



Análisis de la dinámica de bioestimulación de un suelo contaminado por 75000 ppm de aceite residual automotriz

Dynamic analysis of biostimulation of soil polluted by 75000 ppm of waste motor oil

Hernández-Valencia Daniel Filomeno, Santoyo-Pizano Gustavo, Saucedo-Martínez Blanca Celeste, Ignacio De La Cruz Juan Luis, 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, microbiota, bioestimulación, *P. vulgaris*, *V. sativa* mineralización, pH, NOM-138, cromatografía gases.

J. Selva Andina Res. Soc.
2019; 10(1):25-36.

Historial del artículo.

Recibido septiembre, 2018.
Devuelto noviembre 2018
Aceptado enero, 2019.
Disponible en línea, febrero, 2019.

Editado por:
Selva Andina
Research Society

Key words:

Soil, WMO, microorganisms, biostimulation, mineral solution, *P. vulgaris*, *V. sativa*, vermicompost, NOM-138, gas chromatography.

Resumen

En suelo 75000 ppm de aceite residual automotriz (ARA), que es una mezcla de hidrocarburos (HICO) que acorde con la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012 (NOM-138), sobrepasa el límite máximo permisible de 4400 ppm, que impide la mineralización de la materia orgánica y le causa pérdida de fertilidad. Una alternativa de solución para este problema en suelo es la bioestimulación (BIS) con un detergente (DEGE) que emulsifique el ARA, en secuencia un solución mineral (SOMI) rica en nutrientes esenciales, seguida de *Phaseolus vulgaris* y *Vicia sativa* potenciados con *Micromonospora echinospora* y *Penicillium chrysogenum* como abono verde (AVE) y lombricomposta (LOCO) que asegura una efectiva y continua mineralización del ARA. El objetivo de esta investigación fue analizar la BIS de un suelo contaminado por 75000 ppm de ARA hasta un valor inferior al máximo permisible por la NOM-138. En ese sentido a la par de la BIS se cuantificó la microbiota de la mineralización del ARA y por cromatografía de gases se determinó ARA la concentración inicial y final en el suelo, los datos numéricos se analizaron por ANOVA/Tukey. Los resultados indicaron que la BIS del suelo impactado por 75000 ppm de ARA, lo disminuyó hasta 1532 ppm, lo que demostró que la compleja de HICO del ARA fue necesario un DEGE, una SOMI, *P. vulgaris* y LOCO que con compuestos orgánicos e inorgánicos de NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} y K_2O , que indujeron a la microbiota a oxidar el ARA, avalado por el incremento de la población involucrada que causo cambios en el pH y la cromatografía de gases que probo la desaparición de los alifáticos y aromáticos a un valor de 1532 ppm, inferior al máximo aceptado por la NOM-138. Se concluye que la BIS fue útil para remediar el suelo impactado por una relativa alta concentración de ARA.

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

Abstract

Soil polluting by 75000 ppm of waste motor oil (WMO) is a mixture of hydrocarbons (HICO) aliphatic and aromatics, is a concentration which according to NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012 (NOM-138), exceeds the maximum value permissible of 4400 ppm, this high WMO concentration is inhibin organic matter mineralization and causing soil's fertility. An alternative solution is biostimulation (BIS) of soil polluted by 75000 ppm of WMO, with a detergent (DEGE) that emulsified the WMO, then a mineral solution (MISO), following *Phaseolus vulgaris* and *Vicia sativa* powered by *Micromonospora echinospora* and *Penicillium chrysogenum*, after 25 days of growing both plants were incorporated and degraded as green manure (GEMA) and vermicompost (VERMI) for an effective mineralization of WMO. The objective of this research was to analyze the dynamics of the BIS of soil polluted by 75000 ppm of WMO to lower value than the maximum allowed by the NOM-138. In that sense during the BIS, microbial population involved in WMO`oxidation, was counted and by gas chromatography WMO`s concentration at the beginning and end of the assay was determined. Experimental data were analyzed by ANOVA/Tukey. The results indicated that the BIS of the soil impacted by 75000 ppm of WMO decreased it to 1532 ppm, which supports that the biostimulation of the soil with a DEGE, the MISO, GEMA and VERMI enriched it with NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} and K_2O , to induce aerobic heterotrophic microbiota to oxidize the WMO, which was demonstrated by increasing soil's microbial population, pH variation and gas chromatography by disappearance of some aliphatic and aromatics compound of WMO. It is concluded that BIS was worth processing to recover soil impacted by a relatively high concentration of WMO.

