



Biorrestauración de suelo contaminado con aceite residual automotriz por bioestimulación con lombricomposta y fitorremediación con *Sorghum vulgare* inoculado con *Bacillus cereus* y *Rhizobium etli*

Biorestauration of soil polluted by waste motor oil by biostimulation with vermicompost and phytoremediation with *Sorghum vulgare* inoculated by *Bacillus cereus* and *Rhizobium etli*

Juárez-Cisneros Gladys¹, Sánchez-Yáñez Juan Manuel^{1*}

Datos del Artículo

¹Instituto de Investigaciones Químico Biológicas Ed B-3, Ciudad Universitaria, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Francisco J. Mujica S/N, Felicitas del Rio, CP 58,000, Morelia, Mich. México

***Dirección de contacto:**

Juan Manuel Sánchez-Yáñez. Laboratorio de Microbiología Ambiental

E-mail address:
syanez@umich.mx.

Palabras clave:

Aromáticos,
rizosfera,
mineralización,
rizobacterias

J Selva Andina Biosph.
2014; 2(1):15-22.

Historial del artículo

Recibido agosto, 2014.
Devuelto noviembre 2014
Aceptado noviembre, 2014.
Disponible en línea, noviembre 2014.

Editado por:
**Selva Andina
Research Society**

Key words:

Aromatics,
rhizosphere,
mineralization,
rhizobacteria.

Resumen

La contaminación de suelo con aceite residual automotriz (ARA) le causa pérdida de su fertilidad. Los objetivos de esta investigación fueron: a) bioestimular (BS) un suelo contaminado con 10000 ppm de ARA, con lombricomposta (LC) al 3 y 6%; y b) la fitorremediación (FR) de ese suelo para eliminar el ARA remanente con *Sorghum vulgare* inoculado con *Bacillus cereus* y/o *Rhizobium etli*, ambas bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV). Las variables respuesta de este ensayo fueron: en fase de BS del suelo la concentración del ARA en 60 días. En fase de FR de ese suelo, la biomasa de *S. vulgare* inoculado con las BPCV a floración y cantidad final del ARA. Los resultados mostraron que en suelo solo bioestimulado con LC al 3%, el ARA se redujo a 8630 ppm. Comparado con el suelo bioestimulado y luego fitorremediado con *S. vulgare* y las BPCV para eliminar el ARA remanente hasta 210 ppm. Este suelo bioestimulado con la LC al 3%, y luego fitorremediado con *S. vulgare* inoculado con *B. cereus* y *R. etli*; su biomasa fue estadísticamente superior comparado *S. vulgare* en el suelo sin bioestimar donde *S. vulgare* redujo el ARA hasta 260 ppm acorde con el ANOVA Tukey ($p > 0.05$). Lo anterior apoya a la integración de la biorremediación del suelo contaminado con ARA por bioestimulación y su fitorremediación con *S. vulgare* y BPCV como forma rápida y mejor que la acción individual.

© 2014. Journal of the Selva Andina Biosphere. Bolivia. Todos los derechos reservados.

Abstract

Soil pollution by waste motor oil (WMO) caused soil's lost fertility. The aims of this research were a) bioremediation of soil polluted by 10000 ppm of WMO for biostimulation with vermicompost (VC) at 3 and 6 % (w/w) follow by b) phytoremediation (PR) of the same soil to eliminate remaining WMO with *Sorghum vulgare* inoculated with *Bacillus cereus* and/or *Rhizobium etli* or Promoting Growth Plant Bacteria (PGPB). At the first step of assay WMO concentration was measured before and after bioremediation. At the second step the same soil phytoremediation was applied for remaining WHO sowing *S. vulgare* inoculated with PGPB, then at flowering stage its biomass and WHO final concentration was determined. Results showed that soil impacted by WMO biostimulated with VC at 3% was eliminated 8630 ppm of WMO. At the second phase in the same soil PR applied for remaining WMO which was reduced until 210 ppm. Soil polluted by remaining WMO applied PR using *S. vulgare* plus *R. etli* WMO was decreased at 260 ppm. While *S. vulgare*'s biomass inoculated with PGPB was higher compared to *S. vulgare* grown in soil not polluted by WMO according by ANOVA - Tukey ($p > 0.05$). These results suggested that soil polluted by WMO could be recovering by applying integrated BR and PR better than just using one type.

