

Phytoremediation of soil contaminated with 35,000 ppm of waste motor oil

Fitorremediación de suelo contaminado con 35,000 ppm de aceite residual automotriz

Iván Balderas-León; Nabanita Dasgupta-Schubert; Juan Manuel Sánchez-Yáñez*

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Francisco J. Mujica s/n, col. Felicitas del Rio, Morelia, Michoacán, C.P. 58000, MÉXICO.

Correo-e: syanez@umich.mx (*Autor para correspondencia).

Abstract

Soil contaminated with 35,000 ppm of waste motor oil (WMO) is a relatively high concentration according to the Mexican standard NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2003. WMO is toxic to microbial life and plants, although some of the latter have oil tolerance and degradation mechanisms in their roots, enhanced by plant growth promoting bacteria (PGPR). The aim of this study was to perform phytoremediation using *Sorghum vulgare* inoculated with *Bacillus cereus* and *Burkholderia cepacia* of soil contaminated with 35,000 ppm of WMO. The results showed that WMO-damaged soil did not inhibit germination of *S. vulgare* seed. At seedling stage, WMO was phytotoxic, but at flowering *S. vulgare* with *B. cereus* and *B. cepacia* tolerated phytotoxicity and reduced it to 800 ppm after 90 days, a value below the maximum allowable by NOM-138. This suggests that the physiological ability of *S. vulgare* and the plant growth promoting activity and WMO-oxidizing action of PGPB enhanced phytoremediation of this soil.

Keywords: hydrocarbons, mineralization, phytotolerance, rhizobacteria, *Sorghum vulgare*.

Resumen

El suelo contaminado con 35,000 ppm de aceite residual automotriz (ARA) es una concentración relativamente alta acorde con la norma mexicana: NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2003 (NOM-138). El ARA es tóxico para la vida microbiana y las plantas; aunque algunas en sus raíces poseen mecanismos de tolerancia y degradación para este aceite, potenciados por bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV). El objetivo de este trabajo fue realizar fitorremediación utilizando *Sorghum vulgare* inoculado con *Bacillus cereus* y *Burkholderia cepacia* de suelo contaminado con 35,000 ppm de ARA. Los resultados mostraron que en suelo dañado con este aceite no inhibió la germinación de la semilla de *S. vulgare*. En plántula el ARA fue fitotóxico, pero a floración, *S. vulgare* con *B. cereus* y *B. cepacia* toleró la fitotoxicidad y lo redujo a 800 ppm luego de 90 días; valor inferior al máximo permisible por la NOM-138. Lo anterior sugiere que la capacidad fisiológica de *S. vulgare*, la promoción de crecimiento vegetal y oxidante de ARA de las BPCV, potenciaron la fitorremediación de ese suelo.

Palabras clave: hidrocarburos, mineralización, fitotolerancia, rizobacterias, *Sorghum vulgare*.



Introduction

Waste motor oil (WMO) is generated by the lubrication cycle of motor vehicles and industrial machinery; it is a mixture of aliphatic and aromatic hydrocarbons (HCs), along with traces of heavy metals (Sharifi, Sadeghi, & Akbarpour, 2007; Diab, 2008). In soil this oil forms a hydrophobic film that reduces its fertility (Dominguez-Rosado & Pichtel, 2004), inhibits the mineralization of organic matter, and prevents gas exchange with the atmosphere and the diffusion of water and oxygen (Efe & Okpali, 2012; Ogbo, 2009). It has an adverse effect on both plant and microbial life, resulting in a drastic decline in agricultural production (Dominguez-Rosado & Pichtel, 2004; Zand, Bidhendi, & Mehrdadi, 2010). Soil contaminated with 35,000 ppm of WMO is a relatively high concentration of HCs, according to Mexican standard NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2003 (NOM-138), which establishes the maximum permissible limits for the HC fraction: light from 200 ppm, medium from 1,200 ppm and heavy from 3,000 ppm.

There are numerous reports on phytoremediation of soil contaminated with HC mixtures such as WMO, which used unsuitable plants, without enhancing with plant growth promoting bacteria (PGPR). As noted by Shirdam, Zand, Bidhendi and Mehrdadi (2008), who analyzed phytoremediation with *S. vulgare* of soil contaminated with 40,000 ppm of petroleum, 90 days after treatment up to 9,500 ppm were still detected. In another study, Zand et al. (2010) used *Zea mays* in soil impacted with 40,000 ppm of crude oil, which decreased to 17,920 ppm after 120 days, while Baruah, Baruah and Deka (2013) used *Cyperus brevifolius* in soil with 30,000 ppm of crude oil and reduced it to 8,100 ppm. In all cases, values still higher than that allowed by NOM-138 were detected following remediation efforts.

According to the maximum allowable limit stipulated by NOM-138, values greater than 30,000 ppm require chemical remediation. However, it is possible to phytoremediate contaminated soil using plants that tolerate and naturally degrade it, such as *Sorghum vulgare* (Merkl, Schultze-kraft, & Infante, 2005; Shirdam et al., 2008); the physiological capability and adaptation of *S. vulgare* provides it with an extensive and fibrous root system growth pattern that enables it to avoid the phytotoxicity of HCs (Njoku, Akinola, & Oboh, 2009; Asiabadi, Mirbagheri, Najafi, & Moatar, 2014). Based on the above, the aim of this study was to perform phytoremediation with *S. vulgare* inoculated with *Bacillus cereus* and *Burkholderia cepacia* of soil contaminated with 35,000 ppm of WMO, to a concentration below the allowable maximum set by NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2003.

Introducción

El aceite residual automotriz (ARA) es generado por el ciclo de lubricación de automotores y maquinaria industrial; es una mezcla de hidrocarburos (HC) alifáticos, aromáticos y trazas de metales pesados (Sharifi, Sadeghi, & Akbarpour, 2007; Diab, 2008). En el suelo este aceite forma una película hidrofóbica que reduce su fertilidad (Domínguez-Rosado & Pichtel, 2004), inhibe la mineralización de materia orgánica, impide el intercambio gaseoso con la atmósfera y la difusión del agua y el oxígeno (Efe & Okpali, 2012; Ogbo, 2009). Tiene un efecto negativo tanto en la vida vegetal como microbiana, y en consecuencia una drástica disminución de la producción agrícola (Domínguez-Rosado & Pichtel, 2004; Zand, Bidhendi, & Mehrdadi, 2010). El suelo contaminado con 35,000 ppm de ARA es una concentración relativamente alta de HC, acorde con la norma mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2003 (NOM-138); la cual establece los límites máximos permisibles para la fracción de HC: ligera de 200 ppm, mediana de 1,200 ppm y pesada de 3,000 ppm.

Existen numerosos reportes sobre fitorremediación de suelo contaminado con mezclas de HC como el ARA, que emplearon plantas no aptas, sin potenciar con bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV). Como lo señalado por Shirdam, Zand, Bidhendi, y Mehrdadi (2008), quienes analizaron la fitorremediación con *S. vulgare* de suelo contaminado con 40,000 ppm de petróleo; después del tratamiento se observaron hasta 9,500 ppm en 90 días. En tanto que Zand et al. (2010), usaron *Zea mays* en suelo impactado con 40,000 ppm de petróleo crudo, el cual disminuyó hasta 17,920 ppm después de 120 días. Mientras que Baruah, Baruah, y Deka (2013), reportaron que en suelo con 30,000 ppm de petróleo crudo emplearon *Cyperus brevifolius* y lo redujo hasta 8,100 ppm. En todos los casos se presentaron valores aún altos conforme la NOM-138 para su remediación.