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

Introducción

El aceite residual automotriz (ARA), una mezcla de hidrocarburos (HICO) alifáticos, aromáticos y trazas de metales pesados,^{1,2} que de acuerdo con la Ley General de Equilibrio Ecológico y Protección Ambiental (LGEEPA) se considera residuo peligroso para el ambiente.³ El ARA derramado en suelo forma una capa impermeable, bloqueando la difusión de O₂ (oxígeno) y agua,⁴ causando un desequilibrio en la relación C:N (carbono/nitrógeno), que inhibe la actividad de la microbiota heterotrófica aerobia autóctona (MHAA) que oxida la materia orgánica (MO), y como consecuencia reduce la productividad agrícola.^{5,6} Al respecto la NOM-138-SEMARNAT/SSA-2012,⁷ establece un límite máximo permisible de 4400 ppm de HICO, fraccionada en: 200 fracción ligera, 1200 mediana 1200 y 3000 ppm pesada. Un valor superior a 4400 ppm en suelo, esta ley, recomienda la aplicación de métodos químicos: O₃ (ozono), H₂O₂ (peróxido de hidrogeno), Cl (cloro) y ClO₂ (dióxido de cloro), que causan a su vez un daño colateral y elevado costo. Una alternativa ecológica a esta problemática que disminuya la concentración del ARA a concentración menor a la máxima aceptada por la NOM-138, la bioestimulación (BIS) del suelo impactado por ARA mediante un detergente (DEGE) que lo emulsifica,⁸ seguida de H₂O₂ o fuente de O₂ (oxígeno) para acelerar su oxidación⁹ con enriquecimiento de una solución mineral (SOMI) a base de sales de NH₄⁺, NO₃⁻ y PO₄⁻³ que equilibrarían el desbalance de la relación C:N por el exceso de ARA e inducen a la microbiota a su oxidación,^{10,11} a continuación una BIS que mantenga la mineralización de la mezcla de HICO mediante una lombricomposta (LOCO) que incorporen compuestos orgánicos de N como la urea, aminoácidos, entre otros, y de MO almidón y glucosa que favore

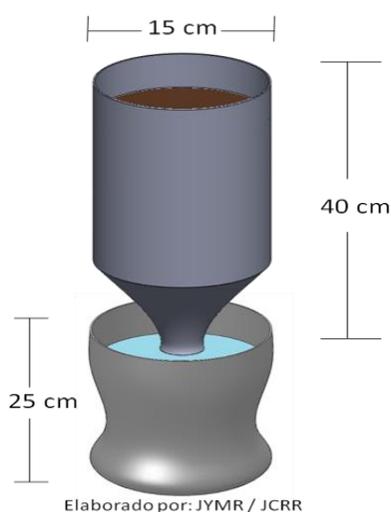
cen por cometabolismo a la oxidación del ARA.¹² Posteriormente en el suelo la BIS mediante la siembra de *Phaseolus vulgaris* (frijol) y de *Vicia sativa* (janamargo) en estadio de plántula, se incorpora como abono verde (AVE) que se degradan para generar aminoácidos, nucleótidos y urea, al igual que azúcares sencillos como glucosa, para mantener el cometabolismo de compuestos aromáticos policíclicos del ARA.^{3,13,14} En suelo impactado por este ARA una manera de facilitar la siembra de *P. vulgaris* y *V. sativa* es potenciarlo con *Micromonospora echinospora* y/o *Penicillium chrysogenum* para minimizar al estrés causado por la fitotoxicidad del ARA, principalmente porque ambos microorganismos oxidan los componentes aromáticos del ARA.^{15,16} Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue analizar la dinámica de BIS de un suelo impactado por 75000 ppm de ARA, y reducirlo a un valor inferior al máximo permisible 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 (IIQB) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), las condiciones micro climáticas promedio fueron: temperatura de 23.2 °C, luminosidad de 450 μmol m⁻¹s⁻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' 41.99" de longitud oeste, con una altitud de 2013 msnm, de clima templado de una zona agrícola denominada "Uruapilla" del municipio de Morelia, Mich., en la carretera Morelia-Pátzcuaro, Mich,

México. Las propiedades fisicoquímicas principales del suelo considerado fueron: MO, textura, pH, densidad, de acuerdo a la norma oficial mexicana NOM-021-RECNAT-2000.¹⁷ El suelo se solarizó por 48 h para minimizar el problema de plagas y enfermedades, se tamizó con una malla del No. 20 y después se contaminó con 75000 ppm de ARA, proveniente de un taller mecánico automotriz de la ciudad de Morelia, Mich, diluido con el DEGE comercial “La Corona®” al 0.5% (p/v).^{8,18}

