



## Biorremediación y fitorremediación de un suelo impactado por aceite residual automotriz con

### *Helianthus annuus* y *Burkholderia vietnamiensis*

## Bioremediation and Phytoremediation of soil impacted by waste motor oil with *Helianthus annuus* and *Burkholderia vietnamiensis*

Escalante-Canizal Samantha<sup>1</sup>, Márquez-Benavides Liliana<sup>2</sup>, Baltierra-Trejo Eduardo<sup>3</sup> Saucedo-Martínez Blanca Celeste<sup>1</sup> y Sánchez-Yáñez Juan Manuel<sup>1\*</sup>

### Datos del Artículo

<sup>1</sup>Microbiología Ambiental, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas Ed. B-3.

<sup>2</sup>Manejo de Residuos Sólidos y Medio Ambiente. Instituto de Investigaciones Agrícolas Pecuarias y Forestales. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Ciudad Universitaria, Col FJ Mujica S/N, Felicitas del Río, 58000, Morelia, Mich., México.

<sup>3</sup>Centro de Investigación en Sustentabilidad Energética y Ambiental Universidad Autónoma del Noreste, Matamoros, Tam, México.

#### \*Dirección de contacto:

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 : [syanez@umich.mx](mailto:syanez@umich.mx)

### Palabras clave:

ARA,  
suelo,  
bioestimulación,  
minerales,  
*V. sativa*,  
*H. annuus*,  
*B. vietnamiensis*.

*J. Selva Andina Res. Soc.*  
2017; 8(2):104-114.

### 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:

WMO,  
soil,  
biostimulation,  
minerals,  
*V. sativa*,  
*H. annuus*,  
*B. vietnamiensis*

### Resumen

En México el suelo se contamina por aceite residual automotriz (ARA), una mezcla de hidrocarburos alifáticos, aromáticos y relacionados, que inhiben la vida en el suelo y reducen la producción agrícola. La Nom-138 Semarnat/ISS-2003 establece que el límite máximo de hidrocarburos en suelo es de 4400 ppm, una solución para eliminarlo, son los métodos químicos de alto costo, que causan daño colateral ambiental. Una alternativa ecológica es la biorremediación (BR), por bioestimulación (BS) y/o la fitorremediación (FR) que explota el potencial de microorganismos y plantas para mineralizar hidrocarburos. El objetivo de esta investigación fue biorremediar suelo contaminado con 20000, 30000 y 45000 ppm de ARA por BS con una solución mineral, *Vicia sativa* o abono verde, seguido de la FR mediante *Helianthus annuus* y *Burkholderia vietnamiensis* para decrecer el ARA a valores inferiores al máximo aprobado por la Nom-138 Semarnat/ISS-2003. Los resultados revelaron que la adecuada integración de la BS mediante sales de N (nitrógeno) y P (fósforo) y K (potasio) de la solución mineral, complementado con la BIS por moléculas orgánicas de C (carbono), y de N, así como de vitaminas e activación de microbiana por la incorporación de *V. sativa* redujo lo suficiente la concentración del ARA, para facilitar la capacidad de degradación vegetal y de *B. vietnamiensis* para minimizar el ARA, lo suficiente para decrecer el ARA a valores inferiores al máximo reconocido por la Nom-138 Semarnat/ISS-2003. Se concluye que la BS secuencial, complementaria y acumulativa o integral, por enriquecimiento con nutrientes inorgánicos, orgánicos, acción microbiana, seguida de la PR mediante *H. annuus* y *B. vietnamiensis* que fueron eficaces en la eliminación del ARA.

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

### Abstract

Soil contaminated by of waste motor oil (WMO) a mix of aliphatic, aromatic hydrocarbon's caused living soil inhibition and to reduce agriculture production. Nom-138 Semarnat/ISS-2003 indicated that maximum concentration at soil accepted is 4400 ppm. To solve this problem chemical methods are apply however they spencil and caused collateral environmental damage. An ecological alternative is Bioremediation (BR) by Biostimulation (BS) or/and Phytoremediation (PR) which to explode it's potencial to mineralize hydrocarbons. The aim of this research was BR) of soil polluted by 20000, 30000 and 45000 ppm of WMO by biostimulation (BS) adding mineral solution and *Vicia sativa* as green manure, then phytoremediation (PR) by *Helianthus annuus* potentied with *Burkholderia vietnamiensis* to reduce WMO at values below to accept by the Nom -138 Semarnat/ISS-2003. These results to support that BS by sequential, accumulative or integral by enrichment of inorganic and organic nutrients due to mineral solution and incorporation and degradation of *V. sativa* reduced WMO at then PR using *H. annuus* and *B. vietnamiensis* was an efficient way to eliminate WMO.