De acuerdo con el límite máximo permisible señalado por la NOM-138 valores superiores a 30,000 ppm demandarían una remediación química. Sin embargo, es posible implementar la fitorremediación de suelo contaminado usando plantas que lo toleraren y lo degraden naturalmente, como *Sorghum vulgare* (Merkl, Schultze-kraft, & Infante, 2005; Shirdam et al., 2008) dada su capacidad y adaptación fisiológica que le permite tener un patrón de crecimiento del sistema radical extenso y fibroso para evitar la fitotoxicidad de HC (Njoku, Akinola, & Oboh, 2009; Asiabadi, Mirbagheri, Najafi, & Moatar, 2014). Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue realizar fitorremediación con *S. vulgare* inoculado con *Bacillus cereus* y *Burkholderia cepacia* de suelo contaminado con 35,000 ppm de ARA, a una concentración inferior al máximo permisible señalado por la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2003

Material y methods

Experimental description and setup

This research was conducted in the Environmental Microbiology Laboratory greenhouse at UMSNH'S Institute for Biological Chemistry Research in Morelia, Michoacán, Mexico. The average microclimatic conditions in this greenhouse were: temperature of 23.2 °C, brightness of 450 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ and relative humidity of 67 %. For this test, soil was collected from a farmland area called "La Cajita" located at 19° 39' 27" NL and 100° 19' 59" WL, at an elevation of 1,820 m. The site is in the Zapata district of Morelia county, Mich., Mexico, at km 5 of the Morelia-Pátzcuaro highway. The area has a temperate climate. The soil was solarized at 70 °C for 48 h to minimize the problem of pests and diseases; subsequently it was with sieved with number 20 mesh. The soil was artificially contaminated with 35,000 ppm of WMO from an automotive garage diluted with 10 % La Corona® detergent solution. This detergent, whose active ingredient is alkyl benzene sulfonate, modifies its emulsification to facilitate mineralization without substantially changing the chemical composition of oil (Asquith, Geary, Nolan, & Evans, 2012).

Then 1 kg of soil was placed in the top container of the Leonard jar experimental unit (Figure 1), whereas the mineral fertilizer (or water) was placed in the reservoir at the bottom. Both parts are connected by a cotton strip of approximately 20 cm in length, to allow movement of the mineral fertilizer by capillary action to the soil according to the treatment: soil unpolluted by WMO and irrigated with water only, used as the absolute control (AC); the same soil without WMO and fed with mineral fertilizer, used as the relative control (RC); WMO-contaminated soil without

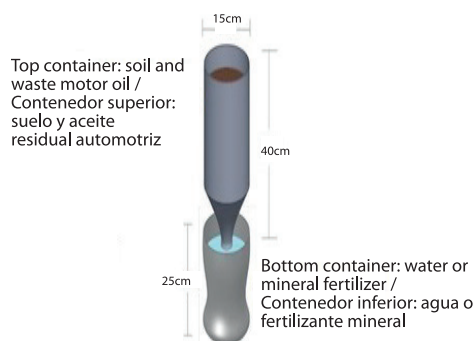


Figure 1. Leonard jar for phytoremediation of soil contaminated with waste motor oil (García-González, Farías-Rodríguez, Peña-Cabriales, & Sánchez-Yáñez, 2005).

Figura 1. Jarra de Leonard para la fitorremediación de suelo contaminado con aceite residual automotriz (García-González, Farías-Rodríguez, Peña-Cabriales, & Sánchez-Yáñez, 2005).

Material y métodos

Descripción y montaje del experimento

Esta investigación se realizó en el invernadero del laboratorio de Microbiología Ambiental del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH, Morelia, Michoacán, México. En ese invernadero las condiciones microclimáticas promedio fueron: temperatura de 23.2 °C, luminosidad de 450 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y humedad relativa de 67 %. Para este ensayo se utilizó suelo colectado de un sitio ubicado a los 19° 39' 27" LN y 100° 19' 59" LO, a 1,820 m de altitud; con 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. El suelo se solarizó a 70 °C por 48 h para minimizar el problema de plagas y enfermedades; posteriormente se tamizó con malla número 20. El suelo se contaminó artificialmente con 35,000 ppm de ARA proveniente de un taller mecánico diluido con una solución de detergente La Corona® al 10 %. Este detergente, cuyo principio activo es el alquil bencen sulfonato de sodio, modifica su emulsificación para facilitar su mineralización sin modificar sustancialmente la composición química del aceite (Asquith, Geary, Nolan, & Evans, 2012).

Después se colocó 1 kg de suelo en el contenedor superior de la unidad experimental jarra de Leonard (Figura 1); mientras que el fertilizante mineral (o agua) se colocó en el reservorio de la parte inferior. Ambas partes se conectaron por una tira de algodón de aproximadamente 20 cm de largo, para permitir el movimiento del fertilizante mineral por capilaridad al suelo según el tratamiento: suelo sin contaminar con ARA irrigado únicamente con agua, usado como control absoluto (CA); ese mismo suelo sin ARA y alimentado con fertilizante mineral, control relativo (CR); suelo contaminado con ARA sin fitorremediar, control negativo (CN), y suelo impactado con ARA fitorremediado con *S. vulgare* inoculado con *B. cereus* y *B. cepacia*.

Para la fitorremediación del suelo contaminado con ARA mediante *S. vulgare*, por cada 20 semillas de *S. vulgare* se adicionó 1 mL de suspensión de *B. cereus* y *B. cepacia*, individualmente, y en mezcla con relación 1:1. De cada género, la concentración bacteriana se ajustó con la solución patrón núm. 0.5 de nefelómetro de McFarland, equivalente a 1.5×10^8 células bacterianas (Roselene, 2014). Para lo anterior se cultivó *B. cereus* en caldo nutritivo con la siguiente composición ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): extracto de carne, 3.0; peptona de carne, 5.0, y pH ajustado a 7.0. En tanto que *B. cepacia* se cultivó en caldo *Pseudomonas cepacia* ácido azaleico y triptamina (CPCAT) con la siguiente composición ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): triptamina, 0.2; ácido azaleico, 2.0; K_2HPO_4 , 4.0; KH_2PO_4 , 4.0; extracto de

phytoremediation, used as the negative control (NC), and WMO-contaminated soil phytoremediated with *S. vulgare* inoculated with *B. cereus* and *B. cepacia*.

For phytoremediation of WMO-contaminated soil by *S. vulgare*, for every 20 *S. vulgare* seeds, 1 mL of *B. cereus* and *B. cepacia* suspension was added, individually, and in mixture with a 1:1 ratio. Of each genus, the bacterial concentration was adjusted to McFarland nephelometer standard No. 0.5, equivalent to 1.5×10^8 bacterial cells (Roselene, 2014). For the above, *B. cereus* was cultured in nutrient broth with the following composition ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): meat extract, 3.0; meat peptone, 5.0, and pH adjusted to 7.0, whereas *B. cepacia* was grown in *Pseudomonas cepacia* azelaic acid and tryptamine (CPCAT) broth with the following composition ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): tryptamine, 0.2; azelaic acid, 2.0; K_2HPO_4 , 4.0; KH_2PO_4 , 4.0; yeast extract, 0.02; MgSO_4 , 0.2, and pH 6.7. Both PGPR were incubated at 30 °C for 72 h.

In soil contaminated with 35,000 ppm of WMO, four *S. vulgare* seeds inoculated with PGPR were seeded per Leonard jar and fed with a mineral fertilizer with the following chemical composition: ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): 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 , traces, and 10 $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$ microelements solution ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): 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, and pH 6.8-7.0. All culture media and mineral fertilizer were prepared with Meyer® QP reagents. Growth of *S. vulgare* was assessed by phenological response variables (plant height [PH] and root length [RL] and biomass (aboveground and root dry weight [ADW/RDW]) (Akutam, Pappoe, Armah, & Enu-Kwesi, 2014; Jayanthi et al., 2014). In the soil, after 90 days, the WMO concentration was determined by Soxhlet, and the HCs of the oil were identified before and after phytoremediation by gas chromatography coupled with mass spectrometry (Kathi & Khan, 2011). With the data obtained, ANOVA and the Tukey test ($P \leq 0.05$) were performed using the Statgraphics Centurion XVI. II statistical package.

