Biorrecuperación de suelo contaminado por 75,000 ppm de aceite residual automotriz y evaluado con *Lactuca sativa* como bioindicador

J. L. Ignacio-Cruz[1], B. C. Saucedo-Martínez[1], J.L. Rico-Serna[2], L. Márquez-Benavides[3] y J. M. Sánchez-Yáñez[1*]

[1]*Microbiología Ambiental, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Ed-B3.*
[2]*Laboratorio Catálisis, Facultad de Ingeniería Química.*
[3]*Laboratorio Medio Ambiente y Manejo de Residuos Sólidos, Instituto de Investigaciones Agrícolas, Pecuarias y Forestales: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Francisco J. Mujica S/N, Col. Felicitas del Rio C.P. 58000, Morelia, Mich, México.*

Biorecuperation of soil contaminated by 75,000 ppm of waste motor oil and evaluated with Lactuca sativa as bioindicator.

Abstract

In soil, 75,000 ppm of automotive waste oil represents a high concentration of aliphatic, aromatic hydrocarbons and traces of heavy metals; therefore, it is considered a hazardous waste according to the Mexican laws of environmental regulation, since it causes loss of fertility and inhibits microbial life. In Mexico, the maximum allowed concentration of residual automotive oil in the soil is 4,400 ppm in accordance with NOM-138-SEMARNAT / SSA1-2003. Based on the above, the following research objectives were proposed: a) biostimulate a soil contaminated by 75,000 ppm of automotive waste oil, using detergent, mineral solution, vermicompost, *Phaseolus vulgaris* as green manure and hydrogen peroxide and b) demonstrate the biorecuperation of the soil through the sowing of *Lactuca sativa*. In the soil, the variable-response of the biorecuperation was determined by the initial and final concentration of automotive residual oil by the Soxhlet method; To evaluate biorecuperation, *L. sativa* was planted, where the seedling phenology was recorded: plant height and root length; biomass: fresh and dry aerial / radical weight. The experimental data were analyzed by ANOVA / Tukey HSD P <0.01%. The results indicate that the biorecuperation of soil contaminated with 75,000 ppm of automotive residual oil, minimized it to 625 ppm in 110 days, compared to the negative control soil where the natural attenuation decreased it to 51,440 ppm. In biorecovered soil the growth of *L. sativa* showed the absence of automotive residual oil derived from biorecuperation.

Key words: soil, WMO, biostimulation, mineralization, *Lactuca sativa* bioindicator, biorecovery.

Resumen

En suelo, 75,000 ppm de aceite residual automotriz representan una alta concentración de hidrocarburos alifáticos, aromáticos y trazas de metales pesados; por ello es considerado un residuo peligroso según las leyes mexicanas de regulación ambiental, ya que causa pérdida de fertilidad e inhibe la vida microbiana. En México, la máxima concentración permitida de mezcla de hidrocarburos en el suelo es de 4,400 ppm acorde con la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2003. Con base en lo anterior se plantearon los siguientes objetivos de investigación: a) bioestimular un suelo contaminado por 75,000 ppm de aceite residual automotriz, utilizando detergente, solución mineral, lombricomposta, *Phaseolus vulgaris* como abono verde y Peróxido de

*Autores de correspondencia
Email: syanez@umich.mx
http://doi.org/10.33154/rlrn.2018.01.002
ISSN 2594-0384 (Electrónica)

hidrógeno y b) demostrar la biorrecuperación del suelo mediante la siembra de *Lactuca sativa*. En el suelo, la respuesta variable de la bioestimulación fue determinada por la concentración inicial y final de aceite residual automotriz por el método de Soxhlet; Para evaluar la biorrecuperación, se sembró *L. sativa*, donde se registró la fenología de la plántula: altura de la planta y longitud de la raíz; biomasa: peso aéreo / radical fresco y seco. Los datos experimentales se analizaron mediante ANOVA / Tukey HSD P <0,01%. Los resultados indican que la bioestimulación del suelo contaminado con 75,000 ppm de aceite residual automotriz, lo redujo a 625 ppm en 110 días, en comparación con el control negativo donde la atenuación natural lo disminuyó a 51,440 ppm. En suelo biorrecuperado, el crecimiento de *L. sativa* demostró la ausencia de aceite residual automotriz derivado de la bioestimulación.

Palabras claves: Suelo, ARA, bioestimulación, mineralización, *Lactuca sativa* bioindicador, biorrecuperación.

Introducción

El aceite residual automotriz (ARA) es una mezcla de hidrocarburos alifáticos, aromáticos y trazas de metales pesados derivado de petróleo, que es producto del ciclo de lubricación de automotores y maquinaria industrial, causa contaminación en el suelo (Sharifi *et al*., 2007; Ogedegbe *et al*., 2013). Acorde a las regulaciones mexicanas, el ARA se clasifica como un residuo peligroso, por ser tóxico para la vida, según la ley general de equilibrio ecológico y protección al ambiente (LGEEPA, 2014). Cuando se derrama en suelo, por su inadecuada disposición final supera la máxima concentración permitida de 4,400 ppm según la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2003 que establece los límites máximos permisibles de hidrocarburos dividida en: fracción ligera (200 ppm), media (1,200 ppm) y pesada (3,000 ppm).