© 2014. Journal of the Selva Andina Biosphere. Bolivia. All rights reserved.

Introducción

El aceite residual automotriz (ARA) es una mezcla de moléculas insolubles de hidrocarburos (HC) alifáticos, aromáticos, policíclicos, halogenados y metales pesados que cuando contamina el suelo afecta negativamente su estructura, impide el intercambio gaseoso con la atmósfera, e inhibe la actividad de las poblaciones microbianas nativas, reduce su fertilidad y la cobertura vegetal (Benavides *et al.* 2006, Delgado-López *et al.* 2011). En consecuencia el ARA se clasifica como un residuo peligroso de difícil mineralización (Osadolor & Seghosi-me 2013.). En suelo una alternativa para eliminar el ARA es aplicar la biorremediación integral por bioestimulación (BS) y en sucesión para el ARA remanente la fitorremediación (FR) con bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) para finalizar su depuración. En suelo impactado con ARA su BS con lombricomposta (LC) incorpora minerales esenciales para inducir a su microbiota aerobia heterotrófica nativa a mineralizar la parte alifática, y simultáneamente enmendar el desequilibrio nutricional para un crecimiento vegetal sano (Maldonado-Chávez *et al.* 2010), que en ese suelo facilite su FR para consumir el ARA remanente con *S. vulgare* inoculado con BPCV y cuyo extenso sistema radical libera exudados que estimulan la actividad oxidante de ARA de géneros como *Bacillus cereus* (Niu *et al.* 2011) y *Rhizobium* spp. (Pivetz 2001, García-Rivero & Peralta-Pérez 2008, López-Ortiz *et al.* 2012).

Normalmente se reporta la FR de suelo contaminado con HC análogos a los del ARA que se aplica como la única estrategia de BR, lo que generalmente solo reduce parcialmente su concentración (Diab 2008, Niu *et al.* 2010, Zhang *et al.* 2010, Izinyon & Seghosi-me 2011). En contraste con los resultados positivos cuando a la BR de un suelo contaminado con 15000 ppm de ARA por BS con un fertilizante mineral (NPK), se integra la FR del mismo suelo para consumir el ARA remanente con *Helianthus annuus* (Domínguez- Rosado & Pichtel 2004). En general la BR de suelo contaminado con ARA por bioestimulación o fitorremediación se aplica de manera independiente, es lenta y no asegura su completa mineralización. Por tanto los objetivos de esta investigación fueron: (i) biorremediar un suelo contaminado con 10000 ppm de ARA por bioestimulación con lombricomposta (ii) fitorremediación de ese suelo con *S. vulgare* inoculado con *Bacillus cereus* y/o *Rhizobium etli*.

Materiales y métodos

El experimento se realizó en invernadero de 10 X 10 m² con una temperatura diurna que varió de 25 a 30 °C, una humedad relativa del 50% y una nocturna de 22-25 °C y una humedad relativa del 55%, con un diseño experimental de bloques de 1.5 m² al azar de 9 tratamientos y 5 repeticiones. Para el ensayo se usó un suelo ubicado a los 19° 39' 27'' de