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

## Introducción

El aceite residual automotriz (ARA) es una mezcla de hidrocarburos alifáticos, aromáticos y trazas de metales pesados (Agarry & Ogunleye 2012), el ARA generado durante el ciclo de lubricación de motores y mantenimiento de maquinaria agrícola e industrial, en el suelo el ARA inhibe actividad microbiana la que mineraliza la materia orgánica, además impide el intercambio gaseoso con la atmósfera, la difusión de agua, lo que ocasiona pérdidas económicas al decrecer la cobertura vegetal y la producción agrícola (Pardo-Castro *et al.* 2004). En México en el suelo la Nom-138 Semarnat/ISS-2003, establece como valor máximo 4400 ppm de mezclas de hidrocarburos similares al ARA, en ese sentido, para la remediación del suelo se recomiendan métodos químicos que tienen el inconveniente de su elevado costo y daños colaterales al ambiente (Banks *et al.* 2003, Agarry & Ogunleye 2012). El suelo impactado con una concentración mayor a 4400 ppm de ARA, además de los métodos químicos podría emplearse la biorremediación (BR) por bioestimulación (BS) secuencial, complementaria y acumulativa o integral así: primero con una solución mineral, con sales inorgánicas a base de C (carbono), N (nitrógeno) P (fósforo) y K (potasio), que inducen a la microbiota aerobia heterotrófica nativa a la oxidación del ARA, seguido de una segunda BS con la incorporación de *Vicia sativa* o abono verde, para reestablecer el equilibrio nutricional mediante enriquecimiento con compuestos orgánicos de C, N, P, y K que complemente la demanda nutricional de la microbiota en la mineralización del ARA (Banks *et al.* 2003, Domínguez-Rosado *et al.* 2004). Finalmente y para concluir se continúa con la fitorremediación (FR) mediante *Helianthus annuus* potenciado a nivel de semilla, con un género de bacteria

promotora de crecimiento vegetal (BPCV) del tipo *Burkholderia vietnamiensis*, un bacilo Gram negativo que convierte los exudados de semilla y raíz en fitohormonas, que en la planta aumentan su capacidad al estrés, tanto nutricional como ambiental, causado por agentes orgánicos fitotóxicos presentes en el ARA (Diab 2008, Agamuthu *et al.* 2010).

Generalmente en el suelo la literatura referente a la BR o la FR impactado por hidrocarburos de la clase del ARA, emplean una u otra de manera individual como única estrategia de BR, con una parcial reducción de la concentración, que no resuelve el problema de la contaminación (Diab 2008). En contraste, si se combinan la BR y FR de manera secuencial, complementaria y acumulativa, podría minimizarse el ARA a un valor inferior al máximo permisible por la regulación mexicana aceptada en la Nom-138 Semarnat/ISS-2003.

Al respecto Domínguez-Rosado *et al.* (2004) bioestimularon un suelo contaminado con 15000 ppm de ARA, con una solución mineral posteriormente por FR mediante *Helianthus annuus* y *Zea mays*, sus resultados indicaron que la BS y FR lograron decrecer el ARA hasta 4950 ppm. En tanto, Agamuthu *et al.* (2010), biorremediaron un suelo impactado por 25000 ppm de ARA mediante BS con una enmienda orgánica y FR con *Jatropha curcas*, los resultados reportaron que la integración de la BS y FR disminuyeron el ARA hasta 2600 ppm en 180 días. Con base en estos antecedentes y la escasa información sobre la integración de la BR y FR de suelo impactado con un amplio rango de concentraciones de ARA, condición ambiental frecuente en México por el problema de los derrames hidrocarburos discretos: Los objetivos de esta investigación fueron

- i) biorremediar un suelo contaminado por 20000,

30000 y 45000 ppm de ARA por BS con una solución mineral, *Vicia sativa* (abono verde) y ii) FR mediante *H. annuus* con *B. vietnamiensis* para de- crecer el ARA a concentración inferior a la máxima permisible por la Nom-138 Semarnat/ISS-2003.

## Materiales y métodos

*Origen de suelo y del aceite residual automotriz.* Esta investigación se realizó en el invernadero del laboratorio de Microbiología Ambiental del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). La temperatura promedio fue de 23.2 °C, luminosidad de 450  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , humedad relativa de 67%. Para este ensayo se utilizó un suelo no estéril colectado de un sitio ubicado a los 19° 39' 27'' de latitud norte 100° 19' 59'' de longitud oeste, con una altitud de 1820 msnm de clima templado de un terreno agrícola denominado "La cajita" de la Tenencia Zapata del municipio de Morelia, Mich., México sobre el Km 5 de la carretera Morelia-Pátzcuaro, Mich, México.