En suelo el ARA forma una película hidrofóbica (Efe & Okpali, 2012), que desequilibra la relación C:N (carbono:nitrógeno) con un drástico aumento en el primer elemento, que inhibe la mineralización de la materia orgánica (Castro *et al*., 2004), impide la difusión del O_2 (oxígeno) y el movimiento del H_2O (agua) (Larenas & de Viana, 2005; Ogbo, 2009). La solución a este problema de contaminación ambiental por hidrocarburos de acuerdo con la NOM-138, es el empleo de agentes químicos como el: NaClO (hipoclorito de sodio), $KMnO_4$ (permanganato de potasio), etc. con la desventaja que causan un daño colateral al ambiente y tienen un alto valor económico, en contraste una alternativa biotecnológica (Domínguez-Rosado *et al*., 2004; Delgadillo-Lopez *et al*., 2011), es la bioestimulación, mediante un detergente que emulsifique los hidrocarburos para iniciar la mineralización (Riojas *et al*., 2010), secuencialmente, la bioestimulación con una solución mineral, que enriquece el suelo con sales de N (nitrógeno), P (fósforo) y K (potasio) que inducen la actividad microbiana autóctona heterotrófica aerobia oxidante del ARA (Pinto *et al*., 2007; Ferrera- Cerrato *et al*., 2007). Mientras que la bioestimulación complementaria con la lombricomposta, aporta compuestos orgánicos de C y N, que favorecen la actividad microbiana (Olivares-Campos *et al*., 2012). En tanto que la bioestimulación con *Phaseolus vulgaris* como abono verde, mantiene la mineralización del ARA mediante una acción acumulativa al enriquecer el suelo con compuestos orgánicos de N que reestablece la relación C:N y de moléculas de C sencillas y bajo peso molecular (Sánchez-Yáñez, 2007; Mósquera *et al*., 2012), que inducen a los microorganismos heterotróficos aerobios por acción coometabólica a la eliminación de los hidrocarburos alifáticos y aromáticos complejos. Mientras que la bioestimulación con el H_2O_2 como fuente de O_2 acelera la oxidación del ARA (Pardo *et al*., 2004). Un aspecto rara vez considerado en la bioestimulación secuencial, complementaria y acumulativa, es el control y mantenimiento del pH en la mineralización del ARA, por su utilización como fuentes de C y energía, que generan ácidos orgánicos del tipo CH_3COOH (ácido acético), que acidifican el pH; a valor inferior a 4, este exceso de iones hidrógeno, inhibe la actividad microbiana (Sánchez-Yáñez, 2007), por tanto es necesaria la neutralización del pH a valores entre 6.8 a 7.2 para asegurar que la bioestimulación logre su propósito (Paredes- Mendoza & Espinosa-Victoria, 2010). Normalmente para comprobar que un suelo ha sido remediado, se realiza un análisis químico que

demuestre la concentración final, valor inferior al máximo aceptado por la NOM-138 (Infante *et al*., 2010), mientras que cuando el valor de los hidrocarburos remanentes sea menor a 1000 ppm. La mejor evidencia que demuestra que el suelo, se ha biorrecuperado de la contaminación original (Sánchez-Yáñez, 2007; Millioli *et al*., 2009), es sembrar *Lactuca sativa* reconocida por su sensibilidad a la presencia de hidrocarburos, que son fitotóxicos para plantas domésticas y por tanto sea nuevamente reutilizado para su explotación con fines agrícolas (Infante & García, 2012; Pentreath *et al*., 2015). Con base a lo expuesto, Balderas-León & Sánchez-Yáñez, 2015, que evaluaron la bioestimulación de suelo contaminado con 75,000 ppm de ARA con solución mineral, que lo enriqueció con minerales N, P y K y luego con *P. vulgaris* como abono verde con compuestos orgánicos de C y N, que mejoraron las condiciones nutricionales para reducir la concentración de ARA a 10,100 ppm en 60 días, su fitorremediación mediante *Sorghum vulgare* con *Bacillus cereus* y/o *Burkholderia cepacia* redujo el ARA remanente a 800 ppm en 60 días, concentración inferior al máximo establecido por la NOM-138. Por lo tanto, los objetivos de esta investigación fueron; i) bioestimular un suelo contaminado con 75,000 ppm de ARA mediante el uso de detergente, solución mineral, lombricomposta, *P. vulgaris* como abono verde, peróxido de hidrógeno para reducir el ARA a valores inferiores al máximo permisible de la NOM-138 y ii) demostrar la biorrecuperación del suelo con *Latuca sativa*.

Materiales y métodos

Esta investigación se realizó en el invernadero del laboratorio de Microbiología Ambiental del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH, en donde las condiciones microclimáticas promedio fueron: temperatura de 23.2°C, luminosidad de 450 µmol m^{-2} s^{-1} y humedad relativa de 67%. Para este ensayo se utilizó un suelo colectado de un sitio ubicado a los 19° 37’ 10” de latitud norte 101° 16’ 41.999” de longitud oeste, con una altitud de 2013 msnm de clima templado en un terreno agrícola denominado “Uruapilla” perteneciente al municipio de Morelia, sobre la carretera Morelia-Pátzcuaro, Mich, México. El suelo se clasificó de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas, como se describe en la tabla 1, después se solarizó a 70 °C/48 h para minimizar el problema de plagas y enfermedades, posteriormente se tamizó con una malla del No. 20 y contaminó con 75,000 ppm de ARA (proveniente de un taller mecánico automotriz de la ciudad de Morelia, Mich.) y luego bioestimulado con detergente comercial (La Corona®) diluido al 1.0% (v/v) (Franzetti *et al*., 2010; Asquith *et al*., 2012). Posteriormente 1.0 kg de suelo se colocó en el contenedor superior de la jarra de Leonard (Figura 1), mientras que en el reservorio de la parte inferior, la solución mineral. Ambas partes se conectaron por una tira de algodón de aproximadamente 35 cm de largo para permitir el movimiento de la solución mineral o agua por capilaridad al suelo (Vallejo *et al*., 2005, García- Hernández *et al*., 2007); según el tratamiento especificado en la tabla 2 del diseño experimental. Para demostrar la biorrecuperación

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del suelo sin contaminar con aceite residual automotriz.