latitud norte 100° 19' 59'' de longitud oeste, con una altitud de 1820 msnm clima templado en 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, México. El suelo fue clasificado como laterítico sódico degradado y compacto, con un historial agrícola de 20 años de un sistema de cultivo intensivo cereal-cereal (maíz-trigo y maíz-cebada), de textura arcilloso, con un contenido de materia orgánica de 1.5% y N orgánico de 39 Kg/ha, de acuerdo a parámetros edáficos, fue pobre en ambas propiedades, con pH 6.7 ligeramente ácido, se solarizó 48 h para minimizar el problema de plagas y enfermedades, se contaminó con 10000 ppm de ARA proveniente de un taller mecánico. Este suelo se colocó en un sistema semihidropónico de jarras de Leonard (García-González *et al.* 2005), el experimento se realizó en dos etapas: (i) BS de suelo contaminado con 10000 ppm de ARA con LC al 3 y 6% (p/p). Este suelo mantuvo su humedad a capacidad de campo con agua potable, después de 30 días se colectaron 15.0 g y se cuantificó la concentración del ARA por Soxhlet (Leal 2003), y (ii) después de la BR del suelo contaminado con el ARA se aplicó la FR del mismo suelo para eliminar el ARA con *S. vulgare* inoculado con *B. cereus/R. etli* ambas BPCV aisladas de *Zea mays mexicana*. El primer género se cultivó en caldo nutritivo, y el segundo género en caldo extracto de levadura manitol rojo congo. Se usaron 40 X 10⁶ UFC de cada uno/semilla de *S. vulgare* (Sánchez-Yáñez 2007) que se sembró en el suelo previamente bioestimulado con la LC, *S. vulgare* se alimentó con una solución mineral (g/L): NH₄Cl, 12.0; KH₂PO₄, 3.0; K₂HPO₄, 3.5; MgSO₄, 1.5; CaCl₂, 0.1; FeSO₄, 0.5mL y una de oligoelementos, 1.5 ml/L, el pH se ajustó a 6.4-6.7 (Leal 2003, Sánchez-Yáñez 2007, Pasaye 2011). Durante

la FR del suelo impactado con ARA se midió la fenotipia y biomasa de *S. vulgare* a floración, por ser la etapa de su mayor actividad fisiológica relacionada con su reproducción y además la concentración del ARA remanente en el suelo por Soxhlet al final de esta fase (Vásquez *et al.* 2010), los datos experimentales se analizaron por ANOVA y después por Tukey con $\alpha=0.05$ software JMP ver.6.0 (Walpole *et al.* 2007).

Resultados

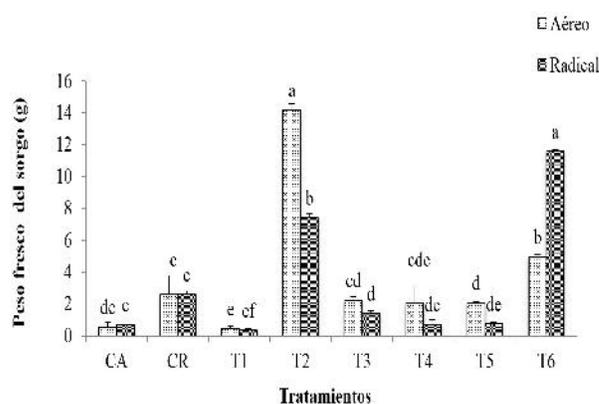


Figura 1 Peso fresco de *Sorghum vulgare* a floración usado en la fitorremediación del suelo contaminado con 8630 ppm de aceite residual automotriz, posterior a la bioestimulación del mismo suelo con lombricomposta.

Control absoluto (CA)= suelo + *S. vulgare*; **Control relativo (CR)**=suelo + *S. vulgare* + solución mineral (SM); **T1**=suelo + aceite residual automotriz (ARA) + lombricomposta (LC) 6% + *S. vulgare/B. cereus + R. etli*; **T2**=suelo + ARA + LC 3% + *S. vulgare/B. cereus + R. etli*; **T3**= suelo + ARA + LC 6%; **T4**=suelo + ARA + LC 3%; **T5**= suelo + ARA + *S. vulgare/R. etli*; **T6**= suelo + ARA + *S. vulgare/B. cereus*; Letras diferentes indica diferencia estadística significativa ANOVA-Tukey ($\alpha=0.05$)

En la figura 1 se muestra que en el suelo del T1 bioestimulado con LC al 6%, donde luego se fitorremedió el suelo para eliminar el ARA remanente con *S. vulgare* inoculado con *B. cereus + R. etli*, en este caso esta gramínea alcanzó un peso fresco aéreo (PFA) de 0.43 g y un peso fresco radical (PFR) de 0.34. En el suelo del T2 primero bioestimulado con LC al 3% y luego fitorremediado para consumir

