



Suelo impactado por 90000 ppm de aceite residual automotriz: bioestimulación y fitorremediación

Soil impacted by 90000 ppm of waste motor oil: biostimulation and phytoremediation

Ignacio-De la Cruz Juan Luis, Márquez-Benavides Liliana, Rico-Cerda José Luis,
Saucedo-Martínez Blanca Celeste, Sánchez-Yáñez Juan Manuel*

Datos del Artículo

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Francisco J. Mujica S/N, Col. Felicitas del Río C.P. 58000, Morelia, Mich., México. Laboratorio de Microbiología Ambiental, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Ed-B3 C.U.

***Dirección de contacto:**

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Francisco J. Mujica S/N, Col. Felicitas del Río C.P. 58000, Morelia, Mich., México. Laboratorio de Microbiología Ambiental, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Ed-B3 C.U.

Juan Manuel Sánchez-Yáñez

E-mail address: syanez@umich.mx

Palabras clave:

Suelo,
ARA,
bioestimulación,
fitorremediación,
C. arietinum,
M. echinospora,
P. chrysogenum,
mineralización,
coometabolismo,
NOM-138.

J. Selva Andina Res. Soc.
2019; 10(2):86-95.

Historial del artículo.

Recibido febrero 2019.
Devuelto mayo 2019
Aceptado junio, 2019.
Disponible en línea, agosto 2019.

Editado por:
Selva Andina
Research Society

Key words:

Soil,
WMO,
biostimulation,
phytoremediation,
C. arietinum,
M. echinospora,
P. chrysogenum,
mineralization,
coometabolism,
NOM-138.

Resumen

En México un suelo impactado por 90000 ppm de aceite residual automotriz (ARA), excede la máxima concentración permitida de 4400 ppm según la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2003 (NOM-138) y que le causa infertilidad. Una alternativa solución es la por bioestimulación (BIS) integral con un detergente, una solución mineral, con H₂O₂ fuente O₂, un extracto fúngico crudo con una lacasa que hidroliza aromáticos del ARA, luego con *Phaseolus vulgaris* o abono verde. Estas acciones se concluyen por fitorremediación (FITO) mediante *Cicer arietinum*. Los objetivos de esta investigación fueron: i) BIS de un suelo impactado por 90000 ppm de ARA, ii) FITO mediante *C. arietinum* con *Micromonospora echinospora* y *Penicillium chrysogenum* para decrecer el ARA a valor inferior al máximo aceptado de la NOM-138. En suelo la variable-respuesta de la BIS fue la concentración inicial y final de ARA por Soxhlet, en la FITO se registró la fenología y biomasa de *C. arietinum* a plántula. Los datos experimentales se analizaron por ANOVA/Tukey HSD P<0.05%. Los resultados muestran que la BIS y FITO en suelo impactado por 90000 ppm de ARA, lo decrecieron hasta 1200 ppm, valor numérico estadísticamente distinto comparado con suelo con 79000 ppm de ARA sin BIS ni FITO o control negativo. Se concluye que en suelo impactado por una relativa alta concentración de ARA la BIS y FITO fue estrategia integral suficiente para recupera acorde con la NOM-138.

© 2019. Journal of the Selva Andina Research Society. Bolivia. Todos los derechos reservados.

Abstract

In México any soil polluted by 90000 ppm waste motor oil (WMO), this concentration is over the maximum accepted of 4400 ppm by regulation law called as a NOM-138-SEMARNAT / SSA1-2003 (NOM-138), 9000 ppm of WMO is causing soil's fertility decreasing. An alternative solution is biostimulation (BIS) by detergent following by mineral solution then. Subsequently the BIS by H₂O₂ as a supplier of O₂ and a crude fungi extract containing laccase able to hydrolyze aromatic of WMO, then by *Phaseolus vulgaris* as a green manure to reduce WMO; concluding by phytoremediation (PHYTO) with *Cicer arietinum*. The objectives of this research were: i) BIS of soil contaminated by 90000 ppm of WMO ii) PHYTO by *C. arietinum* with *Micromonospora echinospora* and *Penicillium chrysogenum* to decrease WMO at lower concentration value than the maximum accepted by NOM-138. In sense at soil's, variable-response of BIS was initial and final concentration of WMO by Soxhlet, at the PHYTO, phenology and biomass of *C. arietinum* were taken at seedling. The experimental data were analyzed by ANOVA/Tukey HSD P <0.05%. Results showed that BIS and PHYTO of soil impacted by 90000 ppm of WMO decreased until 1200 ppm numerical value statistically different compared to 79000 ppm of soil polluted by WMO, without BIS and either PHYTO or negative control. Those results showed that BIS and PHYTO are an effective technique for recovering soil polluting by relative high level of WMO according to NOM-138.

© 2019. Journal of the Selva Andina Research Society. Bolivia. All rights reserved.