**Tabla 1 Propiedades fisicoquímicas iniciales del suelo franco arenoso de origen volcánico sin aceite residual automotriz**

Parámetro	Unidad	Valor	Interpretación
pH (1:20)	UPH	5.55	Moderadamente ácido
Material orgánica	%	6.86	Medio*
Capacidad de intercambio catiónico (CICT)	Cmol(+) Kg <sup>-1</sup>	34.00	Alta
Densidad real (Dr)	g·cm <sup>-3</sup>	2.04	Sin interpretación en la NOM
Densidad aparente (Da)	g·cm <sup>-3</sup>	0.89	Común en suelo volcánico
Porosidad**	%	56.38	Ligeramente alta <sup>+</sup>
Porcentaje de saturación de humedad	%	34.30	Normal <sup>+</sup>
Capacidad de campo***	%	15.79	Normal <sup>+</sup>
Humedad aprovechable	%	7.90	Normal <sup>+</sup>
Pedregosidad	%	24.22	Moderada
Textura			Franco-arenoso
	Arcilla	%	18.9
	Limo	%	19.5
	Arena	%	61.6

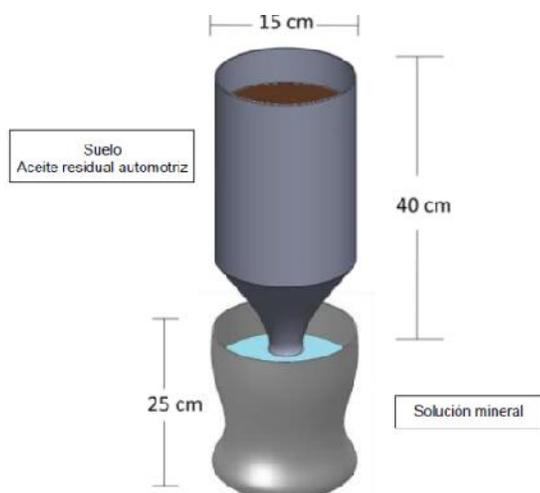
Las propiedades fisicoquímicas del suelo al inicio del experimento se describen en la Tabla 1, que se clasificó como suelo franco-arenoso (Banks *et al.* 2003, Basumatary *et al.* 2012) con un contenido medio de materia orgánica, alta capacidad de intercambio catiónico y moderadamente ácido, con estos datos fue necesario hacer un enriquecimiento mineral, primero, la BS y luego la enmienda orgánica con *V. sativa* o abono verde para complementar las deficiencias de los principales elementos: N, P y K que limitan la mineralización del ARA. El suelo se solarizó a 70 °C·48 h<sup>-1</sup>, posteriormente se tamizó con una malla de 6.3 mm y se contaminó con

20000, 30000 y 45000 ppm de ARA proveniente de un taller mecánico automotriz diluido en agua, con un detergente comercial (La Corona®) al 1.0% (p/v).

*Diseño y montaje experimental.* Como unidad experimental se utilizaron 30 jarras de Leonard o macetas, que estaban compuesta por el contenedor (de aproximadamente 1.2 L de capacidad, 15 cm de diámetro x 40 cm de altura) en la parte superior con 1 kg de suelo, y el reservorio (de aproximadamente 1.3 L de capacidad, con 15 cm diámetro x 25 cm de altura) en la parte inferior, que contenía la solución mineral (de la primera BS) o agua (García-Gonzales

*et al.* 1995). Ambas partes se conectaron por una tira de algodón de aproximadamente de 20 cm de largo para permitir el movimiento de la solución mineral o agua por capilaridad al suelo (Figura 1).

**Figura 1** Diseño de una jarra de Leonard



El diseño experimental para la BR y FR del suelo contaminado con diferentes concentraciones de ARA se describe en la Tabla 2, con un diseño completamente al azar (DCA) con 3 repeticiones por tratamiento, con 3 controles: *i*) el suelo sin contaminar con ARA irrigado solo con agua o control absoluto (CA), *ii*) suelo sin ARA y alimentado con solución mineral o el control relativo (CR), *iii*) suelo contaminado con ARA sin biorremediar o fitorremediar o control negativo (CN), además del suelo con los distintos niveles de ARA, donde se aplicó la BS secuencial, complementaria y acumulativa con solución mineral, *V. sativa* (abono verde), y la posterior FR mediante *H. annuus* fue proporcionado por el Ministerio de Agricultura del país (SAGARPA) quien certificó su calidad fitosanitaria potenciada con *B. vietnamiensis*.

**Tabla 2** Diseño experimental de la biorremediación de suelo contaminado con diferente concentración de aceite residual automotriz por bioestimulación integral y posterior fitorremediación mediante *Helianthus annuus* potenciado con *Burkholderia vietnamiensis*

Tratamiento	Aceite residual automotriz (ppm)			Solución mineral	<i>Vicia sativa</i> (abono verde)	<i>Helianthus annuus</i> y <i>Burkholderia vietnamiensis</i>
	20000	30000	45000			
Control absoluto	-	-	-	-	-	+
Control relativo	-	-	-	100%	+	+
Control negativo	+	+	+	-	-	-
Tratamiento A	+			100%	+	+
Tratamiento B		+		100%	+	+
Tratamiento C			+	100%	+	+

(+) Se agregó (-) no se agregó.