Figura 1 Jarra de Leonard²⁶



Posteriormente 1.0 Kg de suelo se colocó en el contenedor superior de la Jarra de Leonard figura 1, en tanto que la SOMI o agua en el reservorio de la inferior, ambas partes se conectaron por una tira de algodón de 35 cm para facilitar el movimiento de los líquidos por capilaridad. La tabla 1 detalla el diseño experimental con 7 tratamientos y 6 repeticiones, se establecieron 3 controles: i) suelo sin ARA irrigado solo con agua o control absoluto (CA), ii) suelo sin el ARA alimentado con SOMI o control relativo (CR), iii) suelo impactado por el ARA o control negativo (CN) y iv) suelo impactado con el ARA bioestimulado en secuencia con la SOMI, cuya composición química fue g/L: NH_4NO_3 10, K_2HPO_4 2.5, KH_2PO_4 2.0, MgSO_4 0.5, NaCl 0.1, CaCl_2 0.1, FeSO_4 y 1.0 mL/L de una solución de microelementos con la siguiente composición mineral 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. Para la BIS mediante la SOMI se aplicaron 18 mL/Kg/3días/mes, mientras que para la BIS que complementariamente facilito la oxidación del ARA se aplicó la LOCO al 3% (p/p) por 30 días¹² luego se sembraron las semillas de *P. vulgaris* y *V. sativa* (proporcionadas por la Secretaría de Agricultura Ganadería y Recursos Hidráulicos, del Gobierno de México).

Tabla 1 Diseño experimental para la bioestimulación en suelo contaminado por 75000 ppm de aceite residual automotriz

Suelo*	Aceite residual automotriz	Detergente al 0.5%	Solución mineral	Lombricomposta al 3%	Abono verde
Control absoluto (irrigado con agua)	-	-	-	-	-
Control Negativo (CN)	+	-	-	-	-
Control Relativo (CR)	-	+	+	-	-
Bioestimulación (BIS)	+	+	+	+	+

*n = 6, abono verde: *P. vulgaris*/*V. sativa*; (+) = agregado, (-) = no agregado

Estas semillas se potenciaron con *P. chrysogenum*/*M. echinospora* pertenecientes a la colección

del Laboratorio de Microbiología Ambiental del IIQB de la UMSNH cultivadas en agar hueso de

aguacate (AHA)¹⁹ g/L: hueso de aguacate 10, peptona caseína 5, extracto de levadura 1.3, K₂HPO₄ 0.17, KH₂PO₄ 2.61, MgSO₄ 1.5, NaCl 0.9, CuSO₄ 0.05, azul de bromotimol 10 ppm, detergente al 10 % 2.5 mL/L, solución de oligoelementos 1 mL/L, agar 18.0 g, pH ajustado a 6.5 el medio de cultivo se incubó 30 °C/48 h, entonces por cada 20 semillas de ambas leguminosas se inocularon con 1.0 mL en relación 1:1 de *P. chrysogenum* y *M. echinospora*, a una densidad de 1.5x10⁸ UFP/mL obtenida por cuenta viable en placa (CVP), entonces las semillas de *P. vulgaris/V. sativa* se sembraron en el suelo impactado por ARA dejándose crecer hasta plántula o 25 días después la siembra, luego incorporarse como AVE, con un tiempo mineralización de un mes²⁰ durante esta etapa de BIS se aplicó 1.0 mL de H₂O₂ de una solución al 3% (v/v)/sema na/mes. En tanto se cuantificó la densidad de MHAA oxidante de ARA por cuenta viable en placa (CVP), para ello se tomó 1.0 g de suelo en 9.0 mL de NaCl 0.85 % que se diluyó de 10⁻¹ a 10⁻⁹, de ahí 0.2 mL se sembró en agar ARA o (AARA) con la siguiente composición g/L: peptona de caseína 5.0, extracto de levadura 1.0, H₂PO₄ 2.5, HPO₄ MgSO₄ 2.5, NaCl 1.0, solución de oligoelementos 1.0 mL, azul de bromotimol al 0.01%, 5.0 mL, agar 18.0, ARA emulsificador con DEGE con 4 mL/100 mL, este medio de cultivo se ajustó a pH 6.8 para las bacterias, a 7.5 para los actinomicetos y 6.0 para los hongos, las cajas se incubaron a 30 °C/48 h, este procedimiento se realizó por triplicado.^{1,21} Mientras, la humedad del suelo durante la BIS se conservó al 80% de capacidad de campo. Al final de la BIS se determinó la concentración de ARA por método de Soxhlet (NMX-F-089-S-1978).²² En tanto en el suelo asegurar la mineralización del ARA en la fase final de la BIS, el pH derivado de la actividad microbiana se mantuvo a valores entre 6.5 a 6.7 con 1