Introducción

En México, en suelo el derrame accidental o provocado de aceite residual automotriz (ARA) causa un daño ambiental, es una mezcla de hidrocarburos (HICO) alifáticos, aromáticos y policíclicos, tóxicos para la vida^{1,2}, por lo que Ley General de Equilibrio Ecológico y Protección Ambiental (LGEEPA) lo clasifica como un residuo peligroso³. Un suelo impactado por 90000 ppm de ARA, es una concentración relativamente alta acorde con la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2003⁴, que establece como valor máximo permitido de 4400 ppm dividido en la fracción: ligera de 200 ppm, en la mediana de 1200 ppm y en la pesada de 3000 ppm. En suelo 90000 ppm de ARA forma una capa hidrofóbica que impide el intercambio de agua y O₂ (oxígeno), desequilibra la relación C:N (carbono: nitrógeno) asociada con el reciclaje de los ciclos biogeoquímicos necesarios para la continuidad de la vida, e inhibe la actividad de la microbiota heterotrófica oxidante del ARA, lo que causa la infertilidad del suelo.⁵ Una alternativa de solución para resolver este problema es la remediación química, mediante agentes oxidantes fuertes Ca(ClO)₂ o KClO₄, con la desventaja de que causan un efecto colateral negativo al ambiente, y tienen un alto valor económico.⁶ Mientras que una alternativa ecológica es la biorremediación⁷, por una bioestimulación (BIS) integral y secuencia primero con un detergente (DEGE) que emulsifique el ARA a través de los poros del suelo⁸, a continuación con una solución mineral (SOMI) que enriquece el suelo con minerales de NH₄NO₃, K₂HPO₄ y KH₂PO₄⁹, para equilibrar la relación C:N, provocado por el exceso de ARA, lo que induce la actividad de la microbiota autóctona heterotrófica que mineraliza el ARA^{6,10}, en el suelo si la humedad se mantiene al 80% de la capacidad de campo, se

facilita el intercambio de agua y gases, para la eliminación del ARA¹¹, pues la BIS es aerobia, por lo que es necesario aplicar el H₂O₂ (peróxido de hidrógeno) como fuente de O₂ (oxígeno)¹², y acelerar la mineralización del ARA. Mientras que la BIS puede ser mejorada con un extracto fúngico crudo (EX-FUCU) que contiene la lacasa para la hidrólisis y degradación de los aromáticos del ARA¹³, en el suelo una forma de asegurar la continua BIS de esta compleja mezcla de HICO, es mediante la siembra de *Phaseolus vulgaris* como abono verde (AVE), que lo enriquezca con compuestos orgánicos de N: péptidos, aminoácidos y urea lo que mantiene el equilibrio de la relación C:N, con compuestos orgánicos C sencillos derivados de la degradación del AVE en la celobiosa y glucosa en el coometabolismo del ARA^{14,15}, finalmente de biorremediación puede concluir mediante la fitorremediación (FITO), con *Cicer arietinum*¹⁷ un especie vegetal que tolere y degrade el ARA¹⁶, *C. arietinum* se potencia en la rizosfera con géneros de microorganismos promotores de crecimiento vegetal como: *Micromonospora echinospora* y *Penicillium chrysogenum*, ambos capaces de utilizar la fracción aromática del ARA como fuente de C y energía.¹⁸ Con base a lo anterior los objetivos de esta investigación fueron: i) BIS de un suelo impactado por 90000 ppm de ARA, y ii) FITO mediante *C. arietinum* con *M. echinospora* y *P. chrysogenum* para minimizar el ARA a valor inferior al máximo aceptado por la NOM-138.

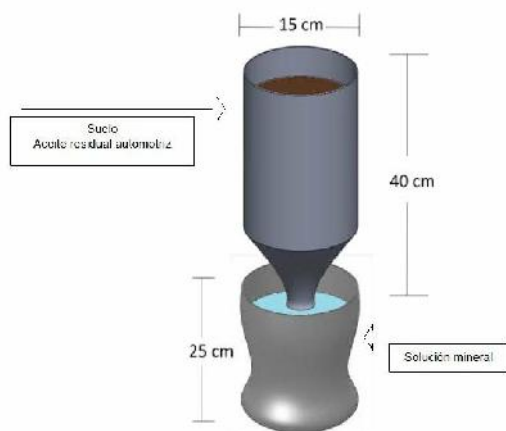
Materiales y métodos

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), Morelia, Mich, México. El invernadero tenía una temperatura promedio de 23.2 °C, una luminosidad de 450 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, una 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, en un terreno agrícola denominado "La cajita" perteneciente a la Tenencia Zapata del municipio de Morelia, sobre el km 5 de la carretera Morelia-Pátzcuaro, Mich, México.

