

BIOTRATAMIENTO DE SUELO CONTAMINADO POR ACEITE RESIDUAL AUTOMOTRIZ: UN RESIDUO PELIGROSO

Blanca Celeste Saucedo Martínez

Laboratorio de Microbiología Ambiental,
Instituto de Investigaciones Químico-
Biológicas, Universidad Michoacana de San
Nicolás de Hidalgo
Morelia, Michoacán, México
<https://orcid.org/0000-0003-3206-188X>

Liliana Márquez Benavides

Instituto de Investigaciones Agropecuarias y
Forestales, Universidad Michoacana de San
Nicolás de Hidalgo
Morelia, Michoacán, México
<https://orcid.org/0000-0003-3738-6608>

Gustavo Santoyo

Instituto de Investigaciones Químico-
Biológicas, Universidad Michoacana de San
Nicolás de Hidalgo
Morelia, Michoacán, México
<https://orcid.org/0000-0002-0374-9661>

Juan Manuel Sánchez-Yáñez

Laboratorio de Microbiología Ambiental,
Instituto de Investigaciones Químico-
Biológicas, Universidad Michoacana de San
Nicolás de Hidalgo
Morelia, Michoacán, México
<https://orcid.org/0000-0002-2276-8446>

All content in this magazine is licensed under a Creative Commons Attribution License. Attribution-Non-Commercial-Non-Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0).



Resumen: El aceite residual automotriz (ARA) es un fluido compuesto por hidrocarburos que de acuerdo a la Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente de México y la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA, 1996), es un residuo peligroso que comúnmente contamina el suelo y representa un problema mundial ambiental en la actualidad. La norma mexicana NOM-138-SEMARNAT/ssa1-2012 (NOM-138), establece como límite máximo permisible de hidrocarburos en suelo de 4,400 ppm. Un tratamiento efectivo para este residuo peligroso es la biorremediación mediante bioestimulación y fitorremediación. Los objetivos de este trabajo fueron: a) bioestimulación (BIS) de suelo contaminado por 60,000 ppm de ARA, y b) fitorremediación (FITO) del suelo con *Sorghum vulgare*, potenciado con *Penicillium chrysogenum* y *Aspergillus niger* para disminuir el ARA a una concentración inferior a la máxima permitida por la NOM-138. Para ello, un suelo agrícola se impactó artificialmente con 60,000 ppm de ARA para bioestimularlo con solución detergente, solución mineral, extracto fúngico crudo y H₂O₂ (peróxido de hidrogeno). Luego para eliminar el ARA remanente de la bioestimulación se fitorremedió el mismo suelo con *S. vulgare* potenciado con *P. chrysogenum* y *A. niger*. Las variables de respuesta fueron la biomasa de *S. vulgare* y concentración inicial y final del ARA por Soxhlet. Los resultados mostraron que el biotratamiento del suelo contaminado por ARA mediante BIS, disminuyó el ARA de 60,000 hasta 13,057 ppm. Luego, en la FITO *S. vulgare* con ambos hongos registró los mayores valores de biomasa de 7.6 g de peso fresco aéreo, 8.8 g de peso fresco de raíz y 1.5 g de peso seco aéreo y de raíz. Después de la FITO

del suelo impactado por ARA, *S. vulgare* con *A. niger* y *P. chrysogenum*, disminuyó el ARA del suelo de 13,057 ppm a 2,649 ppm, valor inferior al máximo permisible de la NOM-138. Este biotratamiento del suelo impactado por ARA por medio de la BIS y FITO es una técnica eficiente y amigable con el ambiente, que devuelve la fertilidad del suelo a diferencia de los tratamientos convencionales de residuos peligrosos que son costosos y contaminantes.

Palabras clave: Suelo, aceite residual automotriz, residuo peligroso, microorganismos, plantas, mineralización.