g de Na₂CO₃/500 g de suelo seco.²³ En una segunda fase, en el suelo al inicio y final de la BIS en secuencia, se realizó el análisis cuali-cuantitativo del ARA, para ello 3 g del suelo por triplicado se conservaron a 4 °C, se secaron a 28 °C/48 h, se homogenizo, cada muestra colocándose en tubos con tapón rosca, se adicionaron 3.0 mL de hexano (pureza 98.5 %, ACS-Sigma Aldrich grado HPLC), se agitaron por 60 s en Vortex Genie II, se filtró 3 veces en un embudo de separación, se pasó por un filtro de algodón 0.5 cm y 1 g de MgSO₄ (sulfato de magnesio), luego se evaporó el solvente a 28 °C/24 h, se aforó cada muestra a 1.0 mL para el análisis por cromatógrafo de gases Agilent Technologies serie 7890A, acoplado a masas serie 5975C, ahí se inyectó 1.0 µL de muestra modo Splitless con el helio (99.995 % pureza) como gas acarreador en una columna capilar Zebron-5MS de 30 cm de longitud, con diámetro interno de 0.25 mm y espesor de película de 0.25 mm. La temperatura del inyector fue de 250 °C y la inicial del horno 50 °C con rampa de 30-150 °C, rampa 2 de 10 °C por min hasta 310 °C por 2 min. El detector de temperatura fue de 280 °C con tiempo de equilibrio de 3 min y una temperatura máxima de 320 °C.²⁴ Los resultados se validaron con ANOVA/Tukey HSD P<0.05% con el programa estadístico Statgraphics Centurión.²⁵

Resultados

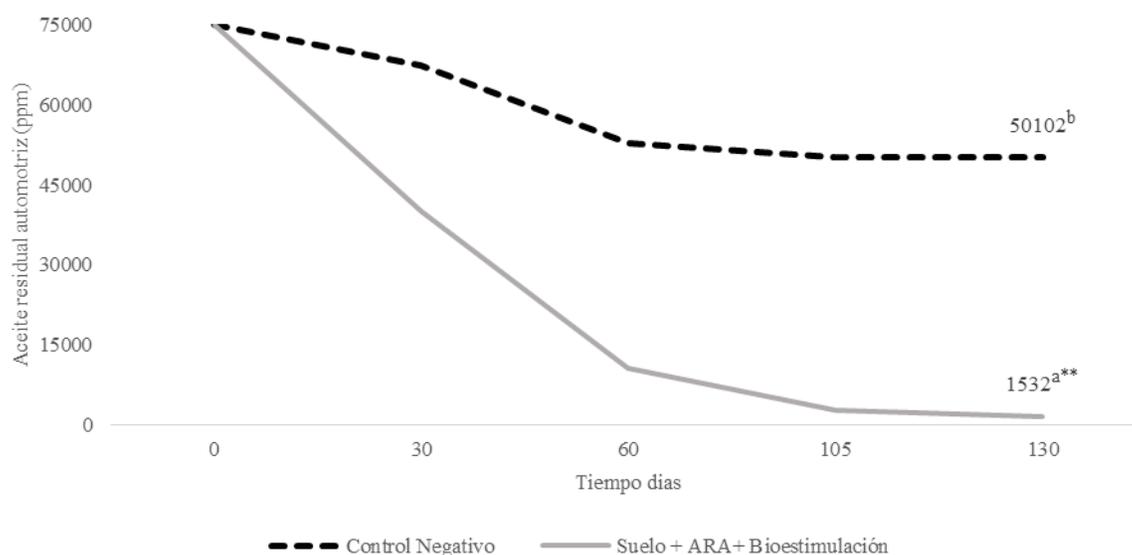
En la tabla 2 señala las propiedades fisicoquímicas del suelo previo a la contaminación por el ARA a pH de 6.64 ligeramente ácido, con una concentración de MO de 4.57% o una moderada cantidad de carbono orgánico, de textura clasificada como franco-arcillosa-arenosa o: arcilla 22.16%, limo 37.28% y arena 40.56%.

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas del suelo sin aceite residual automotriz

Parámetro	Valor
pH	6.64
Material orgánica (%)	4.57
Capacidad de intercambio catiónico (Cmol(+) Kg ⁻¹)	4.61
Textura* (%)	40.56(Ac)-37.28(L)-22.16(Ar)
	Franco-arcillo-arenoso
Densidad real (g/cm ³)	2.01
Densidad aparente (g/cm ³)	1.08
Porosidad (%)	46.35
Saturación de humedad (%)	46.95
Capacidad de campo (%)	30.08
Humedad aprovechable (%)	13.25

Ar: arena, L: limo, Ac: arcilla / NOM-021-RECNAT-2000.

