

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL  
DE HUAMANGA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**TESIS:**

**Capacidad biodegradadora de petróleo diésel por bacterias  
endofíticas aisladas de *Cannabis* sp., Ayacucho 2023**

Para optar el título profesional de:

**BIÓLOGO, ESPECIALIDAD: MICROBIOLOGÍA**

PRESENTADO POR:

**Bach. Maximo Rafael SOSA GARCIA**

ASESOR:

**Dr. Saúl Alonso CHUCHÓN MARTÍNEZ**

COASESORES:

**Mg. Alexandra Antonieta URRUTIA ZEGARRA**

**Mg. Pedro Mauricio DELGADILLO CORONADO**

**AYACUCHO - PERÚ**

**2025**

A mi familia, por su amor y apoyo incondicional, y a quienes estuvieron a mi lado en los momentos difíciles.

Este trabajo es un reflejo del esfuerzo conjunto y de los ánimos que me impulsaron a seguir adelante. Gracias por creer en mí.

## AGRADECIMIENTOS

A mi *Alma Mater*, la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, a la Facultad de Ciencias Biológicas y a la Escuela Profesional de Biología, por brindarme una formación académica integral y las herramientas necesarias para culminar esta etapa profesional, su respaldo institucional fue fundamental para la materialización de esta investigación.

Al Dr. Saúl Alonso Chuchón Martínez, mi asesor, por su predisposición, rigor científico y mentoría durante las fases de esta investigación; su visión crítica y apoyo metodológico fueron pilares para alcanzar los objetivos planteados.

A la Mg. Alexandra Antonieta Urrutia Zegarra, coasesora, por guiarme en el dominio de técnicas moleculares y bioinformáticas; sus capacitaciones detalladas, así como sus consejos profesionales y personales, fortalecieron tanto el desarrollo de esta investigación como mi crecimiento integral.

Al Mg. Pedro Mauricio Delgadillo Coronado, coasesor, por orientarme e impartirme sus conocimientos previos en biodegradación de hidrocarburos y análisis estadístico; su paciencia y dedicación durante las etapas experimentales enriquecieron sustancialmente el enfoque de esta investigación.

Al grupo de investigadores de la Facultad de Ciencias Físicas y Formales, Escuela Profesional de Química, de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, liderado por la Dra. Janet Rossana Zegarra López, por su apoyo técnico en el marco del proyecto “Influencia del medio de cultivo en el mejoramiento de la calidad del aceite esencial medicinal de *Cannabis* sp. y su adecuación en el departamento de Arequipa” (contrato IBA-IB-03-2019); agradezco la provisión de la muestra de raíz de “cáñamo”, recurso indispensable.

A los catedráticos de las distintas áreas académicas y al personal de apoyo técnico-administrativo, por compartir su experiencia técnica y facilitar el acceso a sus laboratorios y equipos; sus contribuciones operativas y académicas fueron determinantes para superar los desafíos experimentales.

## ÍNDICE GENERAL

	Página
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xvii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.1.1. Antecedentes internacionales	3
2.1.2. Antecedentes nacionales	7
2.1.3. Antecedentes locales	7
2.2. Marco conceptual	7
2.2.1. Hidrocarburo	7
2.2.2. Petróleo	7
2.2.3. Diésel	8
2.2.4. Microorganismos endofíticos	8
2.2.5. Cepa	8
2.2.6. Consorcio microbiano	8
2.2.7. Biodegradación	9
2.2.8. Biorremediación	9
2.2.9. Modelado cinético en biología	9
2.3. Base teórica	9
2.3.1. Clasificación y características de los hidrocarburos en el diésel	9
2.3.2. Contaminación por petróleo y derivados	11
2.3.3. Remediación del ambiente	13
2.3.4. <i>Cannabis</i> sp.	14
2.3.5. Identificación de cepas microbianas	19
2.3.6. Secuenciamiento de Genoma Completo (WGS) para la identificación microbiana	19
2.3.7. Enfoque bioinformático	21
III. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1. Área de estudio	23
3.1.1. Ubicación política	23

3.1.2.	Ubicación geográfica	23
3.2.	Tipo y nivel de investigación	23
3.3.	Población y muestra	23
3.3.1.	Población	23
3.3.2.	Unidad muestral	23
3.4.	Metodología y recolección de datos	23
3.4.1.	Preparación de reactivos y medios de cultivo	23
3.4.2.	Obtención, transporte y manejo de la muestra vegetal	24
3.4.3.	Aislamiento y cultivo de cepas bacterianas endofíticas	24
3.4.4.	Adaptación y selección de cepas bacterianas con capacidad degradadora de petróleo diésel	26
3.4.5.	Evaluación experimental de la biodegradación del petróleo diésel	26
3.4.6.	Determinación de la cinética de degradación	28
3.4.7.	Purificación de ADN genómico	29
3.4.8.	Análisis de pureza de ADN	30
3.4.9.	Análisis de integridad de ADN	30
3.4.10.	Secuenciamiento de ADN	31
3.4.11.	Ubicación taxonómica <i>in silico</i>	32
3.5.	Análisis estadístico e interpretación de datos	32
IV.	RESULTADOS	35
V.	DISCUSIÓN	49
VI.	CONCLUSIONES	65
VII.	RECOMENDACIONES	67
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
IX.	ANEXOS	81

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página	
Tabla 1	Influencia en la salud y el entorno ambiental por los vertidos de hidrocarburos.	11
Tabla 2	Procesos de transformación y transporte del petróleo.	12
Tabla 3	Métodos de remediación de suelo y agua subterránea.	13
Tabla 4	Ubicación taxonómica de <i>Cannabis</i> sp.	15
Tabla 5	Parámetros cinéticos de primer orden para la producción neta de CO <sub>2</sub> (g/L) al día 60, por degradación de petróleo diésel a distintas concentraciones iniciales, usando bacterias endofíticas de <i>Cannabis</i> sp, Ayacucho 2024.	40
Tabla 6	Identificación molecular de las bacterias endofíticas de <i>Cannabis</i> sp. degradadoras de petróleo diésel mediante análisis bioinformático Kraken2 (genoma total) y NCBI BLAST (región 16S ARNr), Ayacucho 2024.	41

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1	Clasificación general de los hidrocarburos de petróleo. 10
Figura 2	Morfología de <i>Cannabis</i> sp. 15
Figura 3	Esquema de las vías de fitorremediación de contaminantes emergentes de interés en entornos contaminados (agua, suelo y aire). 16
Figura 4	Catabolismo aeróbico de hidrocarburos alifáticos y aromáticos por oxigenasas. 17
Figura 5	Propuesta de línea de producción de cáñamo industrial con enfoque local en economía circular. 18
Figura 6	Diferencia de la tecnología de secuenciación por generación. 20
Figura 7	Producción acumulativa de CO <sub>2</sub> (g/L), como efecto de la degradación de petróleo diésel a distintas concentraciones iniciales, por cepas y consorcio de bacterias endofíticas de <i>Cannabis</i> sp. “cáñamo”, Ayacucho 2023. 37
Figura 8	Producción neta de CO <sub>2</sub> (g/L), como efecto de la degradación de petróleo diésel a distintas concentraciones iniciales, por cepas y consorcio de bacterias endofíticas de <i>Cannabis</i> sp. “cáñamo”, Ayacucho 2023. 38
Figura 9	Porcentaje de volumen residual de petróleo diésel al día 60, como efecto de la degradación a distintas concentraciones iniciales, por cepas y consorcio de bacterias endofíticas de <i>Cannabis</i> sp. “cáñamo”, Ayacucho 2023. 39
Figura 10	Ajuste cinético de primer orden $\ln(C_0/C)$ en la producción neta de CO <sub>2</sub> (g/L) hasta el día 60, como efecto de la degradación de petróleo diésel a distintas concentraciones iniciales, por cepas y consorcio de bacterias endofíticas de <i>Cannabis</i> sp. “cáñamo”, Ayacucho 2024. 40
Figura 11	Diferencias estadísticas (Test de Duncan) en la producción neta de CO <sub>2</sub> (g/L) al día 05, como efecto de la degradación de petróleo diésel a distintas concentraciones iniciales, por

	cepas y consorcio de bacterias endofíticas de <i>Cannabis</i> sp. “cáñamo”, Ayacucho 2024.	43
Figura 12	Diferencias estadísticas (Test de Duncan) en la producción neta de CO <sub>2</sub> (g/L) al día 10, como efecto de la degradación de petróleo diésel a distintas concentraciones iniciales, por cepas y consorcio de bacterias endofíticas de <i>Cannabis</i> sp. “cáñamo”, Ayacucho 2024.	44
Figura 13	Diferencias estadísticas (Test de Duncan) en la producción neta de CO <sub>2</sub> (g/L) al día 15, como efecto de la degradación de petróleo diésel a distintas concentraciones iniciales, por cepas y consorcio de bacterias endofíticas de <i>Cannabis</i> sp. “cáñamo”, Ayacucho 2024.	45
Figura 14	Diferencias estadísticas (Test de Duncan) en la producción neta de CO <sub>2</sub> (g/L) al día 20, como efecto de la degradación de petróleo diésel a distintas concentraciones iniciales, por cepas y consorcio de bacterias endofíticas de <i>Cannabis</i> sp. “cáñamo”, Ayacucho 2024.	46
Figura 15	Diferencias estadísticas (Test de Duncan) en el porcentaje de ml residual de petróleo diésel al día 60, como efecto de la degradación a distintas concentraciones iniciales, por cepas y consorcio de bacterias endofíticas de <i>Cannabis</i> sp. “cáñamo”, Ayacucho 2024.	47

## ÍNDICE DE ANEXOS

	Página	
Anexo 1	Composición de los medios de cultivo utilizados para el aislamiento, cultivo y biodegradación de petróleo diésel por bacterias endofíticas de <i>Cannabis</i> sp., Ayacucho 2023.	83
Anexo 2	Constancia de donación de la muestra vegetal (raíz) de <i>Cannabis</i> sp.	84
Anexo 3	Aislamiento, adaptación y selección de cepas bacterianas endofíticas de la raíz de <i>Cannabis</i> sp. degradadoras de petróleo diésel, Laboratorio de Microbiología Ambiental, Ayacucho 2023.	85
Anexo 4	Caracterización morfológica macro y microscópica de siete cepas bacterianas endofíticas aisladas de la raíz de <i>Cannabis</i> sp. y adaptadas al 15 % de petróleo diésel, Ayacucho 2023.	86
Anexo 5	Sistema de matraz biómetro agitado modificado para captura de CO <sub>2</sub> en la degradación de petróleo diésel por bacterias endofíticas aisladas de <i>Cannabis</i> sp., Ayacucho 2023.	90
Anexo 6	Evaluación de la biodegradación de petróleo diésel por bacterias endofíticas aisladas de <i>Cannabis</i> sp., Laboratorio de Microbiología Ambiental, Ayacucho 2023.	91
Anexo 7	Datos completos de producción de CO <sub>2</sub> acumulada (g/L) de la degradación de petróleo diésel por bacterias endofíticas de <i>Cannabis</i> sp., Ayacucho 2023.	92
Anexo 8	Datos de la Figura 7: producción acumulada de CO <sub>2</sub> (g/L), como efecto de la degradación de petróleo diésel a distintas concentraciones iniciales, por cepas y consorcio de bacterias endofíticas de <i>Cannabis</i> sp., Ayacucho 2023.	97
Anexo 9	Datos de la Figura 8: producción neta de CO <sub>2</sub> (g/L), como efecto de la degradación de petróleo diésel a distintas concentraciones iniciales, por cepas y consorcio de bacterias endofíticas de <i>Cannabis</i> sp., Ayacucho 2023.	98
Anexo 10	Datos de la Figura 9: porcentaje de volumen residual de petróleo diésel al día 60, como efecto de la degradación a distintas concentraciones iniciales, por cepas y consorcio de bacterias endofíticas de <i>Cannabis</i> sp., Ayacucho 2023.	99

Anexo 11	Datos de la Figura 10: ajuste cinético de primer orden $\ln(C_0/C)$ en la producción neta de $\text{CO}_2$ (g/L) hasta el día 60, como efecto de la degradación de petróleo diésel a distintas concentraciones iniciales, por cepas y consorcio de bacterias endofíticas de <i>Cannabis</i> sp., Ayacucho 2024.	100
Anexo 12	Comparación de los índices de ajuste ( $R^2$ ) de modelos cinéticos de orden cero, primer orden y segundo orden en la degradación de petróleo diésel por cepas y consorcio de bacterias endofíticas de <i>Cannabis</i> sp., Ayacucho 2024.	101
Anexo 13	Prueba de normalidad y homogeneidad de los datos de producción neta de $\text{CO}_2$ (g/L) por día, como efecto de la degradación de petróleo diésel a distintas concentraciones iniciales, por cepas y consorcio de bacterias endofíticas de <i>Cannabis</i> sp., Ayacucho 2024.	102
Anexo 14	Prueba de diferencia significativa ANOVA en la producción neta de $\text{CO}_2$ (g/L) por día, como efecto de la degradación de petróleo diésel a distintas concentraciones iniciales, por cepas y consorcio de bacterias endofíticas de <i>Cannabis</i> sp., Ayacucho 2024.	103
Anexo 15	Prueba de normalidad y homogeneidad de los datos de porcentaje de ml residual de petróleo diésel al día 60, como efecto de la degradación a distintas concentraciones iniciales, por cepas y consorcio de bacterias endofíticas de <i>Cannabis</i> sp., Ayacucho 2024.	104
Anexo 16	Prueba de diferencia significancia ANOVA de los datos de porcentaje de ml residual de petróleo diésel al día 60, como efecto de la degradación a distintas concentraciones iniciales, por cepas y consorcio de bacterias endofíticas de la raíz de <i>Cannabis</i> sp., Ayacucho 2024.	105
Anexo 17	Extracción, purificación y análisis de pureza de ADN genómico para bacterias aisladas de <i>Cannabis</i> sp., Laboratorio de Inmunología y Microbiología Clínica, Ayacucho 2024.	106
Anexo 18	Resultados de la pureza de ADN (longitud de onda vs absorbancia en 10 mm) mediante espectrofotometría UV-	

	Vis/fluorómetro DeNovix DS-11 de las bacterias endofíticas aisladas de <i>Cannabis</i> sp., Ayacucho 2024.	107
Anexo 19	Resultado de la evaluación de la integridad del ADN purificado de bacterias endofíticas aisladas de <i>Cannabis</i> sp. por electroforesis Gelato minipcr, Laboratorio de Inmunología y Microbiología Clínica, Ayacucho 2024.	108
Anexo 20	Reporte de longitud y calidad promedio de lecturas, <i>NanoPlot</i> , del secuenciamiento con <i>Flongle</i> (Oxford Nanopore) bacterias endofíticas aisladas de <i>Cannabis</i> sp., Laboratorio de Inmunología y Microbiología Clínica, Ayacucho 2024.	109
Anexo 21	Visualización de <i>contigs</i> generados tras el ensamblaje del ADN de siete cepas endofíticas aisladas de <i>Cannabis</i> sp. con <i>Flye</i> y representados con <i>Bandage</i> , Ayacucho 2024.	110
Anexo 22	Herramientas bioinformáticas utilizadas en la ubicación taxonómica <i>in silico</i> de las siete cepas bacterianas aisladas de la raíz de <i>Cannabis</i> sp. mediante Galaxy, SnapGene y NCBI BLAST, Ayacucho 2024.	111
Anexo 23	Ubicación taxonómica de la cepa A aislada de <i>Cannabis</i> sp mediante análisis bioinformático con Kraken2 (genoma total) y NCBI BLAST (región 16S ARNr), Ayacucho 2024.	112
Anexo 24	Ubicación taxonómica de la cepa B aislada de <i>Cannabis</i> sp mediante análisis bioinformático con Kraken2 (genoma total) y NCBI BLAST (región 16S ARNr), Ayacucho 2024.	113
Anexo 25	Ubicación taxonómica de la cepa C aislada de <i>Cannabis</i> sp mediante análisis bioinformático con Kraken2 (genoma total) y NCBI BLAST (región 16S ARNr), Ayacucho 2024.	114
Anexo 26	Ubicación taxonómica de la cepa D aislada de <i>Cannabis</i> sp mediante análisis bioinformático con Kraken2 (genoma total) y NCBI BLAST (región 16S ARNr), Ayacucho 2024.	115
Anexo 27	Ubicación taxonómica de la cepa E aislada de <i>Cannabis</i> sp mediante análisis bioinformático con Kraken2 (genoma total) y NCBI BLAST (región 16S ARNr), Ayacucho 2024.	116
Anexo 28	Ubicación taxonómica de la cepa F aislada de <i>Cannabis</i> sp mediante análisis bioinformático con Kraken2 (genoma total) y NCBI BLAST (región 16S ARNr), Ayacucho 2024.	117

Anexo 29	Ubicación taxonómica de la cepa G aislada de <i>Cannabis</i> sp mediante análisis bioinformático con Kraken2 (genoma total) y NCBI BLAST (región 16S ARNr), Ayacucho 2024.	118
Anexo 30	Decreto supremo N°. 018-2022-EM sobre la comercialización de petróleo diésel ultra bajo en azufre, El Peruano.	119
Anexo 31	Especificaciones técnicas del petróleo diésel B5 S-50 Ultra Petroperú.	120
Anexo 32	Decreto supremo N° 005-2019-SA – Ley N° 30681: Respaldo legal para el transporte de <i>Cannabis</i> sp. no psicoactivo.	121
Anexo 33	Matriz de consistencia.	123

## RESUMEN

Se evaluó la capacidad biodegradadora de petróleo diésel por bacterias endofíticas aisladas de *Cannabis* sp. “cáñamo”. El estudio experimental se realizó en los laboratorios de Microbiología Ambiental, e Inmunología y Microbiología Clínica de la UNSCH. Se aislaron siete cepas bacterianas endofíticas de la raíz, caracterizadas macroscópica y microscópicamente, adaptadas y seleccionadas por su tolerancia en medio mínimo M9 con 15 % de diésel; la biodegradación fue evaluada durante 60 días en sistemas de matraces biométricos modificados, con cepas individuales y en consorcio, expuestas a 1, 3, 5 y 7 % de diésel. Se midió el CO<sub>2</sub> acumulado cada cinco días mediante titulación (g de CO<sub>2</sub>/L) y diésel residual al día 60 por centrifugación y volumetría. Se extrajo y evaluó la pureza e integridad del ADN, secuenciando el genoma completo (WGS) y la región 16S por PCR *in silico*, identificando *Pseudomonas citronellolis* (A), *Acinetobacter calcoaceticus/baumannii* complex (B, D), *Pseudomonas putida* (C), *Pseudomonas* sp. FDAARGOS\_380 (E), *Acinetobacter calcoaceticus* (F) y *Acinetobacter schindleri* (G). Los resultados analizados por ANOVA y Duncan ( $p < 0,05$ ) mostraron que a 1 % todas las cepas y consorcio lograron 100 % de degradación (0,001129 g de CO<sub>2</sub>/L). A 3 %, E (12,2 %) y G (16,7 %) fueron menos eficientes frente a otras cepas y consorcio (43,3-62,2 %). A 5 %, A (36,7 %) y B (33,3 %) destacaron. A 7 %, F (17,6 %) y A (16,7 %) superaron a E y G (11 %). La producción de CO<sub>2</sub> reflejó los porcentajes de degradación. La cinética de primer orden evidenció que, a mayor concentración de diésel, la velocidad de degradación ( $k_1$ ) disminuyó y el tiempo de vida media ( $T_{1/2}$ ) aumentó, reflejando inhibición metabólica. Estos hallazgos destacan el potencial de *Pseudomonas* spp. y *Acinetobacter* spp. para degradar diésel a concentraciones elevadas, siendo el consorcio más estable y competitivo.

**Palabras clave:** biodegradación, petróleo diésel, microorganismos endofíticos, *Cannabis* sp, cinética de primer orden.

## I. INTRODUCCIÓN

La presente investigación se refiere al tema de la evaluación de la capacidad biodegradadora de petróleo diésel por bacterias endofíticas aisladas de *Cannabis* sp. en medio líquido, que se puede definir como un enfoque biotecnológico sostenible que usa bacterias para mitigar la contaminación por hidrocarburos en sistemas acuáticos. Bacterias como *Pseudomonas* spp. y *Acinetobacter* spp. pueden reducir la fitotoxicidad, degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) con enzimas, con una menor competencia por nutrientes que las rizobacterias, siendo una alternativa eficiente frente a técnicas físico-químicas (Wang y Dai, 2011; Barac *et al.*, 2004). La contaminación por hidrocarburos, intensificada desde el siglo XIX, es un problema crítico por actividades industriales y derrames. Entre 2010 y 2022, se registraron 63 derrames > 700 toneladas a nivel global (ITOPF, 2025; Shahidul y Tanaka, 2004). En Perú, el sector hidrocarburos, que pese al aporte al Producto Interno Bruto (PIB) (MINEM, 2023), generó 3 231 pasivos ambientales entre 1997 y 2020, con 151 de alto riesgo, como el derrame de 11,900 barriles en Ventanilla en 2022 (León y Zúñiga, 2022; Bisso, 2022). Que afecta la calidad del agua y cultivos agrícolas amenazando la seguridad alimentaria (FAO y UNEP, 2021). La característica principal de este tipo de contaminación es su persistencia, debido a la baja solubilidad de compuestos de HAPs y los alcanos, que resisten la degradación natural. Para analizar esta problemática es necesario mencionar sus causas. Una de ellas es la dependencia de combustibles fósiles y actividades extractivas sin medidas preventivas. Otra es la infraestructura obsoleta, como oleoductos en la Amazonía, que incrementa el riesgo de derrames. Además, la falta de regulaciones y la lenta adopción de tecnologías sostenibles agravan el impacto ambiental (León y Zúñiga, 2022). El interés de este estudio es desarrollar una solución sostenible mediante la biorremediación con bacterias endofíticas de *Cannabis* sp., elegida por su capacidad de fitoextracción de HAPs y metales pesados, y por estimular

comunidades microbianas endofíticas que degradan hidrocarburos mediante enzimas (Y. Wu *et al.*, 2021; Karigar y Rao, 2011). Su rápido crecimiento y alta producción de biomasa la hacen ideal para las industrias de fibra, papel y bioenergía, apoyando un modelo de economía circular (Linger *et al.*, 2002). Comparada con *Medicago sativa*, *Cannabis* sp. degrada 65 % de HAPs frente a 45 % en otras especies (Doty, 2008). Según Linger *et al.*, (2002), *Cannabis sativa* cultivada en entornos contaminados mantiene la calidad de su fibra, permitiendo usos industriales. No obstante, T. Wu *et al.*, (2018) señalan vacíos sobre los endofíticos y la degradación de hidrocarburos en medios líquidos, influida por pH y nutrientes; justifican la necesidad de investigaciones sobre *Cannabis* sp.

Frente a estas limitaciones y considerando la relevancia de la biorremediación para mitigar la contaminación por hidrocarburos, este estudio evalúa la capacidad biodegradadora de bacterias endofíticas de *Cannabis* sp. frente a petróleo diésel en concentraciones de 1, 3, 5 y 7 % (v/v) en medio líquido M9. El trabajo incluye tres etapas: aislamiento y adaptación de cepas, ensayos de degradación, y análisis molecular. La metodología incluye el aislamiento en medio M9, ensayos en matraces biométricos para CO<sub>2</sub>, modelado cinético, identificación molecular mediante secuenciación genómica (WGS) y PCR *in silico* del gen 16S ARNr. Las limitaciones incluyen la variabilidad de las condiciones del medio, la validación de resultados en sistemas acuáticos reales, y restricciones regulatorias para el uso de *Cannabis* sp. Los resultados buscan optimizar la biorremediación al demostrar la eficiente capacidad degradadora de bacterias endofíticas de *Cannabis* sp., estableciendo fundamentos para su uso sostenible en contextos como el Perú.

### **Objetivo general**

Evaluar la capacidad biodegradadora del petróleo diésel por las bacterias endofíticas aisladas de *Cannabis* sp.

### **Objetivos específicos**

- Evaluar la capacidad degradadora de petróleo diésel en diferentes concentraciones por cepas bacterianas endofíticas de *Cannabis* sp.
- Determinar la capacidad degradadora de petróleo diésel en diferentes concentraciones por consorcios bacterianos endofíticos de *Cannabis* sp.
- Analizar la cinética de degradación de petróleo diésel por cepas individuales y consorcios bacterianos endofíticos de *Cannabis* sp.
- Identificar molecularmente las bacterias endofíticas de *Cannabis* sp. con capacidad degradadora de petróleo diésel.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes

#### 2.1.1. Antecedentes internacionales

Lal y Khanna (1996) investigaron el potencial de degradación del petróleo crudo proveniente de India (Bombay High y Gujarat) en ensayos con matraces, con 100 ml de medio sal mineral con 1 000 mg de petróleo y 1 % (v/v) del inóculo, cuantificado por cromatografía los días 2, 5, 10 y 15 por *Acinetobacter calcoaceticus* y *Alcaligenes odorans*, obteniendo degradaciones del 50 y 45 % para Bombay High, y del 29 y 37 % para Gujarat, respectivamente. El consorcio mostró una degradación superior (58 % para Bombay High y 40 % para Gujarat). Zhang *et al.* (1998), compararon la biodegradación de biodiésel y diésel en medios acuáticos utilizando evolución de CO<sub>2</sub> (EPA 560/6-82-003), DBO<sub>5</sub> (EPA 405.1), DQO (EPA 410) y cromatografía de gases con un inóculo mixto a diferentes concentraciones de mg de carbono/L hasta el día 14. Concluyeron que las mezclas de biodiésel/diésel mostraron una mayor biodegradabilidad, siguiendo una cinética de primer orden.

Bhattacharya *et al.* (2003), evaluaron la diversidad genética de *Pseudomonas citronellolis* aisladas de sitios contaminados, mostrando degradaciones de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) entre 65 y 96 % mediante técnicas de cultivo de enriquecimiento, con 5 g de suelo en 100 ml de medio mínimo de sales al 1 % (peso/volumen) de lodo aceitoso como fuente de carbono.

Pasqualino *et al.* (2006), estudiaron la biodegradabilidad de biodiésel, diésel y gasolina (y sus mezclas) mediante la evolución de CO<sub>2</sub> en ensayos en matraz agitado (EPA 560/6-82-003), 225 ml de medio nutritivo mineral, 25 ml de inóculo (lodo activado), se midió mediante retro valoración con HCl 0,1 N. Los resultados al día 28 fue para biodiésel 98 %, diésel 50 % y gasolina 56 %, indicando que la

adición de biodiésel mejoraba significativamente la biodegradación, destacando efectos sinérgicos en la degradación de mezclas.

Obayori *et al.* (2009), analizaron cuatro cepas aisladas de suelos contaminados, identificando a *Pseudomonas putida* como la especie con mayor capacidad de degradar varios hidrocarburos (queroseno, gasolina, diésel, aceite de motor y petróleo crudo) con un tiempo de generación entre 3,07 – 8,55 días, logrando degradar el aceite (50 mg/L) más de 70 % en un plazo de 12 días

Roverssi (2011), tuvo como objetivo determinar la capacidad degradativa del biodiésel en muestras de suelo a través de la evaluación de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) 400 g/kg del hidrocarburo y la evolución de CO<sub>2</sub> (EPA 560/6-82-003). En el cual, se evaluó el biodiésel, diésel y la mezcla de ambas en un medio de suelo urbano, además de medir bioestimulantes. obteniendo una mineralización de 3 g de CO<sub>2</sub>/día y el diésel 1 g de CO<sub>2</sub>/día, el porcentaje de remoción del biodiésel fue de 84,65 % al día 24 y un 57 % del diésel al día 35.

Gkorezis (2014), evaluó bacterias asociadas a las plantas en el proceso de remediación de muestras de suelo y agua subterránea afectadas y contaminadas por los hidrocarburos de petróleo. Se encontraron 30 cepas, siendo de la raíz *Acinetobacter oleivorans* y *Acinetobacter calcoaceticus*, y una cepa rizosférica *Staphylococcus aureus*. Para el proceso de biodegradación se cultivó en medio mínimo con 1 000 mg/kg de aceite diésel. Los resultados de interés mostraron una degradación de 40 % por *A. oleivorans*, 41 % por *A. calcoaceticus*,

Jacob y Irshaid (2015), se enfocaron en bacterias degradadoras de tolueno en suelos contaminados por talleres automotrices, la muestra de tierra (10 g) se incubó en 99 ml de medio Stanier con 1 % de tolueno. Entre las cepas identificadas, *Acinetobacter schindleri* mostró tiempos de generación de ocho horas al 1 % de tolueno, incrementándose a 19 horas al 2 %.

Zahid *et al.* (2016), tuvieron como objetivo evaluar el potencial de cepas rizosféricas de *Cannabis sativa* irrigada con aguas residuales de una refinería petrolera, para degradar benceno en medios M9, utilizando concentraciones crecientes (hasta 1 000 mg/L) mediante densidad óptica de OD<sub>600</sub> ≥ 1,1. Se identificaron cepas como *Pseudomonas aeruginosa* (85 % rendimiento), *Bacillus cereus* (83 %) y *Acinetobacter junii* (70 %) en 72 horas.

Remus-Emsermann *et al.* (2016), describieron la fisiología y el genoma completo de *Pseudomonas citronellolis* P3B5, mostrando que codifica genes que permiten

degradar alcanos de cadenas largas y terpenoides y resistencia al estrés, lo que le confiere un alto potencial en biorremediación.

Pardo *et al.* (2017), evaluaron la capacidad biodegradativa del fenol en muestras de aguas tratadas por la explotación petrolera a concentraciones de 500, 800 y 1 200 mg/L. El estudio identificó que la mayoría de bacterias fueron Gram negativo, siendo *Pseudomonas* sp. Sps1 quien tiene mayor relación con *Pseudomonas citronellolis* como la cepa más tolerante, degradando eficientemente fenol a concentraciones de 500 mg/L en 24 a 28 horas.

Iqbal *et al.* (2017), teniendo como antecedente el trabajo de Zahid *et al.* (2015), evaluaron el potencial de biodegradación de benceno y fenol de cepas bacterianas endofíticas de *Cannabis sativa* irrigadas con aguas de una refinería, aislaron siete cepas mediante secuenciación del gen 16S ARNr, el fenol fue degradado casi por completo a 250, 500 y 750 mg/L por *Acromobacter* sp., *Pseudomonas* sp. y *Alcaligenes* sp., mientras que a 1 000 mg/L fue de 81, 72 y 69 % respectivamente; el benceno fue degradado por *Bacillus* sp, *Enterobacter* sp. y *Acitenobacter* sp. mientras que a 1 000 mg/L fue de 80, 72 y 68 % respectivamente, la tasa de degradación se modeló con cinética de primer orden.

Iqbal *et al.* (2019), se enfocaron en el estudio del potencial de promoción del crecimiento vegetal de endófitos bacterianos que degrada diésel. Se realizó el aislamiento de cepas bacterianas endófitas de *Echinochloa crus-galli* (pasto Cockspur) y *Cynodon dactylon* (pasto Bermuda) de un lugar contaminado con petróleo, se evaluó su potencial para degradar compuestos monoaromáticos (fenol, tolueno y xileno) y diésel a través del crecimiento vegetal; las cepas fueron identificadas mediante la secuenciación del gen 16S ARNr, análisis cromatográfico de gases y se aplicó el modelo Monod para determinar la cinética de crecimiento. Se identificaron 13 cepas, siendo J10 *Pseudomonas* sp. el mejor degradador de diésel con mayor promoción de crecimiento, cinética de primer orden, degradando el 69 % de diésel en cuatro días.

Orijude (2019), evaluó la degradación de hidrocarburos por cepas silvestres y mutantes de *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas putida*. Las cepas mutantes, obtenidas mediante exposición a ácido nitroso e irradiación UV, demostraron porcentajes de degradación significativamente superiores en comparación con las silvestres en medio mineral con 0,5; 1; 1,55 y 2 % de petróleo crudo mostrando un crecimiento mayor y crecimiento medio en 2 % de petróleo crudo, el porcentaje de degradación de aceite y grasa por cepas silvestres fueron 87,25 %, 80,25 % y

88,89 %, mientras que las mutantes fueron 96,23 %, 92,60 % y 99,38 % respectivamente. Concluyendo que las bacterias mutantes tienen una mayor capacidad de biodegradación.

Ho *et al.* (2020), se centraron en la caracterización genómica de *Acinetobacter calcoaceticus* CA16, aislada de raíces de canola en suelo canadiense. La cepa degradó entre el 82 % y 92 % de diésel (0,25 – 2 %) en 28 días, apoyada por la presencia de genes degradadores como alk M y xcp R.

Koutinas *et al.* (2021), abordaron la biodegradación mejorada de aguas residuales de perforación a través de la producción de biosurfactantes y polihidroxicanoatos por *Pseudomonas citronellolis* SJTE-3. La cepa mostró reducciones notables en DQO y metabolizó eficientemente compuestos como n-dodecano y naftaleno.

Iskandar *et al.* (2021), tuvieron como objetivo en análisis sistemático y filogenético molecular de bacterias con potencial de biorremediación por el secuenciamiento del gen 16S ARNr. Las cuatro cepas fueron obtenidas de un estudio anterior sobre desechos clínicos, logrando identificar a *Acinetobacter schindleri*, *Stenotrophomonas*, *S. maltophiliphila*, *S. acidaminiphila*, *Pararheinheimera aquatica*, las cuales contienen el potencial de biorremediación.

Paul *et al.* (2022), tuvieron como objetivo la evaluación de *Pseudomonas putida* en la producción de metano y eliminación de hidrocarburos de lodos de refinería de petróleo. Los lodos fueron pretratados con *P. putida*, logrando optimizar en diferentes dosis la solubilización y biodegradación. La degradación en 20 L para una proporción de 0,5 de inóculo dio como resultado la degradación de 57,07 % de petróleo, 62,98 % de aceite y grasa, y 91,9 % de fenol en 50 días.

Varnava *et al.* (2024), examinaron la capacidad de *Pseudomonas citronellolis* 620C para generar electricidad en celdas de combustible microbianas utilizando agua residual aceitosa. Los resultados mostraron una generación de 0,05 mW/m<sup>2</sup> y altos índices de degradación de hidrocarburos, incluidos HAP y n-alcanos, mostrando a través de la cromatografía de gases y espectrometría de masas una alta degradación de petróleo total, hidrocarburos aromáticos policíclicos y ácidos grasos de agua residual en un 74,3 % y algunos n-alcanos > 90 % en 70 días.

Sawadogo *et al.* (2024), caracterizaron dos cepas bacterianas aisladas de aguas residuales, evaluando su capacidad para degradar diésel y aceites usados (SAE40 y SAE50). Constataron que *Acinetobacter calcoaceticus* superó a *Pseudomonas aeruginosa*, especialmente cuando se trabajó en consorcio, la

capacidad de biodegradación se midió por el método gravimétrico logrando una degradación del 65,33 % en 56 días.

### **2.1.2. Antecedentes nacionales**

Llanco y Reategui (2020) se propusieron identificar bacterias capaces de descomponer petróleo en un medio acuático afectado por hidrocarburos en Ucayali. Para ello, recolectaron muestras de dos sitios en la quebrada Añis Caño, en la zona de la empresa MAPLE GAS, utilizando una metodología exploratoria. Las muestras fueron pre enriquecidas por una semana y enriquecido por tres semanas, donde se mostró cambios del petróleo crudo (turbidez y agregados blancos) por la presencia del crecimiento bacteriano. Se identificaron bioquímicamente cinco géneros de bacterias: *Pseudomonas aeruginosa* (predominante), *Acinetobacter* sp., *Enterobacter* sp., *Serratia* sp. y *Citrobacter* sp.

### **2.1.3. Antecedentes locales**

Delgadillo (2024), tuvo como objetivo evaluar la capacidad degradativa del petróleo diésel mediante el efecto de bioestimulación, seleccionando cepas con capacidad biodegradadora (individualmente y consorcios), sometándose a tratamientos con bioestimulantes (nitrato de amonio y superfosfato triple) frente a controles, con concentraciones de diésel a 5, 10, 15 y 20 %. La degradación se cuantificó mediante extracción por agitación-centrifugación y método gravimétrico (mg de diésel/kg de suelo seco), la identificación molecular mediante PCR permitió determinar a *Stenotrophomonas acidaminiphila*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas aeruginosa*. Los tratamientos bioestimulados tuvieron tasas de remoción neta mayores, logrando un 54,7 % y 83,7 % de degradación a concentraciones de 5 y 10 %, respectivamente, en 28 a 70 días, mientras que el control positivo mostró un rendimiento inferior. El subtratamiento M123, que combinó las tres cepas, presentó el mejor desempeño, lo que sugiere que la sinergia entre los microorganismos potencia la biodegradación.

## **2.2. Marco conceptual**

### **2.2.1. Hidrocarburo**

Compuesto orgánico conformado por cadenas de carbono e hidrógeno que a sido formado en el subsuelo debido a reacciones y transformaciones químicas de la materia orgánica que fue depositada con distintas rocas sedimentarias de grano fino en un pasado geológico (Cabanillas *et al.*, 2015).

### **2.2.2. Petróleo**

Compuesto químico llamado etimológicamente “aceite de piedra” formado por

hidrocarburos y pocas proporciones de oxígeno, nitrógeno, azufre y algunos metales. Presentándose en su estado original en sedimentos rocosos y áreas que en el pasado fueron océanos, las condiciones necesarias para su creación incluyen: falta de oxígeno, la existencia de restos de organismos vegetales y animales, altas temperaturas, acción bacteriana entre muchas otras más. Siendo un fluido poco espeso de color variable (a veces verde, amarillo o negro) con olor desagradable y con una densidad de 800 y 950 kg/m<sup>3</sup>, teniendo una composición de 84 a 88 % de carbón y entre 11,5 a 14 % de hidrógeno y el resto de componentes (Martín y Sala, 2004).

### **2.2.3. Diésel**

Derivado del petróleo con C10-C21, aproximadamente 75 % de hidrocarburos saturados (parafinas) y 25 % de hidrocarburos aromáticos (alcalobencenos y naftalenos), con las siguientes propiedades: densidad de 0,84 kg/L a 15 °C, punto de inflamabilidad de 63 °C, viscosidad dinámica de 3,2 mm<sup>2</sup>/s, número de cetano que varía entre 45 y 50, calor de combustión de 44 Mj/kg, umbral de turbidez de 0 °C y residuo de carbón 0,2 %. Su composición es C10-C21 HC, compuestos por: carbono 86,5 %, azufre 0,05 máx., agua 161 ppm, hidrógeno 13 % (Sarmiento, 2008).