El suelo se solarizó a 70 °C/48 h y tamizó con malla del N_o. 20 para minimizar el problema de plagas y enfermedades. Este suelo se contaminó con 90000 ppm de ARA proveniente de un taller mecánico automotriz de la ciudad de Morelia, Mich, México. Este suelo se bioestimuló al inicio con un DEGE (La Corona®) al 0.5% (p/v), de acuerdo al diseño especificado en la Tabla 1, luego 1.0 Kg del suelo se colocó en la parte superior de la jarra de Leonard, mientras que el agua o la SOMI, se agregó en la parte inferior señalada en la figura 1, ambas partes se conectaron por una tira de algodón 20 cm de largo para facilitar el movimiento del líquido al suelo por capilaridad.¹⁹

Figura 1 Jarra de Leonard¹⁹



En la BIS secuencial del suelo impactado por 90000 ppm de ARA se aplicaron 18.0 mL de una SOMI cada 3 días/mes, con la siguiente composición química (g/L): 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 solución de microelementos (g/L): H_3BO_3 2.86, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.22, $\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.81, pH 6.8-7.0.¹⁷ Mientras que en la BIS se agregó 5.0 mL de H_2O_2 al 3%, cada 3 días/mes, seguida de una BIS con 10.0 mL de un EXFUCU, aplicado una vez por semana/30 días. Para obtener el EXFUCU se reprodujo *P. chrysogenum* en un medio de cultivo con lignina residual de paja de trigo (LIREPATO) de la siguiente manera: 100 g de paja de trigo seca, molida y tamizada en una malla de 0.0841 mm, se trató con $\text{CH}_3\text{-COOH}$ al 10%/30 min en proporción 1:2 (p/v), que se neutralizó con NaOH al 10%, luego se sometió a autoclave a 120 °C/60 min, posteriormente se lavó con agua destilada a pH 7.0 y se secó a 70 °C/24 h. Para la generación del EXFUCU se usaron 12.5 mL de *P. chrysogenum* que se inocularon en un matraz de 500 mL con 250 mL de caldo LIREPATO con las siguiente composición química (g/L): LIREPATO 10.0, peptona de caseína 5.0, extracto de levadura 1.3, K_2HPO_4 0.17, KH_2PO_4 2.61, MgSO_4 1.5, NaCl 0.9, CuSO_4 0.05.0, 2.5 mL del DEGE (la Corona®) al 10% (p/v), y 1.0 mL/L de una solución de oligoelementos, ajustado a pH 5.5 esterilizado a 121 °C/20min; después del periodo de incubación a 30°C/12 días, *P. chrysogenum* se filtró y centrifugó para eliminar el micelio y obtener el EXFUCU libre del hongo, aplicado para bioestimular el suelo.¹³ Luego se sembró semillas de *P. vulgaris* en jarras de Leonard en suelo sin ARA hasta el nivel de plántula, para barbechar e incorporarlo como AVE en el suelo impactado por ARA/30 días.¹¹ Al finalizar la BIS integral después de 120 días, se determinó la concentración de ARA por Soxhlet.^{20,21} Mientras en la FITO se utilizó *C. arie-*

tinum potenciado con *M. echinospora* y/o *P. chrysogenum* géneros de microorganismos promotores de crecimiento vegetal (MPCV). *M. echinospora* se cultivó en agar hueso de aguacate (AHA) cuya composición fue (g/L): hueso de aguacate 10.0, peptona de caseína 5.0, extracto de levadura 1.3. K₂HPO₄ 0.17, KH₂PO₄ 2.61, MgSO₄ 1.5, NaCl 0.9, CuSO₄ 0.05, azul de bromotimol 10% (p/v) 10 ppm, solución detergente 10% 2.5 mL, 1.0 mL de antifúngico

Tecto® 60 al 10%, solución de oligoelementos 1.0 mL, agar bacteriológico 18.0, pH ajustado a 7.5, el actinomiceto se incubó a 30 °C/48h. En tanto que *P. chrysogenum* se reprodujo en agar Sabouraud (ASA) con la siguiente composición (g/L): glucosa 25.0, peptona especial 10.0, extracto de levadura 1.0, agar bacteriológico 18.0, pH ajustado a 5.5, el hongo e incubó 30 °C/48h.

Tabla 1 Diseño experimental para analizar la bioestimulación de un suelo impactado por 90000 ppm de aceite residual automotriz

Suelo*	Aceite residual automotriz	Agua	Solución mineral	Extracto fúngico crudo	<i>Phaseolus vulgaris</i> abono verde
Control absoluto (CA)	-	+	-	-	-
Control relativo (CR)	-	-	+	-	-
Control negativo (CN)	+	-	-	-	-
Bioestimulado con detergente y H ₂ O ₂ al 3%	+	+	+	+	+