Parámetro	Valor
pH (1:20)	6.64
Material orgánica (%)	4.57
Capacidad de intercambio catiónico (Cmol(+) Kg^{-1})	4.61
Textura (%)	22.16(Ac)-37.28(L)-40.56(Ar)
Densidad real (g/cm^3)	2.01
Densidad aparente (g/cm^3)	1.08
Porosidad** (%)	46.35
Porcentaje de saturación de humedad (%)	46.95
Capacidad de campo*** (%)	30.08
Humedad aprovechable (%)	13.25

Ar: arena, L: limo, Ac: arcilla, *Para suelos de origen volcánico, **Estimada a partir de textura, +Reportada para suelos franco-arenoso NOM-021-RECNAT-2000.

del suelo se sembró *L. sativa* de acuerdo a la tabla 3. Al inicio, en el suelo impactado por 75,000 ppm de ARA, se aplicó una solución mineral con la siguiente composición (g l^{-1}): NH_4NO_3, 10; K_2HPO_4, 2.5; KH_2PO_4, 2.0; $MgSO_4$, 1.0; NaCl, 0.1; $CaCl_2$, 0.1; $FeSO_4$, trazas y 10.0 ml de microelementos (g l^{-1}): H_3BO_3, 2.86; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.22; $MgCl_2 \cdot 7H_2O$, 1.81, pH 6.8. Se agregó 20.0 ml de la solución cada 3 días por 40 días (Castro *et al*., 2004; Maldonado- Chávez *et al*., 2010). La bioestimulación complementaria con la lombricomposta al 3% (p/p), se incorporó al suelo y se dio un tiempo de mineralización por 30 días (Hernández- Valencia & Mager, 2003). Para potenciar la bioestimulación acumulativa, se inoculó *P. vulgaris* con *A. fumigatus* y *S. griseus* para emplearse como abono verde, para ello *A. fumigatus* se cultivó en agar papa dextrosa (PDA),

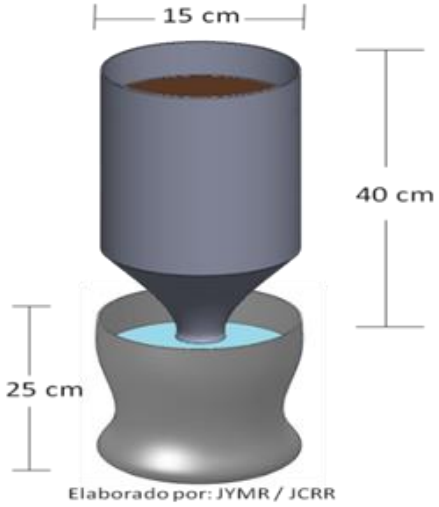


Figura 1. Jarra de Leonard (García-González *et al*., 2005).

Tabla 2. Diseño experimental para analizar la bioestimulación secuencial, complementaria y acumulativa de un suelo contaminado con 75,000 ppm de aceite residual automotriz.

Suelo tratado con	Aceite residual automotriz	Solución mineral	Lombricomposta al 3%	*Phaseolus vulgaris*	H_2O_2 al 0.5%
Agua (control absoluto)	-	-	-	-	-
Solución mineral (control relativo)	-	100%	-	-	-
Aceite residual automotriz (control negativo)	+	-	-	-	-
Bioestimulación	+	100%	+	+	+

(+) = agregado, (-) = no agregado, n=4

Tabla 3. Diseño experimental para demostrar la biorrecuperación de suelo con aceite residual automotriz mediante *Lactuca sativa* inoculado con y sin *Aspergillus fumigatus* y/o *Streptomyces griseus*.

En suelo	Bioindicador con *Lactuca sativa*	*Aspergillus fumigatus*	*Streptomyces griseus*
Agua (control absoluto)	+	-	-
Solución mineral (control relativo)	+	-	-
Bioestimulado	+	+	-
	+	-	+
	+	+	+
	+	-	-

(+) = agregado, (-) = no agregado, n=7

con la siguiente composición (g l^{-1}): infusión de papa 4.0; dextrosa 20.0; agar 15.0 y pH ajustado a 5.6; para *S. griseus* se reprodujo en agar avena (AA), con la siguiente composición (g l^{-1}): avena 30.0; $MgSO_4.7H_2O$ 1.0; K_2HPO_4 1.5; Tecto al 10% 1.0; Agar 18.0; pH 6.8, se incubó a 30°C/72 horas, entonces por cada 20 semillas de *P. vulgaris* se trataron con 1.0 ml de cada género microbiano referido, la concentración se ajustó a la solución patrón No. 0.5 del nefelómetro de McFarland con 1.0 ml de solución detergente al 10% en 99.0 ml de NaCl 0.85% (solución salina) equivalente a una concentración celular de $1.5x10^8$ UFC/g, que *A. fumigatus* y *S. griseus* se inocularon en relación 1:1 (v/v) de cada una a partir del PDA y AA respectivamente (Sánchez-Yáñez, 2007). Las semillas de *P. vulgaris* inoculadas con *A. fumigatus* y/o *S. griseus* se sembraron y se mantuvieron hasta alcanzar el estadio fisiológico de plántula, después se barbechó e incorporó al suelo como abono verde y se dio un tiempo de mineralización por 30 días (Osaigbovo *et al*., 2014). En ese mismo suelo se aplicó H_2O_2 al 0.5%, se agregó 10.0 ml cada 2 días por 10 días. Al terminar esta fase se determinó la concentración del ARA por Soxhlet (Hernández-Valencia & Mager., 2003; Domínguez-Rosado *et al*., 2004). El control de pH se midió al finalizar la BIS de forma secuencial, complementaria y acumulativa del suelo impactado con ARA, cada 3 días por 30 días; para neutralizar el suelo se agregó 1.0 g de Na_2CO_3 (carbonato de sodio) por cada 500 g de suelo para ajustar el pH a valores entre 6.8 y 7.2 (Sánchez-Yáñez, 2007).