Soil physicochemical properties

Table 1 shows the physicochemical properties of the soil; on that basis it was classified as clay-loam-sandy (NOM-021-REC/NAT-2000; Haritash & Kaushik, 2009; Basumatary, Saikia, & Bordoloi, 2012).

Gas chromatography

The WMO-contaminated soil was stored at 4 °C, dried at room temperature for 48 h and homogenized. Three 3-g samples were taken, for a total of three replications. Later they were placed in 10-mL culture tubes with a screw cap, and 3 mL of hexane (98.5 % purity, Sigma-Aldrich ACS HPLC grade) were added; they were stirred for 60 s in a Vortex Genie II, and filtered three times

levadura, 0.02; MgSO_4 , 0.2, y pH de 6.7. Ambas BPCV se incubaron a 30 °C por 72 h.

En suelo contaminado con 35,000 ppm de ARA, se sembraron cuatro semillas de *S. vulgare* inoculadas con las BPCV por jarra de Leonard, y se alimentó con un fertilizante mineral con la siguiente composición química ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): 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 $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$ de solución de microelementos ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): 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, y pH de 6.8 - 7.0. Todos los medios de cultivo y fertilizante mineral se prepararon con los reactivos QP, MEYER®. El crecimiento de *S. vulgare* se evaluó mediante las variables respuesta fenológica (altura de planta [AP] y longitud radical [LR]) y su biomasa (peso seco aéreo y radical [PSA/PSR]) (Akutam, Pappoe, Armah, & Enu-Kwesi, 2014; Jayanthi et al., 2014). En el suelo, después de 90 días, se determinó la concentración de ARA por Soxhlet, y se identificaron los HC del aceite antes y después de la fitorremediación, por cromatografía de gases acoplada a masas (Kathi & Khan, 2011). Con los datos obtenidos se realizó un ANAVA y se aplicaron pruebas de comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$); para ello se empleó el paquete estadístico Statgraphics Centurion XVI.II.

Propiedades fisicoquímicas del suelo

En el Cuadro 1 se reportan las propiedades fisicoquímicas del suelo; con base en ello se clasificó como franco-arcilloso-arenoso (NOM-021-REC/NAT-2000; Haritash & Kaushik, 2009; Basumatary, Saikia, & Bordoloi, 2012).

Cromatografía de gases

El suelo contaminado con ARA se conservó a 4 °C, se secó a temperatura ambiente por 48 h y se homogenizó. Se tomaron tres muestras de 3 g, para un total de tres repeticiones. Posteriormente se colocaron en tubos de cultivo de 10 mL con tapón rosca, y se adicionaron 3 mL de hexano (pureza 98.5 %, ACS-Sigma Aldrich grado HPLC); se agitaron por 60 s en Vortex Genie II, y se filtró tres veces en embudo de separación; posteriormente se pasó por otro filtro, de algodón de 0.5 cm, y 1 g de MgSO_4 . Finalmente se evaporó el solvente por 24 h en temperatura ambiente, y se aforó cada muestra a 1 mL para su posterior análisis.

Las muestras de suelo con ARA se analizaron en cromatógrafo de gases, Agilent Technologies serie 7890A, acoplado a masas serie 5975C; se inyectó 1 μL de muestra modo Splitless y se usó helio (99.995 % pureza) como gas de acarreo en una columna capilar Zebron-5MS de 30 m 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 de 50 °C

Table 1. Initial physicochemical properties of the soil used in this study.
Cuadro 1. Propiedades fisicoquímicas iniciales del suelo empleado en este estudio.

Parameter/Parámetro	Value/Valor
Nitrogen/Nitrógeno	0.62
Phosphorus/Fósforo	0.30
pH (1:20)	6.41
Organic matter (%) / Material orgánico (%)	4.30
Cation exchange capacity (cmol(+) kg ⁻¹) / Capacidad de intercambio catiónico (cmol(+) kg ⁻¹)	32.45
Texture (%) / Textura (%)	24(C)-22(Si)-54(Sa) / 24(Ac)-22(L)-54(Ar)
True density (g·cm ⁻³) / Densidad real (g·cm ⁻³)	2.04
Bulk density (g·cm ⁻³) / Densidad aparente (g·cm ⁻³)	0.96
Porosity** (%) / Porosidad** (%)	53.74
Moisture saturation percentage (%) / Porcentaje de saturación de humedad (%)	38
Field capacity*** (%) / Capacidad de campo*** (%)	18.89
Useable moisture (%) / Humedad aprovechable (%)	9.45

Sa: sand, Si: Silt, C: clay, *For soils of volcanic origin, **Calculated from Da and Dr; *** Estimated based on texture, *Reported for sandy-loam soils (NOM-021-RECNAT-2000).

Ar: arena, L: limo, Ac: arcilla, *Para suelos de origen volcánico, **Calculada a partir de Da y Dr; *** Estimada a partir de textura, *Reportada para suelos franco-arenoso (NOM-021-RECNAT-2000).

in a separatory funnel. Then it was passed through a 0.5-cm cotton filter and 1 g of MgSO₄. Finally, the solvent was evaporated for 24 h at room temperature and each sample was gauged to 1 mL for later analysis.

Soil samples with WMO were analyzed using an Agilent Technologies 7890A gas chromatograph, coupled to an Agilent 5975C series GC/MSD; 1 µL of Splitless-mode sample was injected and helium (99.995 % purity) was used as carrier gas in a Zebron-5MS capillary column (30 m long, with an internal diameter of 0.25 mm and film thickness of 0.25 mm). The injection temperature was 250 °C and the initial oven temperature was 50 °C with a ramp from 30-150 °C, ramp 2 of 10 °C per min to 310 °C for 2 min. The detection temperature was 280 °C with an equilibration time of 3 min and a maximum temperature of 320 °C (Peng, Zhou, Cai, & Zhang, 2009).

Results and discussion

Soil contaminated with 35,000 ppm of WMO did not inhibit germination of *S. vulgare* seed during

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 (Peng, Zhou, Cai, & Zhang, 2009).

Resultados y discusión

El suelo contaminado con 35,000 ppm de ARA no inhibió la germinación de la semilla de *S. vulgare* durante su fitorremediación potenciada con las BPCV, y fue tolerante a la acción hidrófoba del aceite, que impide la difusión de agua y O₂ (Zand et al., 2010; Ogbo, Zibigha, & Odogu, 2009). La semilla de *S. vulgare* sembrada en este suelo, sin potenciar con las BPCV, no germinó; lo anterior probablemente por la elevada concentración de ARA, lo que bloqueó la entrada de agua a la semilla y su respiración aerobia, especialmente por los HC de bajo peso molecular que inhiben la actividad enzimática relacionada con la asimilación de almidón causando la muerte del embrión o retardar su germinación (Sharifi et al., 2007; Ogbo, 2009; Agamuthu, Abioye, & Aziz, 2010).

phytoremediation enhanced with PGPR, and it was tolerant to the hydrophobic action of the oil, which prevents the diffusion of water and O₂ (Zand et al., 2010; Ogbo, Zibigha, & Odogu, 2009). *S. vulgare* seed sown in this soil, without strengthening with PGPR, did not germinate, probably because of the high WMO concentration, which blocked the entry of water to the seed and its aerobic respiration, especially by the low molecular weight HCs which inhibit the enzymatic activity related to the assimilation of starch, killing the embryo or slowing its germination (Sharifi et al., 2007; Ogbo, 2009; Agamuthu, Abioye, & Aziz, 2010).