### **2.2.4. Microorganismos endofíticos**

Son principalmente bacterias y hongos, aunque también pueden incluir arqueas y en algunos casos protistas que, durante al menos una parte de su ciclo de vida, colonizan de forma asintomática los tejidos internos de las plantas sin provocar daño aparente en el hospedero. Esta definición se centra en el hábitat interno de la planta, permitiendo incluir la amplia diversidad de microorganismos que interactúan con el hospedante, independientemente de si su relación resulta mutualista, comensal o, en condiciones específicas, potencialmente patógena (Hardoim *et al.*, 2015).

### **2.2.5. Cepa**

Grupo de organismos de una misma especie, que comparten ciertas características genéticas que no se encuentran en otros miembros de dicha especie, presentándose muchas cepas dentro de una misma especie (Ochoa y Montoya, 2010).

### **2.2.6. Consorcio microbiano**

Es la asociación natural de dos o más poblaciones microbianas de diferentes especies, las cuales actúan conjuntamente como una comunidad en un sistema

complejo, donde todos llegan a beneficiarse de las actividades de los demás (Ochoa y Montoya, 2010).

### **2.2.7. Biodegradación**

Es un proceso que se da a través de bacterias, hongos, levaduras, gusanos y/o insectos que descomponen compuestos orgánicos en compuestos simples (de menor peso molecular) a través del aprovechamiento de reacciones y procedimientos químicos naturales con el cual obtienen sus nutrientes y energía, en condiciones aerobias se produce CO<sub>2</sub> y agua, muchos de estos microorganismos desarrollan reacciones metabólicas únicas que pueden ser usadas para degradar algunas sustancias químicas sintetizadas (Thieman y Palladino, 2010).

### **2.2.8. Biorremediación**

Es una técnica que consiste en el uso de organismos vivos para la limpieza del medio ambiente como del agua subterránea o suelos contaminados con químicos, degradando materiales peligrosos en sustancias menos tóxicas (Thieman y Palladino, 2010).

### **2.2.9. Modelado cinético en biología**

Se basa en la aplicación de ecuaciones matemáticas para describir y predecir la velocidad y dinámica de procesos como el crecimiento microbiano y la biodegradación de compuestos orgánicos. Entre los modelos más utilizados se encuentran el de primer orden y la ecuación de Monod, esta última relaciona la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) con la concentración del sustrato (S), permitiendo cuantificar la degradación en función del tiempo y optimizar las condiciones experimentales para el escalado del proceso (Doran, 2012).

## **2.3. Base teórica**

### **2.3.1. Clasificación y características de los hidrocarburos en el diésel**

El diésel es una mezcla compleja de hidrocarburos derivados del petróleo, cuya composición varía dependiendo del proceso de refinamiento y del tipo de crudo utilizado. Los principales hidrocarburos presentes en el diésel se pueden clasificar en saturados (alcanos y cicloalcanos) y no saturados (aromáticos y olefinas) (Speight, 2014), como se muestra en la Figura 1.

#### **2.3.1.1. Hidrocarburos saturados**

Son los más abundantes en el diésel y representan una fracción importante en términos de estabilidad química y poder calorífico. Se subdividen en:

- **Alcanos lineales y ramificados:** Compuestos de cadena larga como el n-dodecano (C<sub>12</sub>H<sub>26</sub>) y el n-hexadecano (C<sub>16</sub>H<sub>34</sub>), los cuales son relativamente más biodegradables (R M Atlas, 1981).
- **Cicloalcanos (naftenos):** Ejemplos como el ciclohexano y metilciclohexano contribuyen a la densidad del diésel y son menos volátiles.

### 2.3.1.2. Hidrocarburos aromáticos

Estos compuestos son más recalcitrantes y poseen estructuras cíclicas conjugadas que dificultan su degradación microbiana (Prince, 2002).

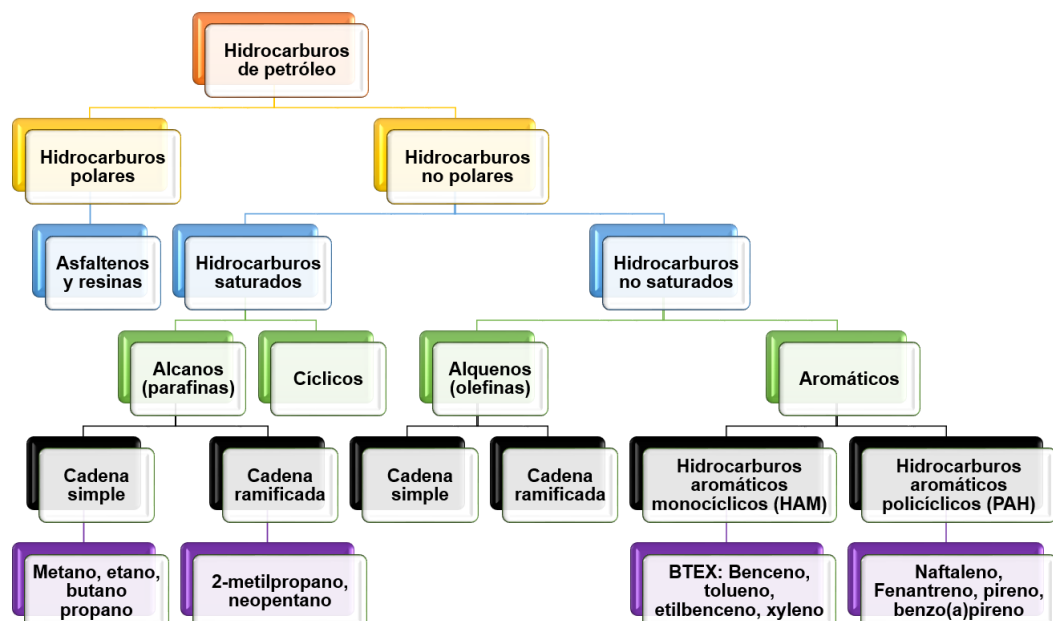
- **Aromáticos monocíclicos (BTEX):** Incluyen benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos, los cuales tienen una alta toxicidad y pueden afectar el crecimiento bacteriano (Das y Chandran, 2011).
- **Aromáticos policíclicos (PAHs):** Como el naftaleno, fenantreno y venzo(a)pireno, que son persistentes en el ambiente y requieren consorcios microbianos especializados para su degradación (Haritash y Kaushik, 2009).

### 2.3.1.3. Asfaltenos y resinas

Son fracciones pesadas del petróleo que contienen heteroátomos (N, S, O) y presentan una solubilidad limitada en hidrocarburos ligeros (Tissot y Welte, 1984). Aunque están en menor proporción en el diésel, su presencia puede afectar la bioaccesibilidad de otros compuestos.

**Figura 1**

*Clasificación general de los hidrocarburos de petróleo.*



Nota. Adaptado de Speight (2014), Prince (2002) y R M Atlas (1981).

### 2.3.2. Contaminación por petróleo y derivados

La contaminación ambiental se origina, en gran medida, por la inadecuada disposición de desechos industriales, lo que resulta en la liberación de diversos productos contaminantes al ambiente. Entre las actividades que impactan significativamente el medio ambiente se encuentran las industriales, agrícolas, domésticas y urbanas; sin embargo, la industria petrolera es especialmente relevante debido a los riesgos asociados con la transformación, transporte y almacenamiento del petróleo, diésel y gasolina. Las fugas accidentales o sistemáticas de estos productos generan derrames que provocan la liberación de hidrocarburos y afectan el medio ambiente (Tabla 1), lo que ha impulsado el desarrollo de diversas técnicas para su remediación (Calderón, 2006).

**Tabla 1**

*Influencia en la salud y el entorno ambiental por los vertidos de hidrocarburos.*

Afectaciones	Descripción de la afectación	Referencia
Daños al medio ambiente	Los hidrocarburos de peso molecular mediano y alto, en particular los poliaromáticos, poseen una característica hidrofóbica y se depositan en suelos y sedimentos, lo que promueve su larga permanencia.	Stanley <i>et al.</i> (2000)
Daños a la salud	Los compuestos poliaromáticos que se encuentran en el diésel y en el petróleo crudo tienen el potencial de ser carcinogénicos para un gran número de organismos, incluyendo los mamíferos superiores.	Agencia de Protección Ambiental (2010)
Daños a suelos agrícolas	La presencia de hidrocarburos limita la permeabilidad del suelo, volviéndolo infértil y afectando la producción agrícola.	Agencia de Protección Ambiental (2010)
Daños a la salud (marinos)	La exposición a diversos compuestos poliaromáticos puede causar mortalidad en animales marinos.	Stanley <i>et al.</i> (2000)
Resistencia a la biodegradación	La combinación de baja solubilidad y la estructura molecular de compuestos como el enzo(a)pireno y el venzo(a)antraceno los hace menos biodegradables y altamente tóxicos.	Crawford y Crawford (1998)

*Nota.* Adaptado de Cavazos Arroyo *et al.* (2014).

Los derrames de hidrocarburos, que incluyen gasolina, parafinas, aceite y queroseno, no solo afectan la superficie terrestre, sino que también pueden infiltrarse en el agua subterránea. Este proceso de translocación se da por escorrentía, generando cambios fisicoquímicos en el agua, tales como la reducción del oxígeno disuelto debido a la interferencia en el intercambio gaseoso entre la atmósfera y el agua. Esta disminución de oxígeno puede inhibir el desarrollo y la nutrición de diversas especies (Jiménez, 2006). Además, algunas fracciones de la gasolina se evaporan, mientras que otras se disuelven o se adhieren al suelo (Tabla 2). Se estima que entre 75 000 y 1 000 000 de tanques de almacenamiento subterráneo han experimentado fugas, lo que resalta el riesgo potencial de exposición (División de Toxicología y Medicina Ambiental, 1995).

**Tabla 2**

*Procesos de transformación y transporte del petróleo.*

<b>Categoría</b>	<b>Proceso</b>	<b>Factores que afectan el proceso</b>
Físico	Advección	Topografía, clima, tipo de suelo, Porosidad (~50%), conductividad hidráulica, Materia orgánica (>1%), Textura del suelo, Geología.
	Dispersión suelo	Mismo que advección, más heterogeneidad.
	Flujo en fracturas	Geología, permeabilidad del suelo.
	Difusión	Mismo que advección, más gradiente de concentración.
	Precipitación	pH, temperatura, química del contaminante.
Químico	Disolución	Solubilidad, pH, temperatura.
	Fraccionamiento	Propiedades del contaminante (volatilidad, viscosidad), tipo de suelo.
	Sorción / Desorción	Materia orgánica, pH, contaminante.
	Intercambio iónico	Propiedades del suelo, contaminante.
	Volatilización	Temperatura, viento, suelo (pérdida C8-C12 hasta 100 %)
	Especiación de equilibrio	pH, ligandos, contaminante.
	Transformación abiótica	pH, temperatura, catalizadores (hidrólisis, oxidación)
Microbiano	Oxidación / Reducción	Geología, Contaminante, Temperatura (20–45°C), pH (5.0–9.0), Agua (50–80%), Oxígeno disuelto, Conductividad eléctrica.
	Hidrólisis	

*Nota.* Adaptado de L. Wang et al. (2021); Yang et al. (2013) y Tindall et al. (1999).

### 2.3.3. Remediación del ambiente

Existen diversos métodos de remediación (Tabla 3), siendo el biológico por microorganismos fundamental tanto desde el punto de vista económico como ambiental. El petróleo y sus derivados, al contener materia orgánica, favorecen el desarrollo de bacterias, hongos, mohos, levaduras y algas verdes; sin embargo, en ecosistemas acuáticos predominan las bacterias y levaduras. En condiciones aeróbicas, estos microorganismos actúan como agentes oxidadores de hidrocarburos, mientras que en ambientes anóxicos la degradación es mucho más lenta y puede prolongarse por años. Por ejemplo, las bacterias metanotróficas degradan metano (el hidrocarburo más simple), pero tienen limitaciones para degradar compuestos con mayor número de carbonos (Mandigan *et al.*, 1999).

**Tabla 3**

*Métodos de remediación de suelo y agua subterránea.*

FÍSICO	BIOLÓGICO	QUÍMICO	TÉRMICO
Coagulación / Floculación	Biorremediación <i>in situ</i>	Neutralización	Incineración
Separación agua – aceite	Lodo activado	Precipitación química	Desorción térmica
Extracción de vapor	Lodo activado con PAC	Intercambio iónico	Vitrificación
Absorción de carbono	Compostaje	Oxidación avanzada (ozono, Fenton)	Pirólisis Tratamiento térmico por microondas
Filtración (membranas)	Bioaumentación	Lavado de suelo	
Ventilación del suelo	Fitorremediación	Estabilización / solidificación	
Sedimentación	Bioventilación	Reducción química	
Evaporación / destilación	Tanque digestor anaeróbico	Fotólisis (luz UV)	
Extracción con solvente	Película fija aerobia / anaerobia	Decloración	
Centrifugación	Cama fluidizada	Oxidación húmeda	
Tratamiento ultrasónico	Filtro de láminas de rocas		
Nanofiltración	Reactor batch de secuenciación		
Electrorremediación	Tratamiento de humedales		
Barreras permeables reactivas	Micorremediación		
	Biorreactores de membrana		

*Nota.* Adaptado de Kuppusamy et al. (2016); Megharaj et al. (2011) y Tindall et al. (1999)

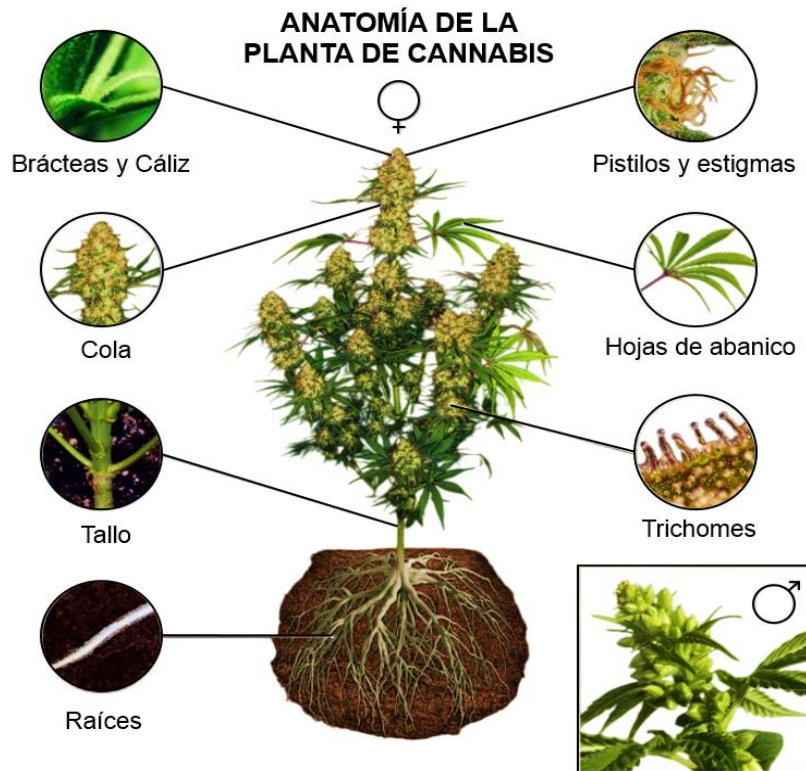
Para una remediación efectiva, es crucial evaluar las características específicas del sitio y del contaminante, considerando propiedades físicas, químicas y biológicas; esto permite optimizar tanto la eficiencia del proceso como los costos y tiempos requeridos (Calderón, 2006). Un aspecto relevante es la producción de biosurfactantes por algunas bacterias en presencia de hidrocarburos, lo que facilita la emulsificación y biodegradación de estos compuestos al hacerlos más accesibles y menos tóxicos (Araujo *et al.*, 2008). En casos de derrames masivos, mientras que las fracciones volátiles se desvanecen con rapidez, los elementos aromáticos y alifáticos de largas cadenas persisten en el ambiente, promoviendo un aumento en la multiplicación de bacterias oxidadoras (Mandigan *et al.*, 1999). En resumen, aunque existen múltiples métodos de remediación (Tabla 3), la elección de la técnica adecuada dependerá de las condiciones específicas del sitio, como el tipo de suelo, topografía, profundidad del nivel freático y consideraciones económicas y de los requerimientos a nivel local y nacional (Calderón, 2006).

#### **2.3.4. *Cannabis* sp.**

Conocida comúnmente como “cáñamo”, *Cannabis* sp. es una planta herbácea anual que puede alcanzar hasta cuatro metros de altura y presenta un tallo erecto (Figura 2). Es dioica, lo que significa que existen plantas masculinas y femeninas separadas. Las hojas son palmadas y estipuladas, con pecíolos de hasta siete centímetros, compuestas por tres a nueve folíolos de ápice agudo, con margen serrado y tricomas glandulares resinosa en ambas caras, siendo la parte inferior de un tono más claro y con pelillos suaves. La inflorescencia consta de brácteas herbáceas y glandulosas ubicadas en las axilas superiores o al final de las ramas; en las plantas masculinas, las flores son ramificadas, laxas y numerosas, mientras que en las femeninas son densas y menos numerosas. Las flores carecen de cáliz y corola diferenciados, presentando un perianto formado por tépalos. En las masculinas, las flores son pediceladas con cinco tépalos y estambres (más cortos, dispuestos de forma opuesta a los tépalos), y en las plantas femeninas, son sésiles y poseen un perianto completo, de textura membranosa y fijado al ovario, el que alberga un óvulo y dos estigmas; el fruto que se origina es un aquenio ovoide, ligeramente comprimido y de color blanco-verdoso teñido de púrpura (Hanan *et al.*, 2009).

**Figura 2**

*Morfología de Cannabis sp.*



Nota. Tomado de Sensi (2022).

**2.3.4.1. Taxonomía**

El género *Cannabis* ha sido objeto de debate a lo largo de la historia. Carl Linnaeus (1753) lo denominó *Cannabis sativa* L., mientras que Lamarck (1785) diferenciaba entre cepas, como: *Cannabis indica* (europeo) y *Cannabis indio* (otras). Sin embargo, la variabilidad en el perfil químico - morfológico y la aparición de híbridos resultantes de la domesticación para obtener fibras o concentraciones elevadas de tetrahidrocannabinol (THC), han generado confusión. Actualmente, la clasificación estándar se consolida como: *Cannabis sativa* (Chandra *et al.*, 2017).

**Tabla 4**

*Ubicación taxonómica de Cannabis sp.*

Reino	Plantae (Planta)
Subreino	Tracheobionta (planta vascular)
Superdivisión	Spermatophyta (planta con semilla)
División	Magnoliophyta (planta con flor)
Clase	Magnoliopsida (dicotiledónea)
Subclase	Hamamelididae
Orden	Urticales
Familia	Cannabaceae
Género	<i>Cannabis</i>

Nota. Adaptado de Chandra *et al.* (2017).

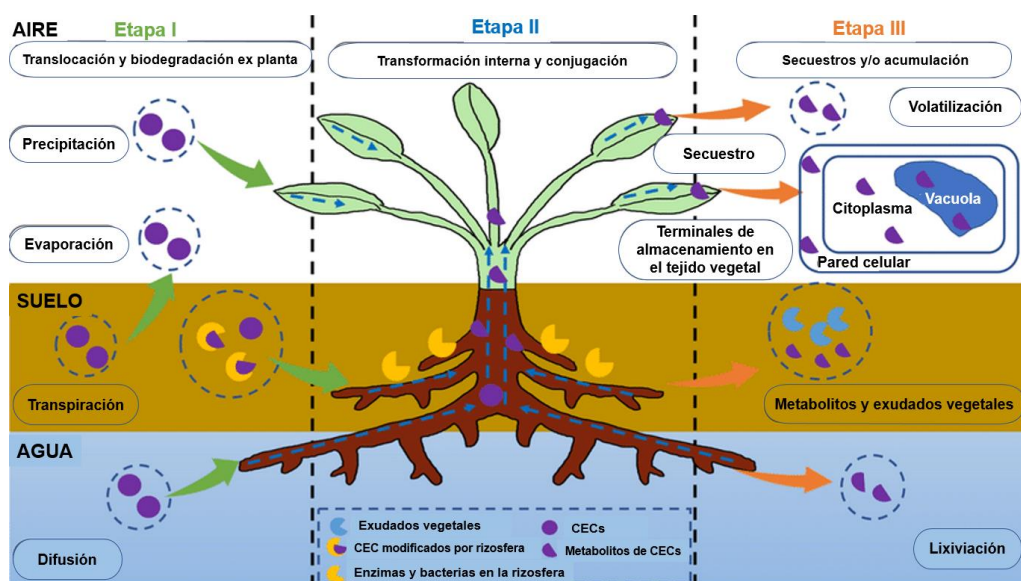
### 2.3.4.2. Aplicación potencial del cáñamo en la biorremediación

El cáñamo industrial ha adquirido un creciente interés debido a sus notables características agronómicas y ambientales. Conocido por su aplicación científica, producción de fibra, papel y biocombustibles, en años recientes se ha evidenciado su potencial en procesos de fitorremediación de ambientes contaminados por desechos antropogénicos (**Figura 3**) (Alufasi *et al.*, 2020):

- Remediación de suelos contaminados con metales pesados: el cáñamo es una planta fitorremediadora acumuladora de metales pesados (Ni, Pb, Cd, Zn, Cu y Cr) por su sistema radicular extenso. Lo que depende de las concentraciones presentes en el medio, afectando el crecimiento de la planta (Alufasi *et al.*, 2020). Ahmad *et al.* (2016) reportaron que el cáñamo extrajo 120 g/ha de cadmio en tres - cuatro meses, además de Cu, Cd y Ni, lo que subraya la necesidad de continuar investigando para optimizar la fitoextracción.
- Remediación de lixiviados de vertederos: ricos en materia orgánica, amonio, metales pesados y sales cloradas que contaminan suelos y fuentes de agua cercanas. (Alufasi *et al.*, 2020). Estudios han evaluado el uso de *Cannabis sativa* para la eliminación de estos lixiviados; Vaverková *et al.* (2019) encontraron un crecimiento óptimo a concentraciones de lixiviados inferiores al 25 %. Se requiere mayor investigación para determinar la etapa de desarrollo (semilla, plántula o planta madura) en la que la planta sea más efectiva.

**Figura 3**

*Esquema de las vías de fitorremediación de contaminantes emergentes de interés en entornos contaminados (agua, suelo y aire).*

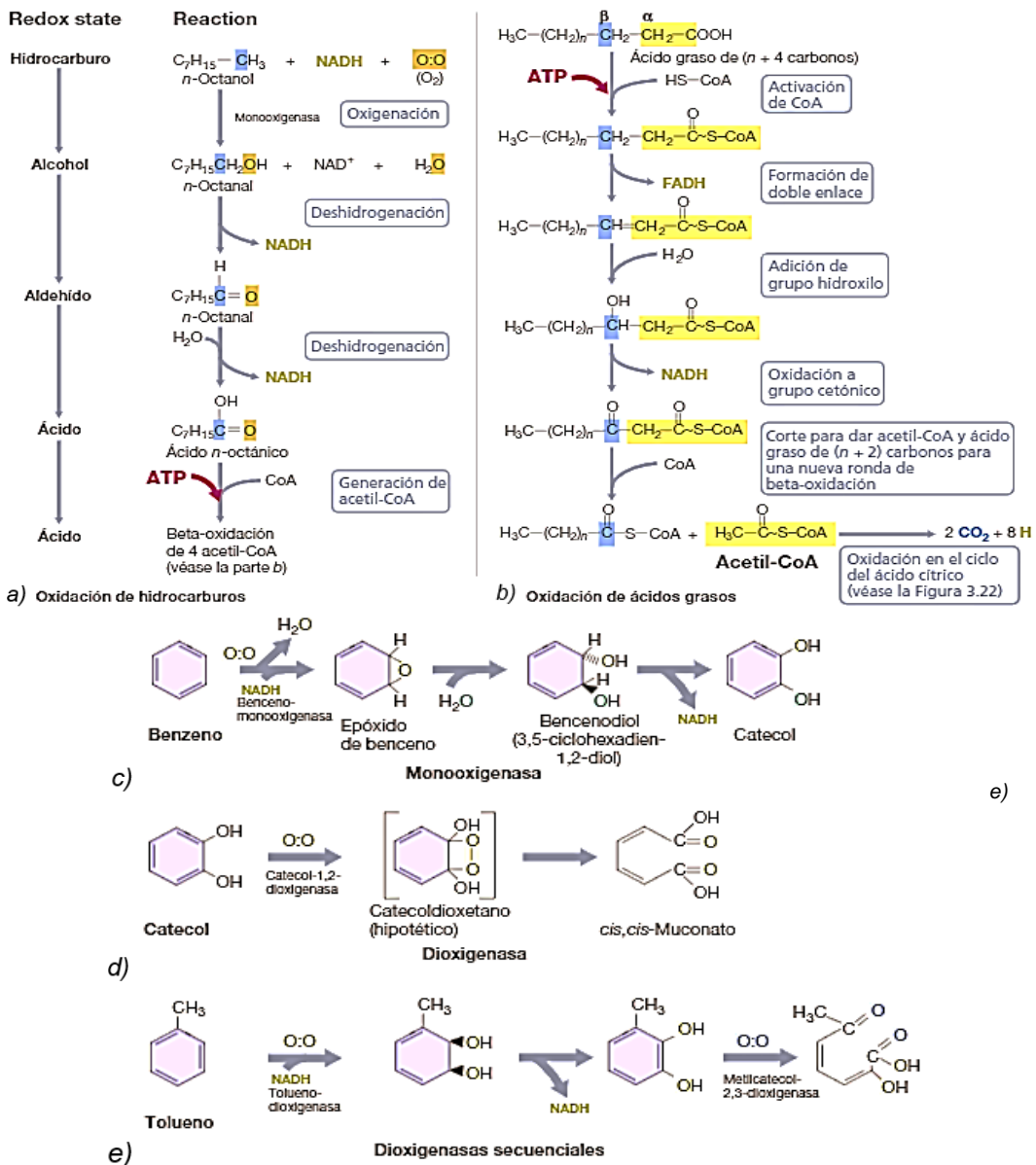


Nota. Adaptado de Y. Wu *et al.* (2021).

- Remediación de hidrocarburos por bacterias endofíticas: representa una estrategia emergente para la degradación de hidrocarburos. Bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* y *Acinetobacter junii* de plantas irrigadas con aguas residuales, degradan benceno hasta en un 85, 83 y 70 % en 72 h (Zahid *et al.*, 2016), lo que sugiere que la asociación planta-bacteria puede potenciar la biorremediación a través de vías enzimáticas **Figura 4**.

**Figura 4**

*Catabolismo aeróbico de hidrocarburos alifáticos y aromáticos por oxigenasas.*



*Nota.* Adaptado de Madigan *et al.* (2015). La figura muestra rutas oxidativas de compuestos hidrofóbicos en presencia de oxígeno. En el caso de un hidrocarburo alifático, (a) una monooxigenasa introduce un grupo hidroxilo, y (b) el producto es degradado por la vía de  $\beta$ -oxidación generando unidades de acetil-CoA. Para el hidrocarburo aromático, (c) el benceno es transformado en catecol por una monooxigenasa, (d) el catecol es escindido por una dioxigenasa tipo intradiol, y (e) el tolueno es degradado mediante la acción secuencial de una monooxigenasa y una dioxigenasa extradiol. Estos procesos permiten incorporar oxígeno molecular y facilitar la entrada de los compuestos al metabolismo central.



### **2.3.5. Identificación de cepas microbianas**

Las comunidades microbianas presentes en distintos ambientes son fundamentales debido a sus actividades metabólicas, las cuales influyen en el funcionamiento de los ecosistemas y en la salud de los organismos. La identificación taxonómica basada en datos de secuenciación masiva, ya sea del gen 16S ARN o secuenciación paralela a gran escala, permite analizar la variedad microbiana y comparar la estructura de las comunidades en distintos momentos y lugares. Estas técnicas han revolucionado el estudio de los ecosistemas microbianos, aportando información actualizada y enriqueciendo las bases de datos internacionales (Brenes, 2018).

Además, en la última década, las técnicas y tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS) han permitido analizar grandes segmentos de ADN de forma rápida y a bajo costo, con aplicaciones tanto en el ámbito clínico (prevención, diagnóstico y tratamiento) como en el ambiental (metagenómica), abarcando desde el procesamiento de muestras hasta el almacenamiento y análisis estadístico de los datos (Ango y Chuchón, 2024).

### **2.3.6. Secuenciamiento de Genoma Completo (WGS) para la identificación microbiana**

El avance de las tecnologías de secuenciación ha propiciado la implementación de la secuenciación de genoma completo (*Whole Genome Sequencing*, WGS) como una herramienta prometedora para la identificación microbiana. Este método, basado en la determinación precisa del orden de los nucleótidos, facilita el estudio de la variación genética, el ensamblado de genomas y transcriptomas, la secuenciación de ADN y ARN, así como la detección de modificaciones epigenéticas, permitiendo determinar la presencia o ausencia de genes de interés (Osorio, 2023; Yin *et al.*, 2019). Actualmente, hay tres generaciones de tecnología de secuenciación, con características particulares (Figura 6).

**Figura 6**

*Diferencia de la tecnología de secuenciación por generación.*



Nota. Adaptado de PacBio (2020).

La tecnología de secuenciación por nanoporos, desarrollada por Oxford Nanopore Technologies, permite leer secuencias de ADN o ARN en tiempo real mediante un nanoporo derivado de la proteína  $\alpha$ -hemolisina, una toxina producida por *Staphylococcus aureus* que forma poros en membranas celulares. Esta proteína se expresa sintéticamente en *Escherichia coli* mediante técnicas de biología molecular, seguida de purificación y modificaciones estructurales para optimizar su estabilidad y precisión en la secuenciación (Bayley, 2015; Walker et al., 1992). En el proceso, el nanoporo se inserta en una membrana sintética, y al aplicar un voltaje eléctrico, las moléculas de ADN o ARN lo atraviesan, generando cambios específicos en la corriente iónica para cada base nucleotídica (A, C, G, T) debido a sus diferencias en tamaño y forma. Estos patrones eléctricos son capturados en tiempo real y analizados por algoritmos bioinformáticos para reconstruir la secuencia sin necesidad de amplificación previa, como la PCR, lo que reduce sesgos y acelera el análisis. Implementada en dispositivos portátiles como el MinION, esta tecnología permite secuenciar fragmentos extremadamente largos (>4 Mb) y tiene aplicaciones en microbiología, diagnóstico clínico y vigilancia epidemiológica, como la identificación de variantes virales durante la pandemia de COVID-19, transformando el análisis genético por su rapidez y versatilidad (Oxford Nanopore Technologies, 2024a; Jain et al., 2016).

La aplicación de la secuenciación por nanoporos en microbiología ha demostrado ser eficaz en la identificación rápida de patógenos, vigilancia epidemiológica y

estudios metagenómicos, contribuyendo significativamente al diagnóstico y control de enfermedades infecciosas (Quick *et al.*, 2016). Su capacidad para detectar variantes genéticas y perfiles de resistencia antimicrobiana en tiempo real la posiciona como una herramienta valiosa en la medicina personalizada y la salud pública (Mikheyev y Tin, 2014). En resumen, las tecnologías de secuenciación de tercera generación, como la basada en nanoporos, en la identificación microbiana, ofrece ventajas significativas en términos de rapidez, precisión y accesibilidad, ampliando las posibilidades en investigación, diagnóstico y tratamiento en microbiología (Jain *et al.*, 2016).

### **2.3.7. Enfoque bioinformático**

La ubicación taxonómica de microorganismos mediante métodos tradicionales a menudo se ve limitada por la imposibilidad de cultivar ciertos microorganismos o por las exigentes condiciones que requieren algunos de ellos. La integración de metodologías de secuenciación de nueva generación permitió superar estas limitaciones, facilitando la identificación y caracterización de microorganismos tanto cultivables como no cultivables, incluso cuando se encuentran en bajas concentraciones (Brenes, 2018).

Uno de los pasos clave en este proceso es la asignación taxonómica de las Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs), lo cual requiere algoritmos de clasificación y alineamiento de secuencias, junto con bases de datos de referencia que contengan secuencias similares a la región de interés. Entre las bases de datos más utilizadas se encuentran SILVA, Greengenes y NCBI, mientras que otras como OTT, RDP y UNITE también son empleadas (Brenes, 2018).

El desarrollo de WGS ha impulsado la creación de diversos software y herramientas para el análisis de la gran cantidad de datos generados por la secuenciación, entre los que destacan:

- NCBI: *National Center for Biotechnology Information* (Centro Nacional de Información Biotecnológica), plataforma ampliamente utilizada para análisis filogenético, repositorios de secuencias y alineamientos derivados de NGS, que incluye datos de 16S, secuenciación masiva, genomas y transcriptomas, y se asocia con recursos como GNN (*Genome News Network*) y GOLD (*Genomes OnLine Database*) (Brenes, 2018).
- SILVA: Base de datos que contiene información taxonómica de bacterias, arqueas y eucariotas, fundamentada en filogenias de ARNr (16S/18S y 23S/28S), basada en manuales bacteriológicos de referencia como el de

Bergey y de la Sociedad Internacional de Protistas (Brenes, 2018).

- Galaxy: Plataforma web de código abierto que permite el análisis de datos biomédicos y la creación de flujos de trabajo. Herramientas integradas como Kraken2 facilitan la clasificación de secuencias taxonómicas mediante el análisis de k-mers y la asignación del ancestro común más bajo (LCA) de forma rápida y precisa (Wood y Salzberg, 2014). Adicionalmente, herramientas como Recentrifuge ayudan a visualizar la presencia y confiabilidad de la identificación de organismos en muestras metagenómicas (Martí, 2019).
- Greengenes: Base de datos especializada en secuencias de bacterias y arqueas, con información derivada de NCBI y CyanoDB.cz (Brenes, 2018).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Área de estudio

El trabajo de investigación se realizó en los ambientes del Laboratorio de Microbiología Ambiental y Laboratorio de Inmunología y Microbiología Clínica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

##### 3.1.1. Ubicación política

Región : Ayacucho  
Provincia : Huamanga  
Distrito : Ayacucho  
Lugar : Ciudad Universitaria UNSCH

##### 3.1.2. Ubicación geográfica

Latitud Sur: 13°08'44.68" S  
Latitud Oeste: 74°13'15.73" O  
Altitud: 2791 m.s.n.m.

#### 3.2. Tipo y nivel de investigación

Experimental – aplicada.

#### 3.3. Población y muestra

##### 3.3.1. Población

Bacterias endofíticas de *Cannabis* sp.

##### 3.3.2. Unidad muestral

Bacterias endofíticas aisladas de la raíz de *Cannabis* sp.

#### 3.4. Metodología y recolección de datos

##### 3.4.1. Preparación de reactivos y medios de cultivo

- Los productos químicos que se emplearon fueron de la más alta pureza.
- Todas las soluciones y medios bacteriológicos se prepararon con agua destilada esterilizadas a 121 °C por 15 min a 15 lb/pulg<sup>2</sup>.

- Para el crecimiento y aislamiento de bacterias, se usó el medio agar nutritivo (MERCK, USA) (Anexo 1).
- La activación y rejuvenecimiento de las cepas se realizó en caldo nutritivo (Microgen, Colombia) (Anexo 1).
- Para los procesos de degradación se usó el medio mínimo de sales minerales M9:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{CaCl}_2$  1 M y  $\text{MgSO}_4$  1 M (Anexo 1), con diferentes porcentajes de (v/v) de petróleo diésel como única fuente de carbono.
- Para la medición de la evolución de  $\text{CO}_2$ , se usó NaOH al 0,01 M (0,4 g por litro) como capturador de  $\text{CO}_2$ , el cual fue preparado con agua destilada hervida para eliminar el  $\text{CO}_2$  restante, mientras que se dejaba enfriar se pesó las lentejas de NaOH en una balanza analítica gramera, una vez fría el agua se homogenizó con las lentejas para su posterior uso (González, 2008).
- Para la titulación del NaOH 0,01 M residual se hizo uso de una bureta graduada de titulación con HCl 0,005 M y fenolftaleína al 1 % hasta la atenuación del color rojo violáceo.
- La obtención del petróleo diésel se realizó mediante la compra en el establecimiento de gasolinería Grifo Plaza – Petroperú (Anexo 30 y 31), el cual fue llevado a la cabina de esterilización UV para su posterior uso (Castañeda *et al.*, 2022).

#### **3.4.2. Obtención, transporte y manejo de la muestra vegetal**

- La raíz de *Cannabis* sp. “cáñamo” no psicoactivo fue proporcionada del proyecto de investigación: Influencia del medio de cultivo en el mejoramiento de la calidad del aceite esencial de *Cannabis* sp. y su adecuación en el departamento de Arequipa, con el código de contrato IBA-IB-03-2019 (Anexo 2) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.
- Para el transporte, la planta fue cortada desde el tallo inferior manteniendo la raíz con la tierra humedecida en su maceta, embalada al instante y enviada por encomienda, al contener tetrahidrocannabinol (THC) inferior al 1 % considerado como *Cannabis* no psicoactivo el cual no es controlado (DS N°005-2019-SA - Ley N°30681 (Anexo 32).

#### **3.4.3. Aislamiento y cultivo de cepas bacterianas endofíticas**

Se empleó la metodología descrita por Iqbal *et al.* (2017) y Zahid *et al.* (2016), con ligeras modificaciones en las veces de enjuague y los días de incubación final:

- Se realizó el desarraigo cuidadoso de las raíces, retirando la mayor cantidad

de tierra.