Figura 2 En suelo dinámica del decremento de la concentración de aceite residual automotriz por la bioestimulación por acciones en secuencia por 130 días



*Suelo bioestimulado con detergente, solución mineral, lombricomposta 3%, *P. vulgaris* y *V. sativa* u abono verde, H₂O₂ 0.5%.

**Letras distintas indican diferencia estadística según 0.5% ANNOVA-Tukey

En la figura 2, se describe la BIS en secuencia múltiple de un suelo impactado por 75000 ppm de ARA, mediante un DEGE, una SOMI, a una humedad del 80% de la capacidad de campo, la integración estas acciones de BIS decrecieron el ARA original hasta 39925 ppm en 30 días, seguida de la BIS con la LOCO que ahora lo redujo a 10697 ppm en 30 días, mientras que la BIS del suelo mediante la

siembra de las semillas de *P. vulgaris* y de *V. sativa* potenciadas con *M. echinospora* y *P. chrysogenum*, ambas leguminosas al nivel de plántula se incorporaron como AVE, con lo que el ARA se decreció hasta 2752 ppm en 55 días, en consideración a que la BIS es una proceso aeróbico la adición de H₂O₂, lo disminuyo hasta 1532 ppm, valor numérico estadísticamente diferente comparado con los 50102

ppm en el suelo impactado por ARA sin bioestimular o CN, cuya concentración fue inferior a la má-

ximo aceptado por la NOM-138.

Tabla 3 En suelo densidad de la población microbiana oxidante aceite residual automotriz durante la fase final de bioestimulación en secuencia múltiple

Unidades Formadoras de Colonias por 10 ⁶ /g de suelo seco*		Bioestimulación en secuencia múltiple**	8.68 ^{a**}
		Bacterias	Control negativo
Unidades Formadoras de Propágulos por 10 ⁶ /g de suelo seco	Hongos	Bioestimulación en secuencia múltiple	7.11 ^b
	Actinomicetos	Control negativo	4.04 ^c
Bioestimulación en secuencia múltiple		7.33 ^b	
Control negativo		3.15 ^c	

n* = 3, control negativo = suelo + 75000 ppm de ARA + agua, suelo**= 75000 ppm de ARA bioestimulado con detergente, solución mineral, lombricomposta, *P. vulgaris/V. sativa* o abono verde + H₂O₂.¹ **Letras distintas indican diferencia estadística 0.5% ANNOVA-Tukey.

En la tabla 3, se presenta la BIS en secuencia de un suelo impactado por ARA, la densidad bacteriana heterotrófica aerobia oxidante de ARA registró 8.68x10⁶ UFC/g de suelo seco, valor numérico estadísticamente diferente comparado con la densidad bacteriana de 6.48x10⁶ UFC/g del suelo seco impactado por ARA sin BIS o CN, mientras que de los hongos oxidantes de ARA se registró una densidad de 7.11x10⁶ UFP/g de suelo seco, valor numérico estadísticamente diferente comparado con la densidad de los hongos de 4.04x10⁶ UFP/g en el suelo sin BIS, impactado por ARA o CN. En relación a los actinomicetos se detectaron 7.33x10⁶ UFP/g valor numérico estadísticamente distinto a la densidad de

los actinomicetos de 3.15 x10⁶ UFP/g suelo seco en el impactado por ARA, sin BIS o CN.

En la tabla 4, se detalla la dinámica del pH durante la BIS secuencia del suelo impactado por 2752 ppm de ARA. Ahí se registró una disminución del pH desde 6.8 en el día cero hasta a 4.70 en el día 105, la caída de pH o acidificación del suelo inhibió la mineralización del ARA, por lo que se neutralizo con Na₂CO₃ cada 5 días, para restaurar y mantener el valor original de 6.64, comparado con el suelo impactado por ARA sin BIS o CN, ahí se registró una mínima variación de 6.7 en el día cero hasta 6.51 al día 130.

