). Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation–bioaugmentation with filamentous fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation* 61:151–160.
53. Mercadé M., Monleón L., de Andrés C. (1996). Screening and selection of surfactant-producing bacteria from waste lubricating oil. *Journal Applied Microbiology*. 81(2):161-166.

54. Merkl, N., Schultze-kraft, R., & Infante, C. (2005). Phytoremediation of Petroleum-Contaminated Soils. *Water, Air, and Soil Pollution*, 165:195-209.
55. Merkl, N., Schultze-kraft, R., & Infante, C. (2005). Assessment of tropical grasses and legumes for phytoremediation of petroleum-contaminated soils. *Water, Air, and Soil Pollution*. 165: 195–209.
56. Millioli V. S., Servulo E. L. C., & Sobral L. G. S., & De Carvalho D. D. (2009) Bioremediation of crude oil-bearing soil: evaluating the effect of rhamnolipid addition to soil toxicity and to crude oil biodegradation efficiency. *Technology*. 11:181-188.
57. Mohamed, A., and A.M. Mafoodh. (2006). Solubilization of naphthalene and pyrene by sodium dodecylsulfate (SDS) and polyoxyethylenesorbitan monooleate (Tween 80) mixed micelles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 287:44–50.
58. Mohsenzadeh F., Nasser S., Mesdaghinia A., Nabizadeh R., Zafari D., Khodakaramian G., Chehregani A. (2010). Phytoremediation of petroleum-polluted soils: Application of *Polygonum aviculare* and its root-associated (penetrated) fungal strains for bioremediation of petroleum-polluted soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73: 613–619
59. Mohsenzadeh F., Chehregani R. A., Akbari M. (2012). Evaluation of oil removal efficiency and enzymatic activity in some fungal strains for bioremediation of petroleum-polluted soils. *Iranian Journal of Environmental Health Sciences & Engineering*. 9:26.
60. Naranjo, L., Urbina, H., González, M., Córdova, J., Muñoz, S., León, V. (2008). Potential of autochthonous non-white rot fungi for partial enzymatic conversion PEC-IDEA Technology of Venezuelan extra-heavy crude oil. Disponible en

[https://www.researchgate.net/profile/Leopoldo_Naranjo/publication/242288511_Potential_Of_Autochthonous_Non-White_Rot_Fungi_For_Partial_Enzymatic_Conversion_\(Pec-Idea_Technology\)_Of_Venezuelan_Extra_Heavy_Crude_Oil/links/02e7e52fbd78b9bb8d000000.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Leopoldo_Naranjo/publication/242288511_Potential_Of_Autochthonous_Non-White_Rot_Fungi_For_Partial_Enzymatic_Conversion_(Pec-Idea_Technology)_Of_Venezuelan_Extra_Heavy_Crude_Oil/links/02e7e52fbd78b9bb8d000000.pdf)

61. Norma oficial mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000 que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis. México.
62. Norma oficial mexicana. NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012 que establece los límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificación para la remediación. México.
63. Ni H., Zhou W., Zhu L. (2014). Enhancing plant-microbe associated of phenanthrene and pyrene contaminated soil by SDBS-Tween 80 mixed surfactants. *Journal Environmental Sciences*. 26:1071-1079.
64. Pardo L., Perdomo C., L. Benavides J. (2004). Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo. *NOVA* 2:40-49.
65. Parekh, P., D. Varade, J. Parikh, and P. Bahadura. (2011). Anionic–cationic mixed surfactant systems: Micellar interaction of sodium dodecyl trioxyethylene sulfate with cationic gemini surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 385:111–20.
66. Peña-Castro J. M., Barrera-Figueroa B. E., Ruiz-Medrano r., Xoconostle-Cázares B. (2006). Bases moleculares de la fitorremediación de hidrocarburos totales del petróleo. *Terra Latinoamericana*, 24:529-539.