INTRODUCCIÓN

El aceite residual automotriz (ARA), es un fluido compuesto por hidrocarburos (HICO) que, de acuerdo con Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente de México y la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA, 1996), es un residuo peligroso que comúnmente contamina el suelo. Lo anterior representa uno de los problemas ambientales más importantes a nivel mundial. La norma mexicana NOM-138- SEMARNAT/ssa1-2012 (NOM-138) establece como límite máximo permisible de HICO en suelo de 4,400 ppm. En el suelo el ARA forma una película en la superficie del suelo que se expande horizontalmente e imposibilita los ciclos biogeoquímicos, ya que, sin aireación en el suelo, el pH se acidifica, en consecuencia, algunos minerales esenciales para las plantas no están químicamente disponibles y se reduce la producción agrícola (Haleyur *et al.*, 2019). Mientras que otra parte del ARA se infiltra verticalmente por la columna del suelo, donde penetra en los microporos y llega a contaminar aguas subterráneas (Akpabio *et al.*, 2017). Normalmente se utilizan técnicas químicas de tratamiento de residuos peligrosos como el suelo impactado

por ARA mediante inyección de oxidantes como el O_3 (ozono), $Na_2S_2O_8$ (persulfato de sodio) y el $KMnO_4$ (permanganato de potasio) que además de costos, causan daños colaterales ambientales y no recuperan la fertilidad del suelo (Perini *et al.*, 2020).

Por otro lado, una estrategia de tratamiento eficiente y amigable con el ambiente, de este residuo peligroso, que asegura la disminución del ARA del suelo a una concentración inferior a la máxima aceptada por la NOM-138, es la biorremediación mediante bioestimulación (BIS) seguida de la fitorremediación (FITO). La BIS consiste en la adición inicial de una solución detergente al 0.5% para emulsificar la mezcla insoluble de HICO, una solución mineral para inducir la oxidación del ARA, un extracto fúngico crudo para hidrolizar los HICO aromáticos del ARA y H_2O_2 (peróxido de hidrogeno) al 0.5% como fuente de O_2 (oxígeno) para acelerar la mineralización del ARA. Luego para eliminar el ARA remanente del suelo, la fitorremediación (FITO) mediante *Sorghum vulgare* que degrada los HICO en las raíces y que se mejora su capacidad al inocularse con hongos filamentosos oxidantes de HICO como *Penicillium chrysogenum* y *Aspergillus niger*. Los objetivos de este trabajo fueron: a) bioestimulación (BIS) de suelo contaminado por 60, 000 ppm de ARA mediante detergente y solución mineral, y b) fitorremediación (FITO) con *Sorghum vulgare*, potenciado con *Penicillium chrysogenum* y *Aspergillus niger* para decrecer el ARA a un valor inferior al máximo establecido por la NOM-138.

MATERIALES Y MÉTODOS

BIOESTIMULACIÓN DEL SUELO CONTAMINADO CON ACEITE RESIDUAL AUTOMOTRIZ

El suelo fue colectado de una zona agrícola

del municipio de Morelia, Mich. El ARA se obtuvo de un taller mecánico automotriz de la ciudad de Morelia, Mich; con el que se contaminó 1 Kg de suelo para obtener una concentración inicial de 60,000 ppm. Después, ese residuo peligroso se colocó en Jarras de Leonard. La bioestimulación se realizó primero con solución detergente comercial al 0.5% Roma®, para emulsificar el ARA del suelo [4]. Posteriormente una bioestimulación cada 3 días con 18 ml de la solución mineral (Abed *et al.*, 2014). Luego se bioestimuló el suelo contaminado dos veces por semana con 8 ml de una solución al 0.5% de H_2O_2 / kg de suelo, para acelerar la oxidación del ARA (Abed *et al.*, 2014). Posteriormente la bioestimulación con 54 ml de extracto fúngico crudo/kg de suelo, sintetizado por *Penicillium chrysogenum*, para hidrolizar los HICO aromáticos (Kadri *et al.*, 2017). Para ello el hongo fue inducido por la presencia de lignina con estructura química similar a los HICO aromáticos (Ogeleka *et al.*, 2020). *P. chrysogenum*, se cultivó previamente en un medio de cultivo con lignina residual obtenida de paja de trigo, 10,0 g / L; peptona de soja, 5,0 g / L; $CuSO_4$, 0,01 g / L; $MgSO_4$, 1,5 g / L; KH_2PO_4 , 1,5 g / L; K_2HPO_4 , 1,5 g / L; NaCl, 0,9 g / L; extracto de levadura, 1,0 g / L; detergente Roma®, 1%, 2,5 mL; solución de oligoelementos 0,001 mL; azul de bromotimol al 0,1%, 10,0 mL. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5,5. Este se incubó durante 20 días a 28 ° C con agitación de 150 rpm a un pH de $5,5 \pm 0,2$, al final se filtró el extracto crudo de hongos (Baltierra *et al.*, 2016) y se ajustó el pH a $6,5 \pm 0,2$ antes de añadirlo para la bioestimulación del suelo contaminado por el ARA. La humedad del suelo se ajustó al 80% de la capacidad de campo. Para el control absoluto, el suelo sin ARA se regó con agua potable. La bioestimulación del suelo contaminado se realizó durante 60 días por sextuplicado (n = 6).