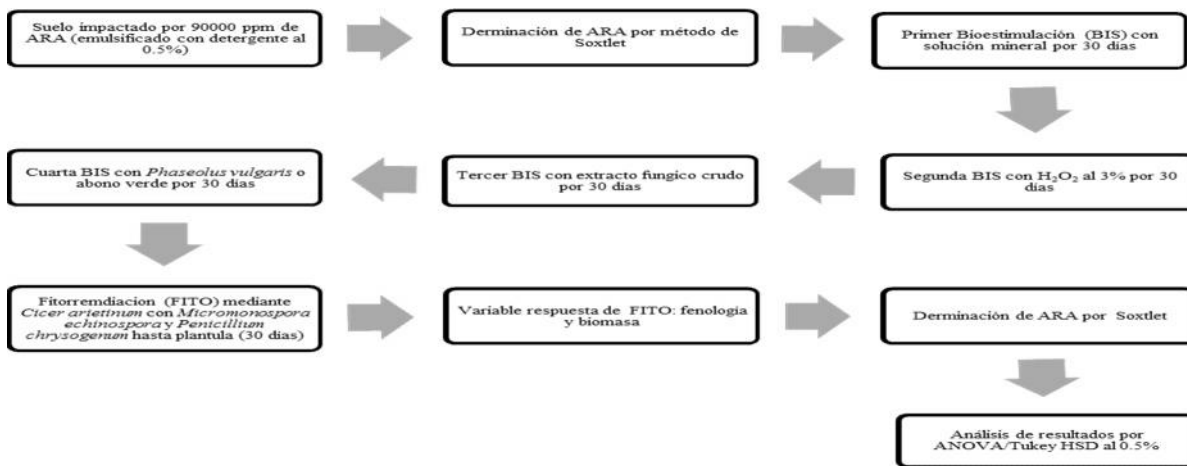
n* (número de repeticiones) = 7, (+) = agregado; (-) = no agregado

Tabla 2 Diseño experimental para la fitorremediación mediante *Cicer arietinum* con *Micromonospora echinospora* y/o *Penicillium chrysogenum* en un suelo contaminado con aceite residual automotriz remanente de la bioestimulación

Suelo*	<i>Cicer arietinum</i>	<i>Micromonospora echinospora</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>
Irrigado con agua (CA)	+	-	-
Alimentado con solución mineral (CR)	+	-	-
Con ARA sin bioestimar (CN)	+	+	-
Con ARA más bioestimulación**	+	+	+

n= 7* (+) agregado, (-) no agregado, (+) = agregado, (-) = no agregado, **bioestimulación múltiple: detergente, H₂O₂ al 3%, extracto fúngico y *Phaseolus vulgaris*

Figura 2 Esquema del experimento de suelo impactado por 90000 ppm de aceite residual automotriz: bioestimulación y fitorremediación mediante *Cicer arietinum*



Inoculación de *C. arietinum* con *M. echinospora* y *P. chrysogenum*. Para ello primero se calculó la densidad del inóculo por cuenta viable en placa en AHA y ASA ajustada a una concentración de 1.5×10^8 unidades formadoras de propágulos (UFP) /mL de *M. echinospora* y *P. chrysogenum* en relación 1:1¹¹ y de igual densidad de manera individual, de acuerdo con el diseño especificado en la tabla 2, fig 2, luego aproximadamente un mes después de la siembra, cuando *C. arietinum* alcanza el nivel de plántula, se midió la fenología: altura de planta (AP) y longitud radical (LR), y la biomasa: peso fresco y seco aéreo/radical (PFA/PFR)/(PSA/PSR). Mientras que en suelo la concentración final del ARA se mi-

dió por método de Soxhlet. Los datos experimentales se validaron por un análisis de varianza (ANOVA) y Tukey HSD al 0.5% con el paquete estadístico Statgraphics Centurión XVI.¹⁰

Resultados

En la Tabla 3, se detalla la BIS integral en suelo impactado por 90000 ppm de ARA mediante un DEGE, la SOMI, el H₂O₂, el EXFUCU y *P. vulgaris* o AVE, los que lo minimizaron hasta 65300 ppm en 120 días, valor numérico estadísticamente diferente en comparación con los 84000 ppm en suelo impactado por ARA sin bioestimular o control negativo.

Tabla 3 Bioestimulación secuencial del suelo impactado por 90000 ppm de aceite residual automotriz después de 120 días

Suelo impactado con aceite residual automotriz (ARA)*	Concentración (ppm)	
	Inicial	Final
Control negativo (CN) solo ARA		84000b
Bioestimulado con detergente, H ₂ O ₂ , solución mineral, extracto fúngico crudo y <i>Phaseolus vulgaris</i> o abono verde	90000a**	65300a*

*n= 7, **Letras distintas indican diferencia estadística según Tukey al 0.05%

Tabla 4 Fenología y biomasa de *Cicer arietinum* potenciado con *Micromonospora echinospora* y/o *Penicillium chrysogenum* al final de la fitorremediación de suelo con una concentración remanente de 1200 ppm de aceite residual automotriz