Table 2 shows that in soil unpolluted by WMO and fed with mineral fertilizer, referred to as the RC, *S. vulgare* recorded the greatest PH with 20.15 cm; this value had statistical difference compared to the 18.78 cm PH obtained by *S. vulgare* enhanced with both PGPR, but in turn it had no statistical difference with the PH of the AC (15.38 cm). At seedling level, it showed an obvious sensitivity to the toxicity of WMO (Lin & Mendelssohn, 2009); this suggests that the HCs prevented O₂ diffusion to the root, as well as immobilization of nitrogen minerals and phosphates, which are aerobic processes

En el Cuadro 2 se puede observar que en suelo sin contaminar con ARA y alimentado con fertilizante mineral, referido como CR, *S. vulgare* registró la mayor AP con 20.15 cm; este valor tuvo diferencia estadística comparado con los 18.78 cm de la AP de *S. vulgare* potenciado con ambas BPCV; aunque a su vez no tuvo diferencia estadística con la AP de CA (15.38 cm). A nivel de plántula, mostró una evidente sensibilidad a la toxicidad del ARA (Lin & Mendelssohn, 2009); esto sugiere que los HC impidieron la difusión de O₂ a la raíz, así como inmovilización de minerales de nitrógeno y fosfatos, que son procesos aeróbicos realizados por el sistema radical de *S. vulgaris* (Agarry & Ogunleye, 2012). En general se reporta que en las células vegetales la fracción aromática del ARA inhibe la síntesis de ácidos nucleicos (Pérez-Armendáriz et al., 2011; Quiñones-Aguilar et al., 2003); además bloquea la formación de clorofila, la actividad fotosintética, altera el mecanismo de cierre y apertura de estomas, la respiración y causa la desintegración de la pared celular (Adam & Duncan, 2003; Basumatary et al., 2012).

En los tejidos vegetales, la acumulación de HC de bajo peso molecular y los aromáticos del tipo: antraceno,

Table 2. Phenology and biomass of *Sorghum vulgare* seedlings enhanced with *Bacillus cereus* and *Burkholderia cepacia*, for phytoremediation.

Cuadro 2. Fenología y biomasa de *Sorghum vulgare* en plántula potenciada con *Bacillus cereus* y *Burkholderia cepacia*, para su fitorremediación.

<i>Sorghum vulgare</i> in soil/ <i>Sorghum vulgare</i> en suelo	PH (cm)/ AP (cm)	RL (cm)/ LR (cm)	ADW (g)/ PSA (g)	RDW (g)/ PSR (g)
Irrigated only with water, without waste motor oil (AC)/Irrigado solo con agua, sin aceite residual automotriz (CA)	15.38 ± 5.83bc ^z	6.53 ± 5.29b	0.016 ± 0.01b	0.010 ± 0.1b
Fed with mineral fertilizer, without waste motor oil (Rc)/Alimentado con fertilizante mineral sin aceite residual automotriz (CR)	20.15 ± 7.35a	6.68 ± 6.86b	0.026 ± 0.05a	0.013 ± 0.1a
Soil with 35,000 ppm of waste motor oil and phytoremediated with <i>S. vulgare</i> inoculated with / Suelo con 35,000 ppm de aceite residual automotriz y fitorremediado con <i>S. vulgare</i> e incluido con				
a) <i>Bacillus cereus</i>	15.70 ± 1.34bc	8.95 ± 1.12a	0.017 ± 0.07b	0.013 ± 0.1a
b) <i>Burkholderia cepacia</i>	9.88 ± 3.16c	4.35 ± 1.20c	0.015 ± 0.01c	0.011 ± 0.7b
c) <i>B. cereus</i> and <i>B. cepacia</i> /c) <i>B. cereus</i> y <i>B. cepacia</i> /	18.78 ± 2.43b	6.45 ± 1.83b	0.016 ± 0.01b	0.014 ± 0.8a
d)Sin <i>B. cereus</i> y <i>B. cepacia</i> / d)Without <i>B. cereus</i> and <i>B. cepacia</i>	-	-	-	-

^zValues with the same letter within columns are not statistically different (Tukey, $P \leq 0.05$, HSD).

(-) No growth, n = 6.

PH: plant height; RL: root length; ADW: aboveground dry weight; RDW: root dry weight; AC: absolute control; RC: relative control

^zValores con la misma letra dentro de columnas no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$, DMSH).

(-) Sin crecimiento, n = 6.

AP: altura de planta; LR: longitud radical; PSA: peso seco aéreo; PSR: peso seco radical; CA: control absoluto; CR: control relativo

performed by the *S. vulgaris* root system (Agarry & Ogunleye, 2012). In general it is reported that in plant cells the aromatic fraction of WMO inhibits nucleic acid synthesis (Pérez-Armendáriz et al., 2011; Quiñones-Aguilar et al., 2003); it also blocks chlorophyll formation and photosynthetic activity, alters the closing and opening mechanism of stomata, affects respiration and causes cell wall disintegration (Adam & Duncan, 2003; Basumatary et al., 2012).

In plant tissues, the accumulation of low molecular weight HCs and aromatics such as anthracene, phenanthrene, and pyrene, among others, induces an abnormal increase in the synthesis of phytohormones (Luhach & Chaudhry, 2012; Shirdam et al., 2008). Consequently, in *S. vulgare* both PH and ADW are reduced, and even death can occur due to mechanisms not yet elucidated (Gogosz, Bona, Santos, & Botosso, 2010), whereas *S. vulgare* enhanced with *B. cereus* recorded the greatest RL with 8.95 cm; this value had statistical difference compared to the RL of 6.53 and 6.68 cm in the AC and RC, respectively. In this regard it is suggested that PGPR, such as *B. cereus*, converted their root exudates into plant growth promoting substances (PGPS), which increased the RL of *S. vulgare* to improve its mineral absorption capacity (Zand et al., 2010).

In the RC, ADW reached 0.026 g, thereby showing statistical difference compared to the contaminated soil, where *S. vulgare* inoculated with the two genera of PGPR recorded a lower value of 0.016 g. This suggests that the low molecular weight, aliphatic HCs of the WMO damaged the integrity of cell membranes and lysed plant cells (Collins, 2007). Consequently, the ADW of *S. vulgare* was reduced; moreover, at root level, the low solubility of the WMO aliphatic fraction inhibited respiration (Ogbo, 2009; Zhang, Zhou, Peng, & Cai, 2010).

The 0.013 g RDW of *S. vulgare* inoculated only with *B. cereus* and the 0.014 g of *S. vulgare* treated with both PGPR, used to phytoremediate contaminated soil, were values that had no statistical difference with the 0.013 g of the RC. This suggests that in WMO-contaminated soil, phytoremediated with *S. vulgare* enhanced with *B. cereus* and *B. cepacia*, the plant's root exudates were converted into PGPS that favored the increase in RDW, and also oil mineralization (Zand et al., 2010; Baruah et al., 2013). In the same soil, with 35,000 ppm of WMO, *S. vulgare* unboosted with PGPR showed a low seed germination percentage; afterwards, the seedlings died, which suggested that it was due to the WMO phytotoxicity (Collins, 2007).

Table 3 shows the data for WMO-contaminated soil phytoremediated with *S. vulgare* at flowering; these plants had greater tolerance to WMO toxicity due to being boosted with *B. cereus* only, enabling them to

fenantreno, pireno, entre otros, inducen el incremento anormal en la síntesis de fitohormonas (Luhach & Chaudhry, 2012; Shirdam et al., 2008). En consecuencia, en *S. vulgare* se reduce la AP y el PSA, e incluso la muerte por mecanismos aún no dilucidados (Gogosz, Bona, Santos, & Botosso, 2010). Mientras *S. vulgare* potenciado con *B. cereus* registró la mayor LR con 8.95 cm, este valor tuvo diferencia estadística comparado con la LR de 6.53 y 6.68 cm de CA y CR, respectivamente. Al respecto se sugiere que las BPCV, como *B. cereus*, convirtieron sus exudados de raíz en sustancias promotoras de crecimiento vegetal (SPCV); las cuales incrementaron la LR de *S. vulgare* para mejorar su capacidad de absorción mineral (Zand et al., 2010).