FITORREMEDIACIÓN DE UN SUELO CONTAMINADO POR ACEITE DE MOTOR USADO CON *SORGHUM VULGAR* POTENCIADO CON *ASPERGILLUS NIGER* Y *PENICILLIUM CHRYSOGENUM*

Después de la bioestimulación del suelo contaminado por ARA, se realizó una fitorremediación con *S. vulgare* potenciado con *A. niger*, *P. chrysogenum* o ambos, durante 60 días para concluir la biorremediación. *A. niger* y *P. chrysogenum* se cultivaron en agar y medio líquido, dextrosa y papa (ADP) incubados a 30 ° C / 24 h; luego se inocularon 48 semillas de *S. vulgare* con 5,0 mL de *P. chrysogenum* o *A. niger*, o en una mezcla de ambos en relación 1:1. Esta concentración de hongos se ajustó a un tubo N ° 1 del nefelómetro de Mc Farland equivalente a 3x10⁸ unidades formadoras de propagulos / mL (UFC / mL) (Hussein y Joo, 2018). Posteriormente, se sembraron cuatro semillas de *S. vulgare* en las jarras de suelo contaminado por ARA y se bioestimularon con una solución mineral durante la fitorremediación. Las variables respuesta fueron la biomasa seca aérea y radical de *S. vulgare* a prefloración.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ACEITE DE MOTOR RESIDUAL DE BIOESTIMULACIÓN Y FITORREMEDIACIÓN DE SUELOS

La determinación del ARA en suelo después de 60 días de bioestimulación y 90 días de fitorremediación con *S. vulgare*, fue evaluada por Soxhlet (Miyawaki *et al.*, 2018).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos experimentales fueron analizados estadísticamente con el software Statgraphics Centurion XVII y con Tukey HSD al 0,05% (Walpole, 2007).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PESO FRESCO Y SECO DE *S. VULGARE* EN LA FITORREMEDIACIÓN DEL SUELO

La Tabla 1 presenta el peso fresco y seco de *S. vulgare* a prefloración en la fitorremediación del suelo impactado por ARA. Se reportó el peso fresco aéreo (PFA) más alto de 7.6 g y el peso fresco de la raíz (PFR) de 8.8 g. Mientras que *S. vulgare* que se potenció con *P. chrysogenum*, dichos valores fueron 5.2 g de PFA y 4.1 g de PFR. En contraste, *S. vulgare* en el suelo sin ARA mostró 4.8 g de PFA y 5.2 g de PFR. Mientras que *S. vulgare* con *A. niger* y *P. chrysogenum* reportaron el peso seco aéreo (PSA) y el peso seco de raíz (PSR) más altos de 1.5 g de PSA y PSR. En el caso de *S. vulgare* con *P. chrysogenum* esos valores fueron 1.2 g de PSA y 0.8 de PSR. Mientras que los de *S. vulgare* sin ARA, fueron 0.5 de PSA y 0.2 g de PSR. Estos resultados muestran que los hongos *P. chrysogenum* y *A. niger* potenciaron la capacidad de *S. vulgare* para eliminar una gran parte de los HICO aromáticos del ARA remanente de la BIS, que sugiere que aumentaron el suministro de nutrientes minerales al sorgo para promover su crecimiento en el suelo contaminado a través de la producción de fitohormonas (Prakash y Sheela, 2016). Al respecto se ha reportado que, a su vez, las raíces de plantas como *S. vulgare* estimulan la actividad de *A. niger* y *P. chrysogenum* para mineralizar los HICO (Otero-Blanca *et al.*, 2018).