Suelo/ <i>Cicer arietinum</i> *	Altura de planta (cm)	Longitud radical (cm)	Peso fresco (g)		Peso seco (g)	
			Aéreo	Radical	Aéreo	Radical
Solo con agua (CA)	22.5 ^{c**}	10.8 ^c	0.63 ^c	0.06 ^c	0.10 ^b	0.03 ^b
Alimentado con solución mineral al 100 % (CR)	46.1 ^a	19.8 ^a	1.48 ^b	0.69 ^b	0.47 ^a	0.09 ^a
<i>Micromonospora echinospora</i> + solución mineral al 50 % ♣	31.9 ^b	14.0 ^b	1.49 ^b	0.76 ^{ab}	0.36 ^a	0.09 ^a
<i>Penicillium chrysogenum</i> + solución mineral al 50 % ♣	43.9 ^a	18.1 ^a	3.08 ^a	0.86 ^a	0.49 ^a	0.11 ^a
<i>M. echinospora/P. chrysogenum</i> + solución mineral al 50 % ♣	45.2 ^a	22.1 ^a	1.87 ^b	0.73 ^{ab}	0.42 ^a	0.10 ^a

*n=7, ♣=suelo impactado por aceite residual automotriz bioestimulado, **Letras distintas indican diferencia estadística según Tukey al 0.05%

En la Tabla 4, se presenta la fenología y la biomasa de *C. arietinum* potenciado con *M. echinospora* y *P. chrysogenum* a nivel de plántula al final de la FITO del suelo, cuando la concentración del ARA decreció hasta 1200 ppm, en ese punto *C. arietinum* alcanzó 45.2 cm de AP y 22.1 cm de LR, ambos valo-

res numéricos sin diferencia estadística comparados con los 46.1 cm de AP y los 19.8 cm en LR de *C. arietinum* en suelo sin ARA, alimentado con la SOMI o CR que mostro el crecimiento sano de la leguminosa en un suelo no impactado por ARA y sin inocular con los microorganismos promotores de

crecimiento vegetal. potenciado con *M. echinospora* y *P. chrysogenum* a plántula. Mientras que la concentración de 1200 ppm de ARA un nivel que ya no causo fitotoxicidad en la biomasa *C. arietinum* cuando se potencio con *P. chrysogenum* registró 3.08 g de PFA y 0.86 g de PFR, ambos valores numéricos con diferencia estadística comparados con los 1.48 g de PFA y los 0.69 g de PFR, en *C. arietinum* en suelo sin ARA, alimentado con SOMI al 100% o

CR. En tanto que en suelo fitorremediado por *C. arietinum* con *M. echinospora* y *P. chrysogenum* fue 0.42 g de PSA y 0.10 g de PSR, ambos valores numéricos estadísticamente diferentes comparados con los 0.47 g de PSA y los 0.09 g en PSR de *C. arietinum* en suelo sin ARA alimentado con la SOMI sin potenciar con los microorganismos promotores de crecimiento vegetal.

Tabla 5 Concentración de aceite residual automotriz en suelo al final de la fitorremediado mediante *Cicer arietinum* potenciado con *Micromonospora echinospora* y *Penicillium chrysogenum*

Suelo impactado con aceite residual automotriz (ARA)	Concentración (ppm)	
	Inicial	Final
Control negativo (CN) con ARA	84000 ^{b**}	79000 ^{b*}
Fitorremediación con <i>Cicer arietinum</i> potenciado con <i>Micromonospora echinospora</i> y <i>Penicillium chrysogenum</i> *	65300 ^a	1200 ^a

*Bioestimulado mediante detergente, H₂O₂, solución mineral, extracto fúngico y *Phaseolus vulgaris* o abono verde,
 **Letras distintas indican diferencia estadística según Tukey al 0.05%

En la Tabla 5, se presenta en el suelo la concentración de ARA al final de la FITO mediante *C. arietinum* potenciado con *M. echinospora* y *P. chrysogenum* a nivel de plántula, donde se registró el máximo decremento del ARA 1200 ppm en 30 días, concentración que fue inferior al límite máximo aceptado por la NOM-138. Este valor numérico fue estadísticamente diferente comparado con los 79000 ppm en suelo impactado por ARA sin bioestimar ni fitorremediar o CN.

Discusión

En la Tabla 3, se presenta la BIS en suelo impactado por 90000 ppm de ARA con el DEGE, que lo emulsifico través de los poros del suelo, y lo hizo disponible al ataque microbiano^{8,22}, seguida de una BIS en secuencia con una SOMI que lo enriqueció con minerales de NH₄NO₃, K₂HPO₄ y KH₂PO₄, para el reequilibrio de la relación C:N, lo que indujo a los