- La raíz y el tallo se lavaron minuciosamente con agua corriente para eliminar residuos de polvo y tierra. Dado el tamaño de la raíz, se realizaron cortes en secciones y se procedió a su esterilización superficial: se sumergieron en etanol al 70 % por un min, seguido de un tratamiento con NaClO al 1 % por cinco min, y finalmente se enjuagaron seis veces con agua destilada estéril (cada enjuague de 60 s).
- Para verificar la asepsia, se tomó una muestra del agua del último enjuague. Esta muestra se sembró en agar nutritivo mediante siembra por estrías (realizada por triplicado) e incubó a 37 °C durante 48 h. La ausencia de crecimiento microbiano en este control confirma que las bacterias que posteriormente se aislarán provienen exclusivamente de los tejidos internos (endofíticas).
- Se homogenizaron cuatro gramos de raíz y tallo esterilizados (utilizando un mortero de porcelana estéril) con 12 ml de suero fisiológico al 0,9 %, repitiendo el procedimiento por triplicado.
- La mezcla se incubó a 30 °C durante una hora para favorecer la sedimentación.
- Se pipeteó cinco ml de la mezcla homogenizada a 100 ml de medio mínimo M9, suplementado con 2 % (v/v) de petróleo diésel como única fuente de carbono. Este ensayo se realizó por triplicado, incluyendo un blanco (medio M9 + 2 % de petróleo diésel sin inoculación) para controlar la degradación fisicoquímica.
- Tras 10 días de incubación a temperatura ambiente y en agitación constante, se tomó una asada de cada botella y se sembró en agar nutritivo mediante la técnica de agotamiento en superficie (por triplicado), incubándose a 25 °C durante 48 h.
- Se tomó una asada de cada una de las botellas y se cultivó en medio agar nutritivo mediante la siembra por agotamiento en superficie por triplicado, incubándose a 25 °C por 48 h.
- Las colonias morfológicamente diferentes se subcultivaron tres veces en agar nutritivo para asegurar pureza y estabilidad; en cada etapa se realizó la tinción de Gram y observación microscópica para corroborar la identidad de las bacterias endofíticas.
- Ante la presencia de una gran diversidad de colonias, se procedió a realizar pruebas de adaptación a concentraciones mayores de petróleo diésel.

#### **3.4.4. Adaptación y selección de cepas bacterianas con capacidad degradadora de petróleo diésel**

La adaptación permite seleccionar aquellas bacterias más aptas para degradar petróleo diésel a concentraciones elevadas (Echeverri, 2011). Se siguió el siguiente procedimiento:

- Se tomó una asada del cultivo que creció en medio M9 con 2 % (v/v) de petróleo diésel y se inoculó en medio M9 con 5 % de diésel. Este ensayo se incubó a temperatura ambiente durante 10 días en agitación constante.
- Una vez finalizado el período, se repitió el proceso, transfiriendo el cultivo al medio M9 con 10 % (v/v) de petróleo diésel.
- Finalmente, se realizó una última transferencia a medio M9 con 15 % (v/v) de petróleo diésel.
- Tras cada etapa, se tomó una asada de cada botella y se sembró en agar nutritivo mediante siembra por agotamiento (realizada por triplicado), incubándose a 25 °C durante 48 h.
- Las colonias morfológicamente distintas se subcultivaron tres veces en agar nutritivo para asegurar su pureza y estabilidad, verificándose mediante tinción de Gram y observación microscópica. Se obtuvieron siete colonias Gram negativas diferentes (Anexo 4).
- Las cepas puras seleccionadas se sembraron una vez más a 25 °C durante 18 h, y posteriormente se conservaron en viales con agar nutritivo, etiquetados, sellados y almacenados a 4 °C para su análisis posterior.

#### **3.4.5. Evaluación experimental de la biodegradación del petróleo diésel**

Para evaluar el proceso de biodegradación se utilizó un sistema de matraz biómetro agitado, basado en las metodologías de EPA 560/6-82-003 (EPA, 1982) y Bartha y Pramer (1965), con algunas modificaciones en la estructura del sistema, la aireación (Anexo 5) y las concentraciones de HCl y NaOH. En este sistema se midió la evolución de CO<sub>2</sub> y el volumen residual en cada ensayo. Se tuvo en cuenta que se producen reacciones químicas en la solución que permiten obtener, de forma indirecta, la cantidad de CO<sub>2</sub> generado por la acción bacteriana. (Baird *et al.*, 2017; Stumm y Morgan, 1996). A continuación, se describe el procedimiento:

**Reacción en la solución de NaOH:** El CO<sub>2</sub> generado por las bacterias se disuelve y reacciona con el NaOH para formar bicarbonato:  $\text{CO}_2 + \text{NaOH} \rightarrow \text{NaHCO}_3$   
Con exceso de NaOH, se forma carbonato:  $\text{NaHCO}_3 + \text{NaOH} \rightarrow \text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{H}_2\text{O}$

**Titulación:** El NaOH residual se titula con HCl:  $\text{NaOH} + \text{HCl} \rightarrow \text{NaCl} + \text{H}_2\text{O}$

**Cálculo del CO<sub>2</sub>:** La diferencia entre la cantidad inicial de NaOH y la cantidad residual (determinada por titulación) equivale a la cantidad de NaOH que reaccionó con el CO<sub>2</sub>. Usando la estequiometría (un mol de CO<sub>2</sub> reacciona con dos moles de NaOH para formar Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), se calculan los moles de CO<sub>2</sub>, que luego se convierten a gramos utilizando su masa molar (44 g/mol).

**Preparación de los cultivos:** Las cepas puras subcultivadas de las colonias morfológicamente diferentes se activaron en agar nutritivo a 25 °C durante 48 h para confirmar su pureza. Se tomaron hisopos estériles para transferir las bacterias activadas y se homogenizaron en 120 ml de agua destilada estéril por cada cepa. La turbidez se comparó con el estándar del tubo número cinco de la escala de McFarland, mediante diluciones apropiadas.

**Configuración del ensayo en sistema de matraz biómetro agitado:** Los experimentos se realizaron en botellas de plástico esterilizadas en la cabina UV, adaptadas como “*biometer flasks*” o “*shake flask systems*”. Se prepararon ensayos con concentraciones iniciales de petróleo diésel de 1, 3, 5 y 7 % (v/v) en medio M9, inoculados con cada cepa bacteriana a una concentración de 3 % (v/v), completando el volumen a 100 ml. Cada condición se realizó en triplicado, incluyendo un blanco (medio M9 + el porcentaje respectivo de petróleo diésel + 5 mg/100 ml de cloruro de mercurio, HgCl<sub>2</sub>, como inhibidor de actividad microbiana).

**Sistema de captura y medición de CO<sub>2</sub>:** En una botella por separado se colocaron 150 ml de NaOH al 0,01 M, conectada por un tubo a la botella que contenía el ensayo, para capturar el CO<sub>2</sub> producido. Ambas botellas se fijaron con ligas y se colocaron en un agitador horizontal adaptado a una plataforma móvil.

**Procedimiento del ensayo:** La agitación se mantuvo constante durante 60 días. Se permitió un período de reposo de aproximadamente dos horas diariamente, durante el cual se oxigenó cada sistema con 20 ml diarios mediante jeringa conectada a un regulador de flujo Roller. Se realizaron lecturas del proceso desde el día cero y luego cada cinco días (12 lecturas en total). Para cada lectura se extrajeron 10 ml de la solución de NaOH 0,01 M, a los que se les añadió una gota de fenolftaleína al 1 % y se tituló con HCl 0,005 M hasta el punto de equivalencia, indicado por la desaparición del color rojo-violeta.

**Cálculo de la degradación y procesamiento final:** Se aplicó la fórmula de Roverssi (2011), primeramente se restaron los valores del blanco a los de las muestras problema, luego se determinó la cantidad de NaOH que no reaccionó con el HCl de la titulación:

$$1\text{mlHCl} \left( \frac{1\text{L}}{1000\text{ml}} \right) \left( \frac{0.005\text{molHCl}}{1\text{L}} \right) \left( \frac{1\text{molNaOH}}{1\text{molHCl}} \right) \left( \frac{1\text{L}}{0.01\text{molNaOH}} \right) \left( \frac{1000\text{ml}}{1\text{L}} \right)$$

Posteriormente se determinó los gramos de CO<sub>2</sub>:

$$1\text{mlNaOH} \left( \frac{1\text{L}}{1000\text{ml}} \right) \left( \frac{0.01\text{molNaOH}}{1\text{L}} \right) \left( \frac{1\text{molH}_2\text{CO}_3}{2\text{molNaOH}} \right) \left( \frac{1\text{molCO}_2}{1\text{molH}_2\text{CO}_3} \right) \left( \frac{44\text{g}}{1\text{molCO}_2} \right)$$

Al finalizar los 60 días, se pipeteó la mezcla de medio M9 y cepa que se encontraba por debajo de la capa de petróleo diésel en cada sistema. El sobrenadante, que contenía el petróleo diésel residual, se transfirió a tubos de centrífuga tipo Falcon y se centrifugó a 4 000 rpm durante cuatro minutos. Posteriormente, se midió el volumen (ml) de petróleo diésel restante y se calculó el porcentaje de degradación neto con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de degradación} = \frac{(\text{ml Blanco} - \text{ml Muestra})}{\text{ml Blanco}} * 100$$

#### 3.4.6. Determinación de la cinética de degradación

Para el estudio de la cinética de degradación de los hidrocarburos se ajustaron los datos a un modelo cinético de primer orden, con gráficos de línea de tendencia (Smith, 1976), ya que este modelo es común en la degradación de compuestos orgánicos acuosos, como el petróleo diésel (Iqbal *et al.*, 2019, 2017). Se realizó lo siguiente:

- Se graficó ln (concentración en g de CO<sub>2</sub> acumulado/L) versus el tiempo en días, utilizando la ecuación:

$$\ln \left( \frac{C_0}{C} \right) = k_1 t$$

- Donde: C<sub>0</sub> es la concentración inicial de CO<sub>2</sub>, C es la concentración de CO<sub>2</sub> en el tiempo t, k<sub>1</sub> es la constante de velocidad del proceso, t es el tiempo en días.
- Se generó la línea de tendencia a partir de la gráfica, obteniéndose la ecuación (donde la pendiente representa k<sub>1</sub>) y el coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>) que evaluó el ajuste del modelo. Aunque el modelo de primer orden es el más utilizado, se observó que en algunos casos la cinética de segundo orden se ajusta ligeramente mejor a los datos experimentales.
- La vida media (T<sub>1/2</sub>) para un proceso de degradación de primer orden se

determinó utilizando la siguiente ecuación:

$$T^{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_1}$$

Esta metodología permite cuantificar la tasa de degradación y evaluar la eficiencia del proceso de biodegradación del petróleo diésel.

#### **3.4.7. Purificación de ADN genómico**

El kit utilizado fue *Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification #K0722*, EE. UU., siguiendo el protocolo del fabricante Thermo Scientific (2011), se usó la centrífuga HERMLE modelo Z216MK, Alemania, con 8.5 cm de radio del rotor:

##### **Preparación del lisado:**

- La cantidad de muestra requerida de cepa bacteriana fue  $\leq 2 \times 10^9$  células, las cuales fueron cultivadas en caldo nutritivo y comparadas con la escala de McFarland, siendo menor al tubo número siete.
- En un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml se pipeteó un mililitro de cepa para su posterior centrifugación a 7 253 rpm (5 000 x g) durante 10 min, desechándose el sobrenadante y obteniendo el pellet.
- El cual se resuspendió en 180  $\mu$ L de buffer de digestión más 20  $\mu$ L de proteinasa K, se mezcló brevemente en un vórtex para una suspensión uniforme.
- Se llevó a incubar a 56 °C con agitación ocasional por una hora, pasado el tiempo se añadió 20  $\mu$ L de RNasa A, se agitó brevemente en el vórtex y se llevó a incuba a temperatura ambiente por 10 minutos.
- Luego se agregó 200  $\mu$ L de buffer de lisis y se mezcló en vórtex (~15 segundos) para conseguir una solución homogénea.
- Se añadió 400  $\mu$ L de etanol al 50 % al lisado y se mezcló en el vórtex.

##### **Unión de ADN:**

- Se tomó una columna de purificación insertada en un tubo de recolección y se cargó el lisado para su centrifugación por un minuto a 7 947 rpm (6 000 x g).
- Luego se descartó el tubo de recolección y se colocó la columna de centrifugación en un nuevo tubo de recolección, para el próximo paso.

##### **Lavado de ADN:**

- Se lavó la columna con 500  $\mu$ L del tampón de lavado I preparado con etanol (10 ml de solución de lavado concentrado I + 30 ml de etanol 96°) y se llevó a centrifugar la columna a 9 175 rpm (8 000 x g) por un minuto, se desechó el flujo del tubo recolección y se colocó en el mismo tubo.

- Se procedió a un segundo lavado de la columna con 500  $\mu$ L del tampón de lavado II preparado con etanol (10 ml de solución de lavado concentrado II + 30 ml de etanol 96°), se llevó a centrifugar a máxima velocidad  $\geq 11\ 237$  rpm ( $\geq 12\ 000 \times g$ ) por tres minutos y se procedió a desechar el tubo de recolección para su elución.

#### **Elución de ADN:**

- Se transfirió la columna de centrifugación a un tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 ml.
- Se añadió 200  $\mu$ L de buffer de elución y se incubó la columna a temperatura ambiente por dos minutos.
- Luego se centrifugó a 9 175 rpm (8 000  $\times g$ ) por un minuto a temperatura ambiente, el tubo de microcentrífuga contuvo el ADN purificado.
- El tubo se cerró y rotuló para ser almacenado en el frigidier (-20 °C), para su posterior uso.

#### **3.4.8. Análisis de pureza de ADN**

Para el análisis de la calidad de las muestras de ADN extraído se utilizó un espectrofotómetro/fluorómetro de la marca DeNovix DS-11, EE. UU. (DeNovix Inc., 2024) (Anexo 18), considerando los siguientes pasos:

- Se tuvo en cuenta la bioseguridad y asepsia en todo momento.
- La medición se realizó en la opción dsDNA (*double strand DNA*) del equipo.
- Se midió el blanco pipeteando un  $\mu$ L del *Elution buffer* del kit de extracción de ADN usado en el panel óptico del DeNovix, se cerró con cuidado la tapa y se procedió a presionar la opción de blanco.
- Se ingresó el nombre de la muestra (A, B, C, D, E, F y G).
- Para poder medir la muestra se homogenizó previamente mediante pipeteo de entre 10 a 15 veces y se colocó un  $\mu$ L en el panel óptico.
- La limpieza del equipo se realizó con el papel óptico especial después de cada medición del blanco y ADN.
- Las lecturas obtenidas fueron transferidas a un USB para su posterior observación de las curvas a diferentes absorbancias.

#### **3.4.9. Análisis de integridad de ADN**

La integridad de la molécula de DNA se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa con el sistema de electroforesis Gelato, EE. UU. (Minipcrbio, 2023) (Anexo 19), todos los reactivos usados fueron de la marca GRiSP, Portugal:

- Se preparó el gel a una concentración de 0,8 % (0,16 g de agarosa LE y 20 ml

de TBE 1X), se llevó a un microondas (~30 segundos) hasta disolver completamente y se dejó enfriar (~2-3 minutos).

- Se colocó el peine de 25 pocillos en la bandeja, se procedió a verter la mezcla, se verificó la ausencia de burbujas y se dejó reposar 10 min.
- Pasado el tiempo se retiró el peine, se limpió el desecho del gel.
- Para correr se colocó la bandeja con el gel en la cámara tampón dentro del blueGel base cerca al extremo (-) y se agregó 30 ml de tampón TBE 1X hasta cubrir apenas el gel de agarosa, se eliminó las burbujas.
- Se procedió a cargar las muestras de ADN con micropipeta (para los peines de 25 pocillos contienen hasta siete microlitros).
- En cada pocillo se agregó: cinco microlitros de muestra de ADN, un microlitro de GRS DNA *loading buffer blue* (6x) (colorante de carga) más 0,5 µL de *Xpert Green DNA Stain DIRECT* (colorante de ADN). Se colocó un *ladder* de 100 pb.
- Se colocó la cubierta y se encendió el equipo a una carga de 75v por 20 min y se inició el corrido.
- Finalmente, se vio en el transiluminador del mismo equipo para su evaluación.

#### **3.4.10. Secuenciamiento de ADN**

Una vez obtenido la pureza e integridad de las muestras de ADN se procedió a seguir los pasos que menciona el protocolo de *rapid sequencing DNA V14 – barcoding* (SQK-RBK114.24 OR SQK-RBK114.96) de la tecnología *Flongle* (Oxford Nanopore Technology, 2024), descripción general:

##### **Preparación de la biblioteca:**

- Se obtuvo 200 ng de ADN en un tubo de PCR, ajustando el volumen con agua de PCR libre de nucleasas a 10 µL cada cepa (siete muestras) por triplicado.
- Código de barras de ADN: se procedió a la tagmentación del ADN utilizando el *rapid barcoding kit 24 V14* (SQK-RBK114.24).
- Agrupamiento y limpieza de muestras: se realizó el agrupamiento de bibliotecas con códigos de barras y limpieza con perlas *AMPure XP* (usando 276 µL para 24 muestras).
- Ligadura del adaptador: se conectó los adaptadores de secuenciación a los extremos del ADN agregándose al ADN barcodeado 0,5 µL del mix (1,5 µL de *rapid adapter* y 3,5 µL de *adapter buffer*).
- Primado y carga de la celda de flujo: se primó la celda de flujo para poder cargar la biblioteca preparada para la secuenciación con el *Flongle sequencing expansion* (EXP-FSE002).

### **Secuenciamiento y análisis:**

- Se descargó el software MinKNOW versión 24.06.16 que permite la adquisición de datos, análisis en tiempo real, *basecalling* (llamado de bases) y transmisión de datos (Oxford Nanopore Technologies, 2024b).
- Se usó el secuenciador MinION Mk1B con el adaptador *flongle* R10.4.1 *flow cells* (FLO-FLG114), la celda de flujo *flongle* fue verificada con anticipación mediante el software MinKNOW (> 50 poros activos).
- Posteriormente se eligió la opción de “*start sequencing*” para el inicio.
- El *basecalling*, la clasificación por código de barra y la corrección de errores en los *single reads* se realizó utilizando la última versión del algoritmo Dorado v.0.8.2 con el modelo de llamado de datos *high-accuracy basecalling* (HAC).
- Una vez obtenidas las lecturas se usó la herramienta *Flye* de la plataforma Galaxy V.24.1.4. de código abierto para el ensamblado (Galaxy Project., 2024).
- El archivo del *Flye: graphical fragment assembly* en formato gfa. se subió a la herramienta *Bandage* para la visualización de los *contigs* (Anexo 21).

#### **3.4.11. Ubicación taxonómica *in silico***

- Para clasificar las lecturas se utilizó el software Kraken2 V. 2.1.3 (Wood *et al.*, 2019) disponible en la plataforma Galaxy V.24.1.4., utilizando la base de datos del *Refseq standard-full* V.2022.06.07.
- Para una mayor consistencia se realizó la amplificación del gen 16S *in silico* con las lecturas de cada cepa con el software SnapGene V.8.0.0 utilizando los primers universales:  
Primer 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG)  
Primer 1492R (TACGGYTACCTTGTTACGACTT)
- El archivo en formato .FASTA se cargó en el *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) de la base de datos NCBI (National Library of Medicine, n.d.) obteniendo coincidencias de acuerdo con los límites taxonómicos propuestos por Yarza *et al.* (2014) (ver Anexo 23-29).

### **3.5. Análisis estadístico e interpretación de datos**

Los datos se organizaron en tablas y figuras utilizando Excel. Para cada día se realizaron primero las pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas: la distribución normal se evaluó mediante la prueba de Kolmogorov–Smirnov, y la homogeneidad se comprobó con la prueba de Levene, aplicando un nivel de confianza del 95 % ( $\alpha = 0,05$ ). Este procedimiento se aplicó tanto a los datos de producción de CO<sub>2</sub> (expresados en g/L) como a los datos de porcentaje de ml

residual de petróleo diésel.

En el caso de la producción de CO<sub>2</sub>, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para cada cinco días y para cada concentración de petróleo diésel (1, 3, 5 y 7 %), con un nivel de confianza del 95 % ( $\alpha = 0,05$ ). Posteriormente, se aplicó la prueba *post hoc* de Duncan, cuyos resultados se representaron en gráficos mediante letras que indican las diferencias significativas entre los grupos.

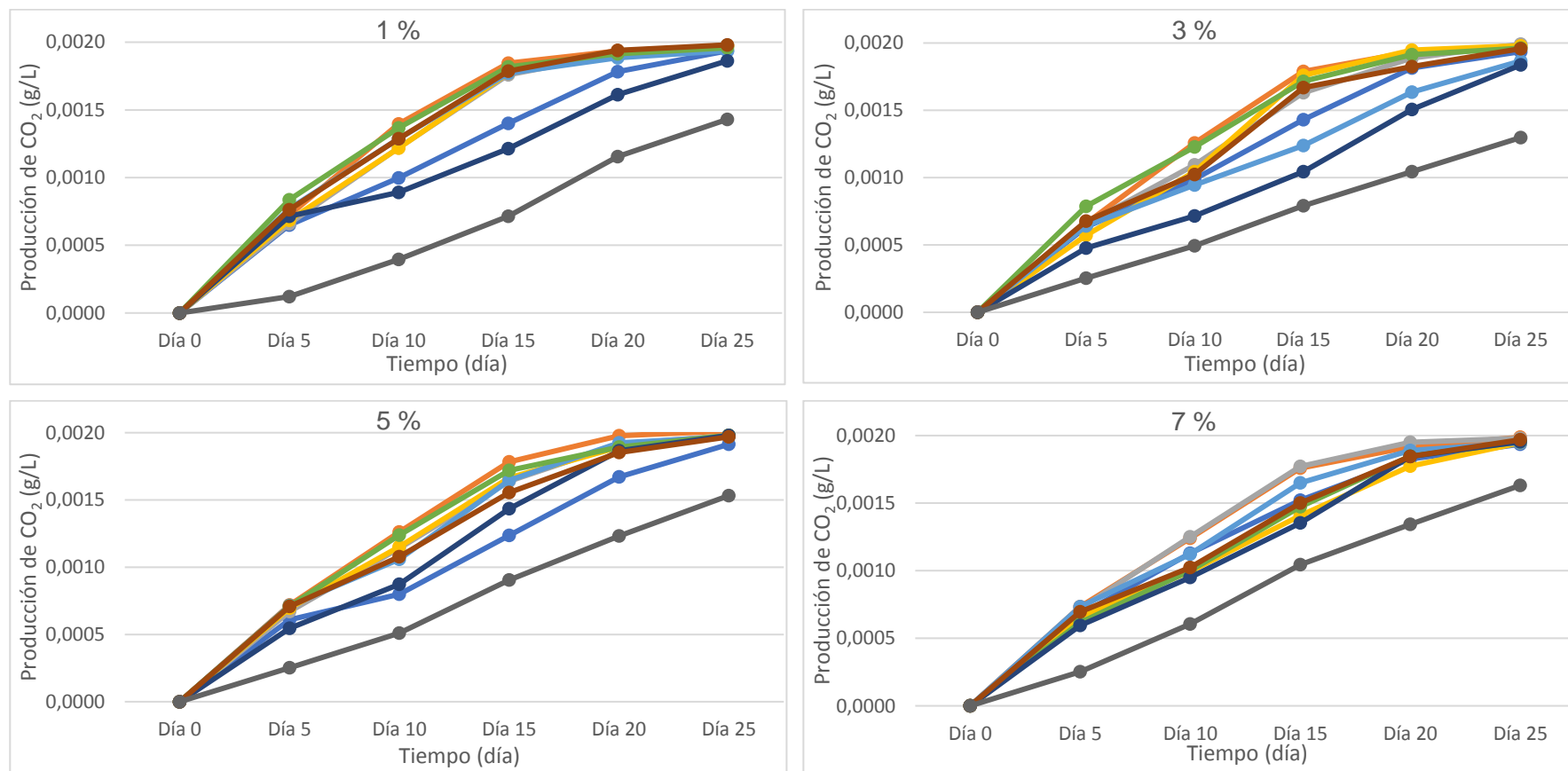
Para los datos de porcentaje de ml residual de petróleo diésel, se realizó el mismo procedimiento estadístico aplicado únicamente al día 60, permitiendo evaluar las diferencias entre las cepas, el consorcio y el blanco a diferentes concentraciones de petróleo diésel (1, 3, 5 y 7 %).

Todo el análisis estadístico se llevó a cabo en R (versión 4.4.1) y RStudio (versión 1.3.959), herramientas de código abierto que facilitaron la determinación precisa de las diferencias significativas en el efecto degradador de las cepas y consorcios bacterianos en la biodegradación del petróleo diésel.

## **IV. RESULTADOS**

**Figura 7**

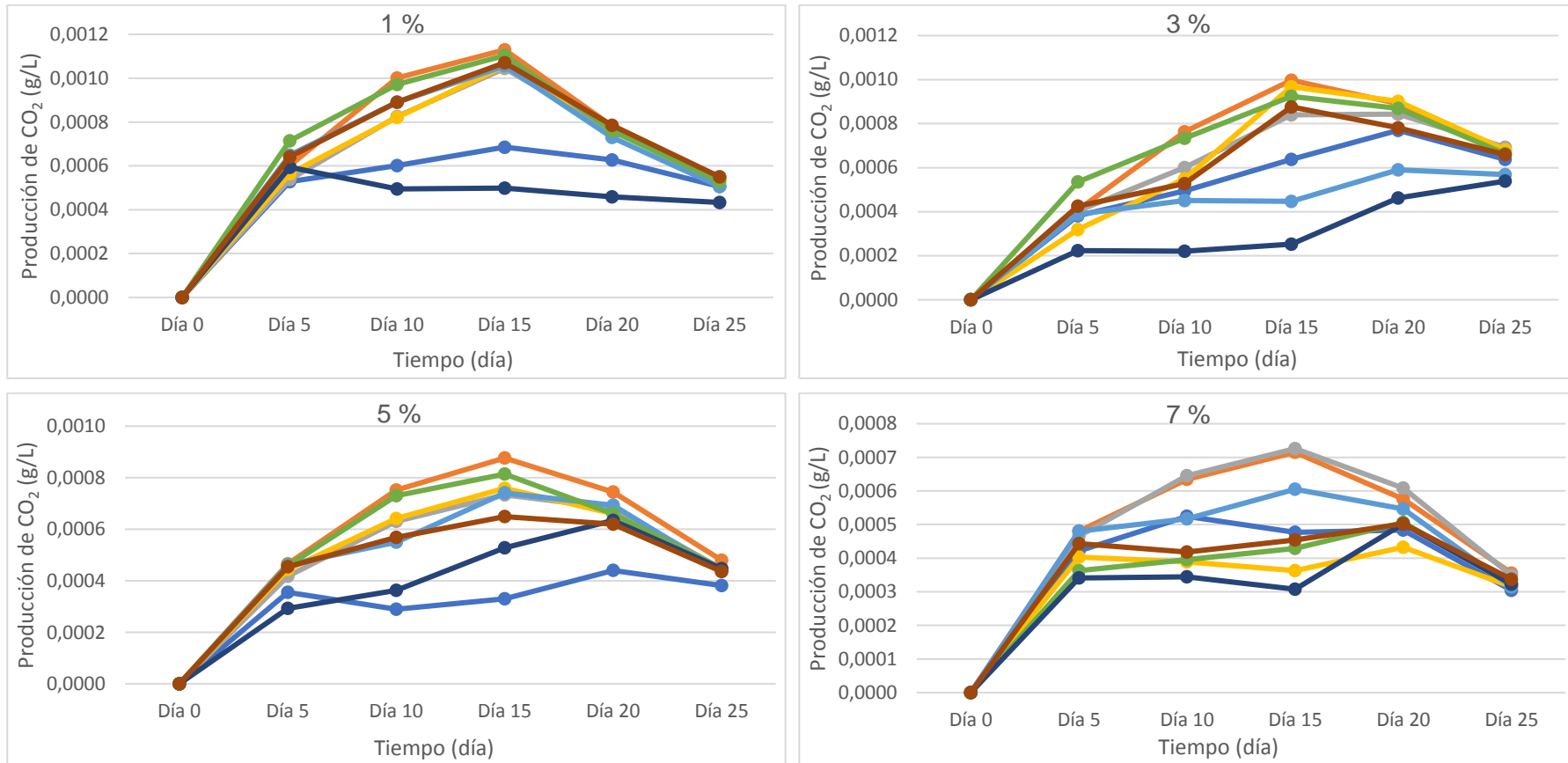
Producción acumulativa de CO<sub>2</sub> (g/L), como efecto de la degradación de petróleo diésel a distintas concentraciones iniciales, por cepas y consorcio de bacterias endofíticas de *Cannabis sp.* "cáñamo", Ayacucho 2023.



Nota. Cada color representa una cepa, consorcio y blanco: A B C D E F G Consorcio Blanco .

**Figura 8**

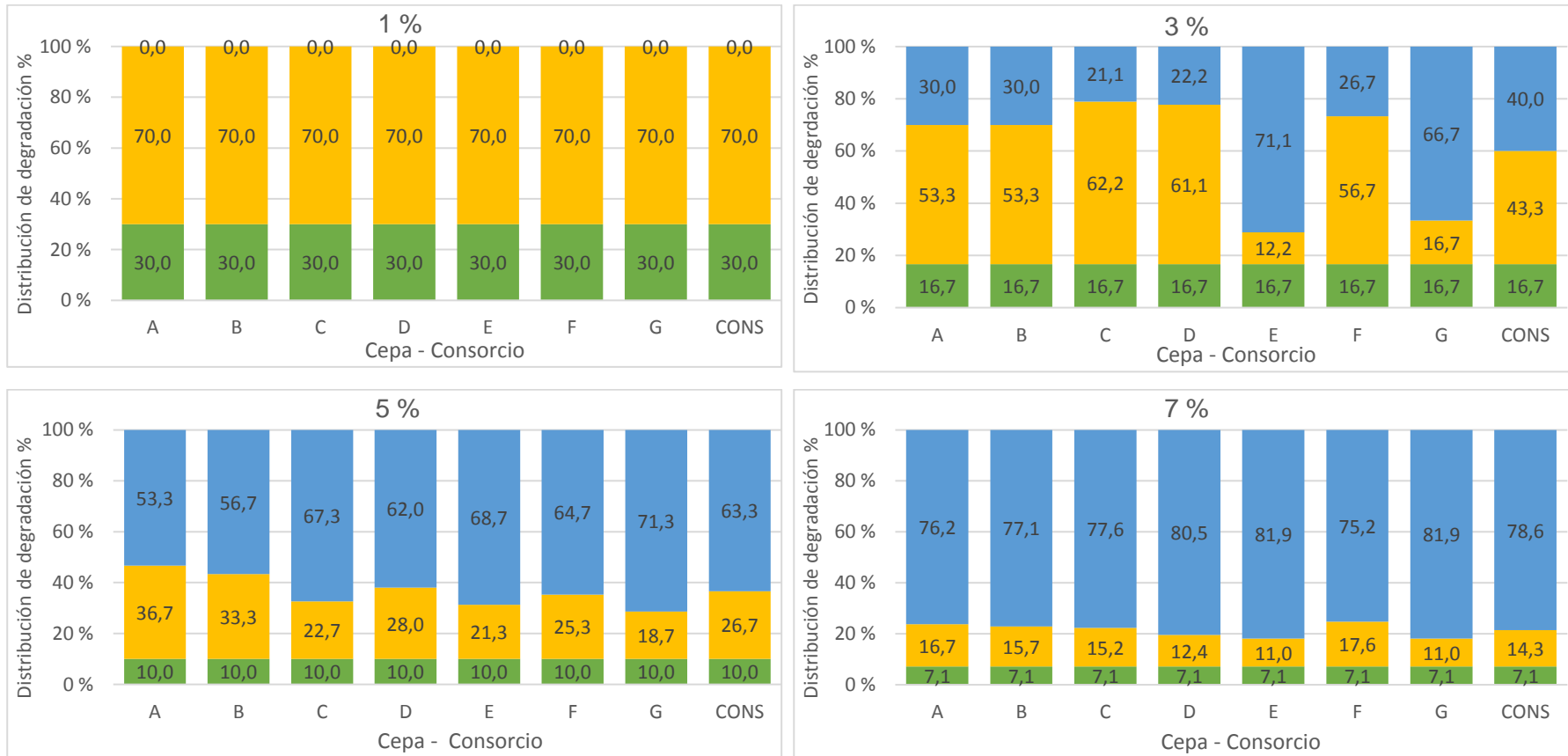
Producción neta de CO<sub>2</sub> (g/L), como efecto de la degradación de petróleo diésel a distintas concentraciones iniciales, por cepas y consorcio de bacterias endofíticas de *Cannabis sp.* “cáñamo”, Ayacucho 2023.



Nota. Cada color representa una cepa y consorcio: A B C D E F G Consortio.

**Figura 9**

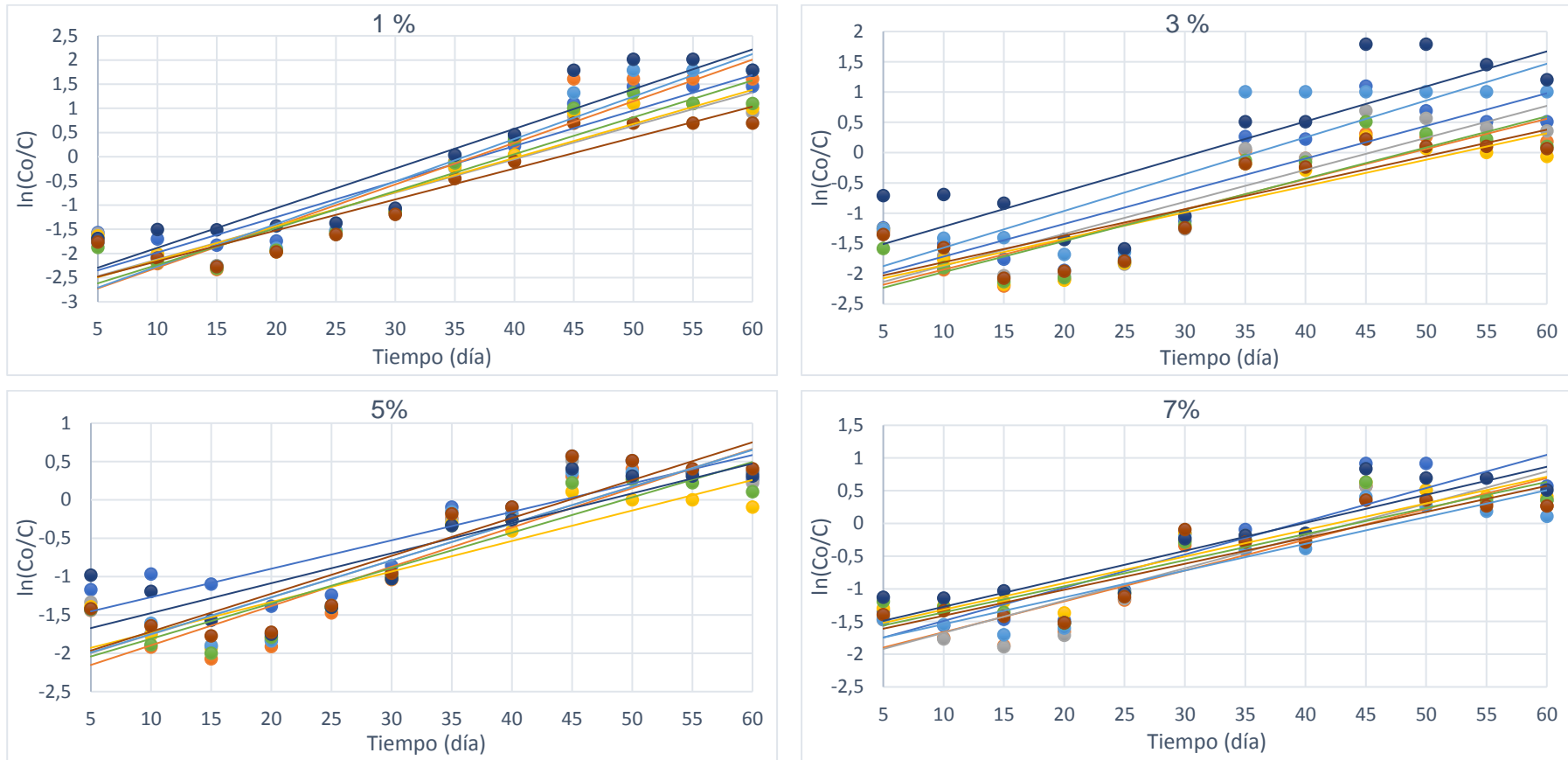
Porcentaje de volumen residual de petróleo diésel al día 60, como efecto de la degradación a distintas concentraciones iniciales, por cepas y consorcio de bacterias endofíticas de *Cannabis sp.* “cáñamo”, Ayacucho 2023.



Nota. Cada color en las columnas representa una fracción del petróleo diésel, según el tratamiento evaluado: ■ % degradación físico-química ■ % degradación bacteriana ■ % no degradado

**Figura 10**

Ajuste cinético de primer orden  $\ln(Co/C)$  en la producción neta de  $CO_2$  (g/L) hasta el día 60, como efecto de la degradación de petróleo diésel a distintas concentraciones iniciales, por cepas y consorcio de bacterias endofíticas de *Cannabis sp.* "cáñamo", Ayacucho 2024.



Nota. Cada color representa el valor de  $\ln(Co/C)$  y la línea de tendencia por cepa y consorcio: —●— A —●— B —●— C —●— D —●— E —●— F —●— G —●— Consorcio.

**Tabla 5**

*Parámetros cinéticos de primer orden para la producción neta de CO<sub>2</sub> (g/L) al día 60, por degradación de petróleo diésel a distintas concentraciones iniciales, usando bacterias endofíticas de Cannabis sp. Ayacucho 2024.*

Conc. ► Deformación	1 % petróleo diésel			3 % petróleo diésel			5 % petróleo diésel			7 % petróleo diésel		
	k1 / día	T1/2 / día	R <sup>2</sup>	k1 / día	T1/2 / día	R <sup>2</sup>	k1 / día	T1/2 / día	R <sup>2</sup>	k1 / día	T1/2 / día	R <sup>2</sup>
<b>Cepa A</b>	0,0734	9,44	0,8925	0,0539	12,86	0,7253	0,0371	18,68	0,7847	0,0508	13,64	0,8615
<b>Cepa B</b>	0,0860	8,06	0,8857	0,0498	13,92	0,7435	0,0512	13,54	0,8537	0,0471	14,72	0,8494
<b>Cepa C</b>	0,0691	10,03	0,8744	0,0528	13,13	0,7465	0,0482	14,38	0,8218	0,0493	14,06	0,8492
<b>Cepa D</b>	0,0704	9,85	0,8817	0,0435	15,93	0,7056	0,0398	17,42	0,8154	0,0406	17,07	0,8618
<b>Cepa E</b>	0,0878	7,89	0,9103	0,0608	11,40	0,7441	0,048	14,44	0,8513	0,041	16,91	0,834
<b>Cepa F</b>	0,0762	9,10	0,8988	0,0515	13,46	0,7879	0,0461	15,04	0,8479	0,0399	17,37	0,8328
<b>Cepa G</b>	0,0820	8,45	0,8852	0,0579	11,97	0,6732	0,039	17,77	0,7483	0,0428	16,20	0,8216
<b>Consorcio</b>	0,0639	10,85	0,8910	0,0438	15,83	0,7464	0,049	14,15	0,8551	0,0397	17,46	0,8469

Nota. Los valores se obtuvieron ajustando los datos de producción neta de CO<sub>2</sub> al modelo de primer orden mediante la gráfica ln(Co/C) versus tiempo, donde Co es la concentración inicial y C la concentración en cada intervalo. Se calcularon la constante de degradación (k, en día<sup>-1</sup>), el tiempo de vida media (T1/2 = ln2/k) y el coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>) para cada tratamiento (1, 3, 5 y 7 % de petróleo diésel).