Para demostrar la biorrecuperación del suelo después de la bioestimulación, se sembró *L. sativa* inoculado con y sin *A. fumigatus* y/o *S. griseus* de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente en *P. vulgaris*. Las variables de respuesta de *L. sativa* fueron: el porcentaje de germinación y la fenología/biomasa a nivel de plántula. En este caso se midió la altura de la planta (AP); la longitud de la raíz (LR) y biomasa aérea y radical, peso fresco (PF) total y peso seco (PS) total de *L. sativa* (Sánchez-Yáñez, 2007; Infante & García, 2012). Para la cuantificación microbiana aerobia oxidante del ARA en suelo se empleó la técnica de cuenta viable en placa (CVP). Para ello se pesó 1.0 g de suelo y se adicionó 9.0 ml de una solución de NaCl 0.85% y se realizaron diluciones de la 10^{-1} a la 10^{-8}. Se trasfirieron 0.2 ml para sembrar en agar base aceite residual automotriz (ABARA) con la siguiente composición (g l^{-1}): peptona de caseína, 5.0; extracto de levadura, 1.0; KH_2PO_4, 2.5; K_2HPO_4, 2.5; $MgSO_4$, 2.5; NaCl, 1.0; solución de oligoelementos 1.0 ml; azul de bromotimol al 0.01%, 5.0 ml; 10.0 ml de ARA emulsificado al 0.5% (0.5 ml de detergente líquido por cada 99.5 ml de ARA); agar 18.0, ajustado a pH 7.0; incubado a 30°C/48 horas por triplicado/g de suelo (Van Gestel *et al*., 2003; Bahadure *et al*., 2013).

Los datos experimentales se analizaron mediante ANOVA/Tukey HSD P<0.01% y el usó del programa estadístico Statgraphics Centurion (García-González *et al*., 2005; Walpole *et al*., 2007).

Resultados y discusión

En la tabla 1, se reportan las propiedades fisicoquímicas del suelo sin ARA: ahí se detectó un pH ligeramente ácido de 6.64, con un bajo contenido de materia orgánica de 4.57%, esto implica un evidente desequilibrio en la relación C:N; alta capacidad de intercambio catiónico de 4.61 Cmol (+) kg^{-1} salinidad general; con una de textura: arcilla 22.16%, limo 37.28 % y arena 40.56% en suelo, clasificado como franco-arcilloso-arenoso (Sánchez-Yáñez, 2007). En la tabla 4, se muestra la bioestimulación secuencial, complementaria y acumulativa del suelo impactado por 75,000 ppm de ARA, mediante los tratamientos durante 110 días, que lo decrecieron hasta 625 ppm,

Tabla 4. En suelo concentración de aceite residual automotriz remanente derivado de la bioestimulación secuencial, complementaria y acumulativa al 80% de la capacidad de campo por 110 días.

Suelo con 75,000 ppm de aceite residual automotriz	Concentración de aceite residual automotriz remanente de la bioestimulación después de 110 días
Sin bioestimular (control negativo)	51,440 ppm[b*]
Biestimualdo mediante detergente, solución mineral, lombricomposta, *P. vulgaris* o abono verde y H_2O_2	625 ppm[a]

*Letras distintas indican diferencia estadística altamente significativa al 0.01% según Tukey.

valor inferior al límite máximo permitido por la NOM-138; el cual de acuerdo a reportes de investigación es similar a la concentración que naturalmente existe en el ambiente. Ello sugiere que la bioestimulación por detergente fue fundamental en la solubilización del ARA para que los microorganismos heterotróficos aerobios iniciaran la mineralización parcial de esta mezcla de hidrocarburos (Riojas *et al*., 2010; Shi *et al*., 2013), la siguiente bioestimulación con la solución mineral enriqueció el ambiente con el NH_4^+ que restableció la relación C:N en desequilibrio por el exceso de ARA (Pardo *et al*., 2004), en tanto que las otras sales de PO_4^{-3} y K debido a la rápida absorción indujeron una mayor actividad microbiana (Ferrera-Cerrato *et al*., 2007; Mancera-López *et al*., 2008). Mientras que la bioestimulación por incorporación de la lombricomposta aceleró la oxidación del ARA (Olivares-Campos *et al*., 2012), al enriquecer el suelo con otras formas inorgánicas de N: NH_4^+, en tanto que los PO_4^{-3} mejoraron la actividad microbiana (Vallejo *et al*., 2007; Infante *et al*., 2010). La bioestimulación mediante *P. vulgaris* como abono verde (Ogbo, 2009; Mósquera *et al*., 2012), incrementó la concentración de compuestos orgánicos de N: proteínas, peptonas, aminoácidos, nucleótidos y vitaminas que restablecieron la relación C:N causado por el elevado nivel de concentración de hidrocarburos del ARA (Sánchez-Yáñez, 2007); simultáneamente el abono verde enriqueció el suelo con moléculas orgánicas de C sencillas y de bajo peso molecular para que los microorganismos heterotróficos aerobios mediante una acción coometabólica lograran la eliminación de los hidrocarburos alifáticos y aromáticos complejos; en consecuencia las integración de las acciones de bioestimulación disminuyeron la concentración del ARA (Sangabriel *et al*., 2006; Diab, 2008). La bioestimulación con el H_2O_2 aseguró el O_2 suficiente para la constante oxidación de esta mezcla de hidrocarburos (Asquith *et al*., 2012), en tanto que en suelo el control de la humedad a capacidad de campo al 80% facilitó el movimiento de los hidrocarburos solubilizados por la bioestimulación con el detergente, los que a través de los poros del suelo aumentó la actividad microbiana (Sánchez-Yáñez, 2007; Riojas *et al*., 2010). La bioestimulación secuencial, complementaria y acumulativa en suelo impactado por ARA, la concentración remanente fue 625 ppm, este valor tuvo diferencia estadística altamente significativa comparada con los 51,440 ppm en suelo impactado por ARA o control negativo, donde el desequilibrio C:N, provocada por la alta concentración de ARA y la ausencia de compuestos orgánicos e inorgánicos a base de N, P y K que limitaron la eliminación del ARA (Gómez *et al*., 2009; Asquith *et al*., 2012).