En el CR, el PSA alcanzó 0.026 g; mostrando diferencia estadística comparado con el suelo contaminado, donde *S. vulgare* inoculado con los dos géneros de BPCV registró un valor inferior de 0.016 g. Lo anterior sugiere que los HC alifáticos del ARA, de bajo peso molecular, dañaron la integridad de las membranas celulares y lisaron la célula vegetal (Collins, 2007); en consecuencia disminuyó el PSA de *S. vulgare*, además de que a nivel de raíces la baja solubilidad del ARA de la fracción alifática inhibió la respiración (Ogbo, 2009; Zhang, Zhou, Peng, & Cai, 2010).

Los 0.013 g de PSR de *S. vulgare* inoculado sólo con *B. cereus* y los 0.014 g de *S. vulgare* tratado con ambas BPCV, usados para fitorremediar el suelo contaminado, fueron valores que no tuvieron diferencia estadística con los 0.013 g del CR. Lo anterior sugiere que en ese suelo contaminado con ARA, fitorremediado con *S. vulgare* potenciado con *B. cereus* y *B. cepacia*, hubo conversión de sus exudados radicales en SPCV que favorecieron el incremento de su PSR, y al mismo tiempo la mineralización del aceite (Zand et al., 2010; Baruah et al., 2013). En el mismo suelo, con 35,000 ppm de ARA, el *S. vulgare* sin potenciar con las BPCV mostró bajo porcentaje de germinación de su semilla; luego las plántulas murieron, lo que se sugiere que fue debido a la fitotoxicidad del ARA (Collins, 2007).

El Cuadro 3 muestra los datos de suelo contaminado y fitorremediado con *S. vulgare* a floración, el cual tuvo mayor tolerancia a la toxicidad del ARA al ser potenciado solo con *B. cereus*, con una AP de 63.48 cm. Lo cual sugiere que los exudados de raíz de *S. vulgare* indujeron a la *B. cereus* a la síntesis de SPCV para favorecer su crecimiento y potenciar su tolerancia a la fitotoxicidad de los HC del ARA (Ozawa, Ikeura, Kaimi, & Tamaki, 2015). En tanto que el valor de la AP de *S. vulgare*, inoculado con *B. cereus*, de 63.48 cm fue estadísticamente diferente comparado con la AP de 53.98 cm de CR y los 41.98 cm de CA.

Por otro lado, en ese suelo contaminado y fitorremediado con *S. vulgare*, potenciado con ambas BPCV, se registró

attain a PH of 63.48 cm. This suggests that the root exudates of *S. vulgare* induced *B. cereus* to synthesize PGPS to promote its growth and enhance its tolerance to the phytotoxicity of the WMO's HCs (Ozawa, Ikeura, Kaimi, & Tamaki, 2015), whereas the 63.48 cm PH value of *S. vulgare*, inoculated with *B. cereus*, statistically differed from the 53.98 cm PH value of the RC and the 41.98 cm of the AC.

Furthermore, in the contaminated soil phytoremediated with *S. vulgare*, enhanced with both PGPR, the highest RL of 23.70 cm was recorded. This is probably because of the plant's root penetration ability in the soil that enables it to mineralize the HCs and tolerate their toxicity (Banks, Kulakow, Schwab, Chen, & Rathbone, 2003). The aforementioned RL value was statistically different from the RC and AC values.

If one compares the ADW values of *S. vulgare* enhanced with *B. cereus*, the RC and the AC, it can be seen that they do not statistically differ; therefore, it is suggested

la mayor LR de 23.70 cm. De lo anterior se sugiere que es debido a su capacidad de penetración radical en el suelo para mineralizar los HC y tolerar su toxicidad (Banks, Kulakow, Schwab, Chen, & Rathbone, 2003). El valor mencionado de LR fue estadísticamente diferente al del CR y al CA.

Si se comparan los valores de PSA de *S. vulgare* potenciado con *B. cereus*, CR y CA, se puede observar que no difieren estadísticamente; por lo anterior se sugiere que a partir de los exudados radicales generó SPCV, que aumentó la absorción mineral de la raíz y su tolerancia a la fitotoxicidad del ARA (Shirdam et al., 2008). Si se comparan los mismos tratamientos para el PSR, se puede observar que no difieren estadísticamente, con valores de 1.09, 0.75 y 0.60, para *S. vulgare* inoculado con *B. cereus*, CR y CA respectivamente; esto sugiere que *B. cereus* indujo la formación de raíces secundarias para incrementar la absorción de minerales y facilitar la difusión del agua y el O₂ en el suelo (Bahadure, Kalia, & Chavan, 2013).

Table 3. Phenology and biomass of *Sorghum vulgare* at flowering enhanced with *Bacillus cereus* and *Burkholderia cepacia* for phytoremediation.

Cuadro 3. Fenología y biomasa de *Sorghum vulgare* a floración potenciado con *Bacillus cereus* y *Burkholderia cepacia* para su fitorremediación.

<i>Sorghum vulgare</i> in soil / <i>Sorghum vulgare</i> en suelo	PH (cm) / AP (cm)	RL (cm) / LR (cm)	ADW (g) / PSA (g)	RDW (g) / PSR (g)
Irrigated only with water, without waste motor oil (AC) / Irrigado solo agua sin aceite residual automotriz (CA)	41.98 ± 4.73c	20.53 ± 2.36b	2.62 ± 0.98 ^{ab}	0.60 ± 0.63ab
Fed with mineral fertilizer, without waste motor oil (RC) / Alimentado con fertilizante mineral sin aceite residual automotriz (CR)	53.98 ± 9.37b	20.03 ± 2.10b	2.73 ± 0.84ab	0.75 ± 0.84ab
Soil with 35,000 ppm of waste motor oil and phytoremediated with <i>S. vulgare</i> inoculated with / Suelo con 35,000 ppm de aceite residual automotriz y fitorremediado con <i>S. vulgare</i> e inculado con				
a) <i>Bacillus cereus</i>	63.48 ± 5.46a	20.88 ± 5.40b	3.62 ± 1.29a	1.09 ± 0.46a
b) <i>Burkholderia cepacia</i>	56.20 ± 5.20ab ^z	19.83 ± 4.09b	1.29 ± 0.48c	0.50 ± 0.23b
c) <i>B. cereus</i> and <i>B. cepacia</i>	56.98 ± 3.77ab	23.70 ± 5.54a	1.90 ± 0.29bc	0.82 ± 0.29 ^{ab}
d) Without <i>B. cereus</i> and <i>B. cepacia</i> / d) Sin <i>B. cereus</i> y <i>B. cepacia</i>	-	-	-	-

^zValues with the same letter within columns are not statistically different (Tukey, $P \leq 0.05$, HSD).

(-) No growth, n = 6.

PH: plant height; RL: root length; ADW: aboveground dry weight; RDW: root dry weight; AC: absolute control; RC: relative control

^zValores con la misma letra dentro de columnas no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$, DMSH).

(-) Sin crecimiento, n = 6.

AP: altura de planta; LR: longitud radical; PSA: peso seco aéreo; PSR: peso seco radical; CA: control absoluto; CR: control relativo

that the root exudates generated PGPS, which increased the mineral absorption of the root and its tolerance to WMO phytotoxicity (Shirdam et al., 2008). If the RDW of these treatments are compared, it can be seen that they do not statistically differ, with values of 1.09, 0.75 and 0.60 for *S. vulgare* inoculated with *B. cereus*, the RC and the AC respectively; this suggests that *B. cereus* induced formation of secondary roots to increase the absorption of minerals and facilitate the diffusion of water and O₂ in the soil (Bahadure, Kalia, & Chavan, 2013).