**Tabla 6**

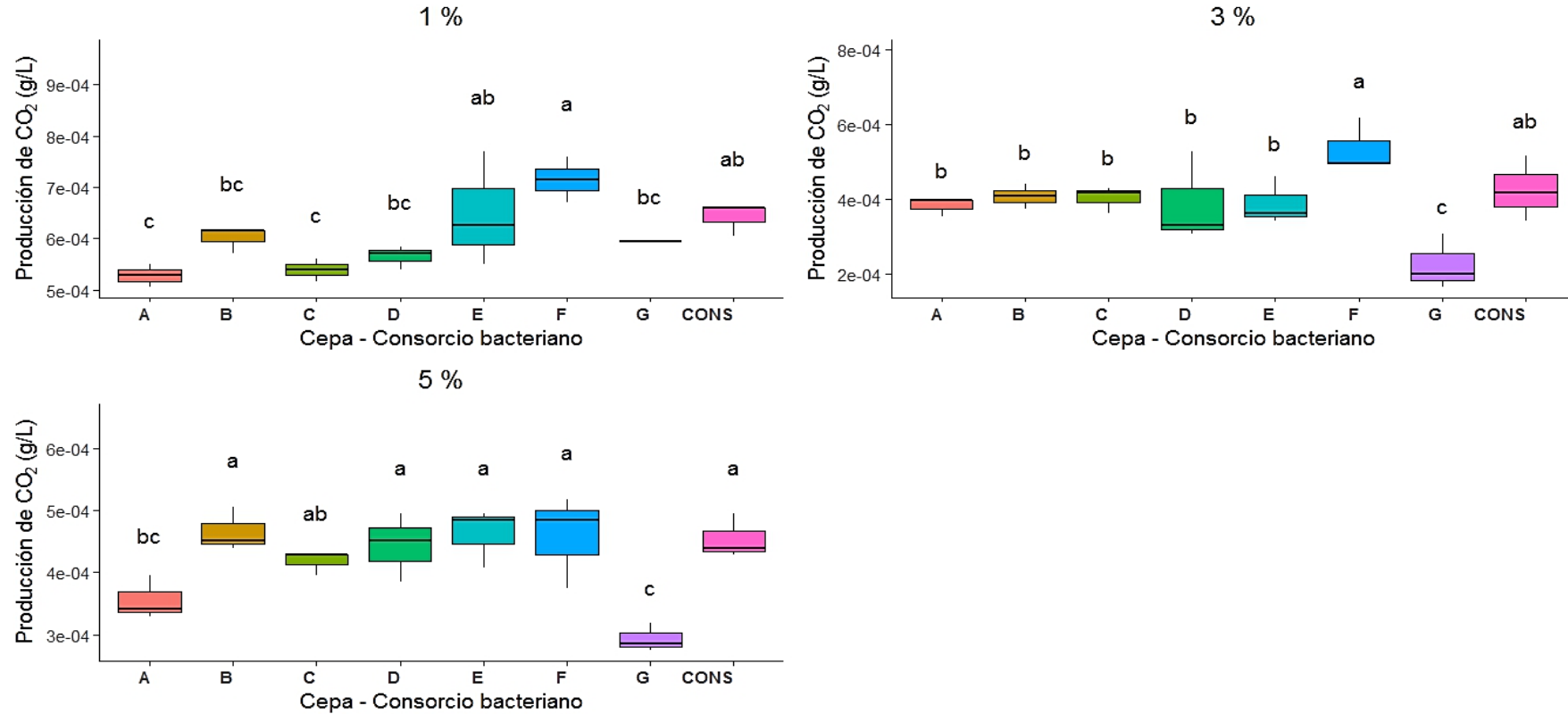
Identificación molecular de las bacterias endofíticas de *Cannabis* sp. degradadoras de petróleo diésel mediante análisis bioinformático Kraken2 (genoma total) y NCBI BLAST (16S ARNr), Ayacucho 2024.

CEPA	Kraken2		NCBI BLAST		
	Nombre científico	Nombre científico	Query Cover	E value	Per. Ident
<b>A</b>	<i>Pseudomonas citronellolis</i>	<i>Pseudomonas citronellolis</i>	100 %	1e-160	96,82 %
<b>B</b>		<i>Acinetobacter calcoaceticus/baumannii</i> complex			
	<i>A. calcoaceticus</i>	<i>A. calcoaceticus</i>	100 %	0,0	86,53 %
	<i>A. pittii</i>	<i>A. lactucae</i>	100 %	0,0	86,27 %
	<i>A. oleivorans</i>	<i>A. pittii</i>	100 %	0,0	86,02 %
	<i>A. baumannii</i>	<i>A. oleivorans</i>	100 %	0,0	85,91 %
	<i>A. saifertii</i>	<i>A. seifertii</i>	100 %	0,0	85,61 %
	<i>A. lactucae</i>	<i>A. nosocomialis</i>	100 %	0,0	85,48 %
<b>C</b>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	100 %	7e-163	97,12 %
<b>D</b>	<i>A. calcoaceticus</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus/baumannii</i> complex			
	<i>A. oleivorans</i>	<i>A. calcoaceticus</i>	99 %	0,0	90,26 %
	<i>A. pittii</i>	<i>A. lactucae</i>	99 %	0,0	88,00 %
	<i>A. baumannii</i>	<i>A. pittii</i>	98 %	0,0	87,97 %
	<i>A. saifertii</i>	<i>A. baumannii</i>	99 %	0,0	87,06 %
	<i>A. lactucae</i>	<i>A. seifertii</i>	90 %	0,0	87,08 %
<b>E</b>	<i>Pseudomonas</i> sp. FDAARGOS_380	<i>Pseudomonas</i> sp. FP215	100 %	0,0	96,31 %
<b>F</b>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	100 %	0,0	95,68 %
<b>G</b>	<i>Acinetobacter schindleri</i>	<i>Acinetobacter schindleri</i>	100 %	0,0	90,08 %

Nota. Query Cover: indica el porcentaje de la secuencia alineada, E value: probabilidad de coincidencia aleatoria, Per. Ident: similitud entre las secuencias. La identificación completa de cada cepa se encuentra en los Anexos 23-29.

**Figura 11**

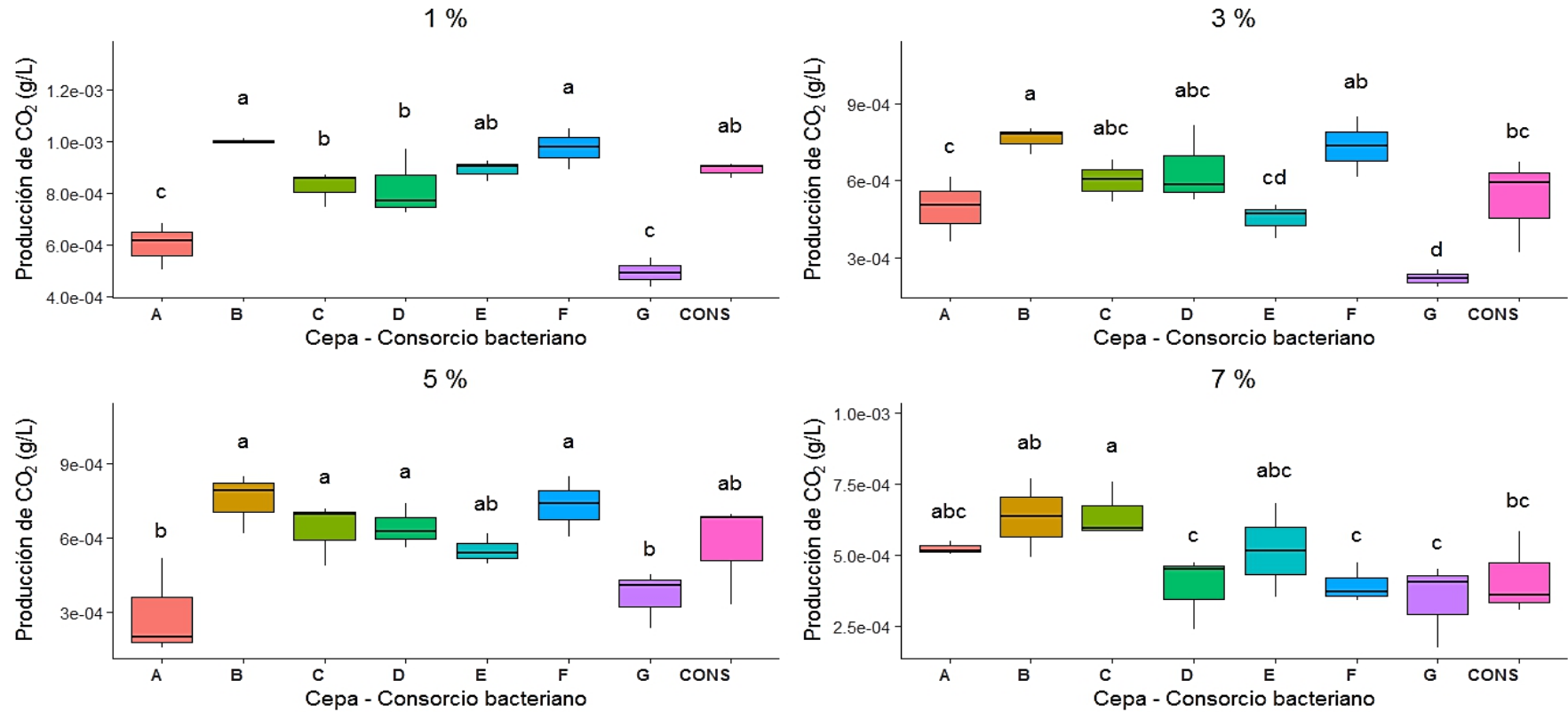
*Diferencias estadísticas (Test de Duncan) en la producción neta de CO<sub>2</sub> (g/L) al día 05, como efecto de la degradación de petróleo diésel a distintas concentraciones iniciales, por cepas y consorcio de bacterias endofíticas de Cannabis sp. “cáñamo”, Ayacucho 2024.*



*Nota.* Se presentan solo los porcentajes con diferencias estadísticas según ANOVA. Las letras (a, b, c, ab y bc) indican diferencias estadísticas según el Test de Duncan ( $p < 0,05$ ). Los grupos con letras iguales no difieren significativamente, mientras que letras distintas señalan diferencias estadísticamente relevantes. Las letras combinadas indican que el grupo no presenta diferencias significativas con ninguno de los grupos identificados por cada letra de forma individual, lo que refleja la carencia de evidencia estadística para distinguirlo de ambos grupos.

**Figura 12**

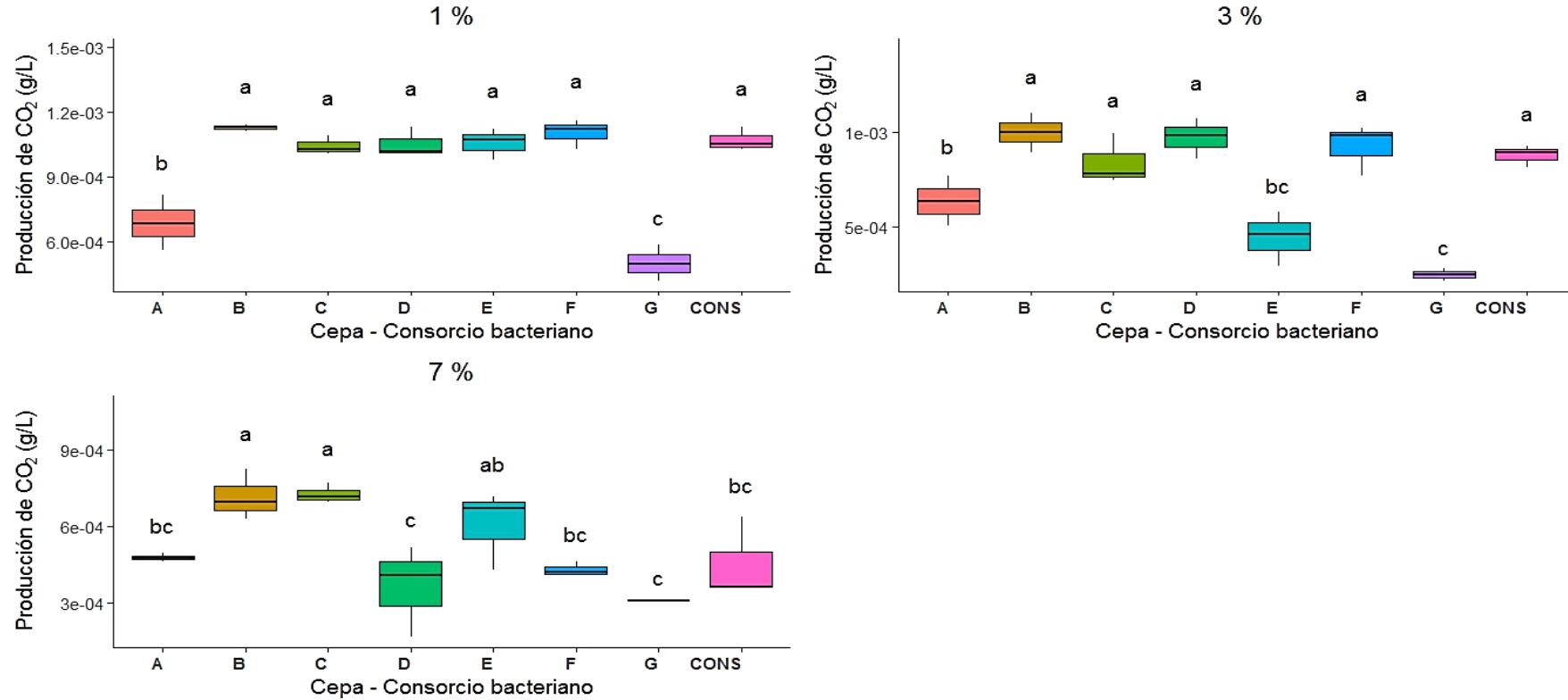
*Diferencias estadísticas (Test de Duncan) en la producción neta de CO<sub>2</sub> (g/L) al día 10, como efecto de la degradación de petróleo diésel a distintas concentraciones iniciales, por cepas y consorcio de bacterias endofíticas de Cannabis sp. “cáñamo”, Ayacucho 2024.*



*Nota.* Porcentajes con diferencias estadísticas significativas según ANOVA. Las letras (a, b, c, d, ab, bc, cd y abc) indican diferencias estadísticas según el Test de Duncan ( $p < 0,05$ ). Los grupos con letras iguales no difieren significativamente, mientras que letras distintas señalan diferencias estadísticamente relevantes. Las letras combinadas indican que el grupo no presenta diferencias significativas con ninguno de los grupos identificados por cada letra de forma individual, lo que refleja la carencia de evidencia estadística para distinguirlo de ambos grupos.

**Figura 13**

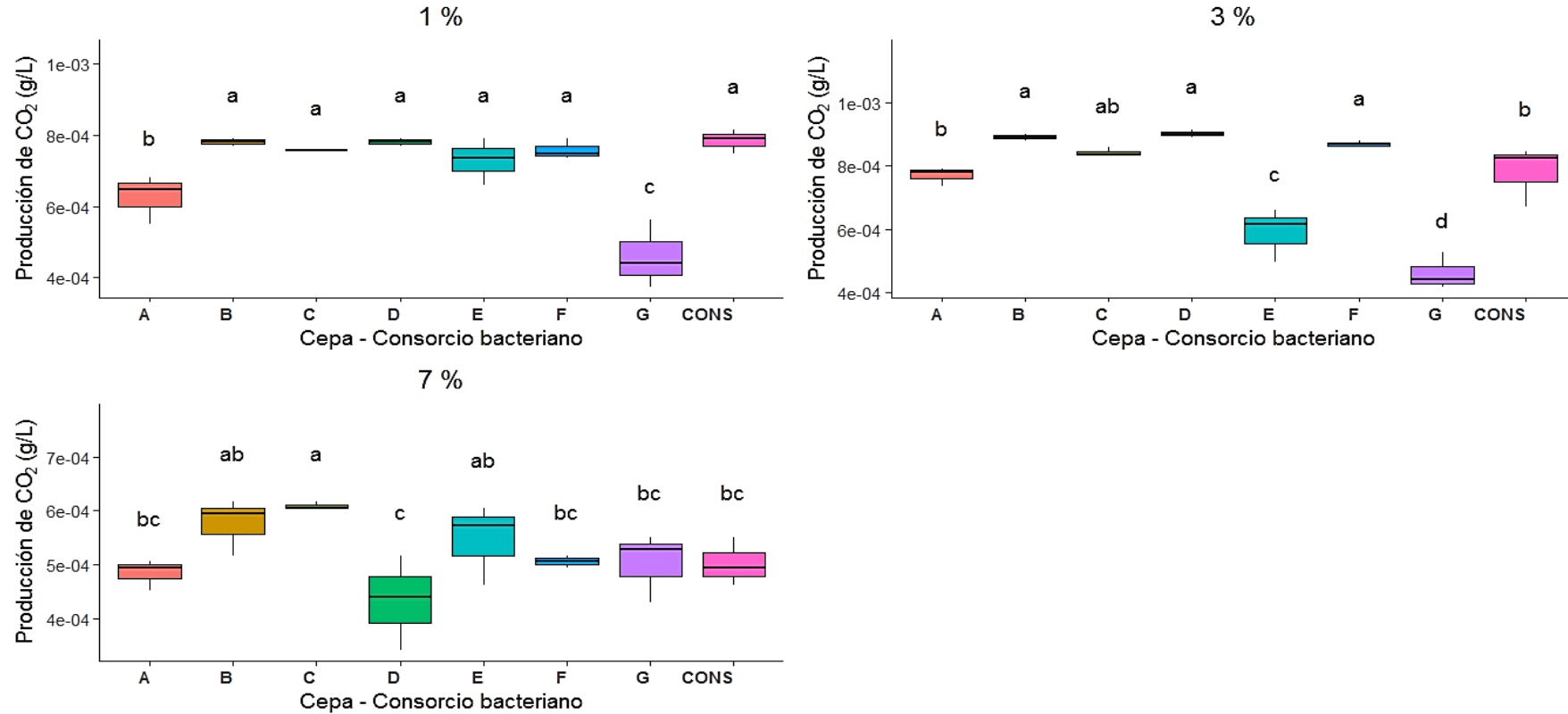
*Diferencias estadísticas (Test de Duncan) en la producción neta de CO<sub>2</sub> (g/L) al día 15, como efecto de la degradación de petróleo diésel a distintas concentraciones iniciales, por cepas y consorcio de bacterias endofíticas de Cannabis sp. "cáñamo", Ayacucho 2024.*



*Nota.* Se presentan solo los porcentajes con diferencias estadísticas según ANOVA. Las letras (a, b, c, ab y bc) indican diferencias estadísticas según el Test de Duncan ( $p < 0,05$ ). Los grupos con letras iguales no difieren significativamente, mientras que letras distintas señalan diferencias estadísticamente relevantes. Las letras combinadas indican que el grupo no presenta diferencias significativas con ninguno de los grupos identificados por cada letra de forma individual, lo que refleja la carencia de evidencia estadística para distinguirlo de ambos grupos.

**Figura 14**

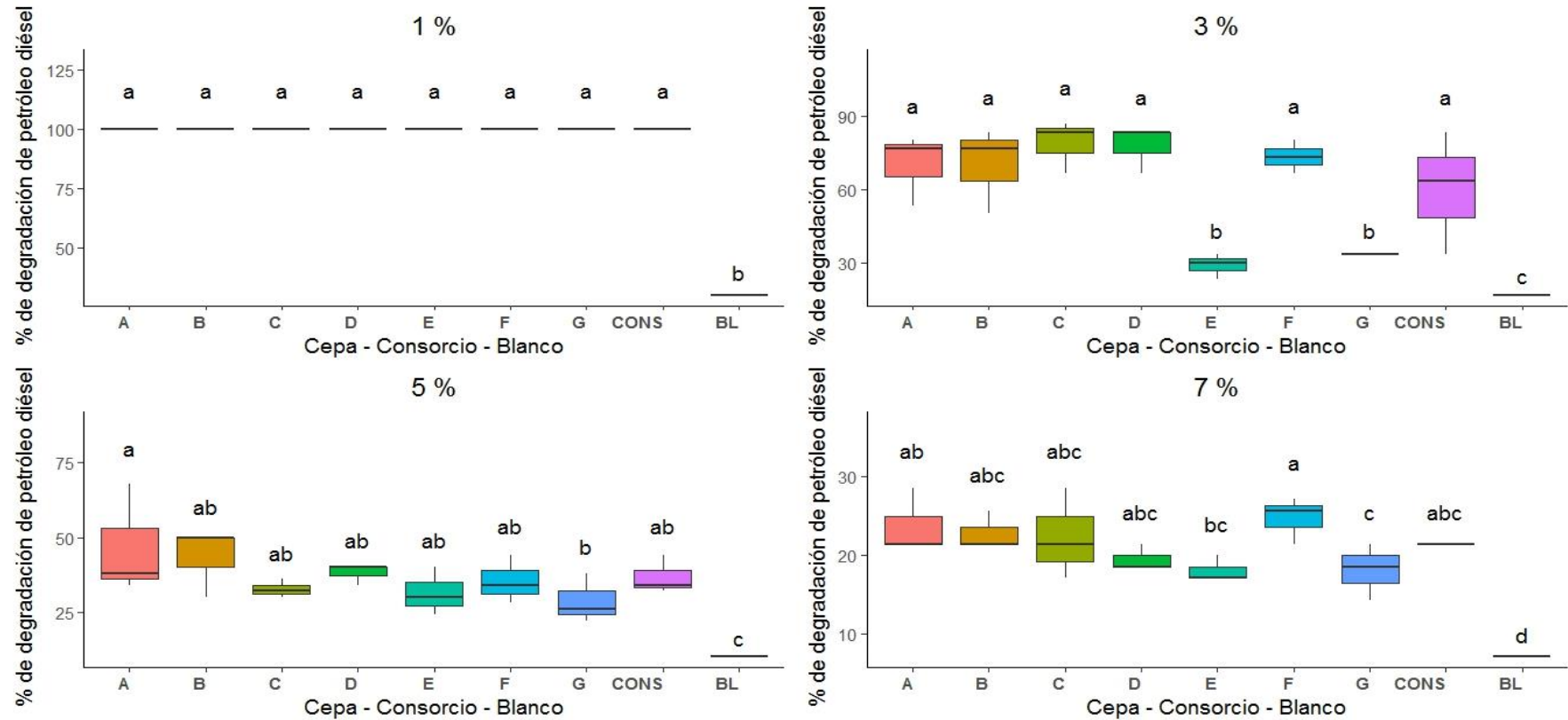
*Diferencias estadísticas (Test de Duncan) en la producción neta de CO<sub>2</sub> (g/L) al día 20, como efecto de la degradación de petróleo diésel a distintas concentraciones iniciales, por cepas y consorcio de bacterias endofíticas de Cannabis sp. "cáñamo", Ayacucho 2024.*



*Nota.* Se presentan solo los porcentajes con diferencias estadísticas según ANOVA. Las letras (a, b, c, d, ab y bc) indican diferencias estadísticas según el Test de Duncan ( $p < 0,05$ ). Los grupos con letras iguales no difieren significativamente, mientras que letras distintas señalan diferencias estadísticamente relevantes. Las letras combinadas indican que el grupo no presenta diferencias significativas con ninguno de los grupos identificados por cada letra de forma individual, lo que refleja la carencia de evidencia estadística para distinguirlo de ambos grupos.

**Figura 15**

*Diferencias estadísticas (Test de Duncan) en el porcentaje de ml residual de petróleo diésel al día 60, como efecto de la degradación a distintas concentraciones iniciales, por cepas y consorcio de bacterias endofíticas de Cannabis sp. “cáñamo”, Ayacucho 2024.*



*Nota.* Porcentajes con diferencias estadísticas significativas según ANOVA. Las letras (a, b, c, d, ab, bc, cd y abc) indican diferencias estadísticas según el Test de Duncan ( $p < 0,05$ ). Los grupos con letras iguales no difieren significativamente, mientras que letras distintas señalan diferencias estadísticamente relevantes. Las letras combinadas indican que el grupo no presenta diferencias significativas con ninguno de los grupos identificados por cada letra de forma individual, lo que refleja la carencia de evidencia estadística para distinguirlo de ambos grupos.

## V. DISCUSIÓN

El presente estudio se diferenció de otros trabajos al evaluar la biodegradación del petróleo diésel en un medio líquido en lugar de muestras de suelo por la limitada información existente sobre ambientes acuáticos. Esto adquiere relevancia debido a los efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales, refinerías petroleras y otros contaminantes antropogénicos que generan un riesgo directo para la salud y el ecosistema (Sauvé y Desrosiers, 2014; Gulkowska *et al.*, 2008). Este riesgo es particularmente importante en entornos agrícolas, donde se ha documentado la absorción y acumulación de compuestos tóxicos (metales pesados, hidrocarburos, hormonas, etc.), que repercuten en las diferentes propiedades fisicoquímicas del suelo, lo que conlleva al impacto en los cultivos destinados a la alimentación (Becerra *et al.*, 2015; Casey *et al.*, 2003). En este contexto, la fitorremediación se ha considerado una estrategia eficiente y rentable; *Cannabis sativa* L. “cáñamo industrial” destaca como planta hiperacumuladora natural gracias a su estructura superficial porosa e hidrófila (Pejic *et al.*, 2011), pero el proceso de fitorremediación no se comprende del todo, especialmente en la relación planta-endófitos. Por ello, nuestro enfoque se dirigió a aislar bacterias endofíticas de *Cannabis* sp. y evaluar su capacidad de degradar diésel, un hidrocarburo comúnmente utilizado en actividades industriales.

Para entender esta relación, se aisló bacterias endofíticas tolerantes a 2 % de diésel, se realizó un protocolo de desinfección superficial y enriquecimiento en medio M9 modificado (Iqbal *et al.* 2017; Zahid *et al.*, 2015). Luego, se aplicó una fase de adaptación a concentraciones crecientes de diésel (5, 10 y 15 %), obteniendo siete cepas Gram negativas (**Anexo 4**). El predominio de Gram negativas concuerda con investigaciones como las de Iqbal *et al.* (2017) y Loureiro *et al.* (2018), quienes reportaron mayor frecuencia de bacterias con membrana externa rica en lipopolisacáridos, lo que facilita la emulsificación y la degradación

de hidrocarburos, que posiblemente podrían ser una ventaja en la adaptabilidad frente a las bacterias Gram positivas (Cabrera *et al.*, 2010).

Una vez obtenido las cepas, se estudió la producción de CO<sub>2</sub>, el cual mide de manera indirecta la biodegradación del hidrocarburo (diésel), siendo este la única fuente de carbono, ya que el CO<sub>2</sub> es un subproducto de la actividad metabólica de los microorganismos durante la mineralización de hidrocarburos (Atlas y Bartha, 1972), siendo este un enfoque ampliamente usado en diversos trabajos de biodegradación, permitiendo así una evaluación cuantitativa, para lo cual se siguió la metodología de EPA 560/6-82-003 (EPA, 1982) y Bartha y Pramer (1965), adaptando algunos aspectos como Roverssi Sobrado (2011). Entre las modificaciones, está el reemplazo del uso de matraz por botellas de plástico conectadas a través de un tubo al captador de CO<sub>2</sub> facilitando la recolección del gas producido (**Anexo 5**), permitiendo así la conversión de los ml de HCl a gramos de CO<sub>2</sub>/L mediante la titulación, adicionalmente, se ajustó la concentración de HCl de 0,01 M a 0,005 M para obtener lecturas más precisas y mejorar la titulación, tal como se sugiere Johnson (2018) y Pedrero (2002) sobre la optimización de técnicas de titulación en sistemas de biodegradación.

En la **Figura 7** “Producción acumulativa de CO<sub>2</sub> (g/L)”, con concentraciones iniciales de diésel de 1, 3, 5 y 7 %, a lo largo de 25 días por ser representativo (la curva se vuelve constante), se observa una evolución temporal típica de la actividad bacteriana, con las siguientes tendencias: fase exponencial (día 0 – 15), se registró un rápido incremento de CO<sub>2</sub>, indicando alta actividad metabólica y ausencia de fase de adaptación, probablemente debido a la preadaptación (Margesin y Schinner, 2001). El blanco (medio M9 + diésel sin inóculo) muestra también un leve incremento, atribuible a reacciones fisicoquímicas, pero significativamente menor que en las cepas inoculadas. Estabilización (día 15 – 25): varias curvas alcanzaron un pico y luego se estabilizan, lo que se asocia a la disminución de nutrientes y/o acumulación de metabolitos tóxicos, como lo describe Leahy y Colwell (1990). El agotamiento de las fracciones más simples del diésel (alifáticos de cadena corta) deja compuestos más recalcitrantes (hidrocarburos aromáticos policíclicos, etc.), dificultando la biodegradación (Head *et al.*, 2006). Mientras que el efecto de la concentración de diésel fue: a menor concentración (1 y 3 %), se genera una mayor producción de CO<sub>2</sub> en menor tiempo, indicando una biodegradación eficiente. Mientras que al 5 y 7 %, las bacterias enfrentan mayor estrés metabólico, reflejado en una producción de CO<sub>2</sub>

menor. Estos gráficos y resultados se contrastan con el trabajo de Zhang *et al.* (1998), midieron la producción de CO<sub>2</sub> de la degradación de biodiésel y diésel en un medio líquido por 28 días con curvas similares, otros trabajos relacionados a la degradación de hidrocarburos en tierra como el estudio de Labud *et al.* (2007) en donde se midió la producción de CO<sub>2</sub> de hidrocarburos al 5 y 10 % (gasolina, diésel y petróleo) en mg C-CO<sub>2</sub>/kg de tierra muestran curvas semejantes, de igual manera se reportó en los estudios de , Barrios *et al.* (2015), Nápoles *et al.* (2015), Melo *et al.* (2014), Falchini *et al.* (2003) y Badalucco *et al.* (1994) .

En la **Figura 8** “Producción neta de CO<sub>2</sub> (g/L)”, se aprecia de forma más clara la contribución puramente biológica, al descontar la degradación fisicoquímica. Esto confirma que la tendencia del día 0 al día 15 aproximadamente muestra un aumento acelerado de la producción de CO<sub>2</sub> correspondiente a la fase exponencial que demuestra una mayor actividad por parte de las bacterias al asimilar la única fuente de carbono (petróleo diésel), omitiendo la fase de latencia y adaptación, demostrando que las bacterias estuvieron metabólicamente activas y que desarrollaron rutas metabólicas específicas para el diésel durante la preadaptación que se realizó con diésel al 15 %, seguida de un rejuvenecimiento en agar nutritivo, este resultado de la omisión de la fase de adaptación se mostró en trabajos como el de Loureiro *et al.* (2019) en donde se evaluó la degradación de diésel al 1 % por *Pseudomonas* sp. hasta el día 15, la cual fue contrastado por la descripción de Margesin y Schinner (2001) que mencionan la mejora de la expresión de enzimas claves para la biodegradación debido a una exposición inicial al contaminante en estudio, al igual que los estudios realizados por Das y Chandran (2011) y Atlas y Bartha (1972) que señalan la eficiencia del tratamiento previo induce a enzimas como monooxigenasas y dioxigenasas necesarias para descomponer hidrocarburos. Mientras que las curvas del día 10 al 15 - 20 aproximadamente tienden a mostrar una estabilización en la producción de CO<sub>2</sub> en algunas cepas, lo que demuestra una posible inhibición de la actividad metabólica, probablemente por la limitación de nutrientes o la acumulación de metabolitos secundarios que tienden a ser tóxicos como ácidos grasos o compuestos aromáticos, que según Leahy y Colwell (1990) estos efectos mencionados son típicos en sistemas donde la actividad bacteriana logra consumir de manera rápida los nutrientes disponibles hasta un cierto punto, logrando así un equilibrio metabólico. Finalmente se muestra que a partir de entre el día 15 - 20 al 25 en algunas cepas existe una fase de declive por la disminución de producción

de CO<sub>2</sub>, que puede deberse al agotamiento de los compuestos más fáciles de degradar del diésel (hidrocarburos saturados), dejando así solo compuestos recalcitrantes tóxicos y difíciles de degradar (hidrocarburos aromáticos policíclicos de alto peso molecular y componentes polares del petróleo crudo como los benzofuranos, benocarbazoles y benzotiofenos o debido al efecto inhibitorio por parte de metabolitos tóxicos acumulados, que se describieron por Head *et al.* (2006) en donde observaron que la presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) y compuestos sulfurados generan un estrés metabólicos que afecta la viabilidad bacteriana. Las curvas de las concentraciones al 1, 3 y 5 % de diésel en las cepas individuales y en consorcio, muestran una tendencia más alta en producción de CO<sub>2</sub> en menor tiempo debido a un menor efecto tóxico por parte del diésel, estudios como el de Varjani, (2017) donde se demuestra una fácil degradación de hidrocarburos a concentraciones relativamente bajas, por su mayor disponibilidad y menor efecto a la permeabilidad celular. Mientras que las curvas al 7 % de diésel muestran una menor producción de CO<sub>2</sub>, principalmente en la fase inicial que podría ser por la toxicidad que genera el diésel a altas concentraciones, estrés osmótico, limitación en el transporte de nutrientes o inhibición metabólica y enzimática (Das y Chandran, 2011; Okoh, 2006; Leahy y Colwell, 1990). Las curvas del consorcio muestran una mayor estabilidad a las diferentes concentraciones de diésel a lo largo del tiempo en comparación de las cepas individuales, lo que según Varjani (2017) sugiere una mayor eficiencia en las rutas metabólicas por las interacciones sinérgicas entre las especies, logrando degradar diferentes fracciones del diésel, tal como lo describe Tyagi *et al.* (2011) y Röling *et al.* (2002), los consorcios bacterianos demuestran ser más efectivos y estables por su colaboración metabólica a la hora de degradar hidrocarburos. Todas estas curvas son contrastadas por diversos trabajos como el de Loureiro *et al.* (2018) que obtuvo curvas similares en la evaluación de degradación del diésel al 0, 1 y 5 %, por bacterias aisladas de lodos industriales. Otro trabajo es el de Gómez (2012), donde se observaron curvas de crecimiento bacteriológico en el proceso de degradación de hidrocarburos totales del petróleo mediante la atenuación natural, bioestimulación y bioaumentación en el suelo contaminado, al igual que el trabajo de Silva *et al.* (2012).

Los gráficos en general muestran un comportamiento típico de la curva de crecimiento bacteriano y degradación de sustratos omitiendo la fase de adaptación (fase exponencial, estacionaria y declinación) que representan el ciclo de

crecimiento y agotamiento de recursos (Atlas y Bartha, 1972); estos resultados sugieren que el consorcio bacteriano es una opción para la biorremediación en concentraciones moderadas de diésel por su estabilidad.

Todos estos resultados de CO<sub>2</sub> se complementaron con la medición volumétrica del petróleo diésel residual al día 60, con el fin de obtener los valores porcentuales de: porcentaje de degradación bacteriana, porcentaje no degradado y el porcentaje de degradación fisicoquímica. Para una mejor visualización se realizó el gráfico de columnas 100 % apiladas, que se muestra en la **Figura 9** con cuatro sub gráficos al 1, 3, 5 y 7 %. El gráfico al 1 %, muestra una degradación completa 100 % por parte de las bacterias individualmente y en consorcio; obteniendo una degradación bacteriana neta de 70 % y una degradación fisicoquímica del 30 %. El gráfico al 3 % mostró una ligera disminución en el porcentaje de degradación; siendo relativamente igual entre las cepas A, B, C, D, F y el consorcio (43,3 % y 62,2 % de degradación), mientras que las cepas E y G mostraron un bajo porcentaje de degradación 12,2 % y 16,7 % respectivamente; el porcentaje de degradación fisicoquímico fue de 16,7 %. El gráfico al 5 % demuestra un porcentaje de degradación estable en todas las cepas individuales y en consorcio, variando entre 18,7 % a 28,0 %, siendo mayor por la cepa A con 36,7 % y B con 33,3 %; mientras que el porcentaje de degradación fisicoquímico fue de 10,0 %. El gráfico al 7 % muestra un bajo porcentaje de degradación en todas las cepas individuales y en consorcio, los porcentajes de degradación está entre 11,0 % a 16,7 %, mientras que el porcentaje de degradación fisicoquímico fue de 7,1 %.