En la tabla 5, se analizó en suelo la cuantificación de la población microbiana heterotrófica aerobia oxidante del ARA inducida por la bioestimulación secuencial, complementaria y acumulativa, a los 10 y 110 días; ahí se registró un incremento de la densidad microbiana desde 59 x 10^6 hasta 326 x 10^6 UFC/g de suelo seco, lo anterior indica que esta bioestimulación integral, enriqueció el suelo con compuestos orgánicos e inorgánicos de N, P y K (Castro *et al*., 2004; Popoviciu & Bercu, 2014), que indujeron la multiplicación acelerada de la microbiota heterotrófica aerobia oxidante del ARA constituida por actinomicetos, bacterias y hongos (Sánchez- Yáñez, 2007) que con distinta capacidad pueden utilizar los hidrocarburos de esta mezcla como fuente de C y energía (Johnsen *et al*., 2005; Wang *et al*., 2012); el valor de 326 x 10^6 UFC/g tuvo diferencia estadística altamente significativa comparada con los 41 x 10^6 UFC/g a 68 x 10^6 UFC/g debido a la toxicidad de los componentes del

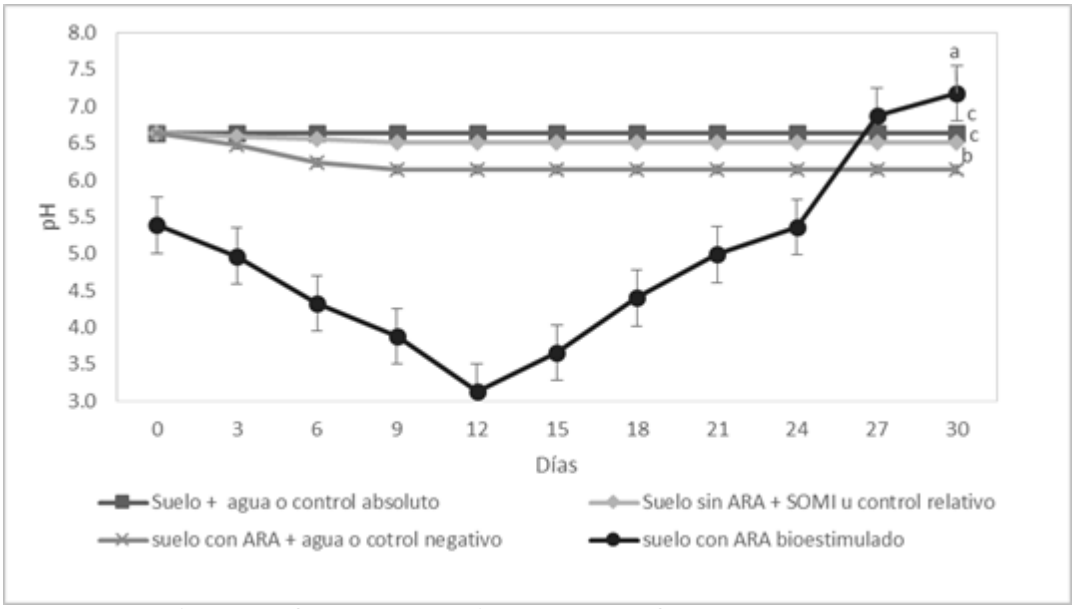
Tabla 5. En suelo cuantificación de la población microbiana oxidante de aceite residual automotriz por bioestimulación secuencial, complementaria y acumulativa a los 10 y 110 días.

Tiempo(días)	Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por 10^6/g de suelo seco		
	Suelo + agua (Control absoluto)	Suelo + 75,000 ppm de ARA (Control negativo)	Suelo + 75,000 ppm de ARA + bioestimulación
10	¥ 8.34^{d*}	¥ 41.00^{c}	¥ 59.00^{b}
110	‡ 37.00^{c}	‡ 68.00^{b}	‡ 326.00^{a}

¥ *Indica diferencia estadística altamente significativa al 0.01% según Tukey a los 10 días; ‡ indica diferencia estadística altamente significativa al 0.01% según Tukey a los 110 días.