Tabla 4 En suelo impactado por 2750 ppm de aceite residual automotriz, dinámica de la pH durante la bioestimulación en secuencia múltiple a los 105 días del ensayo

Control de pH en suelo	Tiempo (días)							
	0	30	60	90	105	120	125	130
	Valores							
Sin ARA (CA)	6.60 ^a	6.63 ^a	6.62 ^a	6.60 ^a	6.64 ^a	6.67 ^a	6.65 ^a	6.70 ^a
Impactado con 50102 ppm de ARA (CN)	6.7 ^a	6.66 ^a	6.64 ^a	6.62 ^a	6.62 ^a	6.40 ^a	6.45 ^a	6.51 ^{ab}
Contaminado por 2752 ppm de ARA remanente de la BIS	6.8 ^a	6.5 ^a	6.3 ^a	5.8 ^b	4.70 ^b	4.95 ^b	5.35 ^b	6.53 ^{ab}

La figura 3 describe el perfil cromatográfico al inicio de la BIS en suelo contaminado por 75000 ppm de ARA, los picos de elución tuvieron tiempos que señalan compuestos de la fracción alifática, algunos con 12 a 35 carbonos que indicaron la existencia de dodecano, tetradecano, octadecano y eicosano. Además se detectaron alifáticos ramificados como: el pristano y el fitano, así como aromáticos del tipo: benceno, fenol, benzoantraceno, metildifenilo y naftaleno.

La figura 4 describe el perfil cromatográfico del ARA después de la BIS en secuencia múltiple del suelo, ahí se observó un evidente decremento de la fracción alifática lineal y ramificada, y menor de la aromática dada la estabilidad química que tiene es la recalcitrante.

Discusión

La figura 1 describe la dinámica de la BIS en secuencia múltiple en el suelo impactado por 75000 ppm de ARA mediante un DEGE al 0.5% que al emulsificar y solubilizar el ARA en el agua indujo una relativa y rápida mineralización¹⁸ pues la BIS mediante SOMI enriqueció el suelo con sales de NH_4NO_3 , para balancear la relación C:N, apoyado por K_2HPO_4 , KH_2PO_4 que estimularon a los MHAA a la oxidación del ARA, por ello fue indispensable ajustar la humedad del suelo al 80% de la capacidad de campo, lo que facilitó el intercambio de agua y O_2 para rápida oxidación del ARA.^{27,11} Complementariamente se realizó la BIS con la LOCO al 3%, que aportó compuestos como urea, nucleótidos, además de NH_4 , PO_4^{3-} , y MO sencilla: almidón y glucosa que favorecieron el cometabolismo de los HICO del ARA por MHAA.¹² Además la BIS mediante *P. vulgaris* y *V. sativa* o AVE potenciados con *M. echinospora* y *P. chrysogenum*, luego de ser

incorporados al suelo, la degradación de este material vegetal aportaron compuestos nitrogenados como: péptidos, aminoácidos, y urea, los que al mantener la relación C:N aseguraron la constante la mineralización del ARA, mientras que los compuestos de C sencillos, producto de la degradación del AVE como: la celobiosa, la glucosa mantuvieron la actividad de MHAA para el cometabolismo del ARA.¹³ Así, la BIS en secuencia múltiple redujo la concentración del ARA a un valor inferior al máximo aceptado por la NOM-138, en contraste con el suelo impactado por ARA sin BIS o C:N, que registró una mínima disminución de la mezcla por la atenuación natural por el exceso de C que desequilibró la relación C:N lo que evitó la oxidación.^{3,28}

La tabla 3 detalla la BIS, la secuencia múltiple del suelo impactado por ARA, por el enriquecimiento de compuestos orgánicos e inorgánicos de N, P y K se indujeron incrementos en las diferentes poblaciones que oxidan el ARA, mientras que en el suelo referido como C:N, se manifestó que no hubo cambio en la densidad de la población microbiana, como consecuencia del desbalance nutricional, la pobre difusión de gases como el O_2 y mínima disposición del H_2O que inhibió la actividad de esta población microbiana oxidante del ARA.²⁸⁻³⁰

En la tabla 4, durante la dinámica de BIS en suelo con ARA, se registró una acidificación del pH por la oxidación parcial del ARA, cuando se generaron ácidos carboxílicos: cítrico, málico, succínico, acético, butírico, entre otros, dada la diversidad genética y bioquímica de actinomicetos, bacterias y hongos, primero durante la oxidación de la MO vegetal por incorporación de *P. vulgaris* y *V. sativa* como AVE,³¹ que inhibió la actividad MHAA oxidante del ARA, puesto que al neutralizar y mantener el pH entre 6.4 y 6.9 se observó una recuperación de la mineralización, lo que redujo la concentración del ARA.³²

La figura 3 describe el perfil cromatográfico del suelo contaminado por 75000 ppm de ARA antes de la BIS, detallándose los principales componentes del ARA³³ los picos que indican la existencia de HICO alifáticos lineales, ramificados y aromáticos, lo que señala porque fue necesaria la remediación del suelo mediante una BIS en secuencia múltiple para decrecer el ARA.³⁴