Todos estos resultados, tanto de la evolución del CO<sub>2</sub> como la medición volumétrica final, tienen un cierto grado de relación y concordancia, habiendo algunos casos discordantes por factores externos. Por ello se realizó un mejor análisis evaluando la cinética de degradación, que permitió medir y describir como se da la variación de la velocidad de degradación del petróleo diésel y el tiempo de vida media, con el fin de saber cómo se comporta las bacterias frente al hidrocarburo (petróleo diésel) y poder identificar el potencial de cada cepa para lograr optimizar los procesos de biorremediación, la metodología se contrasta con Iqbal *et al.*, (2019, 2017). El **Anexo 11** contiene los datos de cinética de primer orden empleando  $\ln(C_0/C)$ , que sirvieron para la obteniendo de la gráfica que se muestra en la **Figura 10**, con cuatro sub gráficos agrupados por las concentraciones de petróleo diésel (1, 3, 5 y 7 %), lo cual nos permite observar la relación y evolución que existe entre C<sub>0</sub> (Concentración inicial de CO<sub>2</sub>) y C

(concentración de CO<sub>2</sub> en un tiempo t) a lo largo de 60 días, se observa que al igual que las curvas de CO<sub>2</sub> visto anteriormente, el comportamiento de la fase inicial al día 20 se muestra un valor de  $\ln(C_0/C)$  menor por la mayor producción de CO<sub>2</sub> (C), mientras que después de transcurrido los 20 días hay un aumento del valor de  $\ln(C_0/C)$  que demuestra una menor producción de CO<sub>2</sub> (C), esto genera una línea de tendencia recta y casi perfecta típico de la cinética de primer orden, similar al reportado por Iqbal *et al.*, (2019) que midió la cinética de primer orden de la degradación de fenol y benceno, permitiendo generar una ecuación y un índice de R<sup>2</sup>, gracias a esos datos se calculó k (constante de velocidad de degradación, pendiente de la ecuación "m") y el tiempo de vida media T<sub>1/2</sub> (tiempo necesario para la degradación al 50 %) que fue hallado mediante la ecuación  $\ln(2)/k$ , todos estos datos se resumen en la **Tabla 5**. El cuadro resumen nos muestra que los valores de k tuvieron una tendencia en todas las cepas individualmente y en consorcio a disminuir por el aumento en la concentración del petróleo diésel del 1 % al 5 %, mientras que al 7 % se observando un ligero aumento en algunos casos, siendo más notorio en la cepa A, que nos indica que hubo un aumento de producción de CO<sub>2</sub> a diferencia del 5 %, esto puede deberse, según Alexander (1999) a la mayor disponibilidad de diésel y componentes más fáciles de degradar, generando esta diferencia de k. El T<sub>1/2</sub> tuvo un igual comportamiento, observando un aumento de días a que es necesario para degradar al menos el 50 % a medida que se aumenta las concentraciones de petróleo diésel. Las cepas B, E y G al 1 % de petróleo diésel tuvieron una k ligeramente mayor que las otras con un T<sub>1/2</sub> menor, mientras que al 3 % la cepa A, E y G tuvieron un mayor k a diferencia de las demás cepas con un T<sub>1/2</sub> ligeramente menor, al 5 % la cepa B tuvo un mayor k a diferencia de las demás cepas con un T<sub>1/2</sub> ligeramente menor, al 7 % la cepa A tuvo un mayor k a diferencia de las demás cepas con un T<sub>1/2</sub> ligeramente menor. Mientras que el R<sup>2</sup> máximo al 1 % fue 0,9102, al 3 % fue de 0,7879, al 5 % fue de 0,8551 y al 7 % fue de 0,8618. Estos coeficientes de determinación indican que el modelo de primer orden explica de forma moderada los datos, pero no completamente, lo que sugiere que puede haber múltiples fases en el sistema que no se ajustan correctamente a la cinética de primer orden. El **Anexo 12** muestra los valores de R<sup>2</sup>, para el cero, primer y segundo orden a las distintas concentraciones para cada cepa y consorcio, se puede ver que en algunos casos, que el valor de R<sup>2</sup> de segundo orden es ligeramente mayor que primer orden, este resultado sugiere

que ambos modelos pueden ajustarse a los datos experimentales obtenidos del CO<sub>2</sub> o puede ser un indicio de que ambos ordenes tienen características compartidas, este tipo de resultado podría estar relacionado con el ruido en los datos, la naturaleza del proceso biológico o que no sea estrictamente lineal ni cuadrática, tal como lo menciona Alexander (1999), que los procesos de biodegradación suele ser multifactorial, por diversos motivos como la disponibilidad del sustrato o factores ambientales que hacen que se produzca un equilibrio en las velocidades de reacción entre diferentes órdenes cinéticos. En estos casos diversos autores mencionan que se debe de priorizar el modelo más simple, primer orden, para garantizar la interpretación y evitar una complejidad innecesaria, este principio se basa en modelados estadísticos y científicos (parsimonia), Burnham y Anderson (2004) destacan que se debe seleccionar el modelos que dé un equilibrio al ajuste y a la complejidad, mientras que Motulsky y Christopoulos (2003) sostiene que la cinética de primer orden suele ser suficiente a menos que exista una buena razón para utilizar un modelo más complejo. La metodología empleada mide indirectamente el CO<sub>2</sub> a través de una titulación de NaOH con HCl, esta medición está sujeta a presentar variabilidad por la presencia de fuentes adicionales de CO<sub>2</sub> (ambiental o procesos no controlados) que podrían afectar al ajuste del modelado cinético, tal como lo menciona Alexander (1999), las mediciones indirectas pueden producir incertidumbre en sistemas con múltiples fuentes de carbono, afectando la cinética del orden.

Una vez comprendido como es el comportamiento de la producción de CO<sub>2</sub>, su cinética de degradación y como tiene relación con los ml degradados (porcentaje de degradación), es necesario identificar a cada una de las cepas, para poder realizar un análisis estadístico y corroborar las diferencias significativas o no que se presenten entre las diferentes cepas. Para confirmar las diferencias significativas se realizó un análisis estadístico mediante ANOVA (**Anexo 14 y 16**) y la prueba de Duncan en la producción de CO<sub>2</sub> neta (días 5, 10, 15 y 20) y en el porcentaje de diésel residual (día 60), considerando distintas cepas y consorcio a diferentes concentraciones de petróleo diésel. Los datos cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad (**Anexo 13 y 15**), lo que permitió aplicar ambas pruebas adecuadamente. Los boxplots (**Figura 11-15**), mostraron que, en los días 5 y 10 hubo diferencias significativas en la producción de CO<sub>2</sub> entre las cepas y consorcio, sobre todo al 1, 3 y 5 %, indicando una activación metabólica temprana y diferencial entre cepas. En los días 15 y 20, las diferencias se

mantuvieron, aunque al 5 % no alcanzaron significancia estadística, lo que podría deberse a un equilibrio metabólico. Mientras que al día 60, el análisis del porcentaje de diésel residual reveló diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en todas las concentraciones, reflejando que la eficacia degradadora depende tanto de la cepa como de la concentración del contaminante a diferencia del blanco. Las cepas con alta producción de  $\text{CO}_2$  en etapas tempranas también presentaron los menores porcentajes de diésel remanente, lo cual refuerza su eficiencia a largo plazo. Estas diferencias se mostraron mediante la prueba de Duncan agrupó por letras (a, b, c...), donde los grupos con letras diferentes muestran diferencias significativas, mientras que los grupos que comparten varias letras, como "abc", indican que sus medias no difieren significativamente entre sí ( $p \geq 0,05$ ), este solapamiento puede deberse a que las diferencias reales son pequeñas y la prueba de Duncan tiende a agruparlas estadísticamente a pesar de que existan diferencias numéricas sutiles. Es importante resaltar que la ausencia de diferencias estadísticas no implica igualdad funcional entre cepas, sino una limitación en la capacidad de detección del diseño experimental. El consorcio bacteriano presentó un rendimiento estable tanto en la producción de  $\text{CO}_2$  como en la degradación de diésel en múltiples concentraciones. Este comportamiento apoya la hipótesis de sinergia microbiana, donde la interacción entre especies mejora la eficiencia metabólica dado por Varjani (2017) y Tyagi *et al.* (2011) . En conjunto, los análisis estadísticos confirman que la capacidad de biodegradación del petróleo diésel está influenciada por la concentración inicial del contaminante y por la fisiología metabólica propia de cada cepa o consorcio. La variabilidad observada entre tratamientos y a lo largo del tiempo evidencia que no existe una única estrategia degradadora, sino múltiples rutas condicionadas por el tipo de microorganismo y el ambiente.

La identificación de las bacterias endofíticas de *Cannabis* sp. degradadoras del petróleo diésel, se muestran en la **Tabla 6**, en donde se tuvo como resultados los géneros *Acinetobacter* y *Pseudomonas*. Mientras que las especies de la cepa A al F fueron: *Pseudomonas citronellolis*, *Acinetobacter calcoaceticus/baumannii* complex, *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter calcoaceticus/baumannii* complex, *Pseudomonas* sp. FDAARGOS\_380, *Acinetobacter calcoaceticus* y *Acinetobacter schindleri* respectivamente; estas bacterias fueron concordantes a los estudios realizados por Iqbal *et al.* (2017), en donde se identificó a los géneros bacterianos *Acinetobacter* y *Pseudomonas*, endofíticas de *Cannabis sativa* irrigada con agua

residual de refinerías, específicamente *A. baumannii* que está relacionado con las cepas B y D (*A. calcoaceticus/baumannii complex*) y *P. aeruginosa* que está relacionado con la cepa E (*Pseudomonas* sp. FDAARGOS\_380), identificadas por la amplificación por PCR del gen 16S ARNr; al igual que el estudio de Zahid *et al.*, (2015) donde se identificó a las bacterias rizosféricas de *Cannabis sativa* irrigadas con agua residual de una refinería de petróleo, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter junii*, identificadas mediante el ARNr 16S; estos géneros bacterianos endofíticos fueron identificadas también en el estudio de Scott *et al.*, (2018) y Afzal *et al.* (2015), más no las especies específicas, lo cual genera un aporte nuevo y que servirá como referencia para posteriores estudios, teniendo en cuenta que la comunidad endofítica esta influenciada por la naturaleza del suelo que está en contacto con la planta (Rashid *et al.*, 2012; McInroy y Kloepper, 1995). El grupo *Acinetobacter calcoaceticus/baumannii complex* también conocido como complejo ACB (por su implicancia en el aspecto clínico) acuñado por Gerner *et al.* (1991), en el cual está las cepas B y D, consta de seis especies: *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. nosocomialis*, *A. pittii*, *A. seifertii* y *A. lactucae*; de las cuales *A. calcoaceticus* se encuentra principalmente en muestras ambientales, mientras *A. baumannii* mayormente es una especie relacionada con infecciones nosocomiales (Mancilla-Rojano *et al.*, 2024; Villalón *et al.*, 2015); en el estudio de Y.-S. Kang *et al.* (2011) el porcentaje de similitud de *A. oleivorans* basado en el gen ARNr 16S con las especies *A. calcoaceticus*, *A. haemolyticus*, *A. baumannii*, *A. baylyi* y *A. beijerinckii* es de 98,2 %, 97,4 %, 97,2 %, 97,1 % y 97,0 % respectivamente, comprobando así que los estudios genómicos complejos como el de Mancilla *et al.* (2024) muestran variaciones de tamaño y secuencia, lo cual resulta difícil vincular las secuencias consenso con las especies específicas que conforman este complejo. Estudios como el de Nemeč *et al.* (2011) en el cual las especies como *A. pittii* y *A. nosocomiales* obtuvieron una cierta diferenciación por el crecimiento a diferentes temperaturas y su asimilación con el malonato, L-tartrato levulinato o citronato que pueden ayudar con la diferenciación hasta cierto grado pero que no se puede confirmar, por ello que en este estudio se tomó en cuenta las cepas B y D como distintas y que están dentro de este complejo. Para realizar las comparaciones de los resultados obtenidos, no se encontraron trabajos específicos realizados en un medio acuático, que hayan trabajado con el petróleo diésel y a concentraciones mayores, ya que la mayoría de trabajos suelen realizar la degradación de concentraciones menores al 1 %; otro aspecto que se

observó es que no se realizó muchos estudios de estas especies a nivel de degradación, en nuestro trabajo se tomó la evolución de CO<sub>2</sub>, ml restantes por volumetría y cinética de degradación, lo cual no se observó en otros estudios, por ello se tomó en cuenta los trabajos que más se aproximen a nuestro estudio, siendo esta una diferencia a tener en cuenta.

Los estudios bases que se tomó en cuenta para el estudio demostraron lo siguiente: Zahid *et al.* (2015) evaluó el potencial de degradación de benceno con cepas rizosféricas del suelo de *Cannabis sativa* irrigada con agua residual de una refinera de petróleo, al identificar los géneros de *Pseudomonas* y *Acinetobacter* fue cultivado en un medio M9 a 1 000 mg/L (0,1 %) de benceno como única fuente de carbono, se evaluó mediante la densidad óptica, obteniendo una degradación de 85 y 70 % respectivamente en 72 horas, en nuestro estudio estos géneros obtuvieron un mayor porcentaje de degradación al 1 % de petróleo diésel en un T1/2 relativamente de nueve días, mostrando que las cepas endofíticas si tienen el potencial de degradación de compuestos más complejos como el diésel y a concentraciones mayores. Iqbal *et al.* (2017) teniendo como antecedente el anterior trabajo realizaron la evaluación pero en este con el benceno y fenol con cepas endofíticas de *Cannabis sativa*, pero de otro lugar de contaminación, los géneros de *Pseudomonas* y *Acinetobacter* presentaron una degradación completa a las concentraciones de 250, 500 y 750 mg/L, mientras que *Pseudomonas* presentó una degradación de 72 % a 1 000 mg/L y *Acinetobacter* un 68 % de degradación a esa misma concentración de benceno con una velocidad constante de  $1,86 \times 10^2$  por hora para *Pseudomonas* con un T1/2 de 1,5 días, estos modelados cinéticos y resultados fueron aplicados al presente estudio, obteniendo datos mayores, debido a la evaluación del diésel que a comparación del fenol y benceno tuvieron mayor grado de complejidad a la hora de degradación, además de ello se utilizó concentraciones más altas a mayor período, lo que nos ayudó a obtener mayores resultados que servirán de base para futuros estudios.

De igual manera Iqbal *et al.* (2019) se enfocaron en el potencial de degradación que tienen estas bacterias y cómo éstas afectan al crecimiento vegetal en lugares contaminados con petróleo, en donde se identificaron el género de *Pseudomonas*, el cual tuvo una degradación de 4 570 mg/L de diésel en un 69 % con una k de 0,044/h en cuatro días, siendo casi la mitad del 1 % de petróleo diésel usado en nuestro estudio obteniendo la degradación al 100 % con un T1/2 de ocho a nueve días con una velocidad de 0,07 a 0,08 por día, lo que comprueba que nuestros

resultados fueron ligeramente mayores pero consistentes con los otros trabajos. Las cepas A, C y E, pertenecientes al del género *Pseudomonas*, con la cepa A identificada como *Pseudomonas citronellolis*, se contrastó con el trabajo de Bhattacharya *et al.* (2003) donde se obtuvo una degradación entre 65 a 96 % al 1 % de TPH de lodo lodoso por *P. citronellolis* al día 15, siguiendo la metodología de Lal y Khanna (1996), mientras que en nuestro estudio obtuvimos una degradación al 100 % de petróleo diésel al 1 %, mostrando una mayor degradación del diésel, esto podría deberse a la composición que tuvo del TPH de lodo oleoso, a comparación del diésel que ya cuenta con una composición específica. Por otro lado, Remus *et al.* (2016) evaluó la secuencia genómica completa y detallada de *P. citronellolis* relacionado a con la filósfera, degradación de alifato, terpenoides y la resistencia a antibióticos, el cual se encontró diversos genomas que permiten la degradación de hidrocarburos, siendo el genoma P3B5 la más representativa, lo cual es consistente con nuestro estudio demostrando que *P. citronellolis* si cuenta con la capacidad de degradar diversos hidrocarburos. Además Pardo *et al.* (2017) obtuvo una tolerancia de *P. citronellolis* entre las 24 – 48 horas a concentraciones altas de 1 200 mg/L de hidrocarburo aromático, demostrando que esta bacteria tiene propiedades de tolerancia a altas concentraciones, tal como se realizó en nuestro estudio en la fase de adaptación al 15 % de diésel. Asimismo, Koutinas *et al.* (2021) evaluó la biodegradación de aguas residuales, mediante el estudio de la producción de biosurfactantes y polihidroxicanoatos por *P. citronellolis* SJTE-3, logrando metabolizar produciendo 93, 86, 85 y 88 % de DQO, n-dodecano, n-tetradecano y naftaleno respectivamente. Demostrando así con nuestros estudios la degradación de diésel al 1, 3, 5 y 7 % con un porcentaje de degradación de 100 %, 70 %, 46,7 % y 23,8 % respectivamente. Finalmente Varnava *et al.* (2024) evaluó el potencial de *P. citronellolis* en la generación de electricidad en una celda de combustible microbiana con agua residual aceitosa, obteniendo un resultado por cromatografía de gases una degradación de 74,3 % de agua residual lodosa y un 90 % de n-alcanos en 70 días, en comparación nuestros resultados demuestran que el T1/2 para degradar al menos la mitad de las concentraciones fue de 9,44, 12,86, 18,68 y 13,64 días para 1, 3, 5 y 7 % respectivamente, mostrando una mayor velocidad constante de degradación. La cepa C, identificada como *Pseudomonas putida*, fue evaluada, Obayori *et al.* (2009) reportaron que *Pseudomonas putida* demostró una mayor degradación de querosene, gasolina, diésel, aceite de motor y petróleo; obteniendo un crecimiento

logarítmico con un tiempo de generación de entre 3,07 a 8,55 días, degradando el aceite (50 mg/L) más del 70 % en 12 días. Nuestros resultados demuestran ser igual de eficientes a mayor concentración de diésel, al 3 % de diésel se obtuvo una degradación de 78,9 % con un T<sub>1/2</sub> de 13,13 días. Por su parte Orijuide (2019) obtuvo una degradación de 87,25 %, 80,25 % y 88,89 % para la degradación de aceite y grasas al 0,5, 1 y 1,55 %, obteniendo mayor porcentaje con las cepas de *Pseudomonas putida* mutadas con un porcentaje de degradación de 96,23 %, 92,60 % y 99,38 %, en nuestro estudio hubo una degradación al 100 % de 1 % diésel, mientras que al 3 % hubo una degradación de 78,9 % infiriendo que, nuestras cepas al estar con pre tratamientos de adaptación las hacen más eficaces en el proceso de biodegradación al igual que las cepas mutantes. Asimismo, Paul *et al.* (2022) estudió la degradación de metano y de hidrocarburos de lodos de una refinería de petróleo, la degradación en 20 L con una proporción de inóculo 0,5 mostró un porcentaje de 57,07 % de HTP, 62,98 % de aceite y grasa y 91,9 % de fenol en 50 días, el presente trabajo realizó una medición de 60 días pero se observa una actividad hasta el día 30, con una degradación de 100 %, 78,9 %, 32,7 % y 22,3 % para los porcentajes de petróleo diésel al 1, 3, 5 y 7 %, mostrando cierta concordancia, ya que el diésel suele tener compuestos más pesados a diferencia de la grasa y fenol.

La cepa E identificada como *Pseudomonas* sp. FDAARGOS\_380; se ha comprobado en diversos estudios que este género tiene un gran potencial para la degradación de diversos hidrocarburos. La cepa identificada (FDAARGOS\_380) no tiene muchos estudios, su primera mención fue en el trabajo de Y. Kang *et al.* (2022) donde se caracterizó la microbioma de la superficie ocular en pacientes con queratitis, obteniendo que es portadora de genes resistentes a múltiples fármacos, por el cual en nuestro estudio fue una de las cepas con menor porcentaje de degradación al 3, 5 y 7 %, debido a que no se encuentra comúnmente en ambientes con hidrocarburos. Al igual que el estudio de Llanco y Reategui (2020), en donde se logró aislar los géneros de *Pseudomonas* y *Acinetobacter* degradadoras de hidrocarburo aisladas de suelos contaminados. Mientras que Delgadillo (2024) evaluó el efecto que ocasiona la bioestimulación en la degradación de petróleo diésel a través del empleo de diversos consorcios microbianos, identificando mediante PCR a *Stenotrophomonas acidaminiphila*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas aeruginosa*. En su estudio, al emplear concentraciones del 5 % y 10 % de diésel, se alcanzaron tasas de remoción del

54,716 % y 83,662 %, respectivamente, en un período de 28 a 70 días. Estos valores superaron a los obtenidos en nuestro estudio con bacterias endofíticas de *Cannabis* sp., donde a una concentración del 5 % de petróleo diésel, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas* sp. FDAARGOS\_380 y el consorcio bacteriano lograron degradaciones netas del 22,7 %, 21,3 % y 26,7 %, respectivamente. A una concentración del 7 %, las tasas de degradación fueron del 15,2 %, 11 % y 14,3 % en un período de 15 a 60 días. La diferencia en los niveles de degradación podría atribuirse a la ausencia de bioestimulantes en nuestro estudio, lo que sugiere que la adición de estos compuestos podría mejorar significativamente la biodegradación. Sin embargo, cabe destacar que la producción de CO<sub>2</sub> fue mayor hasta el día 15, lo que indica una fase inicial de degradación más rápida.

Las cepas B y D, identificadas como parte del complejo *Acinetobacter calcoaceticus/baumannii complex*, como se mencionó anteriormente este complejo involucra diversas especies por lo cual no se puede suponer que sean iguales. Y.-S. Kang *et al.* (2011) realizó un estudio de diferentes especies de *Acinetobacter* aisladas de un arrozal en Corea del Sur, de las cuales la mayoría está dentro del complejo *A. calcoaceticus/baumanni complex*, destacando que *A. oleivorans* tiene la capacidad de adherirse y poder desarrollarse en el gasóleo, obteniendo una similitud en su secuencia genómica de 98,2 %, 97,4 %, 97,2 %, 97,1 % y 97,0 % con las especies de *A. calcoaceticus*, *A. haemolyticus*, *A. baumannii*, *A. baylyi* y *A. beijerinckii*; proporcionando así una evidencia clara de que este género tiene una gran potencial en cuanto a la degradación de hidrocarburos y demás compuestos químicos.

La cepa F, identificada como *Acinetobacter calcoaceticus*, evaluada en contraste con Lal y Khanna (1996), quienes evaluaron el potencial de degradación de petróleo crudo de dos tipos de diferentes lugares de la india (Bombay High y de Gujarat) por *A. calcoaceticus* obtuvieron una degradación de 50 % de Bombay High y 29 % de Gujarat a una concentración de 1 000 mg de petróleo en 100 ml de medio sal mineral con 1 % de inóculo por 15 días; en nuestro estudio se obtuvo una degradación de 100 %, 73,4 %, 35,3 % y 24,7 % a las concentraciones de 1, 3, 5 y 7 % de petróleo diésel, estos datos demuestran una mayor capacidad de degradar a concentraciones bajas. Sin embargo, las diferencias en la composición del petróleo crudo frente al diésel podrían influir en estas comparaciones. Por su parte Gkorezis (2014) aislaron *A. calcoaceticus* y *A. oleivorans* de raíces

asociadas a planta en la remediación de suelos y aguas subterráneas, las bacterias obtuvieron una degradación de 41 % y 40 % respectivamente a una concentración de 1 000 mg/Kg de aceite diésel, en nuestro estudio se obtuvo una mayor degradación a comparación que el investigador, demostrando así la gran capacidad que tienen las bacterias endofíticas de *Cannabis* sp. Asimismo, Ho *et al.* (2020) realizaron experimentos con *A. calcoaceticus* en la degradación de diésel al 0,25, 0,5, 1 y 2 % logrando degradar entre 82-92 % en 28 días, encontrando genes específicos de degradación tales como *alk M* y *xcp R*, demostrando que esta bacteria si posee mediante los genes ser degradadora, en nuestro estudio obtuvimos una degradación de 100 % al 1 % de diésel y de 73,4 % al 3 % de diésel lo que comprueba una degradación relativamente mayor. Finalmente, Sawadogo *et al.* (2024) evaluaron por el método gravimétrico la degradación de diésel, aceites usados SAE40 y SAE50 40 ml de petróleo ether/acetona (1:1 v/v) obteniendo una mayor degradación en consorcio con *P. aeruginosa* de 65,33 % en diésel tras 56 días, consistente con nuestros resultados, con una concentración de 100 % al 1 % de diésel y de 73,4 % al 3 % de diésel. La cepa G, identificada como *Acinetobacter schindleri*, fue contrastada con otros estudios; Jacob y Irshaid (2015) analizaron la degradación de tolueno en tierra (10 g) en 99 ml de medio Stainer con 1 % de tolueno, *A. schindleri* tuvo un tiempo de generación medio de ocho horas al 1 % de tolueno y 19 horas al 2 % de tolueno, en nuestro estudio se obtuvo un T1/2 de 8,45 días al 1 % de diésel y 15,83 días al 3 %, esto se debe a que el tolueno es un compuesto único y aromático, mientras que el diésel es una mezcla de diversos hidrocarburos alifáticos y aromáticos. Por su parte, Iskandar *et al.* (2021) realizaron un análisis sistemático y filogenético mediante el gen 16S ARNr, obteniendo *A. schindleri* de un compuesto de desechos clínicos, pero que a medida que se hizo el estudio se recalcó en el potencial de biorremediación que contiene, el cual se contrasta con nuestros resultados, siendo mejor degradador a concentraciones bajas. En cuanto al consorcio bacteriano, tuvo un comportamiento igual que las cepas individuales, en el trabajo de Zhang *et al.* (1998) en el que evaluaron la degradación de diésel a diferentes proporciones con el biodiésel por un inóculo mixto, obteniendo resultados a través de la evolución de CO<sub>2</sub> un porcentaje de degradación de diésel puro (10 mg de carbono/L) de 18,2 % al día 28, este porcentaje subió a medida que el diésel se mezclaba con biodiésel, en el presente trabajo el consorcio tubo un mayor porcentaje de degradación a concentraciones

más altas de diésel 1, 3, 5 y 7 % con un 100 %, 60 %, 36,7 % y 21,4 % de degradación respectivamente. Asimismo, Pasqualino *et al.* (2006) hicieron un estudio de biodegradabilidad de biodiésel, diésel, gasolina y sus mezclas, en un medio con 225 ml de mineral nutritivo, 25 ml de inóculo mixto de un lodo activado con 10 a 20 g de carbono, obteniendo una degradación al día 28 para biodiésel en un 98 %, diésel 50 % y gasolina en un 56 %, estos porcentajes representan la evolución de CO<sub>2</sub>, mientras que en nuestro trabajo la degradación final fue directa, siendo el porcentaje de 60 % en diésel al 3 %.

## VI. CONCLUSIONES

1. Las cepas bacterianas endofíticas aisladas de raíces de *Cannabis* sp., especialmente la cepa A y F, mantuvieron una mayor eficiencia degradadora en comparación con otras cepas y consorcio a concentraciones de 5 y 7 % de petróleo diésel resaltando la importancia de seleccionar cepas específicas para optimizar procesos de biorremediación de hidrocarburos.
2. El consorcio bacteriano endofítico de *Cannabis* sp. exhibió una capacidad degradadora estable en todas las concentraciones evaluadas (1, 3, 5, 7 %), con una producción constante de CO<sub>2</sub> y reducción del petróleo diésel residual, aunque no superó la eficiencia de cepas individuales en concentraciones altas, el consorcio es más adecuado para procesos de biodegradación a largo plazo debido a su estabilidad sinérgica.
3. La degradación de petróleo diésel por cepas individuales y consorcio de *Cannabis* sp. se ajustó a una cinética de primer orden, típico en la degradación de compuestos orgánicos acuosos como el petróleo diésel, mostrando que la velocidad de degradación disminuyó y el tiempo de vida media aumentó progresivamente con las concentraciones del contaminante, lo que valida el uso de modelos cinéticos para predecir el comportamiento degradador en ambientes contaminados.
4. Mediante secuenciamiento genómico completo y PCR *in silico* del gen 16S, se identificaron siete cepas endofíticas de *Cannabis* sp. con capacidad degradadora: *Pseudomonas citronellolis* (A), *Acinetobacter calcoaceticus* / *baumannii* complex (B, D), *Pseudomonas putida* (C), *Pseudomonas* sp. FDAARGOS\_380 (E), *Acinetobacter calcoaceticus* (F) y *Acinetobacter schindleri* (G), destacando la alta similitud genética entre B y D, la novedad de especies poco reportadas como *A. schindleri*, mostrando una microbiota diversa con potencial funcional para la biodegradación de hidrocarburos.

## VII. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda emplear métodos más precisos para la cuantificación de la biodegradación del petróleo diésel, como cromatografía de gases y métodos gravimétricos con solventes para medir directamente el CO<sub>2</sub> producido, el volumen y composición del diésel residual, asegurando el control adecuado del blanco, con al menos cinco repeticiones.
2. Evaluar métodos de desinfección del petróleo diésel que preserven su integridad química, evitando alteraciones que afecten los resultados de biodegradación.
3. Se sugiere optimizar el sistema de “matraz agitado” para obtener datos más sensibles, como el uso de carbón activado para capturar el CO<sub>2</sub> presente en el aire de oxigenación y materiales de vidrio en lugar de plástico, para mejorar así la precisión y reproducibilidad de los ensayos.
4. Se recomienda realizar la identificación molecular antes de los ensayos de biodegradación, lo que permitiría ampliar la diversidad de géneros y facilitar la comparación de especies.
5. Considerar usar una mayor concentración celular cerca al límite  $\leq 2 \times 10^9$ , recomendado en la extracción de ADN genómico, de acuerdo a la escala de McFarland para garantizar una concentración, pureza e integridad óptima para el secuenciamiento.
6. Realizar una comparación más profunda entre las concentraciones residuales y evaluar cómo estos datos influyen en el modelo cinético, aplicando fórmulas de cinética de mayor complejidad para un mejor ajuste de datos.
7. Utilizar tinciones específicas para la visualización de ADN en el gel de agarosa y elegir un marcador de tamaño molecular (*ladder*) adecuado para fragmentos grandes de ADN genómico, con el fin de mejorar la estimación de tamaño y la comparación visual de las bandas obtenidas.
8. Continuar con investigaciones orientadas a la identificación específica de

genes implicados en la biorremediación. Esto permitirá una mayor precisión en la identificación de especies dentro de complejos y grupos estudiados, potenciando aplicaciones biotecnológicas.

9. Fomentar investigaciones sobre *Cannabis* sp. “cáñamo” con fines científicos solicitando a la UNSCH el otorgamiento de permisos necesarios, dada su relevancia en diversas aplicaciones industriales y ambientales.
10. Investigar la fitorremediación de *Cannabis* sp. “cáñamo” y evaluar la composición química de cada parte de la planta. Esto permitirá determinar si la degradación de hidrocarburos es completa, parcial o meramente acumulativa, información esencial para su uso industrial.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afzal, I., Shinwari, Z., & Iqar, I. (2015). Selective isolation and characterization of agriculturally beneficial endophytic bacteria from wild hemp using canola. *Pak. J. Bot.*, *47*(5), 1999–2008. [https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/78763723/47-libre.pdf?1642225294=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DSelective\\_isolation\\_and\\_characterization.pdf&Expires=1732744591&Signature=EbbXVEJWOCZOM1jB4BUO1~vfJEU1AlovYAlqzDbjyDz37bhEhIkzOyQMh2F](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/78763723/47-libre.pdf?1642225294=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DSelective_isolation_and_characterization.pdf&Expires=1732744591&Signature=EbbXVEJWOCZOM1jB4BUO1~vfJEU1AlovYAlqzDbjyDz37bhEhIkzOyQMh2F)
- Agencia de Protección Ambiental. (2010). *Anexo A. Guía de contaminantes y tecnologías*.
- Ahmad, R., Tehsin, Z., Malik, S. T., Asad, S. A., Shahzad, M., Bilal, M., Shah, M. M., & Khan, S. A. (2016). Phytoremediation Potential of Hemp (*Cannabis sativa* L.): Identification and Characterization of Heavy Metals Responsive Genes. *CLEAN – Soil, Air, Water*, *44*(2), 195–201. <https://doi.org/10.1002/CLEN.201500117>
- Alexander, M. (1999). Kinetics. In *Biodegradation and bioremediation* (2nd ed., pp. 73–104). Academic Press.
- Alufasi, R., Zeman, S., Bagar, T., & Chingwaru, W. (2020). *Cannabis sativa* L. and its potential applications in environmental bioremediation. A Review. *Hmeljarski Bilten*, *27*, 161–172. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20220040453>
- Ango Aguilar, H., & Chuchón Martínez, S. (2024). Metagenómica. In *Microbiología: Tópicos especiales* (1era ed., pp. 134–158). Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.
- Araujo, I., Gómez, A., Barrera, M., Ángulo, N., Morillo, G., Cárdenas, C., & Herrera, L. (2008). Surfactantes biológicos en la biorremediación de aguas contaminadas con crudo liviano. *Interciencia*, *33*(4), 245–250. [https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-18442008000400004&lng=es&tlng=es](https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442008000400004&lng=es&tlng=es)
- Atlas, R. M. (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiological Reviews*, *45*(1), 180–209. <https://doi.org/10.1128/mr.45.1.180-209.1981>
- Atlas, Ronald M., & Bartha, R. (1972). Degradation and mineralization of petroleum by two bacteria isolated from coastal waters. *Biotechnology and Bioengineering*, *14*(3), 297–308. <https://doi.org/10.1002/bit.260140303>
- Badalucco, L., Pomaré, F., Grego, S., Landi, L., & Nannipieri, P. (1994). Activity and degradation of streptomycin and cycloheximide in soil. *Biology and Fertility of Soils*, *18*(4), 334–340. <https://doi.org/10.1007/BF00570637>
- Baird, R., Rice, E., & Eaton, A. (2017). Standard methods for the examination of water and wastewaters. In *Water Environment Federation, Chair Eugene W. Rice, American Public Health Association Andrew D. Eaton, American Water Works Association* (23rd ed., Vol. 1). [https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/62912641/Standard-Methods-For-The-Examination-Of-Water-And-Wastewater-23rd-Edition-by-R.B.-Baird-A.D.-Eaton-libre.pdf?1586608253=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DStandard\\_Methods\\_For\\_The\\_Examination\\_](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/62912641/Standard-Methods-For-The-Examination-Of-Water-And-Wastewater-23rd-Edition-by-R.B.-Baird-A.D.-Eaton-libre.pdf?1586608253=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DStandard_Methods_For_The_Examination_)
- Barac, T., Taghavi, S., Borremans, B., Provoost, A., Oeyen, L., Colpaert, J. V., Vangronsveld, J., & Van Der Lelie, D. (2004). Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants.

- Nature Biotechnology* 2004 22:5, 22(5), 583–588.  
<https://doi.org/10.1038/nbt960>
- Barrios, L., Robayo, J., Prieto, S., & Cardona, S. (2015). Biorremediación de suelos contaminados con aceites usados de motor. *Revista CINTEX*, 20(1), 69–96. <https://revistas.pascualbravo.edu.co/index.php/cintex/article/view/31>
- Bartha, R., & Pramer, D. (1965). Features of a flask and method for measuring the persistence and biological effects of pesticides in soil. *Soil Science*, 100(1), 68–70. <https://doi.org/10.1097/00010694-196507000-00011>
- Bayley, H. (2015). Nanopore Sequencing: From Imagination to Reality. *Clinical Chemistry*, 61(1), 25–31. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.223016>
- Becerra-Castro, C., Lopes, A. R., Vaz-Moreira, I., Silva, E. F., Manaia, C. M., & Nunes, O. C. (2015). Wastewater reuse in irrigation: A microbiological perspective on implications in soil fertility and human and environmental health. *Environment International*, 75, 117–135. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.11.001>
- Bhattacharya, D., Sarma, P. M., Krishnan, S., Mishra, S., & Lal, B. (2003). Evaluation of Genetic Diversity among *Pseudomonas citronellolis* Strains Isolated from Oily Sludge-Contaminated Sites. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3), 1435. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.3.1435-1441.2003>
- Bisso Andrade, A. (2022). Petróleo: daño medioambiental y un peligro para la salud pública. *Rev Soc Peru Med Interna*, 35(1), 5–7. <https://doi.org/10.36393/SPMI.V35I1.648>
- Brenes Guillén, L. (2018). 4 bases de datos para realizar análisis bioinformático de comunidades microbianas. In *Revista de Biología Tropical*. Blog-Blog. [https://scholar.googleusercontent.com/scholar?q=cache:rU5VmI9xWHYJ:scholar.google.com/+brenes+2018+identificación+taxonómica&hl=es&as\\_sdt=0,5](https://scholar.googleusercontent.com/scholar?q=cache:rU5VmI9xWHYJ:scholar.google.com/+brenes+2018+identificación+taxonómica&hl=es&as_sdt=0,5)
- Burnham, K. P., & Anderson, D. R. (2004). Multimodel Inference: Understanding AIC and BIC in model selection. *Sociological Methods & Research*, 33(2), 261–304. <https://doi.org/10.1177/0049124104268644>
- Cabanillas, L., Carstens, G., Lovecchio, J., Marshall, P., Rébora, L., Soldo, J., Vallejo, E., & Vergani, G. (2015). Hidrocarburos convencionales y no convencionales. *Asociación Argentina de Geólogos y Geofísicos Del Petróleo*, 23(134), 41–47. [https://www.researchgate.net/publication/282859103\\_Hidrocarburos\\_convencionales\\_y\\_no\\_convencionales](https://www.researchgate.net/publication/282859103_Hidrocarburos_convencionales_y_no_convencionales)
- Cabrera Ospina, M., Echeverri Jaramillo, G. E., & Manjarrez Paba, G. (2010). Aislamiento de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo en hábitats de ecosistemas costeros en la Bahía de Cartagena, Colombia. *Nova*, 8(13), 76–86. <https://doi.org/10.22490/24629448.441>
- Calderón Gómez, S. M. (2006). *Contaminación de suelos con hidrocarburos y modelos THM* [Universidad de los Andes]. <https://repositorio.uniandes.edu.co/server/api/core/bitstreams/8eab5d68-6de1-43fc-93c6-4f22a8b59c3d/content>
- Casey, F. X. M., Larsen, G. L., Hakk, H., & Šimůnek, J. (2003). Fate and Transport of 17β-Estradiol in Soil–Water Systems. *Environmental Science & Technology*, 37(11), 2400–2409. <https://doi.org/10.1021/es026153z>
- Castañeda Chávez, M. del R., López Sánchez, B. Y., Reyes Velázquez, C., Lango Reynoso, F., & Lizardi Jiménez, M. A. (2022). Identificación de especies dominantes en un consorcio microbiano eficiente en la degradación de diésel. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 38, 155–167. <https://doi.org/10.20937/RICA.54235>

- Cavazos Arroyo, J., Pérez Armendáriz, B., & Mauricio Gutiérrez, A. (2014). Afectaciones y consecuencias de los derrames de hidrocarburos en suelos agrícolas de Acatzingo, Puebla, México. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*, 11(4), 539–550. <https://www.redalyc.org/pdf/3605/360535327006.pdf>
- Chandra, S., Lata, H., Khan, I. A., & ElSohly, M. A. (2017). *Cannabis sativa* L.: Botany and Horticulture. In S. Chandra, H. Lata, & M. A. ElSohly (Eds.), *Cannabis sativa L. - Botany and Biotechnology* (1st ed., pp. 79–100). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-54564-6>
- Crawford, R. L. ., & Crawford, D. L. . (1998). Bioremediation: principles and applications. *Reprinted. Cambridge University Press. U.K.*, 206–260. [https://www.academia.edu/41062762/Ronald\\_L\\_Crawford\\_Don\\_L\\_Crawford\\_Bioremediation\\_Principles\\_and\\_Applications\\_Biotechnology\\_Research\\_19\\_97\\_](https://www.academia.edu/41062762/Ronald_L_Crawford_Don_L_Crawford_Bioremediation_Principles_and_Applications_Biotechnology_Research_19_97_)
- Das, N., & Chandran, P. (2011). Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International*, 2011(1), 1–13. <https://doi.org/10.4061/2011/941810>
- Delgadillo Coronado, P. M. (2024). *Efecto de la bioestimulación de consorcios microbianos en la capacidad degradativa del petróleo crudo, Ayacucho 2019*. [Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga]. <https://repositorio.unsch.edu.pe/handle/20.500.14612/7240>
- DeNovix Inc. (2024). *DeNovix DS-11 Series User Guide*. <https://www.denovix.com/pdf/ds-11-series-user-guide.pdf>
- Decreto Supremo N.º 005-2019-SA - Ley N.º 30681*, (2019) (testimony of Diario Oficial El Peruano). <https://www.gob.pe/institucion/minsa/normas-legales/262787-005-2019-sa>
- Decreto Supremo N.º 018-2022-EM*, 62 (2022) (testimony of Diario Oficial El Peruano). <https://www.gob.pe/institucion/minem/normas-legales/3870680-018-2022-em>
- División de Toxicología y Medicina Ambiental. (1995). Resumen de salud pública gasolina para automóvil . *Agencia Para Sustancias Tóxicas y El Registro de Enfermedades*. [https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es\\_phs72.pdf](https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs72.pdf)
- Doran, P. M. (2012). Bioprocess engineering principles. In *Bioprocess Engineering Principles: Second Edition* (2nd ed., Vol. 1). Academic Press.
- Doty, S. L. (2008). Enhancing phytoremediation through the use of transgenics and endophytes. *New Phytologist*, 179(2), 318–333. <https://doi.org/10.1111/J.1469-8137.2008.02446.X>
- Echeverri Jaramillo, G. E. (2011). Adaptación de bacterias a diferentes concentraciones de fenol en el laboratorio: aspectos esenciales para un proceso de biodegradación. *NOVA*, 9(15), 60–69. <https://doi.org/10.22490/24629448.489>
- EPA. (1982). Aerobic Aquatic Biodegradation. In *Chemical fate testing guidelines and support documents* (PB82-23300th ed., p. CG-2000). U. S. Environmental Protection Agency. [https://cfpub.epa.gov/ols/catalog/advanced\\_brief\\_record.cfm?&FIELD1=SUBJECT&INPUT1=Toxicology Analysis&TYPE1=EXACT&LOGIC1=AND&COLL=&SORT\\_TYPE=MTIC&item\\_count=2&item\\_accn=58360](https://cfpub.epa.gov/ols/catalog/advanced_brief_record.cfm?&FIELD1=SUBJECT&INPUT1=Toxicology Analysis&TYPE1=EXACT&LOGIC1=AND&COLL=&SORT_TYPE=MTIC&item_count=2&item_accn=58360)
- Falchini, L., Naumova, N., Kuikman, P. J., Bloem, J., & Nannipieri, P. (2003). CO2 evolution and denaturing gradient gel electrophoresis profiles of bacterial communities in soil following addition of low molecular weight substrates to simulate root exudation. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(6), 775–782. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(03\)00105-6](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00105-6)
- FAO, & UNEP. (2021). *Global assessment of soil pollution: Report*. Rome.