microorganismos heterotróficos aerobios a oxidar el ARA, bajo una humedad del suelo del 80% de la capacidad de campo⁹, permitiendo el intercambio de agua y gases para acelerar el decremento de la concentración del ARA^{6,23}, dada la compleja naturaleza química de los HICO de esta mezcla y los productos que se generan del ARA, se sugiere que la microbiota del suelo metabolizo los HICO por la ruta de la -oxidación^{24,25}, por consiguiente fue necesaria durante la BIS con H₂O₂, como fuente de O₂ (oxígeno) que aceleró la oxidación del ARA¹² del tipo alifático, de bajo peso molecular, mientras que para degradar la aromática compleja, se aplicó la BIS con el EXFUCU que contenía lacasa¹³, enzima extracelular que hidrolizó, hasta generar ácidos alifáticos, que se metabolizaron por -oxidación decreciendo la concentración del ARA.²⁴ Como producto de la BIS secuencial los HICO remanentes del ARA requieren que el suelo se mantenga una adecuada relación C:N, por lo que siguiente la BIS involucro

la siembra de *P. vulgaris* o AVE (rico en compuestos de N orgánico sencillos), y ser disponible luego de ser incorporados al suelo, para enriquecer con N en forma de aminoácidos esenciales, péptidos y urea contribuyendo al balance de la relación C:N, al igual que C orgánico del tipo celobiosa y glucosa para inducir la degradación parcial de la fracción compleja del ARA mediante una acción coometabólica.^{26,27} Como resultado de la BIS secuencial en el suelo impactado por 90000 ppm de ARA, la concentración decreció apenas un 27.5% equivalente a 65300 ppm, comparado con el suelo con 90000 de ARA no bioestimulado o control negativo, así la elevada concentración de HICO impidió el intercambio de gases, provocando desbalance de la relación C:N e inhibió la posible mineralización del ARA.^{25,28}

En la Tabla 4 se señala la fenología y biomasa de la plántula de *C. arietinum* potenciado por *M. echinospora* y *P. chrysogenum*, al final de FITO del suelo disminuyendo a 1200 ppm cuando del ARA, producto de la fitodegradación de las raíces y capacidad de oxidación de *M. echinospora* y *P. chrysogenum* de la fracción aromática del ARA.^{29,30} Comparado con el crecimiento de *C. arietinum* sin inocular en suelo con ARA sin bioestimular, la semilla no germinó y/o murió por exceso de HICO, formando una película hidrofóbica y viscosa adherida a la semilla de *C. arietinum*, impidiendo la difusión de agua y O₂, ahogando la semilla y por ende su muerte³¹, el decremento del ARA hasta 1200 ppm, permitió el sano crecimiento *C. arietinum*, lo que sugiere que la inoculación con *M. echinospora* y *P. chrysogenum* transformaron los exudados de la raíz en sustancias promotoras de crecimiento vegetal para mostrar un respuesta de la leguminosa similar a lo registrado cuando *C. arietinum* se sembró en suelo libre de ARA alimentado con la SOMI sin inocular^{32,33}

Fue evidente que la inoculación de la semilla de *C. arietinum* con *M. echinospora* y *P. chrysogenum* facilitaron a la par con la fitodegradación radical, la reducción de la concentración del ARA, desde 65300 ppm hasta 1200 ppm, valor numérico inferior al límite máximo aceptado por la NOM-138, aseguro la biorremediación del suelo. Comparado con el suelo impactado por ARA sin bioestimular ni fitorremediar, la microbiota nativa aerobia heterotrófica fue incapaz mineralizar ARA, causada por el desbalance de la relación C:N por exceso de HICO, algunos tóxicos o biocidas y pobreza de minerales que inhiben cualquier acción microbiana asociada con la eliminación del ARA.^{17,25}

En la Tabla 5, se presenta que la BIS secuencia e integral en suelo impactado por 90000 ppm de ARA, lo enriqueció con compuestos orgánicos e inorgánicos de N como: NH₄⁺, aminoácidos, nucleótidos, y urea etc., reequilibraron la relación C:N para inducir la degradación parcial del ARA, en tanto que la BIS con la SOMI, *P. vulgaris* o AVE, además del los compuestos de N, proporcionaron PO₄⁻³ para decrecer el ARA^{2,9}, minimizando hasta 65300 ppm, y facilitó la FITO mediante *C. arietinum* en el sistema radical realizando la fitodegradación del ARA, potenciado con *M. echinospora* y *P. chrysogenum*, ambos géneros y especies con capacidad de oxidar HICO alifáticos y aromáticos al utilizarlos como fuente de C y energía, mientras que la concentración del ARA se redujo hasta 1200 ppm los MPCV convirtieron los exudados radicales de *C. arietinum* en fitohormonas del tipo auxinas y/o giberelinas^{33,34}, que aumentaron su capacidad de absorción radical mineral de N, P y K aportados por la BIS. En tanto que el valor de 1200 ppm de ARA fue inferior al máximo aceptado por la NOM-138^{18,25}, para la confirmación de la biorremediación del suelo. En evidente contraste con el suelo impactado por el ARA sin bioestimular ni fitorremediar o control

negativo, en el cual la atenuación natural fue insuficiente para evitar efecto negativo del ARA^{5,31} Se concluye que el suelo impactado por 90000 de ARA, una alternativa ecológica fue la BIS integral, seguida de una FITO con *C. arietinum* potenciado con *M. echinospora* y *P. chrysogenum*, acciones que favorecieron a la mineralización del ARA hasta 1200 ppm en 150 días, valor inferior al máximo aceptado por la NOM-138 y cuya concentración comparada con otras investigaciones, no fue posible estas acciones biológicas aplicados individualmente y que solo se lograría con los químicos de daño colateral ambiental.