*Biorremediación y fitorremediación de suelo contaminado con aceite residual automotriz.* En la BR del suelo con 20000, 30000 y 45000 ppm de ARA se aplicó la BS doble y secuencial: primero con una solución mineral con la siguiente composición química ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ):  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  10.0,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2.5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.0,  $\text{MgSO}_4$  1.0,  $\text{NaCl}$  0.1,  $\text{CaCl}_2$  0.1, trazas de  $\text{FeSO}_4$ , ajustado a pH de 6.5 y 10.0 mL de solución de oligoelementos con la siguiente composición ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ):

<sup>1</sup>):  $\text{H}_3\text{BO}_3$  2.86,  $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.22,  $\text{MnCl}_2\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.81,  $\text{K}_2\text{MnO}_4$  0.09, pH de 6.8 (Sánchez-Yáñez, 2007) aplicada una vez por semana durante 12 semanas. Para la segunda BS del suelo con ARA se sembraron 10 semillas de *V. sativa* en 30 macetas con suelo sin ARA, cuando la leguminosa alcanzó el estadio fisiológico de plántula equivalente a 25 días después de su siembra se barbecho e incorporó al suelo en forma de abono verde al 1.5% y se dio

un tiempo de mineralización de 6 semanas. Al finalizar este periodo se midió la concentración de ARA por Soxhlet (Hernández-Valencia & Mager 2003). Para la etapa de FR se estableció un almacigo de *H. annuus* en suelo estéril y sin ARA con semillas desinfectadas en hipoclorito de sodio/2.5 min y alcohol 70%/2.5 min. Las semillas de *H. annuus* se inocularon con *B. vietnamiensis* aislada de *Zea mays* sp *mexicana* (teocintle) identificada por el sistema API y evaluada en otras plantas como promotora de crecimiento vegetal, que se marcó con antibióticos para diferenciarla de la población nativa en el suelo contaminado con ARA según describe en García-González *et al.* 2005, crecida en agar *Pseudomona cepacea* azelaico tryptamina (APCAT) con la siguiente composición (g·L<sup>-1</sup>): peptona de caseína 0.2, ácido azelaico 2.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4.0, extracto de levadura 0.02, MgSO<sub>4</sub> 0.2 y pH ajustado a 6.8, incubada a 30 °C·24 h<sup>-1</sup> (Sánchez-Yáñez 2007). Entonces por cada 20 semillas de *H. annuus* se trataron con 0.1 mL de *B. vietnamiensis* que contenía 1x10<sup>6</sup> UFC/mL concentración calculada en el PCAT, después de 10 días de su siembra, dos plantas de *H. annuus* se trasplantaron a cada jarra de Leonard y cuando alcanzó su estadio fisiológico de prefloración, 8 semanas después, se midió la fenología como medida indirecta de la eliminación del ARA en el suelo mediante los datos de la: altura de planta y longitud radical, biomasa: peso fresco y seco de parte aérea, raíz de *H. annuus* se estableció si el ARA había o no desaparecido los suficiente del suelo, un sano crecimiento de *H. annuus* en el suelo sin ARA se comparó con la fenología y biomasa de *H. annuus* potenciada con *B. vietnamiensis* crecida en el suelo con los diferentes niveles de ARA, de tal manera que el detectar el crecimiento de *H. annuus* en el suelo con ARA tendría que ser similar al de *H. annuus* en suelo sin ARA y sin inocular mediante una

prueba estadística. Adicionalmente en el suelo adherido a las raíces de *H. annuus* se cuantificó la concentración del ARA por Soxhlet esta técnica define con precisión el decremento del ARA para decrecerlo a niveles inferiores al máximo señalado por la Norm-138 Semarnat/ISS-2003 (Domínguez-Rosado *et al.* 2004). Mientras que la densidad de la población de *B. vietnamiensis* se determinó en PCAT al principio cuando se inoculo y sembró la semilla de *H. annuus* en el suelo contaminado por el ARA, por la técnica de cuenta viable en placa según se describe en García-González *et al.* 2005. Los datos experimentales fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA), en conjunto con la prueba comparativa de medias Tukey HSD P<0.05% (Ferrera-Cerrato *et al.* 2007) con el programa estadístico Statgraphics Centurion.

## Resultados

*Bioestimulación del suelo con diferentes concentraciones de aceite residual automotriz con solución mineral y Vicia sativa incorporado como abono verde.* En la Tabla 3 se muestra la BR del suelo contaminado con 20000 ARA por la primera BS con solución mineral/12semanas, luego la segunda BIS mediante *V. sativa* (abono verde)/6semanas, el ARA decreció a 9800 ppm, cuando la concentración de N (nitrógeno) total del suelo fue de 0.72%. En suelo con 30000 ppm el ARA se redujo a 14600 ppm, un contenido de N total de 0.80%. Ambos valores fueron estadísticamente diferentes al contenido de N total en suelo sin contaminar con ARA o CA con 0.63%. En el suelo con 45000 ppm de ARA, la secuencial, complementaria BIS, la concentración del ARA se redujo a 26300 ppm con un 0.56% de N total. Estos valores de reducción del ARA comparados con el suelo contaminado con ARA sin biorre-

mediar o control negativo (CN), se registró que la esta mezcla de hidrocarburos. atenuación natural no decreció la concentración de