- <https://doi.org/10.4060/cb4894en>
- Galaxy Project. (2024). *Galaxy: An open, web-based platform for accessible, reproducible, and transparent computational biomedical research*. <https://usegalaxy.org/>
- Gamboa, R. (2004). *Aislamiento e identificación de bacterias degradadoras de hidrocarburos en suelos contaminados de la ciudad de Ayacucho*. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.
- Gerner-Smidt, P., Tjernberg, I., & Ursing, J. (1991). Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(2), 277–282. <https://doi.org/10.1128/jcm.29.2.277-282.1991>
- Gkorezis, P. (2014). *The role of plant-associated bacteria in the remediation of soils and groundwater contaminated with petroleum hydrocarbons* [Hasselt University]. <https://documentserver.uhasselt.be//handle/1942/20493>
- Gómez Rivera, M. E. (2012). *Estudio comparativo de la biodegradación de hidrocarburos totales de petróleo (HTP'S) a través de la atenuación natural, bioestimulación y bioaugmentación en el suelo contaminado* [Universidad Pontificia Bolivariana]. [https://repository.upb.edu.co/bitstream/handle/20.500.11912/2022/digital\\_24073.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repository.upb.edu.co/bitstream/handle/20.500.11912/2022/digital_24073.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- González Palomino, B. E. (2008). *Análisis microbiológico y fisicoquímico al proceso de elaboración de azúcar, sus productos y alcohol en RIOPAILA CASTILLA S.A.* [Universidad del Quindío]. <https://hdl.handle.net/20.500.14550/5965>
- Gulkowska, A., Leung, H. W., So, M. K., Taniyasu, S., Yamashita, N., Yeung, L. W. Y., Richardson, B. J., Lei, A. P., Giesy, J. P., & Lam, P. K. S. (2008). Removal of antibiotics from wastewater by sewage treatment facilities in Hong Kong and Shenzhen, China. *Water Research*, 42(1–2), 395–403. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.07.031>
- Hammond, A., Dertien, J., Colmer-Hamood, J. A., Griswold, J. A., & Hamood, A. N. (2010). Serum Inhibits *P. aeruginosa* Biofilm Formation on Plastic Surfaces and Intravenous Catheters. *Journal of Surgical Research*, 159(2), 735–746. <https://doi.org/10.1016/J.JSS.2008.09.003>
- Hanan, A., Mondragón, J., & Vibrans, H. (2009). *Cannabis sativa* - ficha informativa. In CONABIO. <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/cannabaceae/cannabis-sativa/fichas/ficha.htm#7>. Control
- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S., Campisano, A., Döring, M., & Sessitsch, A. (2015). The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(3), 293–320. [https://doi.org/10.1128/MMBR.00050-14/SUPPL\\_FILE/ZMR003152395SO1.PDF](https://doi.org/10.1128/MMBR.00050-14/SUPPL_FILE/ZMR003152395SO1.PDF)
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.137>
- Head, I. M., Jones, D. M., & Röling, W. F. M. (2006). Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature Reviews Microbiology*, 4(3), 173–182. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1348>
- Ho, M., Li, M., McDowell, T., MacDonald, J., & Yuan, Z. (2020). Characterization and genomic analysis of a diesel-degrading bacterium, *Acinetobacter calcoaceticus* CA16, isolated from Canadian soil. *BMC Biotechnol*, 20(39).
- Husain, R., Weeden, H., Bogush, D., Deguchi, M., Soliman, M., Potlakayala, S., Katam, R., Goldman, S., & Rudrabhatla, S. (2019). Enhanced tolerance of

- industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) plants on abandoned mine land soil leads to overexpression of cannabinoids. *PLOS ONE*, *14*(8), e0221570. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221570>
- Iqbal, A., Arshad, M., Hashmi, I., Karthikeyan, R., Gentry, T. J., & Schwab, A. P. (2017). Biodegradation of phenol and benzene by endophytic bacterial strains isolated from refinery wastewater-fed *Cannabis sativa*. *Environmental Technology*, *39*(13), 1705–1714. <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1337232>
- Iqbal, A., Arshad, M., Karthikeyan, R., Gentry, T. J., Rashid, J., Ahmed, I., & Schwab, A. P. (2019). Diesel degrading bacterial endophytes with plant growth promoting potential isolated from a petroleum storage facility. *3 Biotech*, *9*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/S13205-018-1561-Z/METRICS>
- Iskandar, A. U., Ethica, S. N., Sukeksi, A., Mukaromah, A. H., Sulistyanningtyas, A. R., & Darmawati, S. (2021). Molecular systematic and phylogenetic analysis of indigenous bacterial isolates with potential as bioremediation agent based on 16S rRNA gene analysis. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, *743*(1), 012010. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/743/1/012010>
- IOPF. (2025). *Oil tanker spill statistics 2024*. [https://www.itopf.org/fileadmin/uploads/itopf/data/Documents/Company\\_Lit/Oil\\_Spill\\_Stats\\_brochure\\_2024.pdf](https://www.itopf.org/fileadmin/uploads/itopf/data/Documents/Company_Lit/Oil_Spill_Stats_brochure_2024.pdf)
- Jacob, J. H., & Irshaid, F. I. (2015). Toluene Biodegradation by Novel Bacteria Isolated from Polluted Soil Surrounding Car Body Repair and Spray Painting Workshops. *Journal of Environmental Protection*, *6*(12), 1417–1429. <https://doi.org/10.4236/JEP.2015.612123>
- Jain, M., Olsen, H. E., Paten, B., & Akeson, M. (2016). The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community. *Genome Biology*, *17*(1), 239. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1103-0>
- Jiménez Buitrago, D. L. (2006). Estudio de impacto ambiental generado por un derrame de hidrocarburos sobre una zona estuarina, aledaña al terminal de Ecopetrol en Tumaco [Universidad de La Salle. Facultad de Ingeniería. Ingeniería Ambiental y Sanitaria]. In G. Balint, B. Antala, C. Carty, J.-M. A. Mabieme, I. B. Amar, & A. Kaplanova (Eds.), *Uniwersytet śląski* (Vol. 7, Issue 1). <https://doi.org/10.2/JQUERY.MIN.JS>
- Johnson Batista, A. D. C. (2018). *Desarrollo de una metodología analítica para la determinación de trazas de sulfatos en aguas y su aplicación en la caracterización hidroquímica del acuífero urbano de la ciudad de Penonomé y sus alrededores* [Universidad de Panamá]. <http://up-rid.up.ac.pa/id/eprint/2569>
- Kang, Y.-S., Jung, J., Jeon, C. O., & Park, W. (2011). *Acinetobacter oleivorans* sp. nov. Is capable of adhering to and growing on diesel-oil. *The Journal of Microbiology*, *49*(1), 29–34. <https://doi.org/10.1007/s12275-011-0315-y>
- Kang, Y., Tian, L., Gu, X., Chen, Y., Ma, X., Lin, S., Li, Z., Lou, Y., & Zheng, M. (2022). Characterization of the Ocular Surface Microbiome in Keratitis Patients after Repeated Ophthalmic Antibiotic Exposure. *Microbiology Spectrum*, *10*(2). <https://doi.org/10.1128/SPECTRUM.02162-21>
- Koutinas, M., Kyriakou, M., Andreou, K., Hadjicharalambous, M., Kaliviotis, E., Pasiadis, D., Kazamias, G., Varavvas, C., & Vyrides, I. (2021). Enhanced biodegradation and valorization of drilling wastewater via simultaneous production of biosurfactants and polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas citronellolis* SJTE-3. *Bioresource Technology*, *340*, 125679. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2021.125679>
- Kumar, S., Singh, R., Kumar, V., Rani, A., & Jain, R. (2017). *Cannabis sativa*: A

- Plant Suitable for Phytoremediation and Bioenergy Production. In *Phytoremediation Potential of Bioenergy Plants* (pp. 269–285). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-3084-0\\_10](https://doi.org/10.1007/978-981-10-3084-0_10)
- Kuppusamy, S., Palanisami, T., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., & Naidu, R. (2016). *In-Situ Remediation Approaches for the Management of Contaminated Sites: A Comprehensive Overview* (pp. 1–115). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-20013-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-20013-2_1)
- Labud, V., Garcia, C., & Hernandez, T. (2007). Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. *Chemosphere*, *66*(10), 1863–1871. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.08.021>
- Lal, B., & Khanna, S. (1996). Degradation of crude oil by *Acinetobacter calcoaceticus* and *Alcaligenes odorans*. *The Journal of Applied Bacteriology*, *81*(4), 355–362. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.1996.TB03519.X>
- Leahy, J. G., & Colwell, R. R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*, *54*(3), 305–315. <https://doi.org/10.1128/mr.54.3.305-315.1990>
- León Cépeda, A., & Zúñiga Lossio, M. (2022). La sombra de los hidrocarburos en el Perú: Actualización de la información sobre sitios con daño hidrocarburífero en el Perú: 1997-2021. *OXFAM*, *1*. [https://oi-files-cng-prod.s3.amazonaws.com/peru.oxfam.org/s3fs-public/file\\_attachments/La-sombra-de-los-hidrocarburos-en-el-Perú.pdf](https://oi-files-cng-prod.s3.amazonaws.com/peru.oxfam.org/s3fs-public/file_attachments/La-sombra-de-los-hidrocarburos-en-el-Perú.pdf)
- Linger, P., Müssig, J., Fischer, H., & Kobert, J. (2002). Industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) growing on heavy metal contaminated soil: fibre quality and phytoremediation potential. *Industrial Crops and Products*, *16*(1), 33–42. [https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(02\)00005-5](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(02)00005-5)
- Llanco Palomino, R. L., & Reategui Del Aguila, B. I. (2020). *Identificación de bacterias degradadoras de petróleo en ecosistema acuático de una actividad petrolera de Coronel Portillo-Ucayali, 2018*. [Universidad Nacional de Ucayali]. <https://hdl.handle.net/20.500.14621/4320>
- Loureiro, D., Olivera, C., Herrero, M., Salvatierra, L., & Pérez, L. (2019). Estudio de la degradación de diésel comercial empleando *Pseudomonas* spp. aisladas de lodos facultativos provenientes de una planta productora de biogás. *Energía*, *16*(16), 46–54. <https://repositorio.uca.edu.ar/bitstream/123456789/9826/1/estudio-degradacion-diesel-comercial.pdf>
- Loureiro, D., Olivera, C., Salvatierra, L., & Pérez, L. (2018). Evaluación del potencial de biodegradación de diésel empleando bacterias aisladas de lodos industriales. *Energía*, *15*(15), 84–89. <https://repositorio.uca.edu.ar/bitstream/123456789/5880/1/evaluacion-potencial-biodegradacion-diesel.pdf>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2015). *Brok Biología de los microorganismos* (14th ed.). PEARSON EDUCACIÓN S.A.
- Mancilla-Rojano, J., Flores, V., Cevallos, M. A., Ochoa, S. A., Parra-Flores, J., Arellano-Galindo, J., Xicohtencatl-Cortes, J., & Cruz-Córdova, A. (2024). A bioinformatic approach to identify confirmed and probable CRISPR–Cas systems in the *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex genomes. *Frontiers in Microbiology*, *15*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1335997>
- Mandigan, B., Martinko, J. M., & Parker, J. (1999). *Biología de los microorganismos* (8th ed.). Prentice Hall.
- Margesin, R., & Schinner, F. (2001). Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Applied Microbiology and*

- Biotechnology*, 56(5–6), 650–663. <https://doi.org/10.1007/s002530100701>
- Martí, J. M. (2019). Recentrifuge: Robust comparative analysis and contamination removal for metagenomics. *PLOS Computational Biology*, 15(4), e1006967. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1006967>
- Martín Martín, F., & Sala Gómez, V. (2004). *Estudio comparativo entre los combustibles tradicionales y las nuevas tecnologías energéticas para la propulsión de vehículos destinados al transporte* [Universitat Politècnica de Catalunya]. <https://upcommons.upc.edu/handle/2099.1/3686>
- McInroy, J. A., & Kloepper, J. W. (1995). Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant Soil*, 173, 337–342.
- Megharaj, M., Ramakrishnan, B., Venkateswarlu, K., Sethunathan, N., & Naidu, R. (2011). Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. *Environment International*, 37(8), 1362–1375. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.06.003>
- Melo, P., Araujo, I., Ángulo, N., & Beltrán, A. (2014). Aislamiento, identificación y capacidad de biorremediación de los géneros bacterianos *Bacillus*, *Enterobacter* y *Yersinia*, provenientes de aguas contaminadas con petróleo. *Revista Científica Multidisciplinaria Observador Del Conocimiento*, 2(3). <https://revistaoc.oncti.gob.ve/index.php/odc/article/view/537/412>
- Mikheyev, A. S., & Tin, M. M. Y. (2014). A first look at the Oxford Nanopore MinION sequencer. *Molecular Ecology Resources*, 14(6), 1097–1102. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12324>
- Miller, J. H. (1972). Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory*, 431–435.
- MINEM. (2023). *Anuario Estadístico de Hidrocarburos 2022*. <https://www.gob.pe/institucion/minem/informes-publicaciones/4702707-anuario-estadistico-de-hidrocarburos-2022>
- Minipcrbio. (2023). *Gelato electrophoresis and visualization system: user's guide*. <https://www.minipcr.com/wp-content/uploads/4AA94-rev-0-GELATO-Users-guide.pdf>
- Motulsky, H. J., & Christopoulos, A. (2003). Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression: a practical guide to curve fitting. GraphPad Software. In *GraphPad Software, Inc.* <https://www.facm.ucl.ac.be/cooperation/Vietnam/WBI-Vietnam-October-2011/Modelling/RegressionBook.pdf>
- Nápoles, J., Rodríguez, S., Santiago, L., & Ábalos, A. (2015). Disminución del extracto orgánico total en suelos contaminados con hidrocarburos. *Tecnología Química*, 35(3), 322–333. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2224-61852015000300006&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-61852015000300006&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- National Library of Medicine. (n.d.). *National Center for Biotechnology Information*. NCBI. Retrieved November 25, 2024, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Nemec, A., Krizova, L., Maixnerova, M., van der Reijden, T. J. K., Deschaght, P., Passet, V., Vanechoutte, M., Brisse, S., & Dijkshoorn, L. (2011). Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Ac.* *Research in Microbiology*, 162(4), 393–404. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.02.006>
- Obayori, O. S., Adebuseye, S. A., Adewale, A. O., Oyetibo, G. O., Oluyemi, O. O., Amokun, R. A., & Ilori, M. O. (2009). Differential degradation of crude oil (Bonny Light) by four *Pseudomonas* strains. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 21(2), 243–248. [75](https://doi.org/10.1016/S1001-</a></p>
</div>
<div data-bbox=)

0742(08)62258-5

- Ochoa Carreño, D. C., & Montoya Restrepo, A. (2010). Consorcios microbianos: una metáfora biológica aplicada a la asociatividad empresarial en cadenas productivas agropecuarias. *Revista Facultad de Ciencias Económicas*, 18(2), 55–74. <https://doi.org/10.18359/RFCE.2272>
- Okoh, A. I. (2006). Biodegradation alternative in the cleanup of petroleum hydrocarbon pollutants. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 1(2), 38–50.
- Orijude, J. E. (2019). *Assessing the capacity of wild and mutant strains of Bacillus subtilis and pseudomonas putida isolated from refinery effluent in the degradation of hydrocarbons* [Ahmadu Bello University]. [https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/77615179/ASSESSING\\_THE\\_CAPACITY\\_OF\\_WILD\\_AND\\_MUTANT\\_-libre.pdf?1640824120=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DAssessing\\_the\\_Capacity\\_of\\_Wild\\_and\\_Mutan.pdf&Expires=1732637672&Signature=l9NKA96Jhbg65zrWq9N](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/77615179/ASSESSING_THE_CAPACITY_OF_WILD_AND_MUTANT_-libre.pdf?1640824120=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DAssessing_the_Capacity_of_Wild_and_Mutan.pdf&Expires=1732637672&Signature=l9NKA96Jhbg65zrWq9N)
- Osorio Certuche, N. (2023). *Caracterización genómica de factores de virulencia de aislados clínicos de Pseudomonas aeruginosa basados en WGS provenientes de un hospital de Bogotá, Colombia* [Universidad Nacional de Colombia]. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/84264>
- Oxford Nanopore Technologies. (2024a). *MinION and GridION | Brochure*. <https://nanoporetech.com/resource-centre/minion-and-gridion-brochure>
- Oxford Nanopore Technologies. (2024b). *MinKNOW*. <https://nanoporetech.com/document/experiment-companion-minknow>
- Oxford Nanopore Technology. (2024). *Rapid sequencing DNA V14 - barcoding (SQK-RBK114.24 or SQK-RBK114.96)*. <https://nanoporetech.com/es/document/rapid-sequencing-gdna-barcoding-sqk-rbk114?device=Flongle>
- PacBio. (2020). Sequencing 101: the evolution of DNA sequencing tools - PacBio. In *PacBio*. <https://www.pacb.com/blog/the-evolution-of-dna-sequencing-tools/>
- Pardo, S., Rojas, D., Rolda, F., Brandao, P., & Almansa, E. (2017). Biodegradación de fenol en aguas tratadas de la industria petrolera para re-uso en cultivos agrícolas. *Biología Tropical*, 65(2), 685–699. <https://www.scielo.sa.cr/pdf/rbt/v65n2/0034-7744-rbt-65-02-00685.pdf>
- Pardo, S., Rojas, D., Roldan, F., Brandao, P., & Almansa, E. (2017). Biodegradación de fenol en aguas tratadas de la industria petrolera para re-uso en cultivos agrícolas. *Biología Tropical*, 65(2), 685–699. <https://www.scielo.sa.cr/pdf/rbt/v65n2/0034-7744-rbt-65-02-00685.pdf>
- Pasqualino, J. C., Montané, D., & Salvadó, J. (2006). Synergic effects of biodiesel in the biodegradability of fossil-derived fuels. *Biomass and Bioenergy*, 30(10), 874–879. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMBIOE.2006.03.002>
- Paul Choudhury, S., Panda, S., Haq, I., & Kalamdhad, A. S. (2022). Enhanced methane production and hydrocarbon removal from petroleum refinery sludge after *Pseudomonas putida* pretreatment and process scale-up. *Bioresource Technology*, 343, 126127. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2021.126127>
- Pedrero Izquierdo, M. E. (2002). *Caracterización de las fuentes de incertidumbre y optimización de sistema primario de titulación coulombimétrica* [Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica]. <https://cideteq.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1021/284>
- Pejic, B. M., Vukcevic, M. M., Pajic-Lijakovic, I. D., Lausevic, M. D., & Kostic, M. M. (2011). Mathematical modeling of heavy metal ions (Cd<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup>) biosorption by chemically modified short hemp fibers. *Chemical Engineering*

- Journal*, 172(1), 354–360. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.06.016>
- Petroperú. (2024). *Especificaciones técnicas Petroperú*. <https://www.petroperu.com.pe/Docs/spa/files/productos/especificaciones-tecnicas-para-el-diesel-b5-s50.pdf>
- Pietrini, F., Passatore, L., Patti, V., Francocci, F., Giovannozzi, A., & Zacchini, M. (2019). Morpho-Physiological and Metal Accumulation Responses of Hemp Plants (*Cannabis Sativa* L.) Grown on Soil from an Agro-Industrial Contaminated Area. *Water*, 11(4), 808. <https://doi.org/10.3390/w11040808>
- Prince, R. C. (2002). Petroleum and other hydrocarbons biodegradation. In *Encyclopedia of Environ Microbiol*, 66–74. [https://www.researchgate.net/publication/306177292\\_Biodegradation\\_of\\_Petroleum\\_and\\_other\\_hydrocarbons](https://www.researchgate.net/publication/306177292_Biodegradation_of_Petroleum_and_other_hydrocarbons)
- Quick, J., Loman, N. J., Duraffour, S., Simpson, J. T., Severi, E., Cowley, L., Bore, J. A., Koundouno, R., Dudas, G., Mikhail, A., Ouédraogo, N., Afrough, B., Bah, A., Baum, J. H. J., Becker-Ziaja, B., Boettcher, J. P., Cabeza-Cabrerizo, M., Camino-Sánchez, Á., Carter, L. L., ... Carroll, M. W. (2016). Real-time, portable genome sequencing for Ebola surveillance. *Nature*, 530(7589), 228–232. <https://doi.org/10.1038/nature16996>
- Rashid, S., Charles, T., & Glick, B. (2012). Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. *Appl. Soil Ecol.*, 61, 217–224.
- Remus-Emsermann, M. N. P., Schmid, M., Gekenidis, M. T., Pelludat, C., Frey, J. E., Ahrens, C. H., & Drissner, D. (2016). Complete genome sequence of *Pseudomonas citronellolis* P3B5, a candidate for microbial phyllo-remediation of hydrocarbon-contaminated sites. *Standards in Genomic Sciences*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S40793-016-0190-6/TABLES/5>
- Rodríguez Rodríguez, S. (2006). Interacción entre proteínas de las familias H-NS y Hha/YmoA: regulación de la expresión génica en “Enterobacteriaceae” [Universitat de Barcelona]. In *TDX (Tesis Doctorals en Xarxa)*. <https://www.tdx.cat/handle/10803/2399>
- Röling, W. F. M., Milner, M. G., Jones, D. M., Lee, K., Daniel, F., Swannell, R. J. P., & Head, I. M. (2002). Robust Hydrocarbon Degradation and Dynamics of Bacterial Communities during Nutrient-Enhanced Oil Spill Bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11), 5537–5548. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.11.5537-5548.2002>
- Roverssi Sobrado, G. P. (2011). *Determinación de la degradación de biodiesel en suelo urbano por medición de los Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPH) y evolución de CO2*. [Universidad del Valle de Guatemala]. <https://repositorio.uvg.edu.gt/xmlui/handle/123456789/1677>
- Sarmiento Torres, R. (2008). Propiedades físicas y químicas del biodiésel vs diésel del petróleo. *Energía a Debate*. <https://www.potencianatural.com.mx/energia/Articulos/Noviembre2008/SarmientoNov2008.htm>
- Sauvé, S., & Desrosiers, M. (2014). A review of what is an emerging contaminant. *Chemistry Central Journal*, 8(1), 15. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-8-15>
- Sawadogo, A., Cissé, H., Otoïdobia, H. C., Odetokun, I. A., Zongo, C., Dianou, D., & Savadogo, A. (2024). Characterization of two bacterial strains isolated from wastewater and exhibiting in-vitro degradation of diesel and used oils. *Scientific African*, 25, e02289. <https://doi.org/10.1016/J.SCIAF.2024.E02289>
- Scott, M., Rani, M., Samsatly, J., Charron, J.-B., & Jabaji, S. (2018). Endophytes of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) cultivars: identification of culturable bacteria and fungi in leaves, petioles, and seeds. *Canadian Journal of Microbiology*, 64(10), 664–680. <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0108>
- Sensi Seeds. (2022). *Anatomía de la planta de Cannabis: De las raíces a los*

- pistilos*. Sensi Seeds. <https://sensiseeds.com/es/blog/las-partes-de-la-planta-de-cannabis/>
- Shahidul Islam, M., & Tanaka, M. (2004). Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Marine Pollution Bulletin*, 48(7), 624–649. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2003.12.004>
- Silva, G. S., Marques, E. L. S., Dias, J. C. T., Lobo, I. P., Gross, E., Brendel, M., da Cruz, R. S., & Rezende, R. P. (2012). Biodegradability of soy biodiesel in microcosm experiments using soil from the Atlantic Rain Forest. *Applied Soil Ecology*, 55, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.01.001>
- Smith, J. M. (1976). *Ingeniería de la cinética química*. CECSA. <https://ingenieriapetroquimicaunefazulia.wordpress.com/wp-content/uploads/2011/05/ingenieria-de-la-cinetica-quimica-de-j-r-smith.pdf>
- Speight, J. G. (2014). *The Chemistry and Technology of Petroleum* (5th ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b16559>
- Stanley, G. A., Britz, M. L., Boonchan, S., & Juhasz, A. (2000). Detoxification of soils containing high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by gram-negative bacteria and bacterial-fungal cocultures. In *ENVIRONMENTAL SCIENCE AND POLLUTION CONTROL SERIES* (pp. 409–444). <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=40RZDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA409&ots=Xg11meBPn5&sig=Z6GyGlfHx7TL66W1KcbHgG9PiNE#v=onepage&q&f=false>
- Stumm, W., & Morgan, J. J. (1996). Aquatic chemistry: chemical equilibria and rates in natural waters. In *Environmental science and technology*. <https://documentation-centre.watlab.be/imis.php?module=ref&refid=127507>
- Thermo Scientific. (2011). *GeneJET Genomic DNA Purification kit #K0721, #K0722*. [https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fabo.com.pl%2Fpl%2Fp%2Ffile%2F3af94ce2b5a24e8f6566060540900655%2FGeneJET-Genomic-protokol.pdf&psig=AOvVaw3A8Lem6l2ovuP5wrOrJG4s&ust=1732639144318000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=0CAQQn5wMahcKEwig\\_v](https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fabo.com.pl%2Fpl%2Fp%2Ffile%2F3af94ce2b5a24e8f6566060540900655%2FGeneJET-Genomic-protokol.pdf&psig=AOvVaw3A8Lem6l2ovuP5wrOrJG4s&ust=1732639144318000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=0CAQQn5wMahcKEwig_v)
- Thieman, W. J., & Palladino, M. A. (2010). Biorremediación. In M. Martín- Romo & E. Martín (Eds.), *Introducción a la biotecnología* (2nd ed., pp. 208–230). PEARSON EDUCACIÓN S.A. [https://www.academia.edu/43152286/Introducción\\_a\\_la\\_Biotecnología\\_by\\_Thieman\\_and\\_Palladino](https://www.academia.edu/43152286/Introducción_a_la_Biotecnología_by_Thieman_and_Palladino)
- Tindall, J. A., Kunkel, J. R., & Anderson, D. E. (1999). *Unsaturated zone hydrology for scientists and engineers* (Vol. 4). Upper Saddle River. [https://www.brr.cr.usgs.gov/projects/GW\\_Unsat/Unsat\\_Zone\\_Book/TindallUZTitlePageTableofContents.pdf](https://www.brr.cr.usgs.gov/projects/GW_Unsat/Unsat_Zone_Book/TindallUZTitlePageTableofContents.pdf)
- Tissot, B. P., & Welte, D. H. (1984). *Petroleum Formation and Occurrence* (2nd ed.). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-87813-8>
- Tyagi, M., da Fonseca, M. M. R., & de Carvalho, C. C. C. R. (2011). Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*, 22(2), 231–241. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9394-4>
- Varjani, S. J. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*, 223, 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.037>
- Varnava, C. K., Persianis, P., Ieropoulos, I., & Tsipa, A. (2024). Electricity

- generation and real oily wastewater treatment by *Pseudomonas citronellolis* 620C in a microbial fuel cell: pyocyanin production as electron shuttle. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 47(6), 903. <https://doi.org/10.1007/S00449-024-03016-1>
- Vaverková, M. D., Zloch, J., Adamcová, D., Radziemska, M., Vyhnánek, T., Trojan, V., Winkler, J., Đorđević, B., Elbl, J., & Brtnický, M. (2019). Landfill Leachate Effects on Germination and Seedling Growth of Hemp Cultivars (*Cannabis Sativa* L.). *Waste and Biomass Valorization*, 10(2), 369–376. <https://doi.org/10.1007/S12649-017-0058-Z/METRICS>
- Villalón, P., Valdezate, S., Cabezas, T., Ortega, M., Garrido, N., Vindel, A., Medina-Pascual, M. J., & Saez-Nieto, J. A. (2015). Endemic and epidemic *Acinetobacter baumannii* clones: a twelve-year study in a tertiary care hospital. *BMC Microbiology*, 15(1), 47. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0383-y>
- Walker, B., Krishnasastri, M., Zorn, L., Kasianowicz, J., & Bayley, H. (1992). Functional expression of the alpha-hemolysin of *Staphylococcus aureus* in intact *Escherichia coli* and in cell lysates. Deletion of five C-terminal amino acids selectively impairs hemolytic activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(15), 10902–10909. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1587866>
- Wang, L., Cheng, Y., Naidu, R., & Bowman, M. (2021). The Key Factors for the Fate and Transport of Petroleum Hydrocarbons in Soil With Related in/ex Situ Measurement Methods: An Overview. *Frontiers in Environmental Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2021.756404>
- Wang, Y., & Dai, C. C. (2011). Endophytes: A potential resource for biosynthesis, biotransformation, and biodegradation. *Annals of Microbiology*, 61(2), 207–215. <https://doi.org/10.1007/S13213-010-0120-6/METRICS>
- Wood, D. E., Lu, J., & Langmead, B. (2019). Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biology*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/S13059-019-1891-0>
- Wood, D. E., & Salzberg, S. L. (2014). Kraken: Ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biology*, 15(3), 1–12. <https://doi.org/10.1186/GB-2014-15-3-R46/FIGURES/5>
- Wu, T., Xu, J., Xie, W., Yao, Z., Yang, H., Sun, C., & Li, X. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* L10: A Hydrocarbon-Degrading, Biosurfactant-Producing, and Plant-Growth-Promoting Endophytic Bacterium Isolated From a Reed (*Phragmites australis*). *Frontiers in Microbiology*, 9, 381093. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01087>
- Wu, Y., Trejo, H. X., Chen, G., & Li, S. (2021). Phytoremediation of contaminants of emerging concern from soil with industrial hemp (*Cannabis sativa* L.): a review. *Environment, Development and Sustainability*, 23(10), 14405–14435. <https://doi.org/10.1007/s10668-021-01289-0>
- Yang, M., Yang, Y. S., Du, X., Cao, Y., & Lei, Y. (2013). Fate and Transport of Petroleum Hydrocarbons in Vadose Zone: Compound-specific Natural Attenuation. *Water, Air, & Soil Pollution*, 224(3), 1439. <https://doi.org/10.1007/s11270-013-1439-y>
- Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F. O., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., Whitman, W. B., Euzéby, J., Amann, R., & Rosselló-Móra, R. (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology*, 12(9), 635–645. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3330>
- Yin, R., Kwok, C. K., & Zheng, J. (2019). Whole genome sequencing analysis. In S. Ranganathan, K. Nakai, C. Schonbach, & M. Gribskov (Eds.),

*Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology: ABC of Bioinformatics* (Vol. 3, pp. 176–183). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20095-2>

Zahid, M. S. Bin, Iqbal, A., & Arshad, M. (2015). Benzene degradation with bacterial strains isolated from rhizosphere of *Cannabis sativa* being irrigated with petroleum refinery wastewater. *Desalination and Water Treatment*, 57(37), 17579–17584. <https://doi.org/10.1080/19443994.2015.1086896>

Zhang, X., Peterson, C., Reece, D., Haws, R., & Möller, G. (1998). Biodegradability of biodiesel in the aquatic environment. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, 41(5), 1423–1430. <https://doi.org/10.13031/2013.17277>

## **IX. ANEXOS**

**Anexo 1.** Composición de los medios de cultivo utilizados para el aislamiento, cultivo y biodegradación de petróleo diésel por bacterias endofíticas de *Cannabis* sp., Ayacucho 2023.

<b>Agar nutritivo Merck</b>	
<b>COMPONENTE</b>	<b>UNIDAD (g/L)</b>
Peptona	5,0
Extracto de carne	3,0
Agar	12,0
pH	7,0 ± 0,2
<b>Caldo nutritivo Microgen</b>	
<b>COMPONENTE</b>	<b>UNIDAD (g/L)</b>
Digerido péptico de tejido animal	5,0
Extracto de carne	1,5
Extracto de levadura	1,5
Cloruro de sodio	5,0
pH	7,4 ± 0,2
<b>Medio mínimo de sales minerales M9</b>	
<b>COMPONENTE</b>	<b>UNIDAD (g/L)</b>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,0
NaCl	0,5
NH <sub>4</sub> Cl*	1,0
pH	6,7 ± 6,8

*Nota.* Para el medio mínimo de sales minerales: \* Se añadió para probar fuentes carbonadas, complementando con un ml de MgSO<sub>4</sub> y un ml de CaCl<sub>2</sub> 200 mM. Adaptado de Hammond *et al.* (2010), Miller (1972) y Rodríguez Rodríguez (2006).

**Anexo 2.** Constancia de donación de la muestra vegetal (raíz) de *Cannabis* sp.

**“Año de la recuperación y consolidación de la economía peruana”**

**CONSTANCIA DE DONACIÓN DE MUESTRA VEGETAL (RAÍZ) DE**

***Cannabis* sp.**

Yo, la Dra. Janet Rossana Zegarra López, docente principal a tiempo completo de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Facultad de Ciencias Físicas y Formales, Departamento Académico de Química, e investigadora principal del proyecto de investigación “Influencia del medio de cultivo en el mejoramiento de la calidad del aceite esencial de *Cannabis* sp. y su adecuación en el Departamento de Arequipa” (Código de contrato IBA-IB-03-2019), certifico que, a solicitud del interesado **Máximo Rafael Sosa García**, código universitario N° 02172512, de la Escuela Profesional de Biología del Departamento Académico de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, se donó la muestra de raíz de *Cannabis* sp.. Dicha muestra, identificada mediante el análisis molecular de semillas (Clasificación taxonómica de *Cannabis*: Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliopsida; Mesangiospermae; eudicotyledons; Gunneridae; Pentapetalae; rosids; fabids; Rosales; Cannabaceae; *Cannabis*) para ser utilizada en la realización del trabajo de investigación – tesis: “Capacidad biodegradadora de petróleo diésel por bacterias endofíticas aisladas de *Cannabis* sp., Ayacucho 2023”, proyecto que se ejecutó en el Laboratorio de Microbiología Ambiental y en el Laboratorio de Inmunología y Microbiología del área de Microbiología de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

Dejo constancia de la presente, a solicitud del interesado.

Ayacucho, 01 de marzo de 2025.



Dra. Janet Rossana Zegarra López  
DNI N°29253732

*Nota.* Este documento oficializa la donación de la muestra por la Dra. Janet Rossana Zegarra López, investigadora principal de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, para su uso en la investigación “Capacidad biodegradadora de petróleo diésel por bacterias endofíticas aisladas de *Cannabis* sp.”. Se adjunta con fines de respaldo legal y académico.

**Anexo 3.** Aislamiento, adaptación y selección de cepas bacterianas endofíticas de la raíz de *Cannabis* sp. degradadoras de petróleo diésel, Laboratorio de Microbiología Ambiental, Ayacucho 2023.



Muestra vegetal recibida.



Raíz desarraigada.



Preparación de muestras.



Trituración de la raíz.



Esterilización UV de petróleo diésel.



Pipeteo de petróleo diésel.