Conflictos de intereses

Los autores aseguran que no existe ningún conflicto de intereses entre las instituciones participantes para la realización y publicación de este trabajo.

Agradecimientos

A Proyecto 2.7 (2019) de la CIC-UMSNH, a BIONUTRA S A de CV Maravatío, Mich, México.

Aspectos éticos

La aprobación de la investigación por el Comité de Ética, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo-México, siguió las pautas establecidas para este comité.

Literatura citada

1. Manzanarez Jiménez LA, Ibarra Ceceña MG. Diagnóstico del uso y manejo de los residuos de aceite automotriz en el municipio del Fuerte, Sinaloa. *Ra Ximhai* 2012;8(2.):129-37.
2. Wu M, Dick WA, Li W, Wang XO, Yang Q, Wang T, et al. Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil. *Int Biodeterior Biodegradation* 2016;107:158-64. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.11.019>
3. Ley general del equilibrio ecológico y la protección al ambiente [en línea]. México: Cámara de Diputados H. Congreso de la Unión; 2017. [Acceso 20 de Sep 2018]. Disponible en: http://www.diputados.gob.mx/Leyes_Biblio/pdf/1_48_240117.pdf
4. Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMAR NAT/SSA1-2012, Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación. DOF Secretaria de Gobernación [en línea]. 2013. [Acceso 20 de May 2018]. Disponible en: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5313544&fecha=10/09/2013
5. Cavazos Arroyo J, Pérez Armendáriz B, Mauricio Gutiérrez A. Afectaciones y consecuencias de los derrames de hidrocarburos en suelos agrícolas de Acatzingo, Puebla, México. *Agric Soc Desarro* 2014;11(4):539-50. DOI: <http://dx.doi.org/10.22231/asyd.v11i4.16>
6. Rivera Ortiz P, Rivera Lárraga JE, Andrade Limas EC, Rodríguez LH, De la Garza Requena FR, Castro Meza BI. Bioestimulación y biorremediación de recortes de perforación contaminados con hidrocarburos. *Rev Int Contam Ambient* 2018;34(2):249-62. DOI: <http://dx.doi.org/10.20937/rica.2018.34.02.06>
7. 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-diésel. *Dyna* 2009;76 (160):83-93.
8. Riojas González HH, Gortáres Moroyoqui P, Mondaca Fernández I, Balderas Cortes JJ, Torres Bustillos LG. Evaluación de la biorremediación aplicando mezclas de surfactante-solvente en suelo contaminado con diesel. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales* 2010;6(2):100-9.
 9. Barrios Ziolo LF, Robayo Gómez J, Prieto Cada-vid S, Cardona Gallo SA. Biorremediación de suelos contaminados con aceites usados de motor. *Rev Cintex* 2015;20(1):69-96.
 10. Ferrera Cerrato R, Alarcón A, Mendoza López MR, Sangabriel W, Trejo Aguilar D, Cruz Sánchez JS, et al. Fitorremediación de un suelo contaminado con combustóleo usando *Phaseolus Coccineus* y fertilización orgánica e inorgánica. *Agrociencia* 2007;41(8):817-26.
 11. Sánchez Yáñez JM. 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. Consutenta, SA de CV Morelia, Mich. Mexico; 2007. p. 130-3, 136-8, 153-5.
 12. Effendi AJ, Kamath R, McMillen S, Sihota N, Zuo E, Sra K, et al. Strategies for Enhancing Bio-remediation for Hydrocarbon-Impacted Soils. In: Society of Petroleum Engineers International. Asia Pacific Health, Safety, Security, Environment and Social Responsibility Conference. Society of Petroleum Engineers 2017 [Internet]. Society of Petroleum Engineers. DOI: <http://www.dx.doi.org/10.1109/ITME.2015.163>
 13. Baltierra Trejo E, Silva Espino E, Márquez Benavides L, Sánchez Yáñez JM. Inducción de la degradación de lignina de paja de trigo en aromáticos por *Aspergillus* spp. y *Penicillium chrysogenum*. *J Selva Andina Res Soc* 2016;7(1):10-9.
 14. Félix Herrán JA, Sañudo Torres RR, Rojo Martínez GE, Martínez Ruiz R, Olalde Portugal V. Importancia de los abonos orgánicos. *Ra Ximhai* 2008;4(1):57-68.
 15. Prager Mósquera M, Sanclemente Reyes OE, Sánchez de Prager M, Miller Gallego J, Sánchez DIA. Abonos verdes: Tecnología para el manejo agroecológico de los cultivos. *Agroecología* 2012;7(1):53-62.
 16. Zand AD, Bidhendi GN, Mehrdadi N. Phytoremediation of total petroleum hydrocarbons (TPHs) using plant species in Iran. *Turk J Agric For* 2010;34(5):429-38. DOI: <http://www.dx.doi.org/10.3906/tar-0903-2>
 17. 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 Ambient* 2016;22(2):63-73.
 18. Solans M, Vobis G. Actinomycetes saprofitos asociados a la rizósfera y rizoplano de *Discaria trinervis*. *Ecol Austral* 2003;13(1):97-107.
 19. 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(1):65-72.
 20. Norma Oficial Mexicana. NMX-F-089-S-1978, Determinación de extracto etéreo (método soxhlet) en alimentos. foodstuff-determination of ether extract (soxhlet). Normas Mexicanas. DGN. Disponible en: https://www.colpos.mx/bancode_normas/nmexicanas/NMX-F-089-S-1978.pdf
 21. García Hernández D, Sosa Aguirre CR, Sánchez Yáñez JM. Biorremediación de agua domestica contaminada con aceite residual automotriz. *Ingeniería Hidráulica en México* 2007;22 (2):113-8. Disponible en: <https://scholar.google>.