**Tabla 3 Biorremediación de suelo con diferentes concentraciones de aceite residual automotriz por la bioestimulación integral con una solución mineral y *Vicia sativa* o abono verde en relación con el nivel de nitrógeno total**

Suelo	Aceite residual automotriz (ppm)			Nitrógeno Total (%)
	Inicial	Eliminado por bioestimulación	Remanente en suelo	
Sin ARA irrigado solo agua (control absoluto)	0.0	0.0	0.0 <sup>c</sup>	0.63±0.2 <sup>c</sup>
Con ARA sin bioestimar (control negativo)	20000	0.0	20000±0.4 <sup>b</sup>	-
Suelo A1	20000	10200±0.5	9800±0.1 <sup>a</sup>	0.72±0.4 <sup>b</sup>
Control negativo	30000	0.0	30000±0.1 <sup>b</sup>	-
Suelo A2	30000	15400±0.4	14600±0.5 <sup>a</sup>	0.80±0.8 <sup>a</sup>
Control negativo	45000	0.0	45000±0.2 <sup>b</sup>	-
Suelo A3	45000	18700±0.7	26300±0.4 <sup>a</sup>	0.56±0.7 <sup>d</sup>

\*Letras distintas indican diferencia estadística  $\alpha=0.05$ .

**Tabla 4 Fenología y biomasa de *Helianthus annuus* potenciado con *Burkholderia vietnamiensis* durante la fitorremediación del suelo con el remanente de aceite residual automotriz**

<i>Helianthus annuus</i> en suelo	Altura de planta (cm)	Longitud radical (cm)	Peso fresco (g)		Peso seco (g)	
			Aéreo	Radical	Aéreo	Radical
Sin ARA, irrigado solo con agua (control absoluto)	13.83±2.32 <sup>b*</sup>	3.00±0.71 <sup>c</sup>	0.55±0.02 <sup>b</sup>	0.11±0.05 <sup>b</sup>	0.06±0.01 <sup>c</sup>	0.03±0.01 <sup>b</sup>
Suelo A1 con 9800 ppm de ARA remanente	12.62±0.92 <sup>b</sup>	<b>7.12±1.55<sup>a</sup></b>	1.29±0.75 <sup>ab</sup>	<b>0.21±0.05<sup>a</sup></b>	0.07±0.00 <sup>b</sup>	<b>0.13±0.10<sup>a</sup></b>
Suelo A2 14600 ppm de ARA remanente	<b>18.44±1.51<sup>at</sup></b>	6.18±0.98 <sup>ab</sup>	<b>1.45±0.25<sup>a</sup></b>	<b>0.28±0.07<sup>a</sup></b>	<b>0.09±0.01<sup>a</sup></b>	<b>0.12±0.03<sup>a</sup></b>
Suelo A3 con 26300 ppm de ARA remanente	12.78±2.05 <sup>b</sup>	5.37±0.52 <sup>b</sup>	0.95±0.47 <sup>ab</sup>	<b>0.20±0.07<sup>a</sup></b>	0.05±0.00 <sup>c</sup>	0.09±0.05 <sup>ab</sup>

\*Letras distintas indican diferencia estadística,  $\alpha=0.05$ .

**Tabla 5 En suelo concentración de aceite residual automotriz derivado de la fitorremediación mediante *Helianthus annuus* potenciado con *Burkholderia vietnamiensis***

Concentración de aceite residual automotriz al final de		Porcentaje de biorremediación (%)
Derivado de bioestimulación (ppm)	Fitorremediación (ppm)	
Suelo A1 9800±0.5 <sup>a</sup>	770±0.4 <sup>a*</sup>	<b>96.15%</b>
Suelo A2 14600±0. <sup>a</sup>	630±0.7 <sup>a*</sup>	<b>97.90%</b>
Suelo A3 26300±0.4 <sup>a</sup>	1100±0.1 <sup>a*</sup>	<b>97.56%</b>

\*Letras distintas indican diferencia estadística,  $\alpha=0.05$ + Valores inferiores al máximo de la Nom-138 Semarnat/ISS-200

En suelo concentraciones remanentes de aceite residual automotriz fitorremediado mediante *Helianthus annuus* potenciado con *Burkholderia vietnamiensis*. En la Tabla 4 se muestra la fenología de *H. annuus* a prefloración potenciada con *B. vietna-*

*miensis* en suelo con ARA bioestimulado primero con la solución mineral y la segunda BIS complementaria con *V. sativa* (abono verde), como medida de que el decremento del ARA permite en el normal crecimiento de *H. annuus*. En el caso de la altura

promedio de *H. annuus* se detectó diferencia estadística en suelo con 14600 ppm de ARA comparado con *H. annuus* en el mismo suelo sin ARA, alimentado con la solución mineral o CR. En relación a la longitud radical en el suelo con 9800 ppm remanente de ARA, se registró una longitud radical de 7.12 cm, en suelo con 14600 ppm de ARA remanente, registro un 6.18 cm, ambos valores numéricos fueron estadísticamente diferentes, comparados con los registrados en *H. annuus* en suelo sin ARA alimentado con solución mineral o CR, con una longitud de 3.00 cm. En relación a los valores de la biomasa de *A. annuus*, en el suelo con 9800 ppm, y con los 14600 ppm de ARA remanente, se registraron valores numéricos con diferencia estadística, respecto a *H. annuus* crecido en el mismo suelo sin ARA, alimentado con solución mineral o CR.

