



Bioestimulación integral de un suelo contaminado por 60000 ppm de aceite residual automotriz

Integral biostimulation of soil polluted by 60000 ppm of motor waste oil

Saucedo-Martínez Blanca Celeste¹, Farías-Rodríguez Rodolfo², Santoyo-Pizano Gustavo²,
Juan Manuel Sánchez-Yáñez^{1*}

Datos del Artículo

¹Laboratorio de Microbiología Ambiental, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mich., México.

²Ecología Microbiana, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás.

celsm@live.com.mx
gsantoyo@umich.mx
rrfarias@umich.mx

Dirección de contacto. 1 Laboratorio de Microbiología Ambiental, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciudad Universitaria, Col FJ Mujica S/N, Felicitas del Río, 58000, Morelia, Mich., México

Juan Manuel Sánchez-Yáñez

E-mail address :
svanez@umich.mx

Palabras clave:

Suelo,
ARA,
detergente,
H₂O₂,
solución mineral,
mineralización.

J. Selva Andina Res. Soc.
2017; 8(2):91-103.

Historial del artículo.

Recibido Diciembre, 2016.
Devuelto mayo 2017
Aceptado junio, 2017.
Disponible en línea, agosto, 2017.

Editado por:
**Selva Andina
Research Society**

Key words:

Soil,
WMO,
detergent,
mineral solution,
H₂O₂
Mineralization.

Resumen

El aceite residual automotriz (ARA) es una mezcla de hidrocarburos (HICO) contaminantes del suelo. Dado que el problema es complejo así debe ser la solución una bioestimulación (BIS) secuencial, complementaria y acumulativa o integral; una primer BIS con detergente que emulsifique el ARA, una segunda con solución de nutrientes inorgánicos que restituya la relación C (carbono): N (nitrógeno); una tercera con H₂O₂ como proveedor de O₂ (oxígeno) para favorecer la oxidación del ARA, y el control de la humedad del suelo al 80% de la capacidad de campo para el intercambio de gases en la mineralización de ARA. El objetivo de este trabajo fue: i) bioestimulación integral del suelo contaminado por 60000 ppm de ARA. El suelo se bioestimuló integralmente con detergentes, una solución mineral (SOMI), H₂O₂ y la humedad del suelo se ajustó al 80% de la capacidad de campo. Además, se cuantificó la población bacteriana oxidante de ARA, que sintetizo detergentes asociados con la emulsificación del ARA y realizo su identificación molecular. Los resultados probaron que la BIS secuencial complementaria y acumulativa o integral con un detergente aniónico/no iónico, la SOMI, el H₂O₂ al 0.5% redujeron el ARA de 60000 ppm a 27200 ppm en 23 días. Mientras que la densidad de la población oxidante de ARA fue de 268 X 10⁶ UFC/g de suelo seco, de ahí se seleccionaron las dominantes que sintetizaron detergentes relacionados con el ARA e identificaron 47 géneros bacterianos divididos en: Actinomycetos, Firmicutes y Proteobacterias. Lo anterior apoya que la alternativa para remediar un suelo impactado con ARA demanda una solución compleja o integral; y que existen en ese ambiente bacterias que sintetizan detergente, con un empleo potencial en suelo contaminado con ARA.

© 2017. *Journal of the Selva Andina Research Society, Bolivia. Todos los derechos reservados.*

Abstract

Waste motor oil (WMO) is a mixture of hydrocarbons (HICO) soil pollutants. An alternative solution for its elimination is the biostimulation (BIS), sequential, complementary and accumulative or integral which requires at first BIS by detergents to emulsify WMO, the second one following by enrichment by mineral solution, H₂O₂ as a O₂ source for oxidation of WMO and controlling moisture soil content at 80% field capacity for exchange gases in soil to stimulate WMO mineralization. The aim of the work was: i) analyze in the integral BIS of contaminated soil by 60000 ppm of WMO. The first BIS was applying detergents to emulsify the WMO, the second BIS by mineral solution, then by H₂O₂, under humidity control at 80% of field capacity, for the best oxidation of WMO. Additionally bacterial population oxidant WMO was measured, to select those which synthesized detergent related to WMO degradation, finally the type of bacteria were molecular identify. Results showed than integral BIS by an anionic / nonionic detergent, then enrichment with mineral solution, and 0.5% H₂O₂, reduced WMO from 60000 ppm to 27200 ppm in 23 days. Density of bacterial WMO oxidant population was 268 X 10⁶ CFU/g dry soil, from which the dominant ones were selected and identified 47 bacterial genera divided into: Actinomycetes, Firmicutes and Proteobacteria. These results showed that soil pollution by high concentration level of WMO demanded at integrated BIS, also was found some bacterial genus which synthesized detergent with potential used in soil polluted by WMO.