el ARA remanente con *S. vulgare* inoculado con *B. cereus* y *R. etli* tuvo un PFA de 14.2 g y un PFR de 7.4 g. En tanto que en el suelo del T3 bioestimulado con LC al 6%, y que se fitorremedió para eliminar el ARA con *S. vulgare* pero sin inocular; su PFA fue de 2.25 g y su PFR de 1.4 g. Comparado con el mismo suelo del T4 bioestimulado con LC al 3%, y fitorremediado para consumir el ARA remanente, con el *S. vulgare* sin inocular, ahí tuvo un PFA de 2.1 g y un PFR de 0.7 g. En el suelo del T6 contaminado con ARA sin bioestimular, donde solo se aplicó la FR para el ARA remanente con *S. vulgare* e inoculó con *R. etli*, alcanzó un PFA de 4.95 g y un PFR de 11.6 g, ambos valores fueron estadísticamente diferentes y significativos comparados con lo registrado en *S. vulgare* cultivado en suelo sin ARA alimentado con una SM, en donde tuvo un PFA 2.5 g y un PFR de 2.6 g. En general en el suelo codificado como 1, 3, 4 y 5 primero biorremediado con LC, y luego fitorremediado con *S. vulgare* para eliminar el ARA remanente, tuvieron valores de PFA y PFR que fueron estadísticamente inferiores y significativos comparados con el PFA y PFR de *S. vulgare* cultivado en suelo sin ARA del CR.

En la figura 2 se observa que en el suelo impactado con ARA primero biorremediado con LC y luego para eliminar el ARA remanente fitorremediado con *S. vulgare* a floración se muestra su peso seco aéreo (PSA) y su peso seco radical (PSR). En el suelo (T2) primero biorremediado con LC y después en este suelo para consumir el ARA remanente se fitorremedió con *S. vulgare* alcanzó un PSA de 3.38 g y un PSR de 0.48, superior *S. vulgare* usado como CR cultivado en suelo sin ARA; con un PSA de 0.52 y un PSR de 0.16 g.

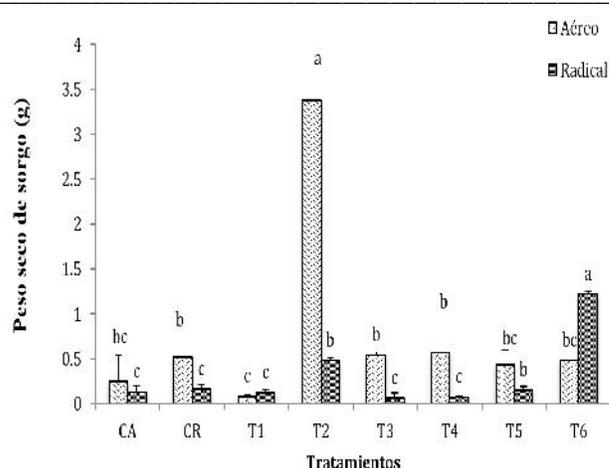


Figura 2 Peso seco de *Sorghum vulgare* a floración usado en la fitorremediación del suelo contaminado con 8630 ppm de aceite residual automotriz, posterior a la bioestimulación de ese suelo con lombricomposta. Control absoluto (CA)= suelo + *Sorghum vulgare*; Control relativo (CR)=suelo + *S.vulgare* + solución mineral (SM); T1=suelo + aceite residual automotriz (ARA)+ lombricomposta (LC) 6%+ *S. vulgare* + *B.cereus*+ *R.etli*; T2=suelo + ARA + LC 3% + *S. vulgare*+ *B.cereus* + *R. etli*; T3= suelo + ARA + LC 6%; T4=suelo + ARA + LC 3%; T5= suelo + ARA + *S. vulgare* y *R. etli*; T6= suelo + ARA + *S. vulgare*+ *B. cereus*. Letras distintas indican diferencia estadística significativa ANOVA-Tukey ($\alpha=0.05$).