En la Tabla 5 se muestra la FR del suelo para minimizar el ARA restante mediante *H. annuus* a prefloreción potenciado con *B. vietnamiensis*. Los resultados muestran que en el suelo con 9800 ppm de ARA decreció a 770 ppm equivalente a un 96.15% de BR, mientras en el suelo con 14600 ppm, disminuyó a 630 ppm y en suelo con 26300 ppm el ARA se redujo a 1100 ppm. En contraste al suelo contaminado con ARA no biorremediados ni fitorremediado utilizado como CN, la atenuación natural fue insuficiente para cambiar la concentración del ARA.

## Discusión

En la Tabla 3, se presenta la BR del suelo con diferente concentración de ARA, durante la primera BS con solución mineral, que reestableció el equilibrio de la relación C:N en la oxidación del ARA, con sus componentes inorgánicos básico P y K (potasio) equilibraron el desbalance nutricional que inhibe la actividad de la microbiota heterotrófica aerobia

que oxida los hidrocarburos del ARA en especial los de cadena corta y bajo peso molecular como los alifáticos (Vallejo *et al.* 2005, Gómez *et al.* 2009, Aleer *et al.* 2011). Como se ha reportado cuando un suelo bioestimulado con solución mineral impactado con mezclas de hidrocarburos, los microorganismos nativos oxidan primero alifáticos de número reducido de C (Abdulsalam & Omale 2009). En el suelo sin bioestimar, la atenuación natural no cambió ninguna de las elevadas concentraciones del ARA, que causaron una inhibición de la actividad que mineraliza estos hidrocarburos (Aler *et al.* 2011, Asquith *et al.* 2012). En la segunda BS del suelo mediante la incorporación de *V. sativa* o abono verde, se favoreció la disponibilidad y concentración de N orgánico y mineral que mantuvo el restablecimiento del balance de C:N necesarios, para un aumento de la población microbiana heterotrófica aerobia que oxidados hidrocarburos del ARA (Diab 2008). En el suelo, *V. sativa* también incorporo compuestos orgánicos de N, K, C de fácil degradación, lo que indujo al coometabolismo de los hidrocarburos más complejos del ARA (Abdulsalam *et al.* 2011, Sánchez-Yáñez 2011), con esta secuencial y acumulativa BS se registró, mediante el método Soxhlet una evidente disminución de la concentración del ARA, ya que ambas acciones estimularon el incremento en la población de microorganismos heterotróficos aerobios que mineralizan el ARA, la incorporación de N por la BS secuencial y acumulativa mejoro la disponibilidad del N total en suelo y con ello el decremento de la concentración del ARA que aunque fueron superiores al valor máximo de la Nom-138 Semarnat/ISS-2003, facilitó la subsecuente FR con *H. annuus* potenciado con *B. vietnamiensis*.

En la Tabla 4 se muestra que parte de la tolerancia de *H. annuus* al ARA, es genética (Maldonado-

Chávez *et al.* 2010), mientras que el crecimiento de las raíces de esta planta fue dependiente de la fitohormonas sintetizadas por *B. vietnamiensis*, cuya presencia y número ( $10 \times 10^6$  UFC/g de raíces secas en la raíces de *H. annuus*), pero en el *H. annuus* sembrado en el suelo CA y en el CR, se sugiere que *B. vietnamiensis* mejoró la absorción de N, P y K de la primera BS con la solución mineral, así como lo generado de la degradación de *V. sativa* o abono verde, ambas tuvieron un efecto positivo en los parámetros de la fenología y biomasa aérea y radical, a pesar de los diversos y elevados niveles de concentración remanentes del ARA (Adenipekun & Isikhuemhen 2008, Hernández-Bejarano *et al.* 2011, Abioye *et al.* 2012. Lo anterior coincide con lo reportado por Ferrera-Cerrato *et al.* 2008, López-Ortiz *et al.* (2012), en un suelo contaminado con naftaleno y fenantreno que fue fitorremediado, con la siembra de *Leucaena leucocephala* potenciado con *Rhizobium tropici* mediante acciones de mejor absorción de minerales que mejoran su crecimiento vegetal (Ferrera-Cerrato *et al.* 2007, 2008, Abdulsalam & Omale 2009, Pérez-Armendáriz *et al.* 2011).