© 2017. *Journal of the Selva Andina Research Society, Bolivia. All rights reserved.*

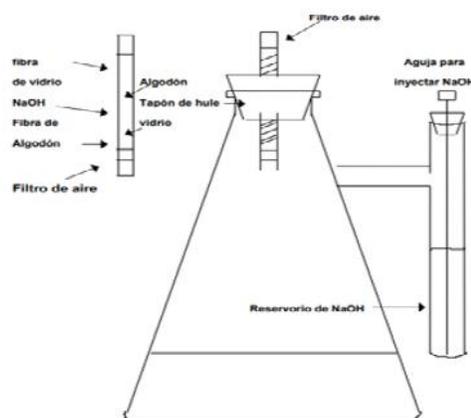
Introducción

El aceite residual automotriz (ARA) es una mezcla de moléculas insolubles de hidrocarburos (HICO) alifáticos de cadenas de entre C11-C20 y de C20-C35, al igual que aromáticos, policíclicos, halogenados (García-Hernández *et al.* 2007), mostrados en la Tabla 1, en consecuencia esta mezcla en México se clasifica como un residuo peligroso, de acuerdo con la regulación conocida como: “Ley General de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente” (LGEEPA 2008); el ARA es generado en talleres mecánicos por uso en la maquinaria agrícola, su inadecuada disposición final es un grave problema ambiental, cuando contamina el agua o suelo (Rosales-Morales 2008), porque en lo general también es de riesgo para la salud humana y la vida. En suelo ARA, forma una película en la superficie que impide el intercambio de O₂ (oxígeno), la difusión de agua (Larenas-Parada & De Viana 2005), inhibe los ciclos biogeoquímicos que sustentan la vida, tales efectos negativos limitan la producción agrícola (Pardo-Castro *et al.* 2004), además de que contaminan el agua superficial y subterránea (Rosales-Morales 2008, Cando-Rodríguez 2011). Algunas alternativas para remediar el suelo impactado con una relativa elevada concentración de ARA superiores a 4440 ppm; recomiendan agentes químicos (Delgadillo-López *et al.* 2011) como el KMnO₄ (permanganato de potasio) y (NH₄)₂S₂O₈ (persulfato de amonio) que son oxidantes fuertes (Villalba 2013), con la desventaja de su alto costo y daño colateral al ambiente. Mientras que la opción biológica es la BIO (biorremediación) del suelo por BIS (bioestimulación) para la eliminación de 60000 ppm de ARA, que induce a la microbiota nativa heterotrófica aerobia a oxidarlo, primero con un detergente para su emulsificación, seguida de una segunda

BIS por enriquecimiento con minerales de N (nitrógeno), PO⁻³₄ (fosfatos) K (potasio) y el H₂O₂ una fuente de O₂ elemento fundamental en la oxidación del ARA, mientras que un aspecto obligado de la BIS, es asegurar una humedad del suelo al 80% de su capacidad de campo, lo que facilita el intercambio de gases pues la mineralización del ARA es aeróbica (Pardo-Castro *et al.* 2004). La integración de estos factores físico-químicos es decir secuencial, complementaria y acumulativa en la BIS son clave en la eficaz recuperación de suelo, la que en realidad ha sido poco investigada, siendo fundamental para entender y manejar un problema de contaminación por ARA, con una solución ecológica y eficaz, por lo que el objetivo de este trabajo fue la bioestimulación integral de un suelo contaminado por 60000 ppm de ARA.

Materiales y métodos

Figura 1 Matraz Bartha



Bioestimulación con detergente para emulsificar y H₂O₂ para inducir la máxima mineralización del ARA. En la BIS del suelo, se seleccionó el detergente y la concentración de H₂O₂ para la máxima mine-

realización del ARA. Para ello se realizaron pruebas en 36 microcosmos, matraces tipo Bartha (Figura 1) (Leal-Castillo 2003), la mineralización del ARA se determinó por la generación de CO₂ derivado de su oxidación. Para ello 100 g de suelo contaminado con 60000 ppm de ARA se colocaron en cada matraz Bartha, que se bioestimuló de 2 veces a la semana con los detergentes: alcohol etoxilado/aniónico dodecil sulfato de sodio (ALEDOS) y alcohol etoxilado (ALETTO), mientras que BIS con 1.0 mL/100 g de suelo con el H₂O₂ al 0.5% y 0.1% por 30 días (Ruiz-Nájera 2001). En el suelo como variable respuesta de la desaparición del ARA, se empleó el método de Soxhlet recomendado ampliamente para la detección de grasas y aceites en ambientes naturales antes y después de la BIS secuencial, complementaría y acumulativa (Infante *et al.* 2010).

En suelo cuantificación de la población bacteriana heterotrófica oxidante de aceite residual automotriz. Para ello 1 g de suelo contaminado con ARA bioestimulado con detergente, solución mineral, H₂O₂, ajustado al 80% de la capacidad de campo, se diluyó en solución salina detergente con NaCl al 0.85% (detergente Corona al 0.1%) mediante diluciones seriadas 10⁻¹ a 10⁻¹⁰ (Mercadé *et al.* 1996, Walter *et al.* 2010), de las que se tomaron 0.2 mL para sembrar en agar ARA (Willumsen & Karlson 1997, Walter *et al.* 2010) con la siguiente composición (g L⁻¹): peptona de caseína 5 g, extracto de levadura 1 g, KH₂PO₄ 2.5 g, K₂HPO₄ 2.5 g, MgSO₄ 2.5 g, NaCl 1.0 g, 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, el pH se ajustado a 7.0, luego las cajas de agar ARA se incubaron a 30 °C/48 h, para el conteo bacteriano expresado UFC (unidades formadoras de colonias)/g suelo seco: las UFC dominantes y dife-

rentes se seleccionaron y purificaron, en agar nutritivo como agar ARA para obtener cultivos axénicos y realizar la prueba de detección de la síntesis de detergentes bacterianos asociada con la mineralización del ARA.