ARA que eliminan y/o inhibe el crecimiento de esta población microbiana autóctona (Venosa y Zhu, 2003; Tang *et al*., 2010).

En la figura 2, se observa la dinámica del pH en suelo bioestimulado secuencial, complementaria y acumulativa; ahí se registró un valor inicial de 5.4 que decreció hasta 3.2 en el día 12, lo que indica que cuando la microbiota heterotrófica aerobia durante la degradación del ARA, generó ácidos orgánicos del tipo: CH_3COOH (acético) y H-COOH (fórmico) (Paredes-Mendoza & Espinosa-Victoria, 2010; Abid *et al*., 2014), que al disociarse en la solución del suelo generaron iones H, los cuales disminuyeron el pH; una acidez que inhibió la actividad microbiana (Gómez *et al*., 2009). Por lo que fue necesario neutralizar con Na_2CO_3 para reestablecer el pH a valores entre 6.8 y 7.2, rango donde la mayor parte de minerales son absorbidos por los microrganismos autóctonos heterotróficos que oxidan los hidrocarburos alifáticos del ARA (Johnsen *et al*., 2005; Sánchez-Yáñez, 2007). En este suelo bioestimulado, el valor de pH fue 3.2, que tuvo diferencia estadística altamente significativa respecto al suelo impactado por ARA o CN; que registró un valor de 6.14 sin variación, consecuencia del exceso de ARA que limitó la actividad microbiana heterotrófica y de la falta de las acciones que la bioestimulación propone para la recuperación del suelo (Asquith *et al*., 2012). En la tabla 6, se muestra la biorrestauración del suelo



Letras distintas indican diferencia estadística altamente significativa al 0.01% según Tukey.

Figura 2. Dinámica del pH después de la bioestimulación secuencial, complementaria y acumulativa de un suelo contaminado con 75,000 ppm de aceite residual automotriz.

Tabla 6. En suelo biorrestaurado por bioestimulación secuencial, complementaria y acumulativa, germinación de las semillas de *Lactuca sativa* inoculado con *Aspergillus fumigatus* y/o *Streptomyces griseus*.

Lactuca sativa sembrada en	Germinación (%)
Suelo sin contaminar irrigado con agua (control absoluto)	74.94^{c*}
Suelo sin contaminar alimentado con solución mineral (control relativo)	83.76^{b}
Suelo biorrecuperado con *Aspergillus fumigatus*	89.12^{a}
Suelo biorrecuperado con *Streptomyces griseus*	89.85^{a}
Suelo biorrecuperado con *A. fumigatus/S. griseus*	91.61^{a}
Suelo biorrecuperado sin inocular	82.38^{b}

*Letras distintas indican diferencia estadística altamente significativa al 0.01% según Tukey.

impactado por ARA, en donde se sembró *L. sativa* inoculada con *A. fumigatus/S. griseus* y detectó un 91.61% de germinación, valor numérico con diferencia estadística altamente significativa comparado con los 83.76% de *L. sativa* en suelo sin ARA alimentado con una solución mineral o suelo control relativo (CR). Lo anterior implica que en suelo biorrestaurado la germinación de *L. sativa*, demostró que la concentración del ARA remanente derivada de la bioestimulación secuencial, complementaria y acumulativa fue similar a la esperada en un suelo sano (Carter *et al*., 2013), si a ello se suma que *A. fumigatus* y *S. griseus* convirtieron los exudados de esta semilla en sustancias promotoras de crecimiento vegetal o fitohormonas, lo que en *L. sativa* aumentó el porcentaje de germinación (Sánchez-Yáñez, 2007; Infante & García, 2012). En la tabla 7, se reporta la biorrecuperación del suelo contaminado con ARA, donde se sembró *L. sativa* inoculada con *A. fumigatus* y *S. griseus* que alcanzó 9.4 cm en altura de planta y 3.5 cm de longitud radical; valores numéricos con diferencia estadística altamente significativa comparado con los 8.0 cm en altura y 2.6 cm en longitud de *L. sativa* en suelo sin ARA alimentado con solución mineral o CR. En tanto que la biomasa de *L. sativa* con *A. fumigatus* y *S. griseus* registró 0.095 g de peso fresco aéreo (PFA) y 0.045 g en peso fresco radical (PFR); valores con diferencia estadística altamente significativa con respecto a los 0.071 g en PFA y los 0.026 g de PFR en *L. sativa* o CR. Mientras que en esta misma hortaliza inoculada con *A. fumigatus* y *S. griseus* se detectó 0.039 g de peso seco aéreo (PSA) y los 0.0041 g en peso seco radical (PSR), valores numéricos con diferencia estadística altamente significativas comparado con los 0.022 g de PSA y los 0.0021 g de PSR en *L. sativa* usado como CR. En suelo biorrecuperado, los resultados de fenología y biomasa de *L. sativa* fueron indicadores de que la concentración del ARA remanente de la bioestimulación, no influyó en su sano crecimiento (Carter *et al*., 2013; Pentreath *et al*., 2015), en consecuencia la inoculación con *A. fumigatus* y *S. griseus*, favorecieron la conversión de los exudados radicales de *L. sativa* en fitohormonas del tipo: auxinas y/o giberelinas, comparada con *L. sativa* sin inocular, alimentada con solución mineral (Sánchez-Yáñez, 2007).