It is reported that during phytodegradation of aromatic WMO HCs, enzymes related to anabolism and catabolism of lignin, such as laccase, are induced, and these in turn decrease the phytotoxicity of WMO by breaking aromatic rings so that later they are mineralized by *B. cereus*, *B. cepacia* and aerobic heterotrophic microorganisms in the soil (Lin & Mendelsohn, 2009; Mohsenzade et al., 2009).

After 90 days, the WMO was reduced to 5,700 ppm when *S. vulgare* was inoculated with *B. cereus* (Table 4), whereas in soil phytoremediated with *S. vulgare* and inoculated with both PGPR, the WMO decreased to 800 ppm, a value lower than the maximum allowed by NOM-138, in which case it is considered remedied.

Se reporta que durante la fitodegradación de HC aromáticos del ARA se inducen enzimas relacionadas con el anabolismo y catabolismo de lignina, como la casa, y que disminuyen la fitotoxicidad del ARA al romper anillos aromáticos para que posteriormente sean mineralizados por *B. cereus*, *B. cepacia* y por los microorganismos heterotróficos aerobios del suelo (Lin & Mendelsohn, 2009; Mohsenzade et al., 2009).

Después de 90 días, el ARA se redujo hasta 5,700 ppm cuando *S. vulgare* se inoculó con *B. cereus* (Cuadro 4); mientras que en suelo fitorremediado con *S. vulgare* e inoculado con ambas BPCV, el ARA decreció a 800 ppm; valor inferior al máximo total permisible por la NOM-138, en cuyo caso se considera remediado. En cambio en el CN, la concentración de ARA no cambió por efecto de la atenuación natural. Lo anterior sugiere que en suelo contaminado con ARA, la combinación de la fitorremediación por *S. vulgare* inoculado con *B. cereus* y *B. cepacia* promovieron su crecimiento y potencializaron la mineralización de ARA (Izinyon & Seghosime, 2013); lo que fue determinante en su reducción, a una concentración de HC menor a la máxima permisible por la NOM-138.

La Figura 2 muestra el perfil cromatográfico de gases del suelo contaminado con 35,000 ppm de ARA al inicio

Table 4. Remaining WMO concentration in soil phytoremediated with *Sorghum vulgare*, enhanced with *Bacillus cereus* and *Burkholderia cepacia*.

Cuadro 4. Concentración remanente de ARA en suelo fitorremediado con *Sorghum vulgare* y potenciado con *Bacillus cereus* y *Burkholderia cepacia*.

Treatment/Soil Tratamiento/Suelo	Remaining waste motor oil (ppm)/ Aceite residual automotriz remanente (ppm)
	<i>Sorghum vulgare</i> at flowering/ <i>Sorghum vulgare</i> a floración
Irrigated only with water, without waste motor oil (AC)/ Irrigado solo agua sin aceite residual automotriz (CA)	0.0
Waste motor oil, without phytoremediation (NC)/ Sin fitorremediar aceite residual automotriz (CN)	35,000 ± 0.3d
Soil with 35,000 ppm of waste motor oil and phytoremediated with <i>S. vulgare</i> inoculated with/ Suelo con 35,000 ppm de aceite residual automotriz y fitorremediado con <i>S. vulgare</i> e inoculado	
a) <i>Bacillus cereus</i>	5,700 ± 0.4b
b) <i>Burkholderia cepacia</i>	8,300 ± 0.2c
c) <i>B. cereus</i> and <i>B. cepacia</i>	800 ± 0.1a*
d) Without <i>B. cereus</i> and <i>B. cepacia</i> /d) Sin <i>B. cereus</i> y <i>B. cepacia</i>	35,000 ± 0.3d

²Values with the same letter within columns are not statistically different (Tukey, $P \leq 0.05$, HSD).

(-) No growth, n = 6.

AC: absolute control; NC: negative control

*Value below the maximum allowable limit stipulated by NOM-138-SEMARNAT/SS-2003.

²Valores con la misma letra dentro de columnas no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$, DMSH).

(-) Sin crecimiento, n = 6.

CA: control absoluto; CN: control negativo

*Valor por debajo del límite máximo permisible por la NOM-138-SEMARNAT/SS-2003.

By contrast, in the NC, the WMO concentration did not change as a result of natural attenuation. This suggests that in WMO-contaminated soil the combination of phytoremediation by *S. vulgare* inoculated with *B. cereus* and *B. cepacia* promoted its growth and enhanced WMO mineralization (Izinyon & Seghosime, 2013), which was decisive in its reduction to an HC concentration less than the maximum allowed by NOM-138.

Figure 2 shows the gas chromatographic profile of soil contaminated with 35,000 ppm of WMO at the start of its phytoremediation, where elution peak times corresponding to the WMO HC light fraction and others belonging to the heavy fraction (higher) were identified. In the test zero-time, it was found that the WMO contains a mixture of branched and linear aliphatic HCs, from 12-35 carbons of the dodecane, tetradecane, octadecane and eicosane class: branched HCs such as pristane and phytane, as well as some aromatics such as benzene, phenol, benzanthracene, methyl diphenyl and naphthalene. The chromatographic profile confirms the wide diversity and complexity of this mixture (Sharifi et al., 2007), which makes its removal difficult and creates the need for biological treatment strategies (Banks et al., 2003) to ensure its mineralization at non-polluting levels according to NOM-138.

Figure 3 shows the chromatographic profile of the WMO HCs at the end of the test, where the apparent reduction in the aliphatic, branched and aromatic fractions of

de su fitorremediación; en donde se identificaron picos de elución con tiempos que corresponden a la fracción ligera de HC del ARA, y otros que pertenecen a la fracción pesada (mayores). En el tiempo cero del ensayo se encontró que el ARA contienen una mezcla de HC alifáticos lineales y ramificados, desde 12 hasta 35 carbonos de la clase del dodecano, tetradecano, octadecano y eicosano; ramificados como el pristano y el fitano; algunos aromáticos como el benceno, el fenol, el benzoantraceno, el metildifenilo y el naftaleno. El perfil cromatográfico confirma la amplia diversidad y complejidad de esta mezcla (Sharifi et al., 2007), que hace difícil su eliminación y la necesidad de establecer estrategias de tratamiento biológico (Banks et al., 2003) para asegurar su mineralización a niveles no contaminantes según la NOM-138.

En la Figura 3, se muestra el perfil cromatográfico de los HC del ARA al final del ensayo, donde se observa la evidente reducción de concentración de la fracción alifática, de la ramificada y de la aromática. Lo anterior como resultado de la fitorremediación de ese suelo con *S. vulgare* inoculado con *B. cereus* y *B. cepacia*, a nivel de floración. Se indica la desaparición de los HC alifáticos de cadena larga como: el dodecano, el tetracosano, el heptacosano, el nonadecano y el eicosano; mientras que de los HC aromáticos desaparecieron: el benceno, el tolueno, el xileno, el benzoantraceno y el naftaleno. Estos resultados sugieren que el crecimiento *S. vulgare* inoculado con *B. cereus* y *B. cepacia* potenciaron su

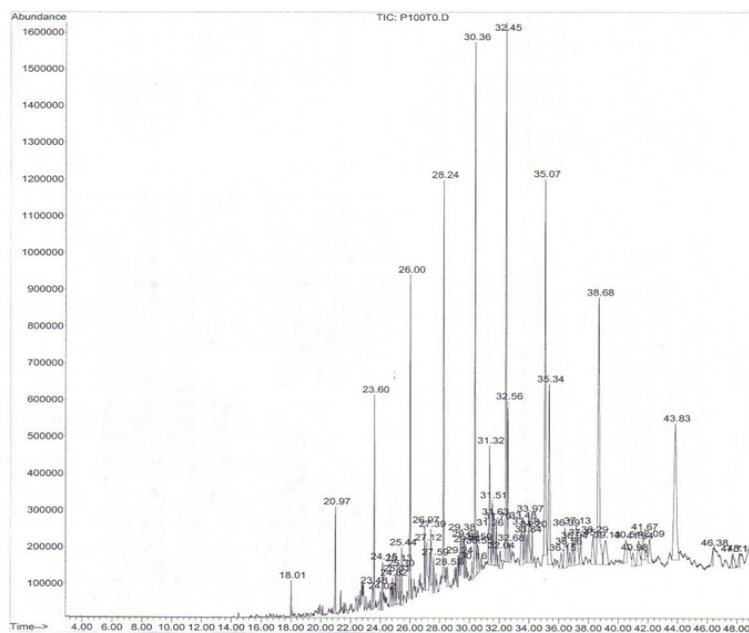


Figure 2. Chromatographic profile at the start of phytoremediation with *Sorghum vulgare* inoculated with *Bacillus cereus* and *Burkholderia cepacia* of soil contaminated with 35,000 ppm of waste motor oil.