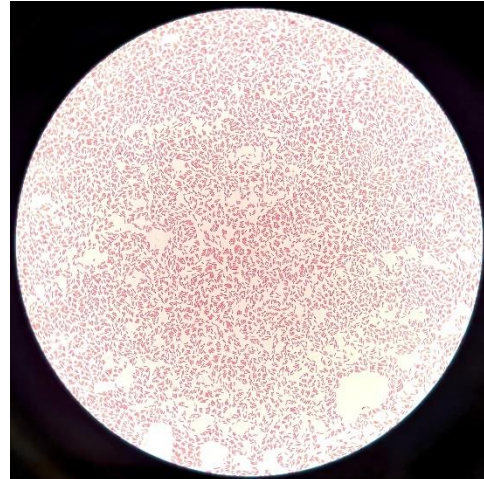
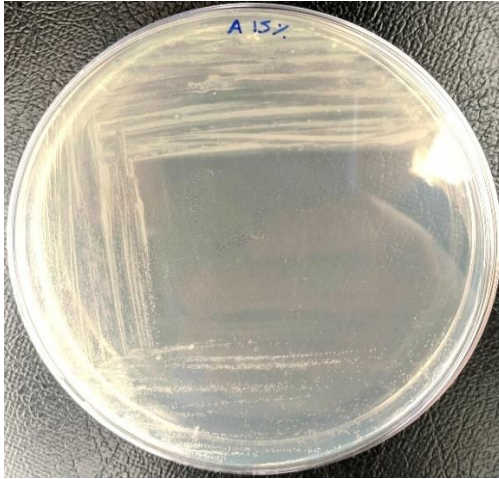
Medio mínimo M9 con petróleo diésel al 5, 10 y 15 % para la adaptación y tolerancia.



Crecimiento de cepas puras rotuladas y selladas conservadas a refrigeración.

**Anexo 4.** Caracterización morfológica macro y microscópica de siete cepas bacterianas endofíticas aisladas de la raíz de *Cannabis* sp. y adaptadas al 15 % de petróleo diésel, Ayacucho 2023.

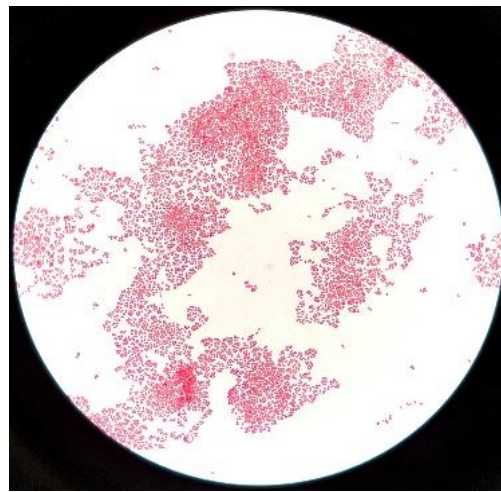
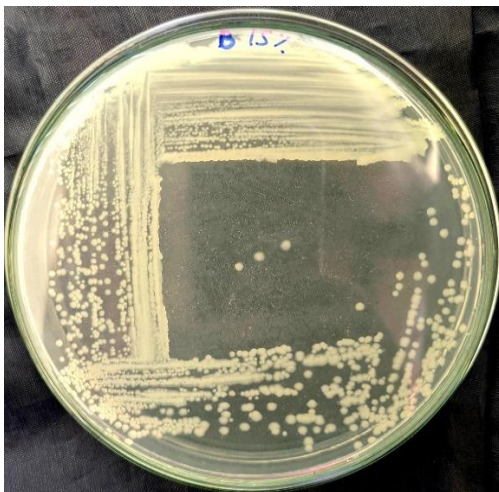
**Cepa A: *Pseudomonas citronellolis***



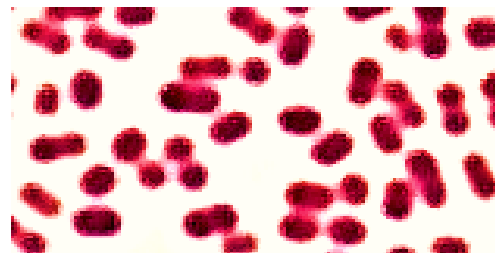
Colonias pequeñas a 24 h de crecimiento lento de color blancas – beige, lisa y redondas, observación al microscopio 400X con tinción Gram, ampliado: bacilos Gram negativo.



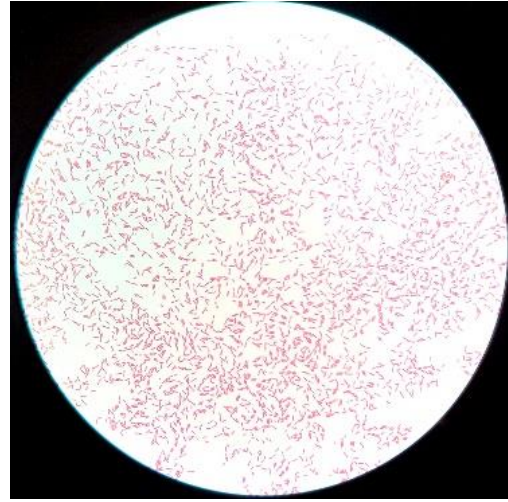
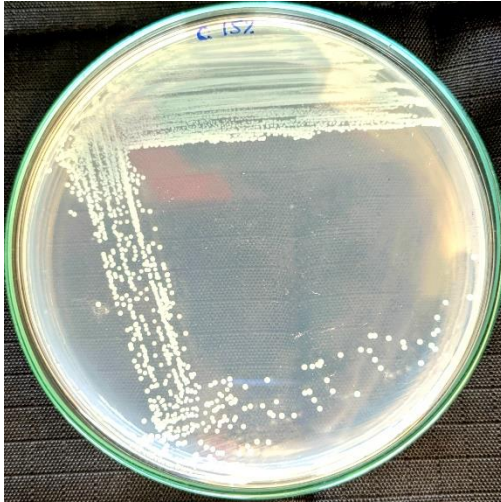
**Cepa B: *Acinetobacter calcoaceticus/baumannii* complex**



Colonias pequeñas a 24 h de color crema – amarillenta, lisa, redondas y convexa, observación al microscopio 400X con tinción Gram, ampliado: cocobacilos Gram negativo que suele parecer diplococo por su disposición en pares.



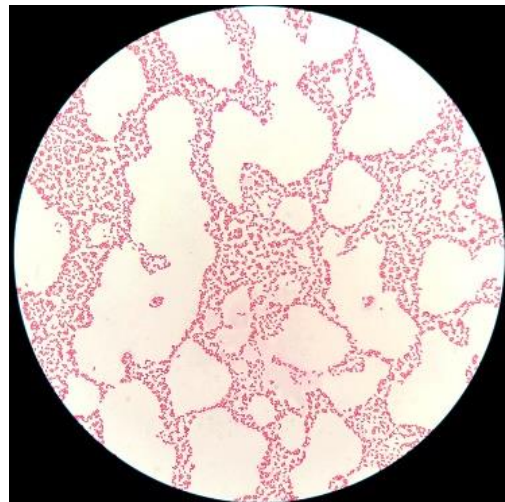
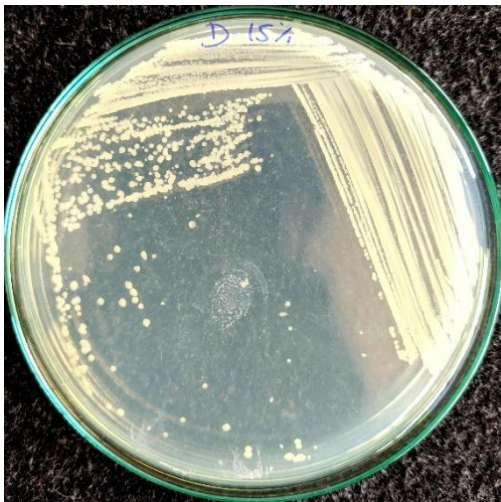
**Cepa C: *Pseudomonas putida***



Colonias pequeñas a 24 h de color blanquecino, lisa, redondas y convexa, observación al microscopio 400X con tinción Gram, ampliado: bacilos Gram negativo.



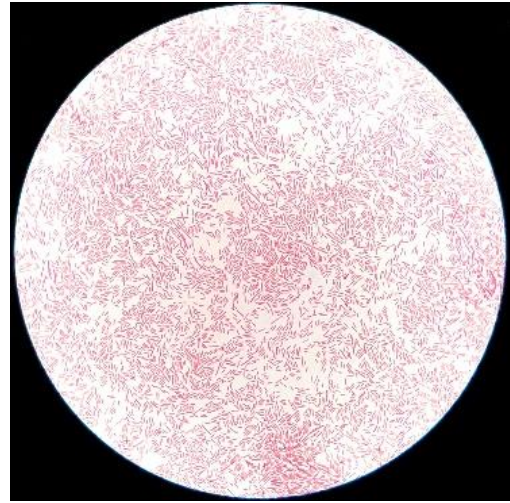
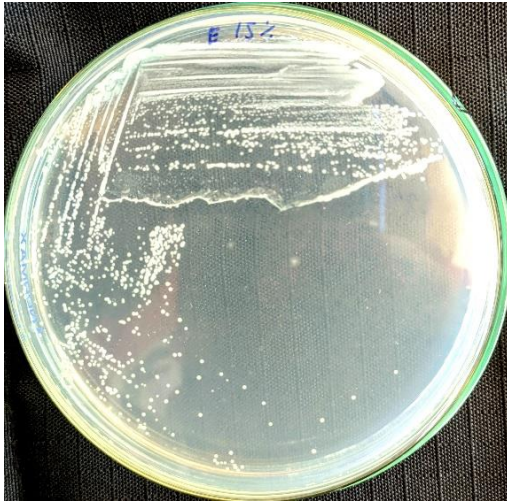
**Cepa D: *Acinetobacter calcoaceticus/baumannii* complex**



Colonias pequeñas de color crema – amarillenta, lisa, redondas y convexa, observación al microscopio 400X con tinción Gram, ampliado: cocobacilos Gram negativo que suele parecer diplococo por su disposición en pares.



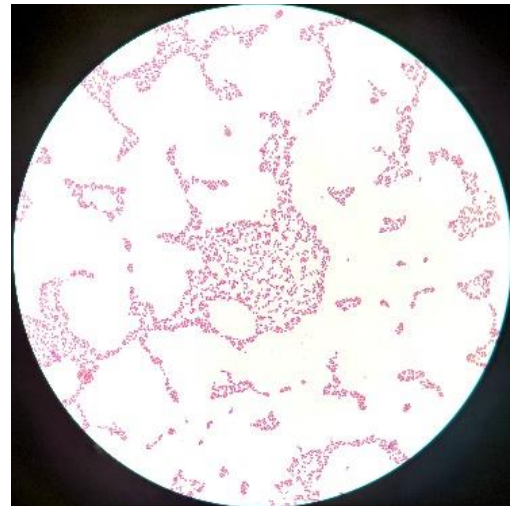
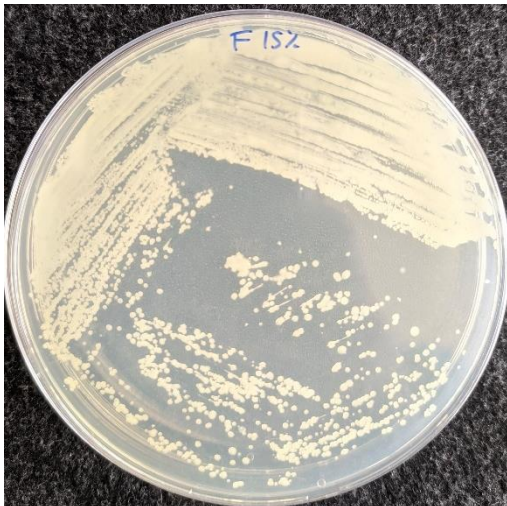
**Cepa E: *Pseudomonas* sp. FDAARGOS\_380**



Colonias pequeñas a 24 h de color blanquecino, lisa Y redondas, observación al microscopio 400X con tinción Gram, ampliado: bacilos rectos Gram negativo.



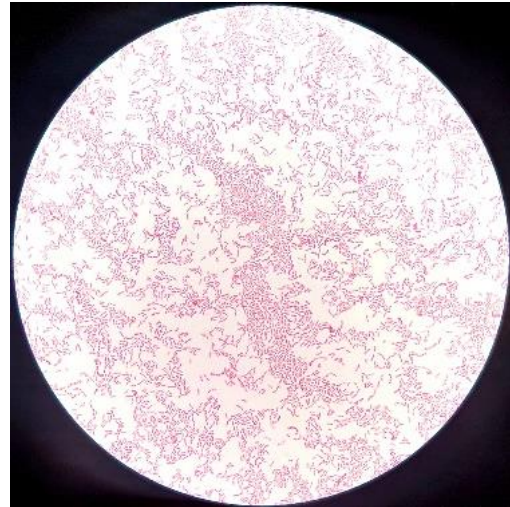
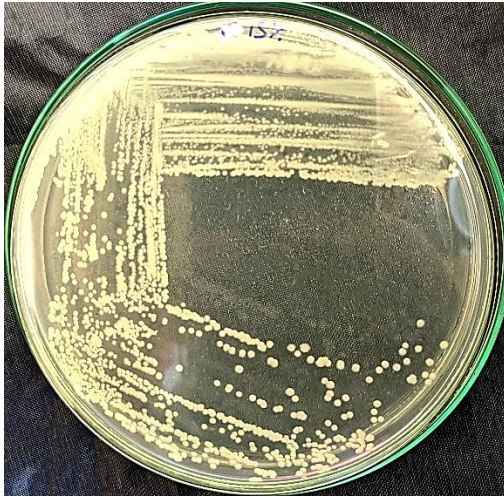
**Cepa F: *Acinetobacter calcoaceticus***



Colonias pequeñas-medianas de color crema – amarillenta, lisa, redondas y convexa, observación al microscopio 400X con tinción Gram, ampliado: cocobacilos Gram negativo que suele parecer diplococo por su disposición en pares.



**Cepa G: *Acinetobacter schindleri***



Colonias pequeñas de color crema – amarillenta, lisa, redondas y convexa, observación al microscopio 400X con tinción Gram, ampliado: cocobacilos Gram negativo que suele parecer diplococo por su disposición en pares.



**Anexo 5.** Sistema de matraz biómetro agitado modificado para captura de CO<sub>2</sub> en la degradación de petróleo diésel por bacterias endofíticas aisladas de *Cannabis* sp., Ayacucho 2023.



A: Filtro para la entrada de oxígeno  
B: Regulador del paso del aire  
C: Frasco para la mezcla problema

D: Salida de CO<sub>2</sub>  
E: Tapa para la extracción de NaOH  
F: Frasco con NaOH capturador de CO<sub>2</sub>

**Anexo 6.** Evaluación de la biodegradación de petróleo diésel por bacterias endofíticas aisladas de la raíz de *Cannabis* sp., Laboratorio de Microbiología Ambiental, Ayacucho 2023.

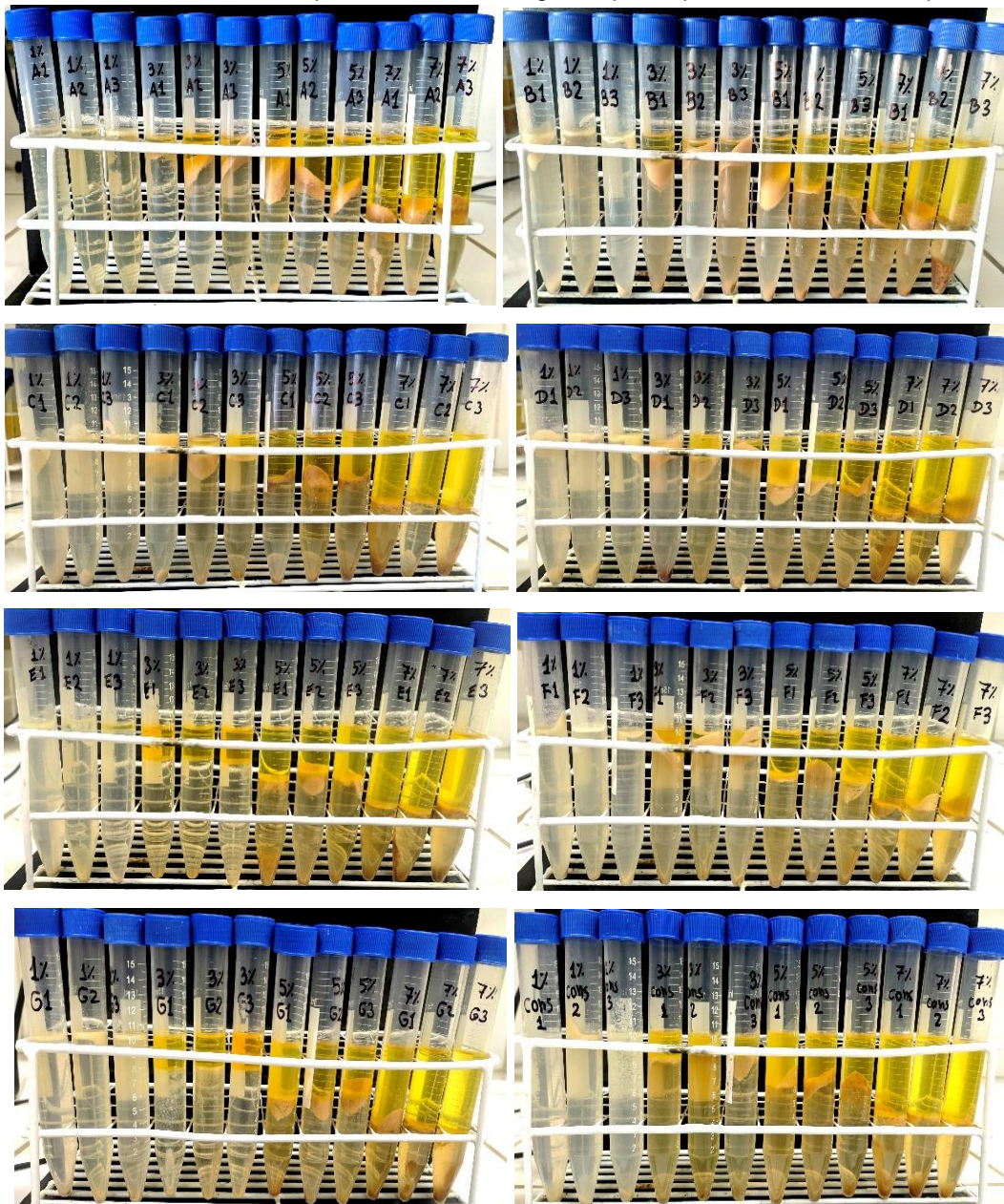


Agitador horizontal modificado para todos los sistemas



Titulación

Medición de ml residual de petróleo diésel, imágenes por cepa-concentración x triplicado.



**Anexo 7.** Datos completos de producción de CO<sub>2</sub> acumulada (g/L) de la degradación de petróleo diésel por bacterias endofíticas de *Cannabis* sp., Ayacucho 2023.

<b>MEDICIÓN DE CO<sub>2</sub> PRODUCIDO MEDIANTE TITULACIÓN ÁCIDO-BASE</b>												
<b>%Cepa</b>	<b>Producción de CO<sub>2</sub> (g/L)</b>											
<b>A</b>	<b>Día 05</b>	<b>Día 10</b>	<b>Día 15</b>	<b>Día 20</b>	<b>Día 25</b>	<b>Día 30</b>	<b>Día 35</b>	<b>Día 40</b>	<b>Día 45</b>	<b>Día 50</b>	<b>Día 55</b>	<b>Día 60</b>
<b>1 %-A1</b>	6,60 E-04	1,08 E-03	1,40 E-03	1,80 E-03	1,97 E-03	1,99 E-03	2,05 E-03	2,06 E-03	2,06 E-03	2,06 E-03	2,06 E-03	2,06 E-03
<b>1 %-A2</b>	6,38 E-04	9,13 E-04	1,29 E-03	1,72 E-03	1,93 E-03	1,97 E-03	1,99 E-03	2,01 E-03	2,02 E-03	2,02 E-03	2,02 E-03	2,02 E-03
<b>1 %-A3</b>	6,49 E-04	1,00 E-03	1,52 E-03	1,83 E-03	1,91 E-03	1,95 E-03	2,00 E-03	2,00 E-03	2,04 E-03	2,04 E-03	2,04 E-03	2,04 E-03
<b>3 %-A1</b>	6,49 E-04	8,69 E-04	1,31 E-03	1,79 E-03	1,95 E-03	1,97 E-03	2,01 E-03	2,02 E-03	2,04 E-03	2,05 E-03	2,06 E-03	2,06 E-03
<b>3 %-A2</b>	6,16 E-04	9,90 E-04	1,43 E-03	1,82 E-03	1,94 E-03	1,96 E-03	2,00 E-03	2,01 E-03	2,05 E-03	2,07 E-03	2,07 E-03	2,07 E-03
<b>3 %-A3</b>	6,38 E-04	1,11 E-03	1,55 E-03	1,84 E-03	1,93 E-03	1,95 E-03	1,98 E-03	1,99 E-03	2,00 E-03	2,02 E-03	2,05 E-03	2,05 E-03
<b>5 %-A1</b>	5,72 E-04	7,37 E-04	1,11 E-03	1,60 E-03	1,90 E-03	1,97 E-03	2,00 E-03	2,02 E-03	2,05 E-03	2,08 E-03	2,09 E-03	2,09 E-03
<b>5 %-A2</b>	6,60 E-04	9,57 E-04	1,40 E-03	1,76 E-03	1,91 E-03	1,95 E-03	1,98 E-03	2,00 E-03	2,01 E-03	2,02 E-03	2,04 E-03	2,04 E-03
<b>5 %-A3</b>	5,94 E-04	7,04 E-04	1,20 E-03	1,66 E-03	1,93 E-03	1,98 E-03	2,02 E-03	2,05 E-03	2,07 E-03	2,07 E-03	2,08 E-03	2,10 E-03
<b>7 %-A1</b>	6,82 E-04	1,17 E-03	1,52 E-03	1,85 E-03	1,95 E-03	1,96 E-03	1,98 E-03	1,99 E-03	2,01 E-03	2,01 E-03	2,02 E-03	2,02 E-03
<b>7 %-A2</b>	6,93 E-04	1,12 E-03	1,54 E-03	1,79 E-03	1,94 E-03	1,99 E-03	2,00 E-03	2,02 E-03	2,04 E-03	2,04 E-03	2,04 E-03	2,04 E-03
<b>7 %-A3</b>	6,49 E-04	1,10 E-03	1,51 E-03	1,84 E-03	1,93 E-03	1,98 E-03	1,99 E-03	2,04 E-03	2,02 E-03	2,02 E-03	2,05 E-03	2,07 E-03
<b>B</b>	<b>Día 05</b>	<b>Día 10</b>	<b>Día 15</b>	<b>Día 20</b>	<b>Día 25</b>	<b>Día 30</b>	<b>Día 35</b>	<b>Día 40</b>	<b>Día 45</b>	<b>Día 50</b>	<b>Día 55</b>	<b>Día 60</b>
<b>1 %-B1</b>	7,26 E-04	1,41 E-03	1,83 E-03	1,94 E-03	1,99 E-03	2,00 E-03	2,01 E-03	2,02 E-03	2,02 E-03	2,02 E-03	2,02 E-03	2,02 E-03
<b>1 %-B2</b>	7,04 E-04	1,40 E-03	1,87 E-03	1,96 E-03	1,98 E-03	1,99 E-03	2,00 E-03	2,04 E-03	2,04 E-03	2,05 E-03	2,05 E-03	2,05 E-03
<b>1 %-B3</b>	7,37 E-04	1,39 E-03	1,84 E-03	1,91 E-03	1,95 E-03	1,97 E-03	1,99 E-03	1,99 E-03	2,01 E-03	2,04 E-03	2,04 E-03	2,04 E-03
<b>3 %-B1</b>	6,93 E-04	1,21 E-03	1,69 E-03	1,95 E-03	1,98 E-03	1,99 E-03	2,02 E-03	2,05 E-03	2,06 E-03	2,06 E-03	2,08 E-03	2,08 E-03
<b>3 %-B2</b>	6,38 E-04	1,29 E-03	1,89 E-03	1,94 E-03	1,99 E-03	2,01 E-03	2,04 E-03	2,06 E-03	2,09 E-03	2,10 E-03	2,10 E-03	2,10 E-03
<b>3 %-B3</b>	6,49 E-04	1,28 E-03	1,78 E-03	1,93 E-03	1,97 E-03	2,00 E-03	2,00 E-03	2,02 E-03	2,07 E-03	2,07 E-03	2,07 E-03	2,07 E-03
<b>5 %-B1</b>	6,93 E-04	1,20 E-03	1,79 E-03	2,00 E-03	2,02 E-03	2,02 E-03	2,02 E-03	2,08 E-03	2,08 E-03	2,09 E-03	2,09 E-03	2,09 E-03
<b>5 %-B2</b>	7,04 E-04	1,29 E-03	1,83 E-03	1,97 E-03	2,04 E-03	2,04 E-03	2,04 E-03	2,05 E-03	2,07 E-03	2,07 E-03	2,08 E-03	2,08 E-03
<b>5 %-B3</b>	7,59 E-04	1,30 E-03	1,73 E-03	1,96 E-03	1,98 E-03	1,99 E-03	2,00 E-03	2,01 E-03	2,04 E-03	2,04 E-03	2,04 E-03	2,04 E-03
<b>7 %-B1</b>	6,93 E-04	1,11 E-03	1,68 E-03	1,87 E-03	1,98 E-03	2,00 E-03	2,01 E-03	2,04 E-03	2,05 E-03	2,07 E-03	2,07 E-03	2,07 E-03

<b>7 %-B2</b>	8,03	1,38	1,87	1,94	1,96	1,97	1,99	1,99	2,01	2,02	2,04	2,05
	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>7 %-B3</b>	7,04	1,23	1,73	1,95	2,02	2,04	2,04	2,05	2,07	2,08	2,08	2,08
	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>C</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>
	<b>05</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>20</b>	<b>25</b>	<b>30</b>	<b>35</b>	<b>40</b>	<b>45</b>	<b>50</b>	<b>55</b>	<b>60</b>
<b>1 %-C1</b>	6,71	1,14	1,73	1,91	1,99	2,00	2,01	2,02	2,05	2,05	2,05	2,06
	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>1 %-C2</b>	6,49	1,28	1,76	1,93	1,98	2,01	2,06	2,07	2,07	2,07	2,07	2,07
	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>1 %-C3</b>	6,60	1,24	1,79	1,90	1,97	1,98	1,99	2,04	2,04	2,04	2,04	2,05
	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>3 %-C1</b>	6,82	1,19	1,79	1,91	1,99	2,00	2,01	2,07	2,07	2,08	2,08	2,08
	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>3 %-C2</b>	6,27	1,00	1,54	1,87	2,00	2,02	2,04	2,05	2,06	2,07	2,09	2,10
	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>3 %-C3</b>	6,60	1,10	1,56	1,88	1,98	1,99	2,00	2,01	2,01	2,01	2,02	2,02
	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>5 %-C1</b>	6,71	1,07	1,61	1,91	1,98	2,01	2,04	2,05	2,06	2,07	2,08	2,10
	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>5 %-C2</b>	6,60	1,13	1,64	1,90	1,99	2,00	2,01	2,02	2,04	2,05	2,06	2,06
	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>5 %-C3</b>	6,82	1,22	1,67	1,93	1,97	1,99	2,02	2,04	2,05	2,06	2,07	2,08
	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>7 %-C1</b>	6,82	1,21	1,75	1,97	1,99	2,00	2,01	2,05	2,07	2,07	2,07	2,07
	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>7 %-C2</b>	7,48	1,36	1,76	1,95	1,98	1,99	1,99	2,00	2,01	2,02	2,04	2,05
	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>7 %-C3</b>	7,26	1,18	1,80	1,94	1,97	1,98	2,00	2,01	2,05	2,05	2,06	2,06
	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>D</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>
	<b>05</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>20</b>	<b>25</b>	<b>30</b>	<b>35</b>	<b>40</b>	<b>45</b>	<b>50</b>	<b>55</b>	<b>60</b>
<b>1 %-D1</b>	6,49	1,17	1,74	1,95	1,99	1,99	2,06	2,06	2,07	2,07	2,07	2,07
	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>1 %-D2</b>	7,15	1,38	1,86	1,94	1,96	1,97	2,00	2,05	2,05	2,05	2,05	2,06
	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>1 %-D3</b>	6,93	1,11	1,72	1,93	1,97	1,98	1,99	2,02	2,02	2,04	2,04	2,04
	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>3 %-D1</b>	7,81	1,32	1,87	1,96	1,97	1,98	2,04	2,05	2,06	2,07	2,08	2,08
	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>3 %-D2</b>	5,94	1,07	1,65	1,95	1,99	2,00	2,06	2,09	2,09	2,11	2,12	2,13
	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>3 %-D3</b>	5,50	1,02	1,76	1,94	1,98	1,99	2,05	2,07	2,08	2,10	2,10	2,11
	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>5 %-D1</b>	7,37	1,21	1,80	1,89	1,95	2,02	2,04	2,07	2,09	2,09	2,09	2,10
	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>5 %-D2</b>	7,15	1,18	1,65	1,90	1,99	2,00	2,01	2,06	2,07	2,10	2,10	2,11
	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>5 %-D3</b>	6,38	1,07	1,54	1,88	2,00	2,01	2,05	2,08	2,08	2,11	2,11	2,12
	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>7 %-D1</b>	6,38	8,58	1,22	1,69	1,95	2,00	2,02	2,04	2,06	2,06	2,06	2,06
	E-04	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>7 %-D2</b>	6,82	1,06	1,45	1,78	1,94	1,95	2,00	2,01	2,02	2,04	2,04	2,04
	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>7 %-D3</b>	6,49	1,07	1,55	1,85	1,96	1,98	2,01	2,02	2,04	2,05	2,07	2,07
	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>E</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>
	<b>05</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>20</b>	<b>25</b>	<b>30</b>	<b>35</b>	<b>40</b>	<b>45</b>	<b>50</b>	<b>55</b>	<b>60</b>

<b>1 %-E1</b>	8,80	1,32	1,84	1,95	1,96	1,98	1,99	2,01	2,04	2,04	2,04	2,04
	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>1 %-E2</b>	6,82	1,25	1,71	1,90	1,97	1,99	2,01	2,04	2,05	2,05	2,05	2,05
	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>1 %-E3</b>	7,48	1,29	1,77	1,80	1,88	1,94	1,96	1,98	2,01	2,01	2,01	2,01
	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>3 %-E1</b>	6,16	8,80	1,10	1,55	1,86	1,97	1,99	1,99	2,01	2,01	2,01	2,01
	E-04	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>3 %-E2</b>	6,05	9,57	1,25	1,65	1,89	1,94	1,95	1,96	1,98	1,99	1,99	1,99
	E-04	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>3 %-E3</b>	7,04	1,00	1,36	1,71	1,85	1,90	1,93	1,94	1,95	1,96	1,96	1,96
	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>5 %-E1</b>	7,37	1,08	1,62	1,94	1,97	1,98	1,99	2,02	2,07	2,07	2,07	2,07
	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>5 %-E2</b>	7,48	1,06	1,73	1,91	1,96	1,99	2,02	2,05	2,05	2,06	2,06	2,06
	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>5 %-E3</b>	6,60	1,05	1,60	1,93	1,98	2,00	2,01	2,04	2,06	2,08	2,08	2,08
	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>7 %-E1</b>	7,15	9,68	1,49	1,82	1,96	2,00	2,02	2,05	2,06	2,07	2,09	2,10
	E-04	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>7 %-E2</b>	7,48	1,29	1,72	1,91	1,95	1,97	2,04	2,04	2,04	2,05	2,05	2,06
	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>7 %-E3</b>	7,37	1,11	1,75	1,94	1,94	1,98	2,05	2,07	2,07	2,08	2,08	2,08
	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>F</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>
	<b>05</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>20</b>	<b>25</b>	<b>30</b>	<b>35</b>	<b>40</b>	<b>45</b>	<b>50</b>	<b>55</b>	<b>60</b>
<b>1 %-F1</b>	7,81	1,38	1,84	1,95	1,98	2,00	2,05	2,06	2,07	2,07	2,07	2,07
	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>1 %-F2</b>	8,47	1,30	1,76	1,90	1,96	1,98	1,99	2,00	2,04	2,04	2,05	2,05
	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>1 %-F3</b>	8,80	1,43	1,86	1,89	1,94	1,97	1,98	1,98	2,02	2,02	2,04	2,04
	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>3 %-F1</b>	7,48	1,12	1,57	1,93	1,98	2,00	2,06	2,07	2,08	2,09	2,10	2,10
	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>3 %-F2</b>	7,59	1,22	1,77	1,91	1,97	1,98	2,04	2,05	2,06	2,08	2,08	2,09
	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>3 %-F3</b>	8,58	1,34	1,80	1,90	1,94	1,96	2,02	2,04	2,04	2,05	2,06	2,08
	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>5 %-F1</b>	7,59	1,19	1,56	1,87	1,97	2,00	2,07	2,08	2,09	2,09	2,09	2,09
	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>5 %-F2</b>	7,48	1,29	1,88	1,93	1,99	2,01	2,02	2,04	2,07	2,08	2,08	2,08
	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>5 %-F3</b>	6,27	1,24	1,72	1,88	1,98	1,99	2,01	2,02	2,05	2,06	2,07	2,10
	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>7 %-F1</b>	6,16	9,57	1,47	1,85	1,96	2,01	2,05	2,06	2,06	2,07	2,07	2,07
	E-04	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>7 %-F2</b>	6,27	9,79	1,45	1,86	1,97	1,98	2,00	2,01	2,02	2,05	2,05	2,05
	E-04	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>7 %-F3</b>	6,05	1,07	1,50	1,84	1,94	1,99	1,99	2,02	2,04	2,06	2,06	2,06
	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>G</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>
	<b>05</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>20</b>	<b>25</b>	<b>30</b>	<b>35</b>	<b>40</b>	<b>45</b>	<b>50</b>	<b>55</b>	<b>60</b>
<b>1 %-G1</b>	7,04	8,91	1,21	1,53	1,82	1,97	1,99	2,00	2,01	2,01	2,01	2,01
	E-04	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>1 %-G2</b>	7,26	9,57	1,31	1,73	1,90	1,95	1,97	1,99	2,00	2,00	2,00	2,00
	E-04	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>1 %-G3</b>	7,15	8,25	1,12	1,58	1,87	1,96	2,00	2,02	2,05	2,07	2,07	2,08
	E-04	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03

<b>3 %- G1</b>	4,51 E-04	7,26 E-04	1,02 E-03	1,47 E-03	1,79 E-03	1,95 E-03	1,98 E-03	1,99 E-03	2,01 E-03	2,01 E-03	2,02 E-03	2,02 E-03
<b>3 %- G2</b>	4,29 E-04	6,71 E-04	1,05 E-03	1,56 E-03	1,90 E-03	1,94 E-03	2,01 E-03	2,01 E-03	2,04 E-03	2,04 E-03	2,05 E-03	2,06 E-03
<b>3 %- G3</b>	5,50 E-04	7,48 E-04	1,07 E-03	1,49 E-03	1,82 E-03	1,90 E-03	1,95 E-03	1,96 E-03	1,98 E-03	1,98 E-03	1,98 E-03	1,99 E-03
<b>5 %- G1</b>	5,28 E-04	8,14 E-04	1,42 E-03	1,83 E-03	1,98 E-03	2,00 E-03	2,00 E-03	2,01 E-03	2,04 E-03	2,05 E-03	2,05 E-03	2,05 E-03
<b>5 %- G2</b>	5,39 E-04	8,47 E-04	1,32 E-03	1,87 E-03	1,97 E-03	2,01 E-03	2,04 E-03	2,06 E-03	2,06 E-03	2,08 E-03	2,08 E-03	2,08 E-03
<b>5 %- G3</b>	5,72 E-04	9,57 E-04	1,56 E-03	1,90 E-03	1,99 E-03	2,02 E-03	2,07 E-03	2,07 E-03	2,07 E-03	2,09 E-03	2,09 E-03	2,09 E-03
<b>7 %- G1</b>	6,93 E-04	1,02 E-03	1,36 E-03	1,78 E-03	1,93 E-03	1,97 E-03	1,98 E-03	1,98 E-03	2,00 E-03	2,01 E-03	2,01 E-03	2,02 E-03
<b>7 %- G2</b>	6,16 E-04	1,06 E-03	1,35 E-03	1,89 E-03	1,96 E-03	1,99 E-03	1,99 E-03	2,00 E-03	2,01 E-03	2,02 E-03	2,02 E-03	2,04 E-03
<b>7 %- G3</b>	4,73 E-04	7,70 E-04	1,34 E-03	1,86 E-03	1,98 E-03	2,00 E-03	2,04 E-03	2,07 E-03	2,07 E-03	2,07 E-03	2,07 E-03	2,08 E-03
<b>Conso rcio</b>	<b>Día 05</b>	<b>Día 10</b>	<b>Día 15</b>	<b>Día 20</b>	<b>Día 25</b>	<b>Día 30</b>	<b>Día 35</b>	<b>Día 40</b>	<b>Día 45</b>	<b>Día 50</b>	<b>Día 55</b>	<b>Día 60</b>
<b>1 %- CONS 1</b>	7,70 E-04	1,31 E-03	1,75 E-03	1,95 E-03	1,97 E-03	1,99 E-03	2,07 E-03	2,07 E-03	2,07 E-03	2,07 E-03	2,07 E-03	2,07 E-03
<b>1 %- CONS 2</b>	7,92 E-04	1,27 E-03	1,77 E-03	1,91 E-03	1,98 E-03	2,01 E-03	2,04 E-03	2,05 E-03	2,05 E-03	2,08 E-03	2,08 E-03	2,08 E-03
<b>1 %- CONS 3</b>	7,26 E-04	1,29 E-03	1,84 E-03	1,96 E-03	1,99 E-03	2,00 E-03	2,06 E-03	2,06 E-03	2,06 E-03	2,06 E-03	2,06 E-03	2,06 E-03
<b>3 %- CONS 1</b>	6,71 E-04	1,10 E-03	1,62 E-03	1,90 E-03	1,96 E-03	2,01 E-03	2,06 E-03	2,07 E-03	2,08 E-03	2,09 E-03	2,09 E-03	2,09 E-03
<b>3 %- CONS 2</b>	7,81 E-04	1,16 E-03	1,72 E-03	1,86 E-03	1,95 E-03	1,98 E-03	2,01 E-03	2,02 E-03	2,05 E-03	2,06 E-03	2,06 E-03	2,06 E-03
<b>3 %- CONS 3</b>	5,83 E-04	8,14 E-04	1,67 E-03	1,72 E-03	1,97 E-03	2,00 E-03	2,07 E-03	2,09 E-03	2,11 E-03	2,12 E-03	2,12 E-03	2,13 E-03
<b>5 %- CONS 1</b>	6,82 E-04	9,13 E-04	1,50 E-03	1,85 E-03	1,97 E-03	2,02 E-03	2,04 E-03	2,05 E-03	2,07 E-03	2,08 E-03	2,10 E-03	2,10 E-03
<b>5 %- CONS 2</b>	6,93 E-04	1,12 E-03	1,54 E-03	1,87 E-03	1,98 E-03	1,97 E-03	2,01 E-03	2,04 E-03	2,06 E-03	2,09 E-03	2,09 E-03	2,09 E-03
<b>5 %- CONS 3</b>	7,48 E-04	1,20 E-03	1,63 E-03	1,84 E-03	1,96 E-03	1,98 E-03	1,99 E-03	1,99 E-03	2,00 E-03	2,00 E-03	2,00 E-03	2,00 E-03
<b>7 %- CONS 1</b>	8,03 E-04	1,20 E-03	1,69 E-03	1,90 E-03	1,97 E-03	1,97 E-03	2,04 E-03	2,04 E-03	2,05 E-03	2,05 E-03	2,05 E-03	2,05 E-03
<b>7 %- CONS 2</b>	6,49 E-04	9,68 E-04	1,41 E-03	1,84 E-03	1,96 E-03	1,96 E-03	2,01 E-03	2,02 E-03	2,07 E-03	2,07 E-03	2,07 E-03	2,07 E-03
<b>7 %- CONS 3</b>	6,38 E-04	9,02 E-04	1,40 E-03	1,79 E-03	1,98 E-03	1,98 E-03	2,00 E-03	2,05 E-03	2,06 E-03	2,06 E-03	2,08 E-03	2,08 E-03
<b>Blanco</b>	<b>Día 05</b>	<b>Día 10</b>	<b>Día 15</b>	<b>Día 20</b>	<b>Día 25</b>	<b>Día 30</b>	<b>Día 35</b>	<b>Día 40</b>	<b>Día 45</b>	<b>Día 50</b>	<b>Día 55</b>	<b>Día 60</b>

<b>1 %-</b>	1,10	3,96	7,15	1,16	1,43	1,64	1,88	1,95	2,01	2,01	2,01	2,01
<b>BL1</b>	E-04	E-04	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>1 %-</b>	1,32	4,07	7,26	1,17	1,44	1,65	1,87	1,93	2,00	2,00	2,00	2,00
<b>BL2</b>	E-04	E-04	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>1 %-</b>	1,21	3,85	7,04	1,14	1,42	1,63	1,89	1,94	1,99	2,02	2,02	2,02
<b>BL3</b>	E-04	E-04	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>3 %-</b>	2,53	5,06	8,03	1,06	1,31	1,63	1,93	1,94	2,00	2,00	2,00	2,00
<b>BL1</b>	E-04	E-04	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>3 %-</b>	2,64	4,84	7,92	1,03	1,29	1,61	1,91	1,93	1,99	1,99	1,99	1,99
<b>BL2</b>	E-04	E-04	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>3 %-</b>	2,42	4,95	7,81	1,05	1,30	1,62	1,90	1,90	1,98	1,98	1,98	1,98
<b>BL3</b>	E-04	E-04	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>5 %-</b>	2,42	5,83	1,05	1,42	1,75	1,85	1,89	1,91	1,97	1,99	1,99	1,99
<b>BL1</b>	E-04	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>5 %-</b>	2,64	4,40	7,70	1,05	1,32	1,56	1,88	1,90	1,99	2,00	2,00	2,00
<b>BL2</b>	E-04	E-04	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>5 %-</b>	2,53	5,06	9,02	1,23	1,53	1,71	1,87	1,89	1,98	1,98	1,98	1,98
<b>BL3</b>	E-04	E-04	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>7 %-</b>	2,53	6,16	1,06	1,35	1,65	1,86	1,88	1,90	1,99	1,99	1,99	1,99
<b>BL1</b>	E-04	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>7 %-</b>	2,42	6,05	1,05	1,34	1,63	1,85	1,87	1,89	1,98	1,98	1,98	1,98
<b>BL2</b>	E-04	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03
<b>7 %-</b>	2,64	5,94	1,03	1,33	1,62	1,84	1,86	1,87	1,97	1,97	1,97	1,97
<b>BL3</b>	E-04	E-04	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03	E-03

**Anexo 8.** Datos de la Figura 7: producción acumulada de CO<sub>2</sub> (g/L), como efecto de la degradación de petróleo diésel a distintas concentraciones iniciales, por cepas y consorcio de bacterias endofíticas de *Cannabis* sp., Ayacucho 2023.