En la Figura 4, presenta el perfil cromatográfico en suelo con 1532 ppm de ARA remanente de la BIS en secuencia múltiple después de 130 días, registrándose la ausencia de algunos componentes alifáticos de cadena larga como: el dodecano, el tetracosano, el heptacosano, el nonadecano y el eicosano en relación al cromatograma original al iniciar la BIS. Así como la ausencia de algunos aromáticos como: benceno, tolueno, xileno, benzoantraceno, naftaleno que son tóxicos y recalcitrantes en el ambiente, lo que indicaría que solo mediante acciones químico biológicas complejas como la BIS múltiple es factible eliminarlas.³²

Se concluye que de acuerdo a la complejidad de los componentes del ARA y la heterogeneidad del suelo fue necesaria la BIS del suelo mediante compuestos orgánicos, inorgánicos apoyados por otras acciones como el ajuste de la capacidad de campo y la regulación del pH durante la BIS, reducir drásticamente y un tiempo relativamente corto la concentración ARA desde 75000 ppm hasta 1532, valor inferior al límite máximo aceptado por la NOM-138 para manifestar que el suelo fue remediado.

Conflictos de intereses

Los participantes en esta investigación declaramos que no existe ningún problema en relación con la información aquí divulgada con las insti-

tuciones participantes así como quienes la financiaron total o parcialmente.

Agradecimientos

A la CIC-UMSNH proyecto 2.7 (2019), BIO NUTRA S.A de C.V, Maravatío y al Laboratorio de Edafología de la Facultad de Biología de la UMSNH, 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. Abioye OP, Agamuthu P, Abdul Aziz AR. Biodegradation of used motor oil in soil using organic waste amendments. *Biotechnol Res Int* 2012; ID 587041:1-8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/587041>
2. 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 May 2018]. Disponible en: http://www.diputados.gob.mx/Leyes_Biblio/pdf/148_240117.pdf
3. Romaniuk R, Brandt JF, Rios PR, Giuffré L. Atenuación natural y remediación inducida en suelos contaminados con hidrocarburos. *Cienc Suelo* 2007;25(2):139-49.
4. Benavides López de Mesa JL, Quintero G, Guevara Vizcaíno AL, Jaimes Cáceres DC, Gutiérrez Riaño SM, Miranda García J. Biorremediación de

- suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova* 2006;4(5):82-90.
5. Zamora A, Ramos J, Arias M. Efecto de la contaminación por hidrocarburos sobre algunas propiedades químicas y microbiológicas de un suelo de sabana. *Bioagro* 2012;24(1):5-12.
 6. Ferreira do Nascimento TC, Santos Oliveira FJ, Pessoa De França F. Biorremediación de un suelo tropical contaminado con residuos aceitosos intemperizados. *Rev Int Com Ambient* 2013;29(1): 21-8.
 7. 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
 8. Saucedo Martinez BC, Farías Rodríguez R, Santoyo Pizano G, Sánchez Yáñez JM. Bioestimulación integral de un suelo contaminado por 60000 ppm de aceite residual automotriz. *J Selva Andina Res Soc* 2016;8(2):91-103.
 9. Effendi AJ, Kamath R, McMillen S, Sihota N, Zuo E, Sra K, et al. Strategies for Enhancing Bioremediation 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>
 10. Pinto Mariano A, de Arruda Geraldés Katao ka AP, de Franceschi de Angelis D, Marcos Bonoto D. Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station. *Braz J Microbiol* 2007;38(2):346-53, DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822007000200030>
 11. García E, Roldán F, Garzón L. Evaluation of biostimulation (nutrients) in hydrocarbons contaminated soils by respirometry. *Acta Biol Colomb* 2011;16(1):195-208.
 12. Olivares Campos MA, Hernández Rodríguez A, Vences Contreras C, Jáquez Balderrama JL, Ojeda Barrios D. Lombricomposta y composta de estiércol de ganado vacuno lechero como fertilizantes y mejoradores de suelo. *Universidad y Ciencia* 2012;28(1):27-37.
 13. 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):57-67.
 14. Hernández Rodríguez OA, Ojeda Barrios DL, López Díaz JC, Arras Vota AM. Abonos orgánicos y su efecto en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo. *Tecnociencia Chihuahua* 2010;4(1):1-6.
 15. De Vasconcellos SP, Angolini CFF, García INS, Dellagnezze BM, da Silva CC, Marsaioli AJ, et al. Screening for hydrocarbon biodegraders in a metagenomic clone library derived from Brazilian petroleum reservoirs. *Org Geochem* 2010; 41(7):675-81. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.orggeochem.2010.03.014>
 16. Ameen F, Moslem M, Hadi S, Al-Sabri AE. Biodegradation of diesel fuel hydrocarbons by mangrove fungi from Red Sea Coast of Saudi Arabia. *Saudi J Biol Sci* 2016;23(2):211-8. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.04.005>
 17. Norma oficial mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis. *México. DOF Secretaria de Gobernación* [en línea]. 2013. [Acceso 20 de May 2018]. Disponible en: http://diariooficial.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=717582&fecha=31/12/2002