Conclusiones

La bioestimulación secuencial, complementaria y acumulativa a través del el uso de detergente, solución mineral, lombricomposta, *P. vulgaris* o abono verde y el H_2O_2, así como el control de la humedad al 80% de la capacidad de campo y del pH, favorecieron una rápida y eficaz mineralización desde 75,000 ppm de aceite residual automotriz hasta 625 ppm en 110 días; valor inferior al máximo establecido por la NOM-138 de 4,400 ppm. En suelo biorrecuperado, el sano crecimiento de *L. sativa* demostró que el aceite remanente de la bioestimulación fue igual a la concentración que naturalmente existe en suelo sin contaminar, por lo que éste puede ser utilizado con fines agrícolas, sin ningún riesgo para la salud del consumidor.

Agradecimiento

CIC-UMSNH proyecto 2.7 (2018), BIONUTRA S.A de C.V, Maravatío y el Laboratorio de

Tabla 7. Fenología y biomasa de *Lactuca sativa*, bioindicador de la usencia del aceite residual automotriz en suelo biorecuperado por bioestimulación secuencial, complementaria y acumulativa.

En suelo *Lactuca sativa*	Altura de planta (cm)	Longitud radical (cm)	Peso fresco (g)		Peso seco (g)	
			Aéreo	Radical	Aéreo	Radical
Irrigado con agua (control absoluto)	7.2^{e*}	2.0^{c}	0.053^{d}	0.016^{d}	0.011^{d}	0.0013^{d*}
Alimentado con solución mineral (control relativo)	8.0^{d}	2.6^{b}	0.071^{c}	0.026^{c*}	0.022^{c}	0.0021^{c}
Inoculado con *Aspergillus fumigatus* (T1♣)	9.1^{b}	3.5^{a}	0.087^{b}*	0.039^{b}	0.033^{b}	0.0031^{b}
Inoculado por *Streptomyces griseus* (T2♣)	8.5^{c}	3.4^{a}	0.084^{b}	0.041^{b}	0.032^{b}*	0.0033^{b}
Inoculado mediante *A. fumigatus/S. griseus* (T3♣)	9.4^{a}*	3.5^{a}	0.095^{a}	0.045^{a}	0.039^{a}	0.0041^{a}
Sin inocular (T4♣)	8.1^{d}	2.7^{b*}	0.068^{c}	0.025^{c}	0.024^{c}	0.0023^{c}

♣ Suelo biorrecuperado mediante bioestimulación.

* Letras distintas indican diferencia estadística altamente significativa al 0.01% según Tukey.

Edafología de la facultad de Biología de la UMSNH. Mich. México.

Referencias

Abid, A., Zaafouri, K., Aydi, A., Manai, I., Trabesli, A. B. H., Messaoud, C., & Hamdi, M. 2014. Feasibility of a Bioremediation Process Using Biostimulation with Inorganic Nutrient NPK for Hydrocarbon Contaminated Soil in Tunisia. Journal of Bioremediation & Biodegradation. 5(4): 1–6.

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 A. 1(5): 637-650.

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 A. 1(5): 637-650.

Bahadure S., Kalia R. y R. Chavan. 2013. Comparative Study of Bioremediation of Hydrocarbon Fuels. International Journal of Biotechnology and Bioengineering Research. 4(7): 677-686.

Balderas-León, I., & Sánchez-Yáñez, J. M. 2015. Biorremediación de suelo contaminado con 75,000 ppm de aceite residual automotriz por bioestimulación y fitorremediación con Sorghum vulgare y Bacillus cereus y/o Burkholderia cepacia. Journal of the Selva Andina Research Society. 6(1): 23-32

Carter, S., Shackley, S., Sohi, S., Suy, T., & Haefele, S. 2013. The Impact of Biochar Application on Soil Properties and Plant Growth of Pot Grown Lettuce (*Lactuca sativa*) and Cabbage (Brassica chinensis). Agronomy. 3(2): 404–418.

Castro, J. L. P., Rojas, M. C. P., & de Mesa, J. B. L. 2004. Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo. Nova. 2(2):40-49.

Delgadillo-López, A. E., González-Ramirez. 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.

Diab EA. 2008. Phytoremediation of Oil Contaminated Desert Soil Using the Rhizosphere Effects. Global J Environ Res. 2(2): 66-73.

Domínguez-Rosado, E & J Pichtel. 2004a. Phytoremediation of Soil Contaminated with Used Motor Oil: II. Enhanced Microbial Activities from Laboratory and Growth Chamber Studies. Environment Engineer Science. 21(2): 169-180.

Efe, S. I., & Okpali, A. E. 2012. Management of Petroleum Impacted Soil with Phytoremediation and Soil Amendments in Ekpan Delta State, Nigeria. Journal of Environmental Protection. 3(5): 386.

Ferrera-Cerrato, R., A. Alarcón., D. Trejo-Aguilar., W. Sangabriel & M. Mendoza-López. *et al*. 2007. Fitorremediación de un suelo contaminado con combustóleo utilizando Phaseolus coccineus y fertilización orgánica e inorgánica. Agrociencia. 41(8): 817-826.

Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., & Banat, I. M. 2010. (Bio)surfactant and Bioremediation, Successes and Failures. Research Signpost. 661(2): 145–156

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(1): 65–72.

García-Hernández D, Sosa-Aguirre CR, SánchezYáñez JM. 2007. Biorremediación de agua doméstica contaminada con aceite residual automotriz por bioestimulación. Ing Hidraul Mex. 22:113-118.

Gómez W, Gaviria J, Cardona S. 2009. Evaluación de la bioestimulación frente a la atenuación natural y la bioaumentación en un suelo contaminado con una mezcla de gasolina-diesel. Dyna. 76: 83-93.

Hernández-Valencia, I., & Mager, D. 2003. Uso de Panicum maximum y Brachiaria brizantha para fitorremediar suelos contaminados con un crudo de petróleo liviano. Bioagro. 15(3): 149-155.