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ACEITE DE MOTOR RESIDUAL DESPUÉS DE LA BIOESTIMULACIÓN Y FITORREMEDIACIÓN DEL SUELO

La Tabla 2 muestra la concentración del ARA después de 60 días de bioestimulación y 60 días de fitorremediación del suelo. La concentración final de ARA en suelo solo

<i>Sorghum vulgare</i> en suelo	Peso fresco aéreo (g)	Peso fresco de raíz (cm)	Peso seco aéreo (g)	Peso seco de raíz (g)
Control absoluto sin contaminar (irrigado con agua)	4.8 ^c	5.2 ^f	1.1 ^b	0.9 ^b
Control relativo sin contaminar (alimentado con solución mineral al 100%)	4.8 ^c	5.2	1 ^c	0.9 ^b
Suelo con ARA bioestimulado + fitorremediado con <i>Sorghum vulgare</i>	1.8 ^c	0.9 ^e	0.5 ^d	0.2 ^e
Suelo con ARA bioestimulado + fitorremediado con <i>Sorghum vulgare</i> + <i>Aspergillus niger</i>	5.2 ^{a+}	4.1 ^a	1.2 ^b	0.8 ^c
Suelo con ARA bioestimulado + fitorremediado con <i>Sorghum vulgare</i> + <i>Penicillium chrysogenum</i>	2.3 ^d	1.8 ^d	0.6 ^d	0.5 ^d
Suelo con ARA bioestimulado + fitorremediado con <i>Sorghum vulgare</i> + <i>Aspergillus niger</i> + <i>Penicillium chrysogenum</i>	7.6 ^a	8.8 ^a	1.5 ^a	1.5 ^a

*Tukey (0.025) Letras distintas = indican diferencia estadística +

Tabla 1. Biomasa seca de **Sorghum vulgare** después de 60 días de bioestimulación y 60 días de fitorremediación del suelo impactado por aceite residual automotriz.

Suelo contaminado por ARA	Aceite residual automotriz remanente (ppm)	Porcentaje de mineralización (%)
Control negativo (sin bioestimar)	45003 ^f	24,9 ^f
Bioestimulación	13057 ^e	78,2 ^e
Bioestimulación + fitorremediación con <i>Sorghum vulgare</i>	4143 ^{d+}	93 d ⁺
Bioestimulación + fitorremediación con <i>Sorghum vulgare</i> + <i>Aspergillus niger</i>	2649 ^{a+}	95,5 ^{a+}
Bioestimulación + fitorremediación con <i>Sorghum vulgare</i> + <i>Penicillium chrysogenum</i>	3317 ^{b+}	94,4 ^{b+}
Bioestimulación + fitorremediación con <i>Sorghum vulgare</i> + <i>Aspergillus niger</i> + <i>Penicillium chrysogenum</i>	3890 ^{c+}	93,5 ^{c+}

*Tukey (0.025) Letras distintas = indican diferencia estadística + = valores por debajo de lo permitido por la NOM-138.

Tabla 2. Aceite residual automotriz después de 60 días de bioestimulación y 90 días de fitorremediación.

bioestimulado sin fitorremediar fue de 13,057 ppm; lo que indica que fue insuficiente para que el suelo fuera considerado biorremediado de acuerdo al límite máximo permisible establecido por la NOM-138. El suelo bioestimulado y fitorremediado con *S. vulgare* sin inocular mostró una disminución de 13,057 ppm a 4,143 ppm. Mientras que el suelo bioestimulado y fitorremediado con *S. vulgare* potenciado por *A. niger* y *P. chrysogenum* redujo el ARA a 3,890 ppm. Mientras tanto, suelo bioestimulado y fitorremediado con *S. vulgare* potenciado por *P. chrysogenum* a 3317, y el suelo bioestimulado y fitorremediado con el sorgo potenciado con *A. niger* mostró la mayor disminución del ARA hasta 2,649 ppm, todas las concentraciones anteriores, fueron inferiores al máximo permisible por la NOM-138, lo que considera al suelo recuperado. Lo anterior se debe a que con la bioestimulación del suelo impactado por ARA mediante detergente emulsificó el ARA (Mao *et al.*, 2015; Shah *et al.*, 2016), mientras que la solución mineral restableció la relación C: N (Alexander, 1977), seguido del H₂O₂, (peróxido de hidrógeno) que aceleró la oxidación del ARA (Mariano *et al.*, 2007); complementariamente con el extracto fúngico que se sugiere hidrolizó los HICO aromáticos y que el control de la humedad al 80% aumentó la disposición de O₂, lo que en conjunto permitió que los microorganismos mineralizaran una parte del ARA. Posteriormente la fitorremediación del suelo con *S. vulgare* inoculado con *A. niger*, promovió el crecimiento del sorgo y aumentó la mineralización del ARA (Izinyon y Seghosime, 2013). Se ha registrado que los hongos utilizan los HICO como fuente de carbono y energía y los asimilan en la biomasa fúngica. Además, las membranas celulares de los hongos son permeables a muchos contaminantes orgánicos como los HICO