Detección de la síntesis de detergentes “in vitro” por la técnica “Drop-collapse” en las bacterias oxidantes de aceite residual automotriz. Para la detección de la síntesis de detergente en las bacterias del suelo contaminado con ARA, se usaron microplacas de poliestireno de 96-micropozos de 12.7 x 8.5 cm, con un diámetro cada uno de 8 mm (Bodour & Miller-Maier 1998), previamente cada micropozo se lavó 3 veces con agua caliente, etanol, agua destilada en proporciones 1:1:1, para la prueba cualitativa en cada pozo se agregó 1.8 µL aceite de motor 10W-40 Pennzoil®, en tanto que para la cuantitativa 0.2 µL de aceite mineral. En ambas pruebas en ambas se agregó una alícuota de 5.0 µL de caldo ARA, en el centro de cada micropozo, entonces la microplaca se inclinó en un ángulo de 45°. En la prueba cualitativa los resultados fueron evaluados visualmente después de 1 min, si la gota de aceite perdía su forma, se consideró positivo derivado de su emulsificación; mientras que en la cuantitativa luego de 1 min se midió el diámetro de las gotas con un micrómetro calibrado (Bodour *et al.* 2003).

Identificación molecular de las bacterias productoras de detergentes oxidantes aislados durante la bioestimulación de suelo contaminado con aceite residual automotriz. En esta etapa de cada cultivo axénico de las bacterias oxidantes de ARA, que sintetizaron detergente, se realizó la extracción y purificación del ADN genómico. El ADN fue analizado por electroforesis con gel de agarosa al 1%, se amplificó la región hipervariable V3 del gen 16S rRNA. Las condiciones de reacción para la PCR del

termociclador fueron desnaturalización inicial de ADN a 95 °C/1 min, seguido de 10 ciclos de desnaturalización a 95 °C/30 s, hibridación 65-60 °C/30 s, con una reducción de la temperatura de 0.5 °C en cada ciclo, un paso de extensión a 72 °C/1min. Para separar y visualizar los amplicones de rRNA 16S se realizó de nuevo la electroforesis con gel de agarosa al 1%, que se corrió a 80 V/30 min. Al finalizar el gel se observó en un transiluminador UV (Cisneros de la Cueva *et al.* 2016) finalmente se realizó la identificación molecular (Laboratorio de Bacteriología Molecular, CINVESTAV Unidad Irapuato, Gto, México). Las secuencias obtenidas fueron analizadas, taxonómicamente clasificadas con un algoritmo BLASTn.NET distribuido (Dowd *et al.* 2005) contra una base de datos de secuencias 16S rRNA de alta calidad obtenidas de NCBI (Cisneros de la Cueva *et al.* 2016)

Resultados

En la Figura 2 se indica la BIS integral del suelo contaminado por 60000 ppm de ARA, primero mediante los detergentes: ALEDOS, ALETO, luego por la solución mineral, seguida por H₂O₂ al 0.5% y 0.1%, y asegurada por la humedad del suelo ajustada al 80% de la capacidad de campo: en donde se observó la generación de CO₂ producto de la mineralización del ARA. La BIS integral iniciada por la solución mineral; seguida del H₂O₂ al 0.1% y 0.5% en el día, contribuyó al aumento de la oxidación del ARA, en consecuencia hubo la máxima generación de CO₂ hasta el día 12. Mientras en la segunda BIS por la solución mineral, el H₂O₂ al 0.5% y 0.1% en los días 13, 14 y 15 no aumento la cantidad de CO₂, los valores numéricos derivados de la mineralización del ARA, no tuvieron diferencia estadística en comparación con los mismos valores numéricos del

CO₂ liberado en el suelo empleado como control negativo o CN, producto de la atenuación natural.

La Tabla 1 se muestra la BIS integrada de suelo, la primera al emulsificar el ARA por el detergente ALEDOS, a continuación por la segunda con la solución mineral, y la tercer BIS H₂O₂ al 0.5% lo decrecieron desde 60000 ppm a 27200 ppm, en tanto que la BIS con el detergente ALETO al 0.5%, seguida de la solución mineral, y la última con el H₂O₂ lo disminuyeron hasta 28100 ppm; en comparación con la BIS integral del suelo con ALEDOS, luego con la solución mineral y H₂O₂ al 0.1%, provocó una disminución del ARA desde 60000 ppm, hasta 30200 ppm; comparado con los valores numéricos de la mineralización del ARA en el suelo CN, donde la atenuación natural, lo redujo de 60000 ppm a 51200 ppm.

En la Tabla 2 se muestra en el suelo BIS integral impactada con 45000 ppm, la densidad de la población bacteriana oxidante de ARA, con un valor de 268 UFC x 10⁶/g suelo seco; comparado con el valor numérico de la población bacteriana del suelo usado como CA, donde había 40 UFC x 10⁶/g suelo, ambos valores numéricos fueron estadísticamente diferentes, en comparación con lo registrado en el suelo bioestimulado integralmente

En la Tabla 3 se presenta los aislados bacterianos del suelo contaminado con 27200 ppm de ARA derivados de la BIS secuencial, complementaria y acumulativa o integral, que crecieron en agar ARA: mediante la prueba *in vitro* para la síntesis de detergentes de la que se obtuvieron: 12 actinomicetos, 10 firmicutes y 25 proteobacterias de los 47 aislados, se demostró que 44 fueron positivos, mientras que la identificación molecular, dividió al grupo en una amplia diversidad de géneros y especies representados por los siguientes géneros y especies: *Achromobacter* sp., *Gordonia amicalis* y *Bacillus subtilis*.