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.

Infante, C., & García, F. A. M. 2012. Evaluación de la Toxicidad en Desechos y Suelos Petrolizados empleando semillas de *Lactuca sativa* L. Interciencia. 37(10): 782.

Johnsen, A. R., Wick, L. Y., & Harms, H. 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. Environmental Pollution. 133(1): 71–84.

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.

Ley General de Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente (LGEEPA) 2014. Diario Oficial de la Federación del, 28.

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 petróleos crudo nuevo e intemperizado. Universidad y Ciencia. 26(2): 121-136.

Mancera-López, M. E., Esparza-García, F., Chávez-Gómez, B., Rodriguez-Vazquez, R., Saucedo-Castaneda, 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(2):151-160.

Margesin, R. 2000. Potential of cold-adapted microorganisms for bioremediation of oil-polluted Alpine soils. International Biodeterioration and Biodegradation. 46(1): 3–10.

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 bioregradation efficiency. Global NEST Journal. 11(2): 181-188.

Mósquera, M. P., Reyes, O. E. S., de Prager, M. S., Gallego, J. M., & Sánchez, D. I. Á. 2012. Abonos verdes: Tecnología para el manejo agroecológico de los cultivos. Agroecología. 7(1): 53-62.

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.

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.

Ogbo, E. 2009. Effects of diesel fuel contamination on seed germination of four crop plants - Arachis hypogaea, Vigna unguiculata, Sorghum bicolor and Zea mays. African Journal Biotechnology. 8(2): 250-253.

Ogedegbe, A. Uwaila., B. Ikhajiagbe & GO Anoliefo. 2013. Growth Response of Alternanthera brasiliana (L.) Kuntze in a Waste Engine Oil-Polluted Soil. Journal of Emerging Trends in Engineering and Applied Sciences. 4(2): 322-327.

Olivares-Campos, M. A., Hernández-Rodríguez, A., Vences-Contreras, C., Jáquez-Balderrama, J. L., & Ojeda-Barrios, D. 2012. Lombricomposta y composta de estiércol de ganado vacuno lechero como fertilizantes y mejoradores de suelo. Universidad y ciencia. 28(1): 27-37.

Osaigbovo, A. U., Law-Ogbomo, K. E., & Agele, S. O. 2014. Effects of Spent Engine Oil Polluted Soil and Organic Amendment on Soil Chemical Properties, Micro-Flora on Growth and Herbage of Telfairia Occidentalis (hook f). Bayero Journal of Pure and Applied Sciences. 6(1): 72-78.

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.

Paredes-Mendoza, M., & Espinosa-Victoria, D. 2010. Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. Terra Latinoamericana. 28(1): 61-70.

Pentreath, V., González, E., Barquín, M., Ríos, S. M., & Perales, S. 2015. Acute toxicity bioassay with native plants to evaluate an oil spill. Revista Salud Ambiental. 15(1): 13–20.

Pinto M. A., Geraldes 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

Popoviciu, D. R., & Bercu, R. 2014. Effects of nutrients and hydrogen peroxide on hydrocarbon biodegradation in marine sandy sediment microcosms. Annals of the Romanian Society for Cell Biology. 19(1): 27–31.

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.

Sánchez-Yáñez JM. 2007. Breve Tratado de Microbiología Agrícola, Teoría y Práctica. Ed. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, CIDEM, Secretaria de Desarrollo Agropecuario del Gobierno del Estado de Michoacán. COSUTENTA, SA de CV Morelia, Mich, México. ISBN: 978-970-95424-1-7.

Sangabriel, W., Ferrera-Cerrato, R., Trejo-Aguilar, D., Mendoza-López, M. R., Cruz-Sánchez, J. S., López-Ortiz, C.& Alarcón, A. 2006. Tolerance and phytoremediation of fuel oil-contaminated soil by six plant species. Revista Internacional de Contaminación Ambiental. 22(2): 63-73.

Sharifi, M., Sadeghi, Y., & Akbarpour, M. 2007. Germination and growth of six plant species on contaminated soil with spent oil. International Journal of Environmental Science & Technology. 4(4): 463-470.

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.

Tang, J. C., Wang, R. G., Niu, X. W., Wang, M., Chu, H. R., & Zhou, Q. X. 2010. Characterisation of the rhizoremediation of petroleum-contaminated soil: effect of different influencing factors. Biogeosciences. 7(12): 3961–3969.

Vallejo, V., Salgado, L., & Roldan, F. 2007. Evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de TPHs en suelos contaminados con petróleo. Revista Colombiana de Biotecnología. 7(2): 67-78.

Van Gestel, K., Mergaert, J., Swings, J., Coosemans, J., & Ryckeboer, J. .2003. Bioremediation of diesel oil-contaminated soil by composting with biowaste. Environmental Pollution. 125(3): 361–368.

Venosa. A. & Zhu. X. 2003. Biodegradation of crude oil contaminating marine shorelines and freshwater wetlands. Spill Science & Technology. 8:63-178.

Walpole E.R., Myers R., Myers LS. 2007. Probabilidad & Estadística para Ingeniería & Ciencias. Ed. Pearson, 8ª, ISBN: 13:978-970-26-0936-0. México.

Wang, Z.-Y., Xu, Y., Wang, H.-Y., Zhao, J., Gao, D.-M., Li, F.-M., & Xing, B. 2012. Biodegradation of Crude Oil in Contaminated Soils by Free and Immobilized Microorganisms. Pedosphere. 22(5): 717–725.