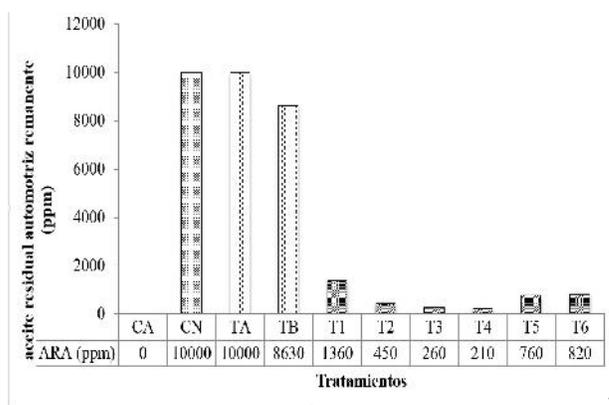


Figura 3 Biorremediación de suelo contaminado con 10000 ppm de aceite residual automotriz con lombricomposta al 3 y 6% y fitorremediado para eliminar el remanente con *Sorghum vulgare* inoculado con *Bacillus cereus* y *Rhizobium etli*. Control absoluto (CA)= suelo + agua; Control negativo (CN)= suelo + 10,000 ppm aceite residual automotriz (ARA)+ agua; TA= suelo + 10,000 ppm ARA + lombricomposta (LC) 6%; TB= suelo + 10,000 ppm ARA + LC 3%; T1=suelo + 10,000 ppm ARA+ LC 6% + *S. vulgare* y *B. cereus*+ *R.etli*; T2=suelo + 10,000 ARA + LC 3% + *S. vulgare* y *B. cereus* + *R.etli*; T3= suelo + 10,000 ppm ARA + LC 6%; T4=suelo + 10,000 ppm ARA + LC 3%; T5= suelo + 10,000 ppm ARA + *S. vulgare* y *R. etli*; T6= suelo + 10,000 ppm ARA, *S.vulgare* + *B.cereus*.

En la figura 3 se observa que en el suelo contaminado con ARA y solo bioestimulado con LC al 6% la concentración de 10000 ppm del ARA no cambió (TA), igual que en el mismo suelo impactado con ARA sin BR

(CN); sin embargo cuando el suelo se bioestimuló con LC al 3% la concentración de ARA disminuyó a 8630 ppm (TB). Cuando el suelo se bioestimuló con LC y luego se aplicó la FR del mismo suelo para eliminar el ARA con *S. vulgare* inoculado con las dos BPCV, se observó que el consumo del ARA se aceleró y redujo a: 1360 ppm en el T1, a 450 ppm en el T2, a 260 ppm en el T3, a 210 ppm en el T4, a 760 ppm en el T5 y a 820 ppm en el T6.

Discusión

En la figura 1 se observó que en el suelo contaminado con ARA por BS con LC al 3% y luego ese suelo se fitorremedió para eliminar el ARA remanente con *S. vulgare* con *B. cereus* y *R. etli* su biomasa alcanzó un valor sin diferencia estadística significativa, comparado con el PF de *S. vulgare* cultivado en suelo sin ARA: este resultado sugiere que en el suelo contaminado con ARA la incorporación de LC al 3% restableció el equilibrio mineral y estimuló la actividad de la microbiota aerobia heterotrófica y al mismo tiempo favoreció el crecimiento vegetal del *S. vulgare* a pesar de la fitotoxicidad del ARA (Sangabriel *et al.* 2006).

En el suelo impactado con ARA, bioestimulado con LC, y posterior FR de este suelo para eliminar el ARA remanente con *S. vulgare* con *B. cereus* y *R. etli* se sugiere que estas BPCV tu-

vieron un efecto positivo en su crecimiento mediante sustancias promotoras de crecimiento vegetal, y que aumentaron la tolerancia de la gramínea al estrés causado por la fitotoxicidad del ARA (Ferrera-Cerrato 2006, Shirdam *et al.* 2008). También se reporta que en la rizosfera vegetal como la de *S. vulgare* bacterias como *B. cereus* y *R. etli* pueden contribuir a la degradación de HC aromáticos similares a los encontrados en el ARA, en parte porque esta gramínea tiene un sistema radicular extenso, fibroso y voluminoso que explora una mayor área de suelo para la captación de minerales y agua, además de que facilita su asociación con BPCV y aumenta su resistencia al estrés inducido por el ARA (Shirdam *et al.* 2008, Ndimele 2010, Tang 2010, González-Paredes *et al.*, 2013). Lo anterior se apoya en que en suelo contaminado con HC fue fitorremediado y esta actividad vegetal fue mejorada con la inoculación de BPCV, como lo reportaron López-Ortiz *et al.* 2012, que en un suelo contaminado con naftaleno y fenantreno lo fitorremediaron con *Leucaena leucocephala* (Lam.) inoculada con *Rhizobium tropici* CIAT89 y se generó un efecto positivo de la FR; análogo a lo que *S. vulgare* generó en este suelo contaminado con ARA (figura 3). Este resultado sugiere que la incorporación de LC lo enriqueció con sales de N, P, K y micronutrientes (Nwoko *et al.* 2007, Shirdam *et al.* 2008), que favorecieron a las poblaciones microbianas nativas oxidantes de HC simples del ARA (Mrozik, *et al.* 2003).