Tabla 1 En suelo concentración de aceite residual automotriz por la bioestimulación integral con detergentes: alcohol etoxilado/dodecil sulfato de sodio, alcohol etoxilado H₂O₂, solución mineral a capacidad de campo del 80%

Suelo + 60000 ppm de aceite residual automotriz	Aceite residual automotriz (ppm) en el suelo después de 23 días de bioestimulación
Control negativo	51200 ^d
ALETO y H ₂ O ₂ , 0.1%	32100 ^c
ALETO y H ₂ O ₂ 0.5%	28100 ^a
ALEDOS y H ₂ O ₂ 0.1%	30200 ^b
ALEDOS y H ₂ O ₂ 0.5%	27200 ^{a*}

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

Tabla 2 En suelo densidad de la población bacteriana oxidante de aceite residual automotriz derivada de la bioestimulación integral

Suelo	UFC x 10 ⁶ /g suelo seco
Suelo sin aceite residual automotriz (control absoluto)	40 ^{b*}
Suelo con 60000 ppm de aceite residual automotriz	268 ^a

*Tukey (0.025) Letras distintas= con diferencia estadística. UFC = unidades formadoras de colonias.

Tabla 3 Determinación de la síntesis de detergentes “in vitro” de actinomicetos, firmicutes y proteobacterias que mineralizan el aceite residual automotriz (derivada de la bioestimulación integral) 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 4 se muestra el diámetro de gota de aceite mineral medido por síntesis de detergentes en los: actinomicetos, firmicutes y proteobacteria de suelo impactado por 27200 ppm de ARA por el método Drop-collapse. Ahí se registró que *Streptomyces* sp., SCARA1h y *Gordonia amicalis* SCARA8i tuvieron el mayor diámetro de gota con 5.16 mm, estos valores numéricos fueron estadísticamente diferentes a los de *B. subtilis* SCARA3h1 y *S. hominis* SCARA6i con 4.33, y 4 mm de diámetro de gota mientras que *Acinetobacter ursingii* SCARA3f2 registró un diámetro de gota de 4 mm. En

este ensayo de la prueba Drop-collapse todos los valores anteriores fueron estadísticamente diferentes al blanco o control absoluto sin aceite que solo contenía agua, ahí el diámetro de gota fue solo de 2 mm.

En la Figura 3 se muestra la identificación de géneros y especies bacterianos de un suelo con 27200 ppm de ARA, basado en las secuencias parciales de los genes 16S rRNA, con lo que de los 47 se detectaron 3 grupos: 12 actinomicetos, 10 firmicutes y 25 protobacterias.

Tabla 4 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 ^c	<i>Cupriavidus</i> sp SCARA4j	4 ^b
		<i>Cupriavidus</i> sp SCARA5j	2.66 ^d

*Tukey (0.025) Letras diferentes = con diferencia estadística

Figura 2. En suelo producción de CO₂ derivado de la mineralización del aceite residual automotriz por Bioestimulación integral con detergentes dodecil sulfato de sodio/alcohol etoxilado, alcohol etoxilado, H₂O₂, solución mineral y control de la humedad del suelo al 80% de capacidad de campo.