- com.mx/scholar?cluster=11022505553255969615&hl=es&as_sdt=0,5
22. Riojas González HH, Gortáres Moroyoqui P, Mondaca Fernández I, Balderas Cortes JJ. Influencia de los surfactantes en la remediación de suelos contaminados con hidrocarburo. *Rev Fac Cien Básicas* 2016;7(1):94-115. DOI: <https://dx.doi.org/10.18359/rfcb.2066>
23. Jiménez Hernández V, Guerra Sánchez R. Obtención de un medio enriquecido para hacer más eficiente la biodisponibilidad de los hidrocarburos intemperizados en un suelo costero. *Rev Int Contam Ambient* 2016;32(4):413-24. DOI: <http://dx.doi.org/10.20937/RICA.2016.32.04.05>
24. Das N, Chandran P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnol Res Int* 2011;11:1-13. DOI: <http://dx.doi.org/10.4061/2011/941810>
25. Muskus Morales AM, Santoyo Muñoz C, Plata Quintero LS. Evaluación de las técnicas de atenuación natural, bioventing, bioaumentación y bioaumentación-bioventing, para la biodegradación de diésel en un suelo arenoso, en experimentos en columna. *Gest Ambient* 2013;16(2):83-94.
26. Martín GM, Rivera R. Mineralización del nitrógeno incorporado con los abonos verdes y su participación en la nutrición de cultivos de importancia económica. *CulTrop* 2004;25(3):89-96.
27. Yanque Huamaní L. Importancia de los abonos orgánicos en la agricultura. *Revista de Investigación Universitaria* 2014; 3(1). DOI: <https://dx.doi.org/10.17162/riu.v3i1.42>
28. Silvana Alvaro CE, Arocena LA, Martínez MÁ, Nudelman NES. Biodegradación aerobia de fracciones de hidrocarburos provenientes de la actividad petrolera en un suelo de la región Patagonia Norte, Argentina. *Rev Int Contam Ambient* 2017;33(2):247-57. DOI: <http://dx.doi.org/10.20937/rica.2017.33.02.06>
29. Maldonado Chávez E, Rivera Cruz MC, Izquierdo Reyes F, Palma López DJ. Efectos de rizosfera, microorganismos y fertilización en la biorremediación y fitorremediación de suelos con petróleo crudo nuevo e intemperizado. *Universidad y Ciencia* 2010;26(2):121-36.
30. Agamuthu P, Abioye OP, Aziz AA. Phytoremediation of soil contaminated with used lubricating oil using *Jatropha curcas*. *J Hazard Mater* 2010; 179(1-3):891-4. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.03.088>
31. Basumatary B, Saikia R, Bordoloi S. Phytoremediation of crude oil contaminated soil using nut grass, *Cyperus rotundus*. *J Environ Biol* 2012;33(5):891-6.
32. Armenta Bojórquez AD, García Gutiérrez C, Camacho Báez JR, Apodaca Sánchez MA, Gerardo Montoya L, Nava Pérez E. Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. *Ra Ximhai* 2010;6(1):51-6. DOI: <http://dx.doi.org/10.35197/rx.06.01.2010.07.aa>
33. Leitão AL. Potential of *Penicillium* species in the bioremediation field. *Int J Environ Res Public Health* 2009;6(4):1393-417. <https://dx.doi.org/10.3390/ijerph6041393>
34. Leitão AL, Enguita FJ. Gibberellins in *Penicillium* strains: challenges for endophyte-plant host interactions under salinity stress. *Microbiol Res* 2016;183:8-18. <https://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.004>