Mientras la acción secuencial con FR del mismo suelo con *S. vulgare* inoculado con *B. cereus* y *R. etli* minimizaron el efecto fitotóxico del ARA; probablemente por esta BPCV usaron algunos de sus aromáticos como fuente de carbono y energía (Zand *et al.* 2010, Efe & Okpali 2012, Gonzales- Paredes *et al.* 2013).

Se concluye con base a los resultados obtenidos que la adecuada integración de la biorremediación por bioestimulación del suelo impactado con 10000 ppm de ARA con lombricomposta y su posterior fitorremediación para eliminar el remanente, con *S. vulgare* inoculado con *Bacillus cereus* y *Rhizobium etli* aceleró y mejoró la biorrestauración de este ambiente, en comparación con solo aplicar la biorremediación y/o la atenuación natural.

Conflicto de intereses

Los participantes en esta investigación aseguramos que no existe ningún problema de intereses relacionados con la planeación, ejecución y reporte de esta investigación que comprometa el valor de los resultados obtenidos o sus consecuencias en términos científicos o técnicos o de cualesquier otra índole.

Agradecimientos

A la Coordinación de Investigación Científica-UMSNH proyecto 2.7 (2014), beca del CONACYT a la primera autora. A BIONUTRA y FI-

TONUTRIMENTOS, SA de CV, Maravatio, Mich, México.

Literatura citada

- Benavides LJ, Quintero G, Guevara VAL, Jaimes CDC, Gutiérrez RSM, Miranda JG. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. NOVA. 2006; 4(5):82-90.
- Delgadillo-López AE, González-Ramírez CA, Prieto-García F, Villagómez-Ibarra JR, Acevedo-Sandoval O. Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación. Tropical and Subtropical Agroecosystems. 2011; 14:597-612.
- Diab EA. Phytoremediation of Oil Contaminated Desert Soil Using the Rhizosphere Effects. Global J Environ Res. 2008; 2(2):66-73.
- Dominguez-Rosado E, Pichtel J. Phytoremediation of Soil Contaminated with Used Motor Oil: II. Greenhouse Studies. Environ Eng Sci. 2004; 21(2):169-180.
- Efe SI, Okpali AE. Management of Petroleum Impacted Soil with Phytoremediation and Soil Amendments in Ekpan Delta State, Nigeria. J Environ Protec. 2012; 3(5): 386-393.
- García-Rivero M, Peralta-Pérez MR. Cometabolismo in the biodegradation of hydrocarbons. Rev Mex Ing Quím. 2008; 7 (1):1-12.
- García-González MM, Farías-Rodríguez R, Peña-Cabriales JJ, Sánchez-Yáñez JM. Inoculación del trigo var. Pavón con *Azospirillum* spp. y *Azotobacter beijerinckii*. Terra Latinoamericana 2005; 23:65-72.
- González-Paredes Y, Alarcón A, Ferrera-Cerrato R, Almaraz JJ, Martínez-Romero E, Cruz-Sánchez