Figura 2. Perfil cromatográfico al inicio de la fitorremediación con *Sorghum vulgare* inoculado con *Bacillus cereus* y *Burkholderia cepacia* de suelo contaminado con 35,000 ppm de aceite residual automotriz.

the concentration can be seen. This resulted from the phytoremediation of this soil with *S. vulgare* inoculated with *B. cereus* and *B. cepacia*, at flowering level. The disappearance of long-chain aliphatic HCs, such as dodecane, tetracosane, heptacosane, nonadecane and eicosane, is indicated, whereas the aromatic HCs that disappeared were benzene, toluene, xylene, benzo(a) anthracene and naphthalene. These results suggest that growth of *S. vulgare* inoculated with *B. cereus* and *B. cepacia* enhanced its phytoremediation ability to oxidize the long-chain (more than 12 WMO carbons), aliphatic fraction HCs, since there is evidence that the genus *Bacillus* oxidizes aliphatic and some aromatic HCs, whereas *B. cepacia* is considered an oxidant of both, depending on their complexity (White, Wolf, Thoma, & Reynolds, 2006)

capacidad de fitorremediación para oxidar los HC de la fracción alifática de cadena larga (más de 12 carbonos del ARA), dado que existe evidencia de que el género *Bacillus* oxida HC alifáticos y algunos aromáticos; en tanto que *B. cepacia* está considerada como oxidante de ambos tipos, en función de su complejidad (White, Wolf, Thoma, & Reynolds, 2006)

Conclusión

Un aspecto innovador de esta investigación fue la inoculación *S. vulgare* con *B. cereus* y *B. cepacia* que potenciaron su capacidad de fitorremediación para disminuir la concentración del ARA a un nivel inferior al máximo permisible por la NOM-138-SEMARNAT/SS-2003.

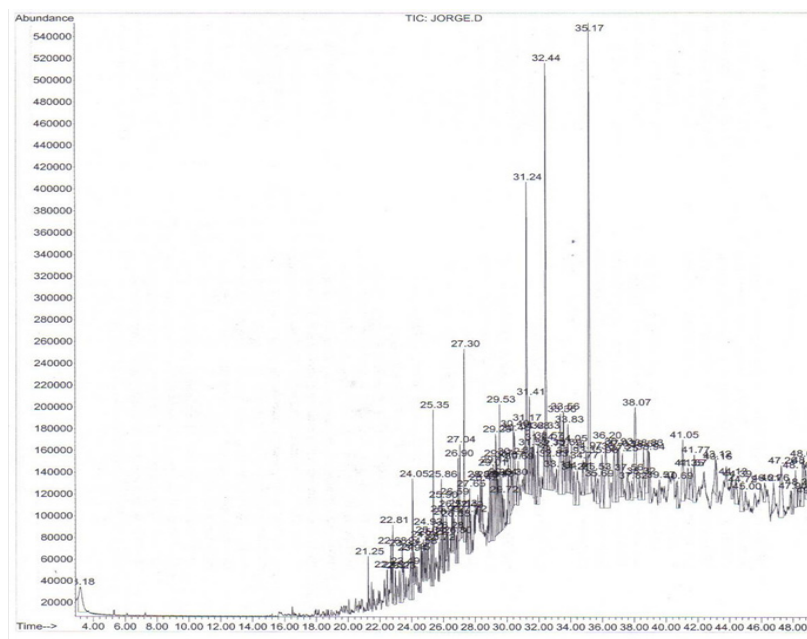


Figure 3. Chromatographic profile at the end of phytoremediation with *Sorghum vulgare* inoculated with *Bacillus cereus* and *Burkholderia cepacia* of soil contaminated with 35,000 ppm of waste motor oil.

Figura 3. Perfil cromatográfico al final de la fitorremediación con *Sorghum vulgare* inoculado con *Bacillus cereus* y *Burkholderia cepacia* de suelo contaminado con 35,000 ppm de aceite residual automotriz.

Conclusion

An innovative aspect of this research was the *S. vulgare* inoculation with *B. cereus* and *B. cepacia* that enhanced its phytoremediation ability to decrease the WMO concentration to a level below the maximum allowed by NOM-138-SEMARNAT/SS-2003.

Acknowledgements

The authors thank the UMSNH Scientific Research Affairs Office for authorizing project 2.7 (2015),

Agradecimientos

Al proyecto 2.7 (2015) de la Coordinación de la Investigación Científica-UMSNH; al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca tesis al primer autor y al Laboratorio de Edafología de la Facultad de Biología de la UMSNH por los análisis fisicoquímicos del suelo.

Fin de la versión en español

Mexico's National Science and Technology Council for granting the thesis scholarship to the first author and the UMSNH Biology Faculty's Soil Science Laboratory for conducting the physicochemical analysis of the soil.