y estos pueden ser degradados por enzimas intracelulares como citocromo P450 (Ostrem Loss y Yu 2018) y nitrorreductasas (Tripathi *et al.* 2017), hasta llegar a compuestos orgánicos más simples, seguidos de un metabolismo posterior como la b-oxidación y la entrada en el ciclo del ácido tricarbóxico (Varjani, 2017). Por lo anterior, el suelo impactado por el ARA fue recuperado de acuerdo con la NOM-138 en un tiempo relativamente corto, y sin causar daños colaterales, comparado con otras técnicas de tratamiento de residuos peligrosos. Mientras que el suelo control negativo mostró un ligero decremento a 45003 ppm de ARA, donde según lo informado por Agnello *et al.*, 2016, la falta de nutrientes por bioestimulación y fitorremediación impidió que los microorganismos mineralizaran la mayor parte del ARA.

CONCLUSIONES

El biotratamiento de suelo impactado por ARA como residuo peligroso a través de la BIS y FITO, es una técnica eficiente y ambientalmente segura que devuelve la fertilidad del suelo, a diferencia de los tratamientos de residuos peligrosos comunes.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Universidad de Harvard, Cambridge, Ma, EUA, Fundación Rockefeller 2022. Proyecto 2.7 (2022) y BIONUTRA, SA CV Maravatio, Mich, Mexico y a Conacyt por el apoyo.