- JS, *et al.* Tolerance, growth and degradation of phenanthrene and benzo[a]pyrene by *Rhizobium tropici* CIAT 899 in liquid culture médium. Appl Soil Ecol. 2013; 63(1):105-111.
- Leal CM. Biorremediación de suelo contaminado con aceite residual automotriz. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Colima. Colima, México, (inérita). 2003.
- 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 Ambient. 2012; 28(4):333-342.
- Maldonado-Chávez E, Rivera-Cruz MC, Izquierdo-Reyes F, Palma-López DJ. Effects of rizosphere, microorganisms and fertilization on bioremediation and phytoremediation of soils with new and weathered crude oil. Universidad y Ciencia. 2010; 26(2):121-136.
- Mrozik A, Piotrowska-Seget Z, Labusek S. Bacterial degradation and biorremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Pol J Environ Stud. 2003; 12(1):15-23
- Ndimele PE. A review on the Phytoremediation of Petroleum hydrocarbon. Pakistan J Biol Sci. 2010; 13(15): 715-722.
- Niw DD, Liu HX, Jiang CH, Wong MP, Wang QY, Jin HL, *et al.* The plant Growthpromoting *Rhizobacteriu Bacillus cereus* AR156 Induces Systemic Resistance in *Arabidopsis thaliana* by simultaneously activating Salicylate and Jasmonate/ethylene dependet signaling pathways. Mol Plant-Microbe Interact. 2011; 24:533-542.
- Nwoko CO, Okeke PN, Agwu OO, Akpan IE. Full Length Research Paper Performance of *Phaseolus vulgaris* L. in a soil contaminated with spent-engine oil. Afr J Biotechnol. 2007; 6(16): 1922-1925.
- Osadolor C, Izinyon, Seghosime A. Assessment of Show Star Grass (*Melampodium Paludosum*) for Phytoremediation of Motor Oil Contaminated Soil. Civil Environ Res. 2013; 3(3):386-393.
- Pasaye AM. Biorremediación de un suelo agrícola impactado con aceite residual automotriz. Tesis Maestría. Laboratorio de Microbiología Ambiental, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas y Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México, 2011.
- Pivetz E. Phytoremediation of Contaminated Soil and Ground Water at Hazardous Waste Sites. ManTech Environmental Research Services Corporation, Technology Innovation Office Office of Solid Waste and Emergency Response, US EPA, Washington, DC. 2001.
- Sánchez-Yáñez J.M. Ciclo del nitrógeno en: Breve Tratado de Microbiología Agrícola; teoría y práctica. Eds. Coordinación de la Investigación Científica-UMSNH, Secretaria de Desarrollo Agropecuario, Gobierno del Estado de Michoacán, Centro de Investigación y Desarrollo del Estado de Michoacán, COSUSTENTA, SA de CV Morelia, Michoacán, México. 2007; 30-143 pp.
- Sangabriel W, Ferrera-Cerrato R, Trejo-Aguilar D, Mendoza-López MR, Cruz-Sánchez JS, López-Ortiz C, *et al.* Tolerancia y capacidad de fitorremediación de combustóleo en el suelo por seis especies vegetales. Rev Int Contam Ambie. 2006; 22(2):63-73.
- Shirdam R, Zand AD, Bidhendi GN, Mehrdadi N. Phytoremediation of hydrocarbon-contaminated soils with emphasis on the effect of petroleum hydrocarbons on the growth of plant species. Phytoprotection. 2008; 89(1):21-29.

- Tang J. Bioremediation of Petroleum Polluted Soil by Combination of Ryegrass with Effective Microorganisms. *J Environ Tech Eng.* 2010; 3(2): 80-86.
- Vasquez MC, Guerrero FJT, Quintero A. Biorremediación de lodos contaminados con aceites lubricantes usados. *Rev Colomb Biotecnol.* 2010; 12: 141-157.
- Walpole ER, Myers R, Myers LS. Pruebas de hipótesis de una y dos muestras. En: *Probabilidad & Estadística para Ingeniería & Ciencias.* (Cruz C.L.M. y Hernández C.F. Pearson Educación de México, S.A. de C.V. Ed), Naucalpan de Juárez, México. 2007; 321-388 pp.
- Zand, A.D., Bidhendi, G.N., Mehrdadi, N. Phytoremediation of total petroleum hydrocarbons (TPHs) using plant species in Iran. *Turk J Agric For.* 1010; 34(1): 429-438.
- Zhang J, Yin R, LiN X, Liu Weiwei, Li X. Interactive effect of biosurfactant and microorganism to enhance phytoremediation for removal of aged polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. *J Health Sci.* 2010; 56(3): 257-266.
-