End of English version

References / Referencias

- Adam, G., & Duncan, H. (2003). The effect of diesel fuel on common vetch (*Vicia sativa* L.) plants. *Environmental Geochemistry and Health*, 25(1), 123-130. doi: 10.1023/A:1021228327540
- Agamuthu, P., Abioye, O. P., & Aziz, A. A. (2010). Phytoremediation of soil contaminated with used lubricating oil using *Jatropha curcas*. *Journal of Hazardous Materials*, 179(1-3), 891-894. doi: 10.1016/j.jhazmat.2010.03.088
- Agarry, S. E., & Ogunleye, O. O. (2012). Box-Behnken design application to study enhanced bioremediation of soil artificially contaminated with spent engine oil using biostimulation strategy. *International Journal of Energy and Environmental Engineering*, 3(1), 31. doi: 10.1186/2251-6832-3-31
- Akutam, A., Pappoe, A. N. M., Armah, F. A., & Enu-Kwesi, L. (2014). Phytoremediation potential of indigenous Ghanaian grass and grass-like species grown on used motor oil contaminated soils. *Journal of Ecology and Environment*, 37(2), 41-51. doi: 10.5141/ecoenv.2014.006
- Asiabadi, F., Mirbagheri, S., Najafi, P., & Moatar, F. (2014). Phytoremediation of Petroleum-Contaminated Soils Around Isfahan Oil Refinery (Iran) by Sorghum and Barley. *Current World Environment Journal*, 9(1), 65-72. doi: 10.12944/CWE.9.1.10
- 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*, 1(5), 637-650.
- Bahadure, S., Kalia, R., & Chavan, R. (2013). Comparative Study of Bioremediation of Hydrocarbon Fuels. *International Journal of Biotechnology and Bioengineering Research*, 4(7), 677-686.
- Banks, M. K., Kulakow, P., Schwab, A. P., Chen, Z., & Rathbone, K. (2003). Degradation of crude oil in the rhizosphere of *Sorghum bicolor*. *International Journal of Phytoremediation*, 5(3), 225-234.
- Baruah, P., Baruah, P. P., & Deka, S. (2013). Removal of Hydrocarbon from Crude oil Contaminated Soil. *Bulletin of Environment. Pharmacology and Life Sciences*, 2(6), 123-130.
- Basumatary, B., Saikia, R., & Bordoloi, S. (2012). Phytoremediation of crude oil contaminated soil using nut grass, *Cyperus rotundus*. *Journal Environment Biology*, 33(5), 891-896. Recuperado de http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&d b=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23734455
- Collins, C. D. (2007). Implementing Phytoremediation of Petroleum Hydrocarbons. *Phytoremediation*, 23(2), 99-108. doi: 10.1007/978-1-59745-098-0_8
- Diab, E. A. (2008). Phytoremediation of Oil Contaminated Desert Soil Using the Rhizosphere Effects. *Global Journal of Environmental Research*, 2(2), 66-73.
- Dominguez-Rosado, E., & Pichtel, J. (2004). Phytoremediation of Soil Contaminated with Used Motor Oil: II. Greenhouse Studies. *Environmental Engineering Science*, 21(2), 169-180. doi: 10.1089/109287504773087345
- Efe, S. I., & Okpali, A. E. (2012). Management of Petroleum Impacted Soil with Phytoremediation and Soil Amendments in Ekpan Delta. *Journal of Environmental Protection*, 3(May), 386-393. doi: 10.4236/jep.2012.35048
- García-González, M. M., Farías-Rodríguez, R., Peña-Cabrales, J. J., & Sánchez-Yáñez, J. M. (2005). Inoculación del trigo var. Pavón con *Azospirillum* spp. y *Azotobacter beijerinckii*. *Terra Latinoamericana*, 23(1), 65-72.
- Gogosz, A. M., Bona, C., Santos, G. O., & Botosso, P. C. (2010). Germination and initial growth of *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae), in petroleum-contaminated soil and bioremediated soil. *Brazilian Journal of Biology*, 70(4), 977-986. doi: 10.1590/S1519-69842010000500009
- Haritash, A. K., & Kaushik, C. P. (2009). Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*, 169(1-3), 1-15. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.03.137
- Izinyon, O. C., & Seghosime, A. (2013). Assessment of Show Star Grass (*Melampodium Paludosum*) for Phytoremediation of Motor Oil Contaminated Soil. *Civil and Environmental Research*, 3(3), 19-28. Recuperado de <http://www.iiste.org/Journals/index.php/CER/article/view/4630> <http://www.iiste.org/Journals/index.php/CER/article/download/4630/4710> <http://www.iiste.org/Journals/index.php/CER/article/view/4630/4710>
- Jayanthy, V., Geetha, R., Rajendran, R., Prabhavathi, P., Karthik Sundaram, S., Dinesh-Kumar, S., & Santhanam, P. (2014). Phytoremediation of dye contaminated soil by *Leucaena leucocephala* (subabul) seed and growth assessment of *Vigna radiata* in the remediated soil. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21(4), 324-333. doi: 10.1016/j.sjbs.2013.12.001
- Kathi, S., & Khan, A. (2011). Phytoremediation approaches to PAH contaminated soil. *Indian Journal of Science and Technology*, 4(1), 56-63. Recuperado de <http://jnronline.com/index.php/indjst/article/view/29935>
- Lin, Q., & Mendelsohn, I. A. (2009). Potential of restoration and phytoremediation with *Juncus roemerianus* for diesel-contaminated coastal wetlands. *Ecological Engineering*, 35(1), 85-91. doi: 10.1016/j.ecoleng.2008.09.010
- Luhach, J., & Chaudhry, S. (2012). Open Access Research Article Effect of Diesel Fuel Contamination on Seed Germination and Growth of Four Agricultural Crops. *Universal Journal of Environmental Research and Technology*, 2(4), 311-317.

- Merkl, N., Schultze-kraft, R., & Infante, C. (2005). Phytoremediation of Petroleum-Contaminated Soils. *Water, Air, and Soil Pollution*, 165(1), 195-209.
- Mohsenzade, F., Nasser, S., Mesdaghinia, A., Nabizadeh, R., Zafari, D., & Chehregani, A. (2009). Phytoremediation of petroleum-contaminated soils: Pre-screening for suitable plants and rhizospheral fungi. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 91(8), 1443-1453. doi: 10.1080/02772240902744451
- Njoku, K. L., Akinola, M. O., & Oboh, B. O. (2009). Phytoremediation of crude oil contaminated soil the effect of growth of *Glycine max* on the physico-chemistry and crude oil contents of soil. *Nature and Science*, 7(10), 79-87.
- Norma Oficial Mexicana, NOM-021-RECNAT-2000, 31 de diciembre de 2002. *Norma oficial mexicana, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis*. Diario Oficial de la Federación.
- Norma Oficial Mexicana, NOM-138-SEMARNAT/SS-2003, 29 de marzo de 2005. *Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación*. Diario Oficial de la Federación.
- Ogbo, E. M. (2009). Effects of diesel fuel contamination on seed germination of four crop plants - *Arachis hypogaea*, *Vigna unguiculata*, *Sorghum bicolor* and *Zea mays*. *African Journal of Biotechnology*, 8(2), 250-253.
- Ogbo, E. M., Zibigha, M., & Odogu, G. (2009). The effect of crude oil on growth of the weed (*Paspalum scrobiculatum* L.) – phytoremediation potential of the plant. *Science And Technology*, 3(9), 229-233. doi: 10.5897/AJEST09.067
- Ozawa, S., Ikeura, H., Kaimi, E., & Tamaki, M. (2015). Selection of the Most Effective Cultivar of Genus *Zinnia* Flowers for Phytoremediation of Oil-contaminated Soil. *International Journal of Plant & Soil Science*, 4(1), 61-71.
- Peng, S., Zhou, Q., Cai, Z., & Zhang, Z. (2009). Phytoremediation of petroleum contaminated soils by *Mirabilis Jalapa* L. in a greenhouse plot experiment. *Journal of Hazardous Materials*, 168(2), 1490-1496. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.03.036
- Pérez-Armendáriz, B., Castañeda-Antonio, D., Castellanos, G., Jiménez-Salgado, T., Tapia-Hernández, A., & Martínez-Carrera, D. (2011). Anthracene effect on stimulation of growth of maize and kidney bean. *Terra Latinoamericana*, 29(1), 95-102.
- Quiñones-Aguilar, E. E., Ferrera-Cerrato, R., Gavi-Reyes, F., Fernández-Linares, L., Rodríguez-Vázquez, R., & Alarcón, A. (2003). Emergence and growth of maize in a crude oil polluted soil. *Agrociencia*, 37(6), 585-594.
- Roselene, H. (2014). A Study on Remediation of Polluted Water Using *Canna indica*. *International Journal of Research & Review*, 1(1), 1-15.
- 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. doi: 10.1007/BF03325982
- Shirdam, R., Zand, A. D., Bidhendi, G. N., & Mehrdadi, N. (2008). Phytoremediation of hydrocarbon-contaminated soils with emphasis on the effect of petroleum hydrocarbons on the growth of plant species. *Phytoprotection*, 89(1), 21-29. doi: 10.7202/000379ar
- White, P. M., Wolf, D. C., Thoma, G. J., & Reynolds, C. M. (2006). Phytoremediation of alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons in a crude oil-contaminated soil. *Water, Air, and Soil Pollution*, 169(1-4), 207-220. doi: 10.1007/s11270-006-2194-0
- Zand, A. D., Bidhendi, G. N., & Mehrdadi, N. (2010). Phytoremediation of total petroleum hydrocarbons (TPHs) using plant species in Iran. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 34(5), 429-438. doi: 10.3906/tar-0903-2
- Zhang, Z., Zhou, Q., Peng, S., & Cai, Z. (2010). Remediation of petroleum contaminated soils by joint action of *Pharbitis nil* L. and its microbial community. *Science of the Total Environment*, 408(22), 5600-5605. doi: 10.1016/j.scitotenv.2010.08.003