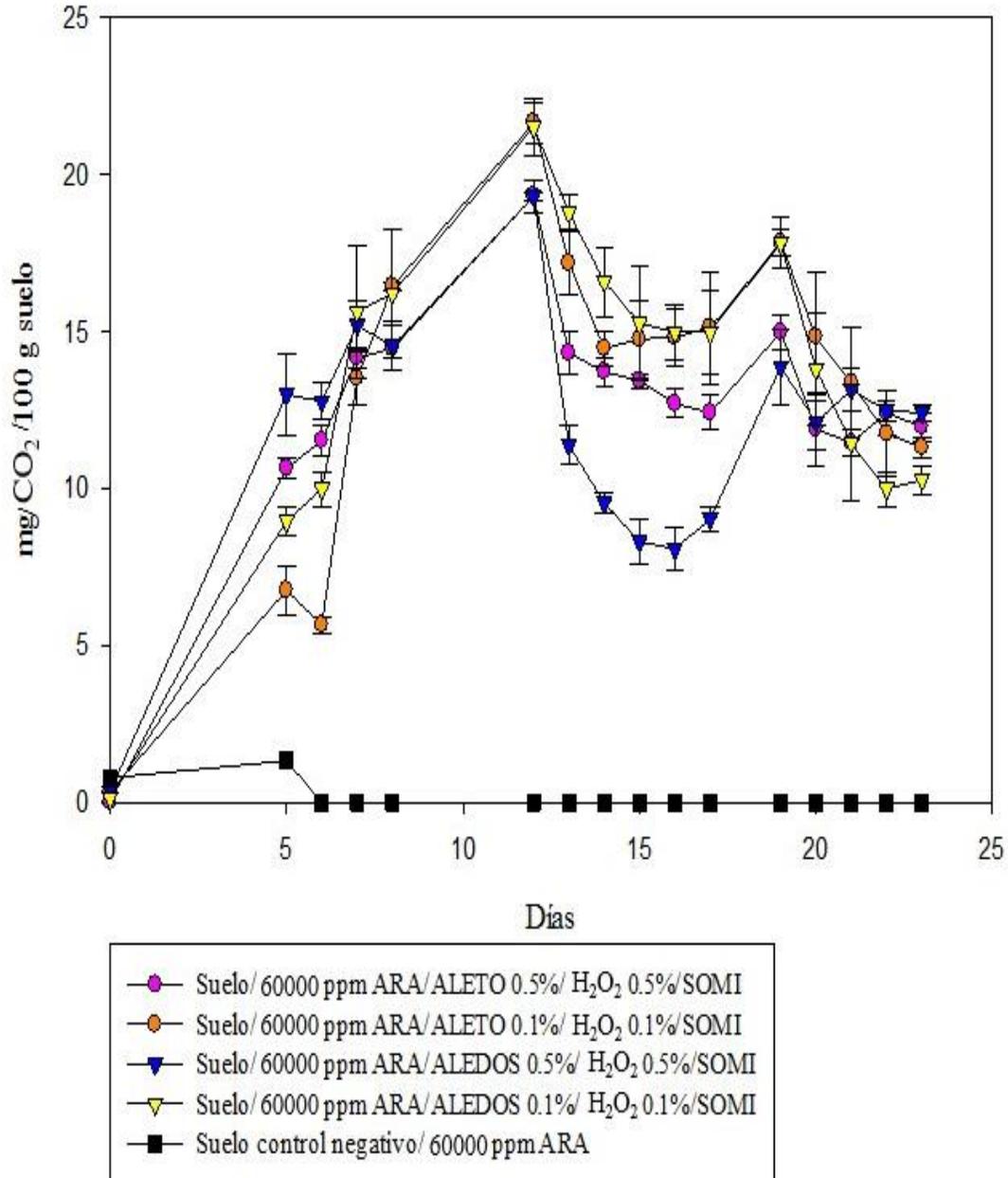
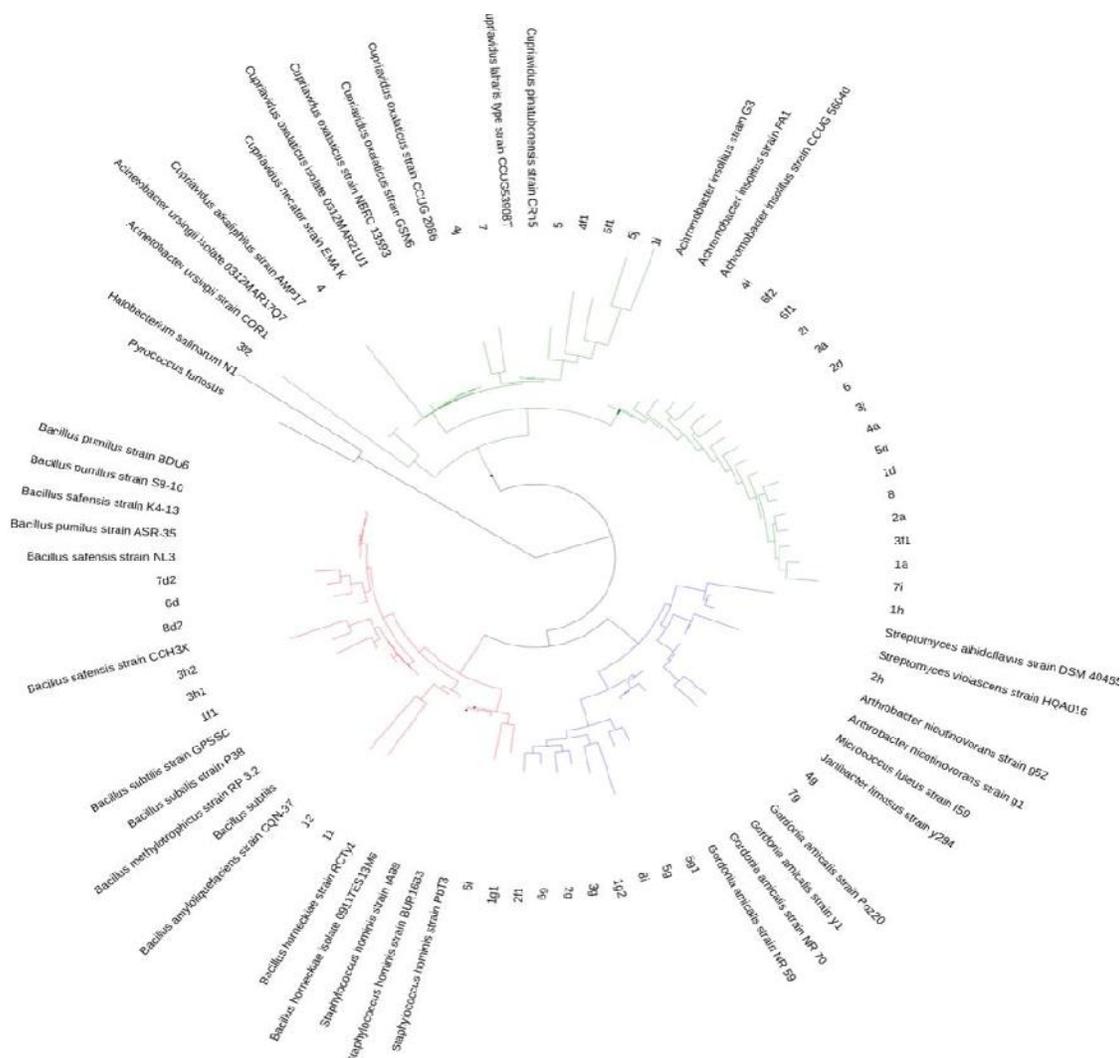