En la tabla 5 se muestran los resultados de la BS secuencial, complementaria y acumulativa del suelo contaminado con diversas concentraciones de ARA desde 20000 a 45000 ppm de ARA, seguida de la FR mediante *H. annuus* potenciada con *B. vietnamiensis*: lo que sugiere que *H. annuus* tiene la capacidad de sintetizar algunas enzimas del metabolismo de la lignina, que de manera inespecífica degradan algunos de los aromáticos del ARA, mientras que la actividad de oxidante de ARA de *B. vietnamiensis*, mediante la conversión de exudados de la semilla y raíces en fitohormonas (Adenipekun & Isikhuemhen 2008 Ferrera-Cerrato *et al.* 2008, Abdulsalam *et al.* 2011, que aumentaron su resistencia a la fitotoxicidad del ARA y al mismo tiempo optimizaron la

absorción de minerales que dio lugar a un sano crecimiento, indicación de que la FR, fue eficaz para concluir la BR del suelo a que a pesar de las diversas concentraciones del ARA, existe evidencia de que *B. vietnamiensis* (corroborado por el incremento en la densidad de la población desde  $1 \times 10^6$  UFC/g al inocular la semillas de *H. annuus* hasta  $100 \times 10^6$  UFC/g de raíces de *H. annuus* al terminar la FR (datos no mostrados en tabla) tiene capacidad genética para oxidar algunos componentes del ARA, lo que fue determinante en el decremento de las concentraciones de la mezcla de hidrocarburos (Abioye *et al.* 2012), a valores inferiores al máximo aceptado por la Nom-138 Semarnat/ISS-2003 (Maldonado-Chávez *et al.* 2010).

La BR de un suelo contaminado con diversas concentraciones de ARA por BS integral, primero con la solución mineral, y luego complementariamente con la segunda BS mediante *V. sativa* (abono verde), apoya que la composición química de ambas fueron adecuadamente, para suplir la demanda nutricional de la microbiota nativa oxidante parcial del ARA independientemente de cada concentración, en tanto que la FR mediante *H. annuus* con su capacidad genética degradó algunos aromáticos remanente del ARA, acción potenciada por la promoción de crecimiento vegetal de *B. vietnamiensis* que por conversión de exudados de la raíces en fitohormonas mejoró la absorción de N, P y K para una eficaz eliminación de las diversas concentraciones del ARA a niveles inferiores al máximo señalado por la Nom-138 Semarnat/ISS-2003. La combinación adecuada de la BS y la FR fue útil en la disminución de la concentración final de ARA para cumplir con la Nom-138 Semarnat/ISS-2003 a un relativo bajo costo, con ello se cumplió con el propósito de la investigación de realizar una eficaz biorestaura-

ción de suelo contaminado con diferentes concentraciones de ARA.

### Conflictos de intereses

Los autores de esta investigación declaramos que no existe ningún conflicto de interés relacionado con la planeación, ejecución y redacción de este artículo, así como con aquellos que le apoyaron para su realización.

### Agradecimientos

Al proyecto 2.7 (2017) de la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, BIONUTRA S A de CV Maravatio, Mich, México y al Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología por beca-tesis para el primer autor CECTI-1005.

### Literatura citada

- Abdulsalam S, Bugaje IM, Adefila SS, Ibrahim S. Comparison of biostimulation and bioaugmentation for remediation of soil contaminated with spent motor oil. *Int J Environ Sci Tech* 2011; 8(1):187-94.
- Abdulsalam S, Omale AB. Comparison of biostimulation and bioaugmentation techniques for the remediation of used motor oil contaminated. *Braz Arch Biol Technol* 2009; 52(3): 747-54.
- Abioye OP, Agamuthu P, Abdul-Aziz AR. Biodegradation of used motor oil in soil using organic waste amendments. *Biotechnol Res Int* 2012; 8(2):56-67.
- Adenipekun CO, Isikhuemhen OS. Bioremediation of engine oil polluted soil by the tropical white rot fungus, *Lentinus squarrosulus* Mont. (Singer). *Pak J Biol Sci* 2008; 11(12):1634-7.
- Agamuthu P, Abioye OP, Aziz AA. Phytoremediation of soil contaminated with used lubricating oil using *Jatropha curcas*. *J Hazard Mater* 2010; 179:891-4.
- Agarry SE, Ogunleye OO. Box-Behnken design application to study enhanced bioremediation of soil artificially contaminated with spent engine oil using biostimulation strategy. *Int J Energy Environ Eng* 2012; 3:31-4.
- Aleer S, Adetutu EM, Makadia TH, Patil S, Ball AS. Harnessing the hydrocarbon-degrading potential of contaminated soils for the bioremediation of waste engine oil. *Water Air Soil Poll* 2011; 218(1-4):121-30.
- Asquith E, Geary P, Nolan A, Evans C. Comparative bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by biostimulation, bioaugmentation and surfactant addition. *J Environ Sci Eng* 2012; 1:637-50.
- Banks MK, Kulakow P, Schwab AP, Chen Z, Rathbone K. Degradation of crude oil in the rhizosphere of *Sorghum bicolor*. *Int J Phytoremediation* 2003; 5(3):225-34.
- Basumatary B, Bordoloi S, Sarma HP. Crude oil-contaminated soil phytoremediation by using *Cyperus brevifolius* (Rottb.) Hassk. *Water Air Soil Poll* 2012; 223(6):3373-83.
- Diab E. Phytoremediation of oil contaminated desert soil using the rhizosphere effects. *Glob J Environ Res* 2008; 2(2):66-73.
- Dominguez-Rosado E, Pichtel J, Coughlin M. Phytoremediation of soil contaminated with used motor oil: II. Enhanced microbial activities from laboratory and growth chamber studies. *Environ Eng Sci* 2004; 21(2):157-68.