67. Pérez-Armendáriz, B., Castañeda-Antonio, D., Castellanos, G., Jiménez-Salgado, T., Tapia-Hernández, A., & Martínez-Carrera, D. (2011). Anthracene effect on stimulation of growth of maize and kidney bean. *Terra Latinoamericana*. 29(1): 95–102.
68. Pernía B., Demey J.R., Inojosa Y., Naranjo-Briceño L. (2012). Biodiversidad y potencial hidrocarbonoclástico de hongos aislados de crudo y sus derivados: Un meta-análisis. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*. 3(1):1-39
69. Pinto M. A., Gerales K. A., De Franceschi D. D., Marcos B. D. (2007). Laboratory study on the bioremediation of diésel oil contaminated soil from a petrol station. *Brazilian Journal of Microbiology* 38:346-353.
70. Piña M. O. (2012). Lavado in situ de un suelo contaminado con diesel, asistido con surfactantes. Tesis de Maestria en Ingenieria Civil. Instituto Politecnico Nacional. Disponible en <http://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/5694/Tesis%20Maestr%C3%ADa%20Oscar%20Pi%C3%B1a%20Maldonado.pdf?sequence=1> (Inedita)
71. Rajeswari V., Kalaivani P. S., Saranya V., Suguna P., Shenbagarathai R. (2016). Immunostimulation by phospholipopeptide biosurfactant from *Staphylococcus hominis* in *Oreochromis mossambicus*. *Fish and Shellfish Immunology*. 48: 244-253.
72. Riojas-González H. H., Gortáres-Moroyoqui P., Mondaca-Fernández I., Balderas-Cortes J. J. y Torres-Bustillos L. G. (2011). Aplicación de Tween 80 y D-Limoneno en la biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos. *Ide@s CONCYTEG*. 6:571-584.

73. Riojas, H., P. Gortáres, I. Mondaca, J. Balderas y L. G. Torres (2010), Evaluación de la biorremediación aplicando mezclas de surfactante-solvente en suelo contaminado con diesel, Revista. Latinoamericana de Recursos Naturales 6 :100-109.
74. Rosales Morales, L. A. (2008). Biorremediación de suelos contaminados con aceite usado de automóvil con el hongo de la pudrición blanca *Pleurotus ostreatus*. Disponible en <http://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/12726/biorremediacion.pdf?sequence=1>.
75. Roselene, H. (2014). A Study on Remediation of Polluted Water Using *Canna indica*. International Journal of Research & Review, 1:1-15.
76. Ruiz N. R. E. (2001). Efectos de niveles de abono verde sobre la degradación de atrazina en un suelo agrícola no esterilizado y esterilizado. Tesis de Doctorado en Ciencias en Área Biotecnología. Universidad de Colima (Inédita). Disponible en línea en http://digeset.ucol.mx/tesis_posgrado/Pdf/Ramiro%20Eleazar%20Ruiz%20Najera.pdf
77. Salazar J. (2005). El fósforo en los sistemas ganaderos de Leche. *Agronomía Mesoamericana*. 16:231-238.
78. Salinas-Martínez A., Hernández-Carbajal G. R., Santos-Córdoba M. D., López-Miranda J., Soto-Cruz N. O., Pérez-Andrade H., Medrano Roldan H. (2010). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo. *Ciencia, Tecnología e Innovación para el Desarrollo de México*. 2(49)

79. Sánchez-Yáñez J.M., (2007). Breve Tratado de Microbiología Agrícola; teoría y práctica, Eds. Microbiología Ambiental, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Secretaria de Desarrollo Agropecuario, Gobierno del Estado de Michoacán, COSUSTENTA, SA de CV, CIDEM. ISBN: 978-970-95424 Morelia, Mich, México. 155:1-7
80. Saratale G., Kalme S., Bhosale S., Govindwar S. (2007). Biodegradation of kerosene by *Aspergillus ochraceus* NCIM-1146. *Journal of Basic Microbiology*. 47: 400-405.
81. Shi Z, Chen J, Yin X. (2013). Effect of anionic-nonionic-mixed surfactant micelles on solubilization of PAHs. *Journal of the Air & Waste Management Association*. 63(6): 694-701.
82. Sousa M., Dantas I. T., Feitosa F. X., Alencar A. E. V., Soares S. A., Melo V. M. M., Goncalves L. R. B., Sant' Ana H. B. (2014). Performance of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* LAMI005 on the formation of oil / biosurfactant / water emulsion: study of the phase behaviour of emulsified systems. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 31(03):613-623.
83. Supaphol S., Jenkins S. N., Intomo P., Waite IS & O'Donnell A. G. (2011) Microbial community dynamics in mesophilic anaerobic co-digestion of mixed waste. *Bioresour. Technol.* 102: 4021–4027.
84. Thavasi R., Sharma S., Jayalakshmi S. (2011). Evaluation of screening methods for the isolation of biosurfactant producing marine bacteria. *Petroleum & Environmental Biotechnology*. S1:001.