Figura 3 Árbol filogenético basado en las secuencias parciales de los genes 16S rRNA de los géneros y especies de bacterias aisladas de un suelo contaminado con 45000 ppm de aceite residual automotriz



Discusión

La Figura 2 sugiere que la BIS integral del suelo mediante, primero los detergentes ALEDOS, ALETO; luego la segunda por la solución mineral, que reestableció la relación C (carbono): N (nitrógeno) para facilitar la oxidación de las formas sencillas y parcialmente complejas, luego la tercer BIS se realizó con el H₂O₂, mientras como parte de la integral BIS se mantuvo la humedad al 80% de la capaci

dad de campo que favoreció el intercambio de gases, lo que indujo a la microbiota nativa heterotrófica aerobia al consumo inicial de la fracción alifática del ARA, lo que sugiere la ruta oxidativa que involucra los ácidos grasos, luego al decrecer los alifáticos, hubo una ataque microbiano sobre los aromáticos, como consecuencia la disminución de la concentración de la generación del CO₂, debido a que

los aromáticos del ARA son resistentes a la degradación biológica (Pinto *et al.*, 2007).

En la Tabla 1 se muestra la BIS integral del suelo con los detergentes que emulsificarán del ARA, ello sugiere que sucedió por sorción de los HICO en la superficie del suelo, luego por la formación de micelas (Zhon-Yi *et al.* 2014) para que con la segunda BIS mediante la solución mineral, seguida por la tercera con el H₂O₂ al 0.5 y 0.1 %; indujeron a que los microorganismos autóctonos heterótrofos aerobios tuviesen a disposición el ARA para su mineralización (Riojas-González *et al.* 2010). En suelo la BIS con los detergentes mixtos de mezclas aniónicas y no iónicas del ALEDOS fueron eficaces en la desorción de los HICO del ARA, en comparación con los detergentes aniónicos y catiónicos, o los catiónicos y no iónicos comunes recomendados para emulsificar HICO (Fujii *et al.* 1986, Altmajer 2004). La BIS con el detergente no iónico ALETO (alcohol etoxilado) solubilizó el ARA, mejor que los aniónicos acorde como lo reportaron Pinto *et al.* (2007) para que tanto la segunda BIS con solución mineral y la tercer con el H₂O₂ integralmente facilitaron la mineralización del ARA En suelo impactado con ARA las concentraciones del detergente al 0.5% y 0.1% sugieren que emulsificarán los HICO por la mayor formación de micelas disponibles para solubilización (Shi *et al.* 2013), además la BIS con el H₂O₂ al 0.1% y 0.5% indujo la mineralización del ARA (Asquith *et al.* 2012, Sáenz-Marta *et al.* 2015). En la Tabla 2 se muestra los datos experimentales que fueron similares a lo reportado por Zamora *et al.* 2012, que registraron en suelo impactado HICO de crudo mediano un aumento en la densidad de bacterias oxidantes de esa clase de HICO en comparación con la misma densidad registrada en el suelo sin contaminar con el crudo mediano u CA; al respecto García *et al.*, 2011 reportaron que en un suelo

impactado por HICO totales del petróleo, por BIS con fertilizantes minerales hubo un incremento en la densidad microbiana, en comparación con el mismo suelo usado como CA. Mientras que Venosa & Zhu 2003 en un suelo bioestimulado con minerales se detectó la degradación de HICO, que generó compuestos intermediarios simples durante su mineralización, debida a que la BIS indujo una amplia diversidad microbiana heterotrófica aerobia oxidante de HICO. El valor numérico de la densidad bacteriana de 268 UFC x 10⁶/g suelo fue estadísticamente diferente, comparado con los con 40 UFC x 10⁶/g suelo de la misma población del suelo CA sin ARA. Los resultados de la Tabla 3 sugieren que ciertos géneros y especies de bacterias asociadas la BIS del suelo contaminado con ARA, tienen capacidad potencial de síntesis de detergentes, demostrado por una prueba cualitativa; esa capacidad rompe las fuerzas de tensión superficial entre la gota y la hidrófoba del aceite, lo que permite que se use como la fuente de C (carbono) y energía o el HICO, a la vez que facilita su parcial o total solubilización en el en agua, similares a las que existen en el ARA, por lo que este tipo de bacterias están obligadas a sintetizar detergente para consumir los HICO (Supaphol *et al.* 2011, Yáñez-Ocampo & Wong-Villareal 2013).