- Ferrera-Cerrato R, Alarcón A, Trejo-Aguilar D, Sangabriel W, Mendoza-López M, Cruz-Sánchez J. Fitorremediación de un suelo contaminado con combustóleo utilizando *Phaseolus coccineus* y fertilización orgánica e inorgánica. *Agrociencia* 2008; 41:817-26.
- Ferrera-Cerrato R, Alarcón A, Trejo-Aguilar D, Sangabriel W, Mendoza-López M, Cruz-Sánchez J, et al. Fitorremediación de un suelo contaminado con combustóleo utilizando *Phaseolus coccineus* y fertilización orgánica e inorgánica. *Agrociencia* 2007; 41:817-26.
- García-González MM, Peña-Cabriales JM, Moreno MP, Sánchez-Yáñez JM. Inoculación de maíz con bacterias fijadoras de N<sub>2</sub>. *Terra Latinoam* 1995; 13:71-80.
- García-González MM, Farías-Rodríguez R, Peña-Cabriales JJ, Sánchez-Yáñez JM. Inoculación del trigo var. Pavón con *Azospirillum* spp y *Azotobacter beijerinckii*. *Terra Latinoam* 2005; 23:65-72.
- Gómez W, Gaviria J, Cardona S. Evaluación de la bioestimulación frente a la atenuación natural y la bioaumentación en un suelo contaminado con una mezcla de gasolina-diesel. *Dyna* 2009; 76:83-93.
- Hernández-Bejarano AL, Rodríguez-Donantes AM<sup>a</sup>, Barrios-Rodríguez MA, Rodríguez-Tovar A, Guerrero-Zúñiga LA. Análisis de la diversidad microbiana de la rizósfera de tres especies vegetales de un suelo contaminado con hidrocarburos del petróleo y su potencial rizoremediador. *Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal* 2011; 2(1):1-17.
- Hernández-Valencia I, Mager D. Uso de *Panicum maximum*, *Brachiaria brizantha* para fitorremediar suelos contaminados con un crudo de petróleo liviano. *Bioagro*. 2003; 15(3):149-55.
- López-Ortiz C, Ferrera-Cerrato R, Alarcón A, Almaraz JJ, Martínez-Romero E, Mendoza-López MR. Establecimiento y respuestas fisiológicas de la simbiosis *Rhizobium tropici*-*Leucaena leucocephala* en presencia de fenantreno y naftaleno. *Rev Int Contam Amb* 2012; 28(4):333-42.
- Maldonado-Chávez E, Rivera-Cruz MC, Izquierdo-Reyes F, Palma-López DJ. Efectos de rizósfera, microorganismos y fertilización en la biorremediación y fitorremediación de suelos con petróleos crudo nuevo e intemperizado. *Universidad y Ciencia* 2010; 26(2):121-36.
- Nom-138-Semarnat/SS-2003. "Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación". Norma Oficial Mexicana. Diario Oficial de la Federación, 29 de marzo de 2005.
- Nom-021- Recnat-2000. "Norma oficial mexicana, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis". Norma Oficial Mexicana. Diario Oficial de la Federación, 31 de diciembre de 2002.
- Pardo-Castro JL, Perdomo-Rojas MC, Benavides-López de Mesa J. Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo. *NOVA* 2004; 2(2):40-9.
- Pérez-Armendáriz B, Castañeda-Antonio D, Castellanos G, Jiménez-Salgado T, Tapia-Hernández A, Martínez-Carrera D. Efecto del antraceno en la estimulación del crecimiento en maíz y frijol. *Terra latinoam* 2011; 29(1):95-102.
- Sánchez-Yáñez J. Breve Tratado de Microbiología Agrícola, teoría y práctica, Ed. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Centro de Investigaciones y Desarrollo del Estado

de Michoacán. Sedagro Consustenta SA de CV, Morelia, Mich: México; 2007: p. 130-133, 136-138.

Sánchez-Yáñez JM. Biorremediación de ambientes impactados con aceites y lubricantes en: Biorremediación, Estrategias contra la contaminación ambiental; 2011. p. 62-75, 79-91.

Vallejo V, Salgado L, Roldan F. Evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de TPH en suelos contaminados con petróleo. Rev Colomb Biotecnol 2005; 7:67-78.

---