REFERENCIAS

1. Abed, R. M., Al-Sabahi, J., Al-Maqrashi, F., Al-Habsi, A., & Al-Hinai, M. (2014). Characterization of hydrocarbon-degrading bacteria isolated from oil-contaminated sediments in the Sultanate of Oman and evaluation of bioaugmentation and biostimulation approaches in microcosm experiments. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 89, 58-66. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.01.006>
2. Agnello, A. C., Bagard, M., van Hullebusch, E. D., Esposito, G., & Huguenot, D. (2016). Comparative bioremediation of heavy metals and petroleum hydrocarbons co-contaminated soil by natural attenuation, phytoremediation, bioaugmentation and bioaugmentation-assisted phytoremediation. *Science of the Total Environment*, 563, 693-703. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.061>
3. Akpabio, G. T., Udoinyang, I. E., & Basil, T. S. (2017). Effect of used motor oil contamination on geotechnical properties of clay soil on Uyo-Akwa Ibom. *J. Nat. Sci. Res*, 5(2), 22-30. <https://doi.org/10.18488/journal.63.2017.52.22.30>
4. Alexander M. (1977). *Introducción a la microbiología del suelo*. Transformaciones microbianas del fósforo. 355-361. AGT Editor, S. A. México D.F.
5. Baltierra-Trejo, E., Silva-Espino, E., Márquez-Benavides, L., & Sánchez-Yáñez, J. M. (2016). Inducción de la degradación de lignina de paja de trigo en aromáticos por *Aspergillus* spp. y *Penicillium chrysogenum*. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 7(1), 10-19. <https://doi.org/10.4067/S2072-92942016000100003>
6. Haleyur, N., Shahsavari, E., Jain, S. S., Koshlaf, E., Ravindran, V. B., Morrison, P. D., ... & Ball, A. S. (2019). Influence of bioaugmentation and biostimulation on PAH degradation in aged contaminated soils: Response and dynamics of the bacterial community. *Journal of environmental management*, 238, 49-58. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.02.115>
7. Hussein, K. A., & Joo, J. H. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria improved salinity tolerance of *Lactuca sativa* and *Raphanus sativus*. *Journal of microbiology and biotechnology*, 28(6), 938-945. <https://doi.org/10.4014/jmb.1712.12027>
8. Izinyon, O. C., & Seghosime, A. (2013). Assessment of show star grass (*Melampodium paludosum*) for phytoremediation of motor oil contaminated soil. *Assessment*, 3(3).
9. Kadri, T., Rouissi, T., Brar, S. K., Cledon, M., Sarma, S., & Verma, M. (2017). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungal enzymes: A review. *Journal of environmental sciences*, 51, 52-74. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2016.08.023>
10. Ley general del equilibrio ecológico y la protección al ambiente. México: Cámara de Diputados H. Congreso de la Unión; Última reforma DOF 18/01/2021; 2021.
11. Mao, X., Jiang, R., Xiao, W., & Yu, J. (2015). Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: a review. *Journal of hazardous materials*, 285, 419-435. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.12.009>
12. Mariano, A. P., Kataoka, A. P. D. A. G., Angelis, D. D. F. D., & Bonotto, D. M. (2007). Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(2), 346-353. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000200030>
13. Miyawaki, T., Tobiishi, K., Takenaka, S., & Kadokami, K. (2018). A rapid method, combining microwave-assisted extraction and gas chromatography-mass spectrometry with a database, for determining organochlorine pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in soils and sediments. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 27(1), 31-45. <https://doi.org/10.1080/15320383.2017.1360245>
14. NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012. Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificación para la remediación. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Diario Oficial de la Federación. 10 de septiembre de 2010.
15. Ogeleka, D., Bokolo, P., & Omoregie, G. (2020). Assessment of the Phytotoxic Effects and Ecological Risks to *Phaseolus vulgaris* Planted on Crude Oil Spiked Soils. *Tanzania Journal of Science*, 46(1), 116-128.
16. Ostrem Loss EM, Yu JH. 2018. Bioremediation and microbial metabolism of benzo(a)pyrene. *Mol Microbiol*. 109(4):433-444. doi:10.1111/ mmi.14062

17. Otero-Blanca, A., Folch-Mallol, J. L., Lira-Ruan, V., Carbente, M. D. R. S., & Batista-García, R. A. (2018). Phytoremediation and Fungi: An Underexplored Binomial. In *Approaches in Bioremediation* (pp. 79-95). Springer, Cham.
18. Perini, B. L. B., Bitencourt, R. L., Daronch, N. A., dos Santos Schneider, A. L., & de Oliveira, D. (2020). Surfactant-enhanced in-situ enzymatic oxidation: A bioremediation strategy for oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soils and aquifers. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(4), 104013. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104013>
19. Prakash D, Sheela S. 2016. Beneficial role of rhizosphere mycoflora in the field of agriculture: an overview. *Int J Sci Res*. 5(8):529–533
20. Shah, A., Shahzad, S., Munir, A., Nadagouda, M. N., Khan, G. S., Shams, D. F., ... & Rana, U. A. (2016). Micelles as soil and water decontamination agents. *Chemical reviews*, 116(10), 6042-6074. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00132>
21. Tripathi V, Edrisi SA, Chen B, Gupta VK, Vilu R, Gathergood N, Abhilash PC. 2017. Biotechnological advances for restoring degraded land for sustainable development. *Trends Biotechnol*. 35(9):847–859. doi:10.1016/j.tibtech.2017.05.001.
22. US EPA (1996). "Managing Used Oil: Advice for Small Businesses". Report. 530EPA-F-96-004. Web Map Tile Service, 1. http://www.cprac.org/docs/olis_eng.pdf (20.06.2019).
23. Varjani SJ. 2017. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresour Technol*. 223:277–286. doi:10.1016/j.biortech.2016.10.037
24. Walpole ER, Myers R, Myers LS. *Probabilidad & Estadística para Ingeniería & Ciencias*. Ed. Pearson. 2007. 8ª. México. 509