En la Tabla 4 muestra los resultados de la identificación molecular de *Streptomyces* sp., SCARA1h que esta reportado como capaz de sintetizar del tipo fosfolipopeptidos, con un alto grado de emulsificación de HICO (Rajeswari *et al.* 2016). Así como los géneros y especies: *Gordonia amicalis* SCARA8i. Mientras que *B. subtilis* SCARA3h1 es un género bacteriano que sintetiza un detergente de naturaleza lipopeptido C (Tugrul & Cansunar 2005, Sousa *et al.* 2014), así como *Acinetobacter ursingii* SCARA3f2 que Cisneros de la Cueva *et al.* 2016 que

reportan como sintetizador de detergente; al igual que *S. hominis* SCARA6i (Yáñez-Ocampo & Wong-Villareal 2013).

En la Figura 3 la mayoría de las bacterias identificadas están reconocidas como emulsificadoras de HICO y sintetizadores de detergentes, al igual que los actinomicetos, del tipo *Streptomyces* sp., SCARA1h (Cheng *et al.* 2015) y *Gordonia amicalis* SCARA8i (Hao *et al.* 2008) reportada y recuperada de suelo contaminado por una elevada concentración de HICO, por lo que se sabe que ambos, sintetiza al menos dos tipos de detergentes (Franzetti *et al.* 2008). En las Proteobacterias se registraron nuevas especies bacterianas por primera vez reportadas como es el caso de *Achromobacter*, mientras el género *Acinetobacter* pertenece a las Proteobacterias que sintetizan complejos de lípidos-polisacáridos (Youssef *et al.* 2004). Los resultados de este ensayo indican que los géneros y especies identificadas tienen valor potencial en la bioaumentación de suelo impactados por ARA. Mientras que la BIS integral de un suelo contaminado con una alta concentración de ARA de 60000 ppm, permito con la primer BIS con el detergente emulsificar la mayor parte de la mezcla de HICO; seguida de la segunda BIS con el enriquecimiento de la solución mineral; mientras que con la tercer acción mediante el H₂O₂ y el control de la humedad en el suelo se lograron las condiciones ambientales adecuadas para rápida reducción de la concentración del ARA en vía a la recuperación del suelo impactado por esta mezcla de HICO.

Conflictos de intereses

Los autores declaran que no existe ningún tipo de conflicto de interés en su planificación, realización y redacción con las instituciones involucradas y así

como las que apoyaron económicamente esta investigación.

Agradecimientos

Al apoyo de la Coordinación de Investigación Científica-UMSNH proyecto 2.7 (2017), a BIONUTRA S.A. de C.V. Maravatío, Mich, México y a CONACYT por la beca para la primera autora.

Literatura citada

- Altmajer DV. Formulaciones detergentes biodegradables: Ensayos de lavado. [Tesis doctoral]. Universidad de Granada, España; 2004. p 21-4 (inérita).
- Asquith EA, Geary PM, Nolan AL, Evans CA. Comparative bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by biostimulation, bioaugmentation and surfactant addition. *J Environ Sci Eng A* 2012; 1:637-50.
- Bodour AA, Drees KP, Miller-Maier RM. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. *Appl Environ Microbiol* 2003;69(6): 3280-7.
- Bodour AA, Miller-Maier RM. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *J Microbiol Methods* 1998; 32(3):273-80.
- Cando-Rodríguez MA. Determinación y análisis de un proceso de biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos. [Tesis de licenciatura]. Universidad Politécnica Salesiana, Sede-Cuenca, España. 2011; p. 23. (Inédita).
- Cheng K, Rong X, Pinto-Tomás AA, Fernández-Villalobos M, Murillo-Cruz C, Huang Y. Pop-

- ulation genetic analysis of *Streptomyces albidoflavus* reveals habitat barriers to homologous recombination in the diversification of *Streptomyces*. *Appl Environ Microbiol* 2015; 81(3):966-75.
- Cisneros de la Cueva S, Hernández-Rodríguez C, Soto-Cruz NO, Rojas-Contreras JA, López-Miranda J. Changes in bacterial populations during bioremediation of soil contaminated with petroleum hydrocarbons. *Water Air Soil Pollut* 2016; 227(3):1-12.
- Delgadillo-López AE, González-Ramírez CA, Prieto-García F, Villagómez-Ibarra JR, Acevedo-Sandoval O. Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación. *Trop Subtrop Agroecosyst* 2011; 14(2):597-612.
- Dowd SE, Zaragoza J, Rodríguez JR, Oliver MJ, Payton PR. Windows. NET network distributed basic local alignment search toolkit (W.ND-BLAST). *BMC Bioinformatics* 2005; 6:93.
- Franzetti A, Bestetti G, Caredda P, La Colla P, Tamburini E. Surface-active compounds and their role in the access to hydrocarbons in *Gordonia* strains. *FEMS Microbiol Ecol* 2008; 63(2):238-48.
- Fujii T, Tatara T, Minagawa M Studies on applications of lipolytic enzyme in detergency I. Effect of lipase from *Candida cylindracea* on removal of olive oil from cotton fabric. *J Am Oil Chem Soc* 1986; 63(6):796-9.
- García E, Roldán F, Garzón L. Evaluación de la bioestimulación (nutrientes) en suelos contaminados con hidrocarburos utilizando respirometría. *Acta Biolo Colomb* 2011; 16(1):195-208.
- García-Hernández D, Sosa-Aguirre CR, Sánchez-Yáñez JM. Biorremediación de agua doméstica contaminada con aceite residual automotriz por bioestimulación. *Ing Hidraul Mex* 2007; 22:113-8.
- Hao DH, Lin JQ, Song X, Lin JQ, Su YJ, Qu YB. Isolation, identification, and performance studies of a novel paraffin-degrading bacterium of *Gordonia amicalis* LH3. *Biotechnol Bioprocess Eng* 2008; 13(1):61-8.
- Infante C, Ortega C, Morales F, Ehrmann U, Hernández-Valencia I, Pérez R. Efecto del potasio en la biorremediación de un suelo contaminado con un crudo liviano. *Bioagro* 2010; 22(2): 145-52.
- Larenas-Parada G, De Viana ML. Germinación y supervivencia del pasto cubano *Tithonia tubaeformis* (Asteraceae) en suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo. *Ecol Austral* 2005; 15(2):177-81.
- Leal-Castillo M. Biorremediación de un suelo agrícola contaminado con aceite residual automotriz [tesis doctoral]. Universidad de Colima. México; 2003; p. 115. (Inédita).
- LGEEPA. 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, DF, Disponible en: <http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/ref/lgeepa.htm>.
- Mercade ME, de Andres MC, Rodon I, Martinez E, Espuny MJ, Manresa A. Screening and selection of surfactant-producing bacteria from waste lubricating oil. *J Appl Bacteriol* 1996; 81:161-6.
- Pardo-Castro JL, Perdomo-Rojas MC, Benavides-López de Mesa JL. Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo. *Nova* 2004; 2(2):40-9.