18. Chong ZY, Liao XY, Yan XL, Sun L, Zhao D, Liang T. Enhanced desorption of PAHs from manufactured gas plant soils using different types of surfactants. *Pedosphere* 2014;24(2):209-19. DOI: [https://dx.doi.org/10.1016/S10020160\(14\)60007-2](https://dx.doi.org/10.1016/S10020160(14)60007-2)
19. 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.
20. Lacasta C, Maire N, Meco Murillo R. El abono verde, un manejo controvertido en los cultivos herbáceos de secano. *La Fertilidad de la Tierra* 2003;(14):1-8.
21. Bahadure S, Kalia R, Chavan YR. Comparative study of bioremediation of hydrocarbon fuels. *Int J Biotechnol Bioeng Res* 2013;4(7):677-86.
22. 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/banco-denormas/nmexicanas/NMX-F-089-S-1978.pdf>
23. Ramos Vásquez E, Zúñiga Dávila D. Efecto de la humedad, temperatura y pH del suelo en la actividad microbiana a nivel de laboratorio. *Ecol Apl* 2008;7(1-2):123-30.
24. Peng S, Zhou Q, Cai Z, Zhang Z. Phytoremediation of petroleum contaminated soils by *Mirabilis Jalapa* L. in a greenhouse plot experiment. *J Hazard Mater* 2009;168(2-3):1490-6. DOI: <http://www.dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.036>
25. Walpole ER, Myers RH, Myers SL. Probabilidad y Estadística para Ingeniería y Ciencias [Internet]. Naucalpan de Juárez; 2007- Recuperado a partir de: <http://librosenpdf.org/libro-pdf-probabilidad-y-estadistica/>
26. García González MM, Farías Rodríguez R, Peña Cabrales JJ, Sánchez-Yáñez JM. Inoculación del trigo var. Pavón con *Azospirillum* spp. y *Azotobacter beijerinckii*. *Terra Latinoam* 2005; 23(1):65-72.
27. Vallejo V, Salgado L, Roldan F. Evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de TPHs en suelos contaminados con petróleo. *Rev Colomb Biotechnol* 2005;7(2):67-78. DOI: <https://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.biote>
28. 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.
29. Tang JC, Wang RG, Niu XW, Wang M, Chu HR, Zhou QX. Characterization of the rhizoremediation of petroleum-contaminated soil: effect of different influencing factors. *Biogeosciences* 2010; 7(12):3961-9. DOI: <https://dx.doi.org/10.5194/bg-7-3961-2010>
30. Wang ZY, Xu Y, Wang HY, Zhao J, Gao DM, Li FM, et al. Biodegradation of crude oil in contaminated soils by free and immobilized microorganisms. *Pedosphere*. 2012;22(5):717-25. DOI: [https://dx.doi.org/10.1016/S1002-0160\(12\)60057-5](https://dx.doi.org/10.1016/S1002-0160(12)60057-5)
31. Rivera MC, Ferrera R, Volke V, Rodríguez R, Fernández L. 2002. Adaptación y selección de microorganismos autóctonos en medios de cultivos enriquecidos con petróleo crudo. *Terra Latinoam* 2002;20(4):423-34.
32. Gómez Romero SE, Gutierrez Bustos DC, Hernández Martín AM, Hernández Rodríguez CZ, Losada Casallas M, Mantilla Vargas PC. Factores bióticos y abióticos que condicionan la bioremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos. *Nova* 2008;6(9):101-12.

-
33. Sharifi M, Sadeghi Y, Akbarpour M. Germination and growth of six plant species on contaminated soil with spent oil. *Int J Environ Sci Technol* 2007;4(4):463-70. DOI: <https://dx.doi.org/10.1007/BF03325982>.
34. Banks MK, Kulakow P, Schwab AP, Chen Z, Rathbone K. Degradation of crude oil in the rhizosphere of *Sorghum bicolor*. *Int J Phytorem* 2003;5(3):225-34. DOI: <https://dx.doi.org/10.1080/0713779222>
-