85. Tsao D. (2003). *Phytoremediation Volumen 78 de Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer. 51-75. Germany
86. Tanee, F. B. G., & Akonye, L. A. (2009). Effectiveness of *Vigna Unguiculata* as a Phytoremediation Plant in the remediation of Crude Oil polluted soil for Cassava (*Manihot Esculenta*; Cranz) Cultivation *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 13:43-47.
87. Trujillo-Narcia A., Rivera-Cruz M. C., Lagunez-Espinoza L. C., Palma-Lopez D. J., Soto-Sánchez S., Ramirez-Valverde G. (2012). Efecto de la restauración de un fluvisol contaminado con petróleo crudo. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 28:361-374.
88. Tugrul T., Cansunar E. (2005). Detecting surfactant-producing microorganisms by the drop-collapse test. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 21:851-853.
89. Vallejo V, Salgado L, Roldan F. (2005). Evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de THP en suelos contaminados con petróleo. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 5: 67-78.
90. Venosa. A. & Zhu. X. (2003). Biodegradation of crude oil contaminating marine shorelines and freshwater wetlands. *Spill Science & Technology*. 8:63-178.
91. Villalba V. N. M. (2013). Remediación de suelos contaminados con fenantreno por oxidación química. Tesis de Maestría en Fisicoquímica. Facultad de Ciencias Naturales y Exactas. Universidad Nacional de Asunción. (Inedita) Disponible en <http://www.conacyt.gov.py/sites/default/files/TES-BN-004.pdf>

92. Walpole E.R., Myers R., Myers LS. (2007). Probabilidad & Estadística para Ingeniería & Ciencias. Ed. Pearson, 8ª, ISBN: 13:978-970-26-0936-0. México.
93. Walter V., Syldatk C. & Hausmann R. (2010). Screening Concepts for the Isolation of Biosurfactants Producing Microorganisms. *Microbiology*. 85:56-62.
94. Willumsen P. & Karlson U. (1997). Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. *Biodegradation* 7:415-423.
95. Yáñez-Ocampo G. & Wong-Villareal A. (2013). Biosurfactantes microbianos, producción potencial con residuos agroindustriales de Chiapas. *BioTecnología*. 3:12-28.
96. Youssef N. H., Duncan K. E., Nagle D. P., Savage K. N., Knapp R. M., McInerney M. J. (2004). Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* 56: 339– 347
97. Yu, H., L. Zhu, & W. Zhou. (2007). Enhanced desorption and biodegradation of phenanthrene in soil–water systems with the presence of anionic-nonionic mixed surfactants. *Journal of Hazardous Materials* 142:354–61.
98. Zacarías-Salinas M., García-Peña E. I & Torres L. G. (2013). Treatment of Wastewaters Generated by Surfactant-Enhanced Washing of Soil in an Aerobic Biofilter Inoculated with a Consortium of Hydrocarbon Degradars. *British Biotechnology Journal*, 3:471-484.
99. Zaidi, A., Khan, M. S., Ahemad, M., Oves, M. & Wani, P. A. (Editors). (2009). Recent advances in plant growth promotion by phosphate-solubilizing

microbes. In: Mohammad Saghir Khan; Almas Zaidi and Javed Musarrat (Editors). *Microbial strategies for crop improvement*. 23-50. Springer-Verlag, Berlin.

100. Zamora, A; Ramos, J. & Arias, M. (2012). Efecto de la contaminación por hidrocarburos sobre algunas propiedades químicas y microbiológicas de un suelo de sabana. *Bioagro*. 24:5-12.

101. Zhong-Yi C., Xiao-Yong L., Xiu-Lan Y., Lu S., Dan Z & Tao L. (2013). Enhanced Desorption of PAHs from Manufactured Gas Plant Soils Using Different Types of Surfactants. *Pedosphere*. 24:209-219.