- Pinto MA, Geraldés KA, De Franceschi DD, Marcos BD. Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station. *Braz J Microbiol* 2007; 38(2):346-53.
- Rajeswari V, Kalaivani-Priyadarshini S, Saranya V, Suguna P, Shenbagarathai R. Immunostimulation by phospholipopeptide biosurfactant from *Staphylococcus hominis* in *Oreochromis mossambicus*. *Fish Shellfish Immunol* 2016; 48: 244-53.
- Riojas-González HH, Gortáres-Moroyoqui P, Mondaca-Fernández I, Balderas-Cortés JJ, Torres-Bustillos LG. Evaluación de la biorremediación aplicando mezclas de surfactante-solvente en suelo contaminado con diésel. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales* 2010; 6(2):100-9.
- Rosales-Morales LA. Biorremediación de suelos contaminados con aceite usado de automóvil con el hongo de la pudrición blanca *Pleurotus ostreatus* (setas) en Durango. [Tesis de maestría] Instituto Politécnico Nacional, México; 2008; p. 6. (Inédita).
- Ruiz-Nájera RE. Efectos de niveles de abono verde sobre la degradación de atrazina en un suelo agrícola no esterilizado o esterilizado [tesis doctoral]. Universidad de Colima, México; 2001; p. 49-50. (Inédita).
- Sáenz-Marta CI, Ballinas-Casarrubias ML, Rivera-Chavira BE, Nevárez-Moorillón GV. Biosurfactants as useful tools in bioremediation. In: Shiomi editor. *Advances in bioremediation of wastewater and polluted soil*. 2nd ed. Tech Publish; 2015; p. 94-109.
- Shi Z, Chen J, Yin X. Effect of anionic-nonionic-mixed surfactant micelles on solubilization of PAHs. *J Air Waste Manag Assoc* 2013; 63(6): 694-701.
- Sousa M, Dantas IT, Feitosa FX, Alencar AEV, Soares SA, Melo VMM, et al. 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. *Braz J Chem Eng* 2014; 31(3):613-23.
- Supaphol S, Jenkins SN, Intomo P, Waite IS, O'Donnell AG. Microbial community dynamics in mesophilic anaerobic co-digestion of mixed waste. *Bioresour Technol* 2011; 102: 4021-7.
- Tugrul T, Cansunar E. Detecting surfactant-producing microorganisms by the drop-collapse test. *World J Microbiol Biotechnol* 2005; 21(6):851-3.
- Venosa A, Zhu X. Biodegradation of crude oil contaminating marine shorelines and freshwater wetlands. *Spill Sci Technol B* 2003; 8(1):163-78.
- Villalba VNM. Remediación de suelos contaminados con fenantreno por oxidación química [Tesis de maestría] Universidad Nacional de Asunción, Paraguay. 2013; p. 20-4. (Inédita).
- Walter V, Syldatk C, Hausmann R. Screening concepts for the isolation of biosurfactants producing microorganisms. *Adv Exp Med Biol* 2010; 672:1-13.
- Willumsen PAE, Karlson U. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactant and bioemulsifiers. *Biodegradation* 1997; 7(5): 415-23.
- Yáñez-Ocampo G, Wong-Villareal A. Biosurfactantes microbianos, producción potencial con residuos agroindustriales de Chiapas. *Bio Tecnología* 2013; 17(3):12-28.

Youssef NH, Duncan KE, Nagle DP, Savage KN, Knapp RM, McInerney MJ. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *J Microbiol Methods* 2004; 56(3): 339-47.

Zamora A, Ramos J, Arias M. Efecto de la contaminación por hidrocarburos sobre algunas propiedades químicas y microbiológicas de un suelo de sabana. *Bioagro* 2012; 24(1):5-12.

Zhong-Yi C, Xiao-Yong L, Xiu-Lan Y, Lu S, Dan Z, Tao L. Enhanced Desorption of PAHs from Manufactured Gas Plant Soils Using Different Types of Surfactants. *Pedosphere* 2014; 24(2): 209-19.