<b>MEDICIÓN DE CO<sub>2</sub> PRODUCIDO MEDIANTE TITULACIÓN ÁCIDO-BASE</b>						
<b>% - Cepa</b>	<b>Gramos de CO<sub>2</sub> producido</b>					
<b>1 %</b>	<b>Día 0</b>	<b>Día 5</b>	<b>Día 10</b>	<b>Día 15</b>	<b>Día 20</b>	<b>Día 25</b>
<b>A</b>	0,00000	0,00065	0,00100	0,00140	0,00178	0,00194
<b>B</b>	0,00000	0,00072	0,00140	0,00184	0,00194	0,00197
<b>C</b>	0,00000	0,00066	0,00122	0,00176	0,00191	0,00198
<b>D</b>	0,00000	0,00069	0,00122	0,00177	0,00194	0,00197
<b>E</b>	0,00000	0,00077	0,00129	0,00177	0,00188	0,00194
<b>F</b>	0,00000	0,00084	0,00137	0,00182	0,00191	0,00196
<b>G</b>	0,00000	0,00072	0,00089	0,00121	0,00161	0,00186
<b>Consorcio</b>	0,00000	0,00076	0,00129	0,00179	0,00194	0,00198
<b>Blanco</b>	0,00000	0,00012	0,00040	0,00072	0,00116	0,00143
<b>3 %</b>	<b>Día 0</b>	<b>Día 5</b>	<b>Día 10</b>	<b>Día 15</b>	<b>Día 20</b>	<b>Día 25</b>
<b>A</b>	0,00000	0,00063	0,00099	0,00143	0,00182	0,00194
<b>B</b>	0,00000	0,00066	0,00126	0,00179	0,00194	0,00198
<b>C</b>	0,00000	0,00066	0,00110	0,00163	0,00189	0,00199
<b>D</b>	0,00000	0,00057	0,00105	0,00176	0,00195	0,00198
<b>E</b>	0,00000	0,00064	0,00095	0,00124	0,00164	0,00187
<b>F</b>	0,00000	0,00079	0,00123	0,00172	0,00191	0,00196
<b>G</b>	0,00000	0,00048	0,00072	0,00105	0,00151	0,00184
<b>Consorcio</b>	0,00000	0,00068	0,00102	0,00167	0,00183	0,00196
<b>Blanco</b>	0,00000	0,00025	0,00050	0,00079	0,00105	0,00130
<b>5 %</b>	<b>Día 0</b>	<b>Día 5</b>	<b>Día 10</b>	<b>Día 15</b>	<b>Día 20</b>	<b>Día 25</b>
<b>A</b>	0,00000	0,00061	0,00080	0,00124	0,00167	0,00191
<b>B</b>	0,00000	0,00072	0,00126	0,00178	0,00198	0,00201
<b>C</b>	0,00000	0,00067	0,00114	0,00164	0,00191	0,00198
<b>D</b>	0,00000	0,00070	0,00115	0,00166	0,00189	0,00198
<b>E</b>	0,00000	0,00072	0,00106	0,00165	0,00193	0,00197
<b>F</b>	0,00000	0,00071	0,00124	0,00172	0,00189	0,00198
<b>G</b>	0,00000	0,00055	0,00087	0,00143	0,00187	0,00198
<b>Consorcio</b>	0,00000	0,00071	0,00108	0,00155	0,00185	0,00197
<b>Blanco</b>	0,00000	0,00025	0,00051	0,00091	0,00123	0,00153
<b>7 %</b>	<b>Día 0</b>	<b>Día 5</b>	<b>Día 10</b>	<b>Día 15</b>	<b>Día 20</b>	<b>Día 25</b>
<b>A</b>	0,00000	0,00067	0,00113	0,00152	0,00183	0,00194
<b>B</b>	0,00000	0,00073	0,00124	0,00176	0,00192	0,00199
<b>C</b>	0,00000	0,00072	0,00125	0,00177	0,00195	0,00198
<b>D</b>	0,00000	0,00066	0,00099	0,00141	0,00177	0,00195
<b>E</b>	0,00000	0,00073	0,00112	0,00165	0,00189	0,00195
<b>F</b>	0,00000	0,00062	0,00100	0,00147	0,00185	0,00195
<b>G</b>	0,00000	0,00059	0,00095	0,00135	0,00184	0,00195
<b>Consorcio</b>	0,00000	0,00070	0,00102	0,00150	0,00184	0,00197
<b>Blanco</b>	0,00000	0,00025	0,00061	0,00105	0,00134	0,00163

**Anexo 9.** Datos de la Figura 8: producción neta de CO<sub>2</sub> (g/L), como efecto de la degradación de petróleo diésel a distintas concentraciones iniciales, por cepas y consorcio de bacterias endofíticas de *Cannabis* sp., Ayacucho 2023.

<b>MEDICIÓN DE CO<sub>2</sub> PRODUCIDO MEDIANTE TITULACIÓN ÁCIDO-BASE</b>						
<b>% - Cepa</b>	<b>Gramos de CO<sub>2</sub> neto producido</b>					
<b>1 %</b>	<b>Día 0</b>	<b>Día 5</b>	<b>Día 10</b>	<b>Día 15</b>	<b>Día 20</b>	<b>Día 25</b>
<b>A</b>	0,000000	0,000528	0,000601	0,000686	0,000627	0,000506
<b>B</b>	0,000000	0,000601	0,001001	0,001129	0,000781	0,000543
<b>C</b>	0,000000	0,000539	0,000825	0,001045	0,000759	0,000550
<b>D</b>	0,000000	0,000565	0,000821	0,001056	0,000781	0,000543
<b>E</b>	0,000000	0,000649	0,000891	0,001056	0,000730	0,000506
<b>F</b>	0,000000	0,000715	0,000972	0,001104	0,000759	0,000528
<b>G</b>	0,000000	0,000594	0,000495	0,000499	0,000458	0,000433
<b>Consorcio</b>	0,000000	0,000642	0,000891	0,001071	0,000785	0,000550
<b>3 %</b>	<b>Día 0</b>	<b>Día 5</b>	<b>Día 10</b>	<b>Día 15</b>	<b>Día 20</b>	<b>Día 25</b>
<b>A</b>	0,000000	0,000381	0,000495	0,000638	0,000770	0,000638
<b>B</b>	0,000000	0,000407	0,000763	0,000997	0,000891	0,000682
<b>C</b>	0,000000	0,000403	0,000601	0,000840	0,000843	0,000693
<b>D</b>	0,000000	0,000319	0,000550	0,000968	0,000902	0,000682
<b>E</b>	0,000000	0,000389	0,000451	0,000447	0,000590	0,000568
<b>F</b>	0,000000	0,000535	0,000733	0,000924	0,000869	0,000664
<b>G</b>	0,000000	0,000224	0,000220	0,000253	0,000462	0,000539
<b>Consorcio</b>	0,000000	0,000425	0,000528	0,000876	0,000781	0,000660
<b>5 %</b>	<b>Día 0</b>	<b>Día 5</b>	<b>Día 10</b>	<b>Día 15</b>	<b>Día 20</b>	<b>Día 25</b>
<b>A</b>	0,000000	0,000356	0,000290	0,000330	0,000440	0,000381
<b>B</b>	0,000000	0,000466	0,000752	0,000876	0,000744	0,000480
<b>C</b>	0,000000	0,000418	0,000631	0,000733	0,000682	0,000447
<b>D</b>	0,000000	0,000444	0,000642	0,000759	0,000660	0,000447
<b>E</b>	0,000000	0,000462	0,000550	0,000741	0,000693	0,000436
<b>F</b>	0,000000	0,000458	0,000730	0,000814	0,000660	0,000447
<b>G</b>	0,000000	0,000293	0,000363	0,000528	0,000634	0,000447
<b>Consorcio</b>	0,000000	0,000455	0,000568	0,000649	0,000620	0,000436
<b>7 %</b>	<b>Día 0</b>	<b>Día 5</b>	<b>Día 10</b>	<b>Día 15</b>	<b>Día 20</b>	<b>Día 25</b>
<b>A</b>	0,000000	0,000422	0,000524	0,000477	0,000484	0,000304
<b>B</b>	0,000000	0,000480	0,000634	0,000715	0,000576	0,000356
<b>C</b>	0,000000	0,000466	0,000645	0,000726	0,000609	0,000348
<b>D</b>	0,000000	0,000403	0,000389	0,000363	0,000433	0,000315
<b>E</b>	0,000000	0,000480	0,000517	0,000605	0,000546	0,000315
<b>F</b>	0,000000	0,000363	0,000396	0,000429	0,000506	0,000323
<b>G</b>	0,000000	0,000341	0,000345	0,000308	0,000502	0,000323
<b>Consorcio</b>	0,000000	0,000444	0,000418	0,000455	0,000502	0,000337

**Anexo 10.** Datos de la Figura 9: porcentaje de volumen residual de petróleo diésel al día 60, como efecto de la degradación a distintas concentraciones iniciales, por cepas y consorcio de bacterias endofíticas de *Cannabis* sp., Ayacucho 2023.

ml residual de petróleo diésel												
Conc ►	1 %			3 %			5 %			7 %		
CEPA	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
A	0,0	0,0	0,0	0,6	1,4	0,7	1,6	3,2	3,3	5,5	5,5	5,0
B	0,0	0,0	0,0	1,5	0,5	0,7	2,5	2,5	3,5	5,5	5,2	5,5
C	0,0	0,0	0,0	0,4	0,5	1,0	3,2	3,5	3,4	5,5	5,0	5,8
D	0,0	0,0	0,0	0,5	1,0	0,5	3,0	3,3	3,0	5,7	5,7	5,5
E	0,0	0,0	0,0	2,0	2,1	2,3	3,5	3,0	3,8	5,8	5,8	5,6
F	0,0	0,0	0,0	1,0	0,6	0,8	3,3	2,8	3,6	5,1	5,2	5,5
G	0,0	0,0	0,0	2,0	2,0	2,0	3,9	3,7	3,1	5,7	5,5	6,0
Consortio	0,0	0,0	0,0	2,0	0,5	1,1	3,4	2,8	3,3	5,5	5,5	5,5
Blanco	0,7	0,7	0,7	2,5	2,5	2,5	4,5	4,5	4,5	6,5	6,5	6,5
	1 %			% degradación fisicoquímica			% degradación bacteriana			% no degradado		
	A			30,0			70,0			0,0		
	B			30,0			70,0			0,0		
	C			30,0			70,0			0,0		
	D			30,0			70,0			0,0		
	E			30,0			70,0			0,0		
	F			30,0			70,0			0,0		
	G			30,0			70,0			0,0		
	Consortio			30,0			70,0			0,0		
	3 %			% degradación fisicoquímica			% degradación bacteriana			% no degradado		
	A			16,7			53,3			30,0		
	B			16,7			53,3			30,0		
	C			16,7			62,2			21,1		
	D			16,7			61,1			22,2		
	E			16,7			12,2			71,1		
	F			16,7			56,7			26,7		
	G			16,7			16,7			66,7		
	Consortio			16,7			43,3			40,0		
	5 %			% degradación fisicoquímica			% degradación bacteriana			% no degradado		
	A			10,0			36,7			53,3		
	B			10,0			33,3			56,7		
	C			10,0			22,7			67,3		
	D			10,0			28,0			62,0		
	E			10,0			21,3			68,7		
	F			10,0			25,3			64,7		
	G			10,0			18,7			71,3		
	Consortio			10,0			26,7			63,3		
	7 %			% degradación fisicoquímica			% degradación bacteriana			% no degradado		
	A			7,1			16,7			76,2		
	B			7,1			15,7			77,1		
	C			7,1			15,2			77,6		
	D			7,1			12,4			80,5		
	E			7,1			11,0			81,9		
	F			7,1			17,6			75,2		
	G			7,1			11,0			81,9		
	Consortio			7,1			14,3			78,6		

**Anexo 11.** Datos de la Figura 10: ajuste cinético de primer orden  $\ln(\text{Co}/\text{C})$  en la producción neta de  $\text{CO}_2$  (g/L) hasta el día 60, como efecto de la degradación de petróleo diésel a distintas concentraciones iniciales, por cepas y consorcio de bacterias endofíticas de *Cannabis* sp., Ayacucho 2024.

Petróleo diésel al 1 % PRIMER ORDEN $\ln(\text{Co}/\text{C})$								
T día	Cepa A	Cepa B	Cepa C	Cepa D	Cepa E	Cepa F	Cepa G	Consortio
5	-1,5686	-1,6987	-1,5892	-1,6358	-1,775	-1,8718	-1,6864	-1,7636
10	-1,6987	-2,2083	-2,0149	-2,0104	-2,0919	-2,1785	-1,5041	-2,0919
15	-1,8299	-2,3289	-2,2513	-2,2618	-2,2618	-2,3059	-1,5115	-2,2756
20	-1,7405	-1,9601	-1,9315	-1,9601	-1,8921	-1,9315	-1,4271	-1,9648
25	-1,5261	-1,596	-1,6094	-1,596	-1,5261	-1,5686	-1,3695	-1,6094
30	-1,0986	-1,1527	-1,1838	-1,1314	-1,0986	-1,1421	-1,0647	-1,1939
35	-0,1823	-0,0953	-0,2364	-0,2097	0,0339	-0,1252	0,0339	-0,449
40	0,2231	0,3102	0,0339	0,0339	0,4055	0,3567	0,4568	-0,0953
45	1,0986	1,6094	0,8362	0,9163	1,3218	1,0033	1,7918	0,6931
50	1,4553	1,6094	1,0986	1,0986	1,7918	1,3218	2,0149	0,6931
55	1,4553	1,6094	1,0986	1,0986	1,7918	1,0986	2,0149	0,6931
60	1,4553	1,6094	0,9163	1,0033	1,7918	1,0986	1,7918	0,6931
Petróleo diésel al 3 % PRIMER ORDEN $\ln(\text{Co}/\text{C})$								
T día	Cepa A	Cepa B	Cepa C	Cepa D	Cepa E	Cepa F	Cepa G	Consortio
5	-1,2432	-1,3083	-1,2993	-1,2622	-1,2622	-1,5824	-0,7097	-1,3524
10	-1,5041	-1,9363	-1,6987	-1,7636	-1,411	-1,8971	-0,6931	-1,5686
15	-1,7579	-2,2046	-2,0325	-2,1748	-1,4028	-2,1282	-0,8329	-2,0753
20	-1,9459	-2,0919	-2,0369	-2,1041	-1,6802	-2,0669	-1,4351	-1,9601
25	-1,7579	-1,8245	-1,8405	-1,8245	-1,6422	-1,7973	-1,5892	-1,7918
30	-1,1314	-1,2528	-1,2622	-1,2238	-1,0647	-1,1939	-1,0415	-1,2432
35	0,2657	0,0339	0,0690	-0,1823	1,0033	-0,1252	0,5108	-0,1823
40	0,2231	-0,0953	-0,0953	-0,2877	1,0033	-0,1542	0,5108	-0,2364
45	1,0986	0,3102	0,6931	0,2657	1,0033	0,5108	1,7918	0,2231
50	0,6931	0,2657	0,568	0,0690	1,0033	0,3102	1,7918	0,1054
55	0,5108	0,1823	0,4055	0,0000	1,0033	0,2231	1,4553	0,1054
60	0,5108	0,1823	0,3567	-0,0645	1,0033	0,1054	1,2040	0,0690
Petróleo diésel al 5 % PRIMER ORDEN $\ln(\text{Co}/\text{C})$								
T día	Cepa A	Cepa B	Cepa C	Cepa D	Cepa E	Cepa F	Cepa G	Consortio
5	-1,1735	-1,443	-1,335	-1,3946	-1,4351	-1,4271	-0,9808	-1,4191
10	-0,9683	-1,9218	-1,7463	-1,7636	-1,6094	-1,8921	-1,1939	-1,6422
15	-1,0986	-2,0753	-1,8971	-1,9315	-1,9071	-2,0015	-1,5686	-1,775
20	-1,3863	-1,912	-1,8245	-1,7918	-1,8405	-1,7918	-1,7521	-1,7287
25	-1,2432	-1,474	-1,4028	-1,4028	-1,3779	-1,4028	-1,4028	-1,3779
30	-0,8615	-1,0415	-0,9933	-1,0296	-0,9555	-0,9933	-1,0296	-0,9555
35	-0,0953	-0,2364	-0,2624	-0,3124	-0,1542	-0,3365	-0,3365	-0,1823
40	-0,0953	-0,2624	-0,1823	-0,4055	-0,1823	-0,2624	-0,2624	-0,0953
45	0,568	0,3102	0,5108	0,1054	0,3567	0,2231	0,4055	0,568
50	0,5108	0,4055	0,5108	0,0000	0,3567	0,2657	0,3102	0,5108
55	0,3567	0,3567	0,3567	0,0000	0,3567	0,2231	0,3102	0,4055
60	0,2657	0,3567	0,2231	-0,0953	0,3567	0,1054	0,3102	0,4055
Petróleo diésel 7 % PRIMER ORDEN $\ln(\text{Co}/\text{C})$								
T día	Cepa A	Cepa B	Cepa C	Cepa D	Cepa E	Cepa F	Cepa G	Consortio
5	-1,3437	-1,474	-1,443	-1,2993	-1,474	-1,1939	-1,1314	-1,3946
10	-1,5616	-1,7521	-1,7693	-1,2622	-1,5476	-1,2809	-1,1421	-1,335
15	-1,4663	-1,8718	-1,8871	-1,1939	-1,7047	-1,361	-1,0296	-1,4191
20	-1,4816	-1,655	-1,7108	-1,3695	-1,6027	-1,5261	-1,5188	-1,5188
25	-1,0176	-1,1735	-1,1527	-1,0531	-1,0531	-1,0761	-1,0761	-1,1206
30	-0,1542	-0,3365	-0,2624	-0,1542	-0,2097	-0,2877	-0,2364	-0,0953
35	-0,0953	-0,2624	-0,1823	-0,2624	-0,4055	-0,2624	-0,1823	-0,2877
40	-0,1542	-0,2097	-0,1823	-0,2097	-0,383	-0,2624	-0,1542	-0,2877
45	0,9163	0,568	0,568	0,6286	0,4055	0,6286	0,8362	0,3567
50	0,9163	0,3567	0,5108	0,5108	0,2657	0,3567	0,6931	0,3567
55	0,6931	0,3102	0,4055	0,4055	0,1823	0,3567	0,6931	0,2657
60	0,568	0,2657	0,3567	0,4055	0,1054	0,3567	0,5108	0,2657

**Anexo 12.** Comparación de los índices de ajuste ( $R^2$ ) de modelos cinéticos de orden cero, primer orden y segundo orden en la degradación de petróleo diésel por cepas y consorcio de bacterias endofíticas de *Cannabis* sp., Ayacucho 2024.

Conc ►	1 % petróleo diésel			3 % petróleo diésel			5 % petróleo diésel			7 % petróleo diésel		
	orden cero [A]	1er orden ln(Co/C)	2do orden 1/[A]	orden cero [A]	1er orden ln(Co/C)	2do orden 1/[A]	orden cero [A]	1er orden ln(Co/C)	2do orden 1/[A]	orden cero [A]	1er orden ln(Co/C)	2do orden 1/[A]
<b>Cepa A</b>	0,8401	0,8925	0,8032	0,6107	0,7253	0,6361	0,7315	0,7847	0,7453	0,8194	0,8615	0,7447
<b>Cepa B</b>	0,7582	0,8857	0,7743	0,6153	0,7435	0,7864	0,7246	0,8537	0,8610	0,7595	0,8494	0,8028
<b>Cepa C</b>	0,7462	0,8744	0,8019	0,6171	0,7465	0,7350	0,7274	0,8218	0,7737	0,7401	0,8492	0,8282
<b>Cepa D</b>	0,7516	0,8817	0,8134	0,5693	0,7056	0,7275	0,7262	0,8154	0,8169	0,8347	0,8618	0,7981
<b>Cepa E</b>	0,7943	0,9103	0,7949	0,6723	0,7441	0,7562	0,7347	0,8513	0,8643	0,7769	0,8340	0,7868
<b>Cepa F</b>	0,8012	0,8988	0,8069	0,7029	0,7879	0,7447	0,7405	0,8479	0,8440	0,7611	0,8328	0,7752
<b>Cepa G</b>	0,9077	0,8852	0,7409	0,4292	0,6732	0,6109	0,5921	0,7483	0,7843	0,7214	0,8216	0,7536
<b>Conсор.</b>	0,7867	0,8910	0,8311	0,6087	0,7464	0,7932	0,7879	0,8551	0,8730	0,7962	0,8469	0,8398

*Nota.* Los valores expresados corresponden al coeficiente de determinación obtenido al ajustar la producción acumulativa de CO<sub>2</sub> a tres modelos cinéticos: orden cero, primer orden (ln(C<sub>0</sub>/C)) y segundo orden (1/[A]), en diferentes concentraciones de diésel (1, 3, 5 y 7 %).

**Anexo 13.** Prueba de normalidad y homogeneidad de los datos de producción neta de CO<sub>2</sub> (g/L) por día, como efecto de la degradación de petróleo diésel a distintas concentraciones iniciales, por cepas y consorcio de bacterias endofíticas de *Cannabis* sp., Ayacucho 2024.

<b>PRODUCCIÓN NETA DE CO<sub>2</sub></b>		
<b>PRUEBA DE DISTRIBUCIÓN NORMAL Y HOMOGENEIDAD DE VARIANZA</b>		
<b>DÍA</b>	<b>PRUEBA DE KOLMOGOROV – SMIRNOV (p-valor)</b>	<b>PRUEBA DE LEVENE (p-valor)</b>
<b>05</b>	0,4179	0,9437
<b>10</b>	0,5097	0,9982
<b>15</b>	0,2262	0,8118
<b>20</b>	0,2593	0,05246

*Nota.* Los resultados de la prueba de Kolmogorov–Smirnov indican que los datos siguen una distribución normal en cada uno de los días evaluados. Asimismo, la prueba de Levene muestra que las varianzas son homogéneas en todos los casos ( $p > 0,05$ ), lo que sugiere que la dispersión de los datos es consistente entre los diferentes grupos evaluados.

**Anexo 14.** Prueba de diferencia significativa ANOVA en la producción neta de CO<sub>2</sub> (g/L) por día, como efecto de la degradación de petróleo diésel a distintas concentraciones iniciales, por cepas y consorcio de bacterias endofíticas de *Cannabis* sp., Ayacucho 2024.

<b>PRUEBA DE ANOVA (p-valor)</b>				
<b>CONCENTRACIÓN DE PETRÓLEO DIÉSEL</b>				
<b>DÍA</b>	<b>1 %</b>	<b>3 %</b>	<b>5 %</b>	<b>7 %</b>
<b>05</b>	0,00282	0,00855	0,0018	0,109*
<b>10</b>	2,31e-06	0,00114	0,00856	0,0458
<b>15</b>	4,15e-08	3,67e-06	0,0967*	0,000977
<b>20</b>	3,83e-06	5,11e-08	0,848*	0,0202

*Nota.* Los valores marcados con \* indican que no se encontraron diferencias significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre los grupos comparados en esa concentración de petróleo diésel. Los demás valores ( $p < 0,05$ ) reflejaron diferencias estadísticamente significativas según el ANOVA.

**Anexo 15.** Prueba de normalidad y homogeneidad de los datos de porcentaje de ml residual de petróleo diésel al día 60, como efecto de la degradación a distintas concentraciones iniciales, por cepas y consorcio de bacterias endofíticas de *Cannabis* sp., Ayacucho 2024.

<b>PORCENTAJE DE MILÍTRO RESIDUAL</b>		
<b>PRUEBA DE DISTRIBUCIÓN NORMAL Y HOMOGENEIDAD DE VARIANZA</b>		
<b>DÍA</b>	<b>PRUEBA DE KOLMOGOROV – SMIRNOV (p-valor)</b>	<b>PRUEBA DE LEVENE (p-valor)</b>
<b>60</b>	0,05141	0,3646

*Nota.* Los resultados indican que, a día 60, la distribución de los datos se aproximó a la normalidad (Kolmogorov–Smirnov) y se cumplió la homogeneidad de varianza (Levene) con un  $p > 0,05$ .

**Anexo 16.** Prueba de diferencia significancia ANOVA de los datos de porcentaje de ml residual de petróleo diésel al día 60, como efecto de la degradación a distintas concentraciones iniciales, por cepas y consorcio de bacterias endofíticas de la raíz de *Cannabis* sp., Ayacucho 2024.

<b>PRUEBA DE ANOVA (p-valor)</b>				
<b>CONCENTRACIÓN DE PETRÓLEO DIÉSEL</b>				
<b>DÍA</b>	<b>1 %</b>	<b>3 %</b>	<b>5 %</b>	<b>7 %</b>
<b>60</b>	<2e-16	5,91e-07	4,98e-05	3,56e-07

*Nota.* Los valores de p obtenidos mediante ANOVA indican diferencias altamente significativas ( $p < 0,001$ ) entre los tratamientos para cada concentración evaluada. Los resultados confirman que, a pesar de algunas variaciones en la producción residual de petróleo diésel, existen diferencias significativas en la degradación según el tratamiento aplicado.

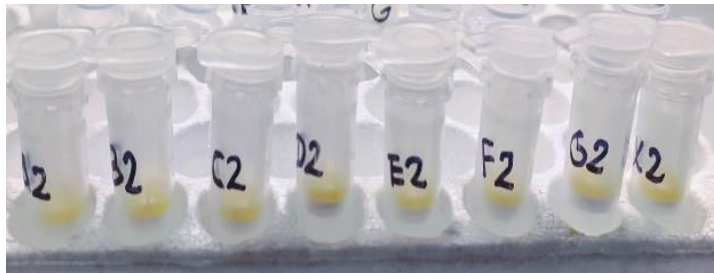
**Anexo 17.** Extracción, purificación y análisis de pureza de ADN genómico de bacterias aisladas de la raíz de *Cannabis* sp., Laboratorio de Inmunología y Microbiología Clínica, Ayacucho 2024.



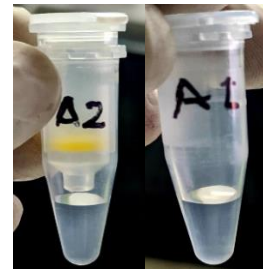
Extracción y purificación de ADN



Rejuvenecimiento de las cepas en caldo nutritivo



Columnas con filtros para la extracción y purificación de ADN



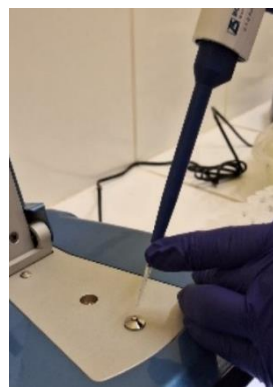
ADN purificado



Análisis de pureza del ADN

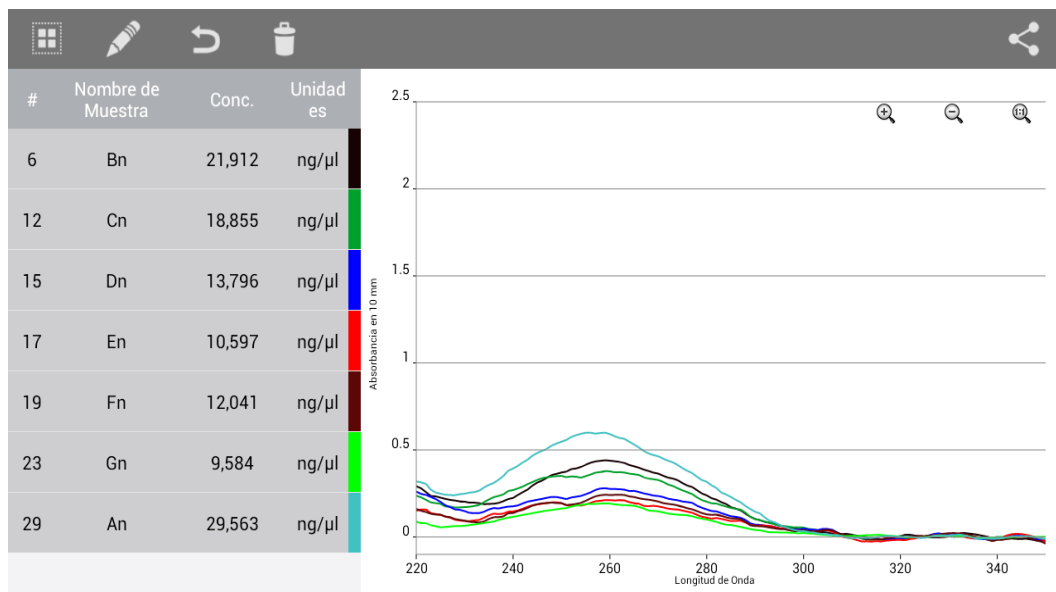


Espectrofotómetro UV Vis-fluorómetro DeNovix DS-11



Pipeteo del ADN

**Anexo 18.** Resultados de la pureza de ADN (longitud de onda vs absorbancia en 10 mm) mediante espectrofotometría UV-Vis/fluorómetro DeNovix DS-11 de las bacterias endofíticas aisladas de *Cannabis* sp., Ayacucho 2024.



**Datos de la pureza de ADN.**

Cepa	[ ] ng/μL	λ 230	λ 260	λ 280	λ 340	λ 260/280	λ 260/230
<b>A</b>	29,563	0,249	0,5913	0,317	- 0,009	1,87	2,38
<b>B</b>	21,912	0,203	0,4382	0,239	- 0,005	1,84	2,16
<b>C</b>	18,855*	0,172	0,3771	0,203	- 0,001	1,86	2,20
<b>D</b>	13,796*	0,148	0,2759	0,158	- 0,010	1,75	1,86
<b>E</b>	10,597*	0,092	0,2119	0,111	- 0,009	1,91	2,31
<b>F</b>	12,041*	0,094	0,2408	0,130	- 0,017	1,86	2,57
<b>G</b>	9,584*	0,064	0,1917	0,100	- 0,006	1,91	2,97

Nota. [ ]: concentración, λ: absorbancia, \* debajo de la concentración mínima.

**Anexo 19.** Resultado de la evaluación de la integridad del ADN purificado de bacterias endofíticas aisladas de *Cannabis* sp. por electroforesis Gelato minipcr, Laboratorio de Inmunología y Microbiología Clínica Ayacucho 2024.



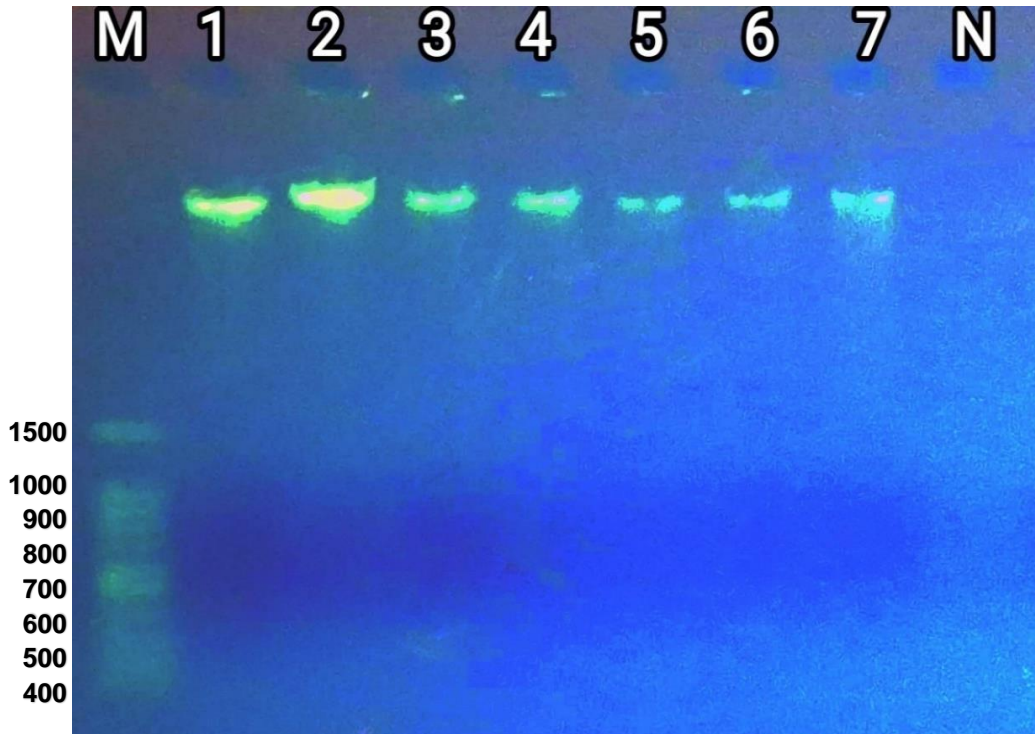
Pipeteo de las muestras de ADN en cada pocillo



Gel de agarosa al 0,8 % con los peines



Equipo Gelato minipcr



*Nota.* Se empleó un gel de agarosa al 0,8 % corrido a 75V por 20 min. Carril M: Ladder de 100 bp; carriles 1 a 7: cepas A, B, C, D, E, F y G; carril N: Control negativo.

**Anexo 20.** Reporte de longitud y calidad promedio de lecturas, *NanoPlot*, del secuenciamiento con *Flongle* (Oxford Nanopore) bacterias endofíticas aisladas de *Cannabis* sp., Laboratorio de Inmunología y Microbiología Clínica, Ayacucho 2024.



Flongle Flow cell R10.4.1



Adaptador Flongle y MinION MKB1



Primado y cargado de la celda de flujo Flongle

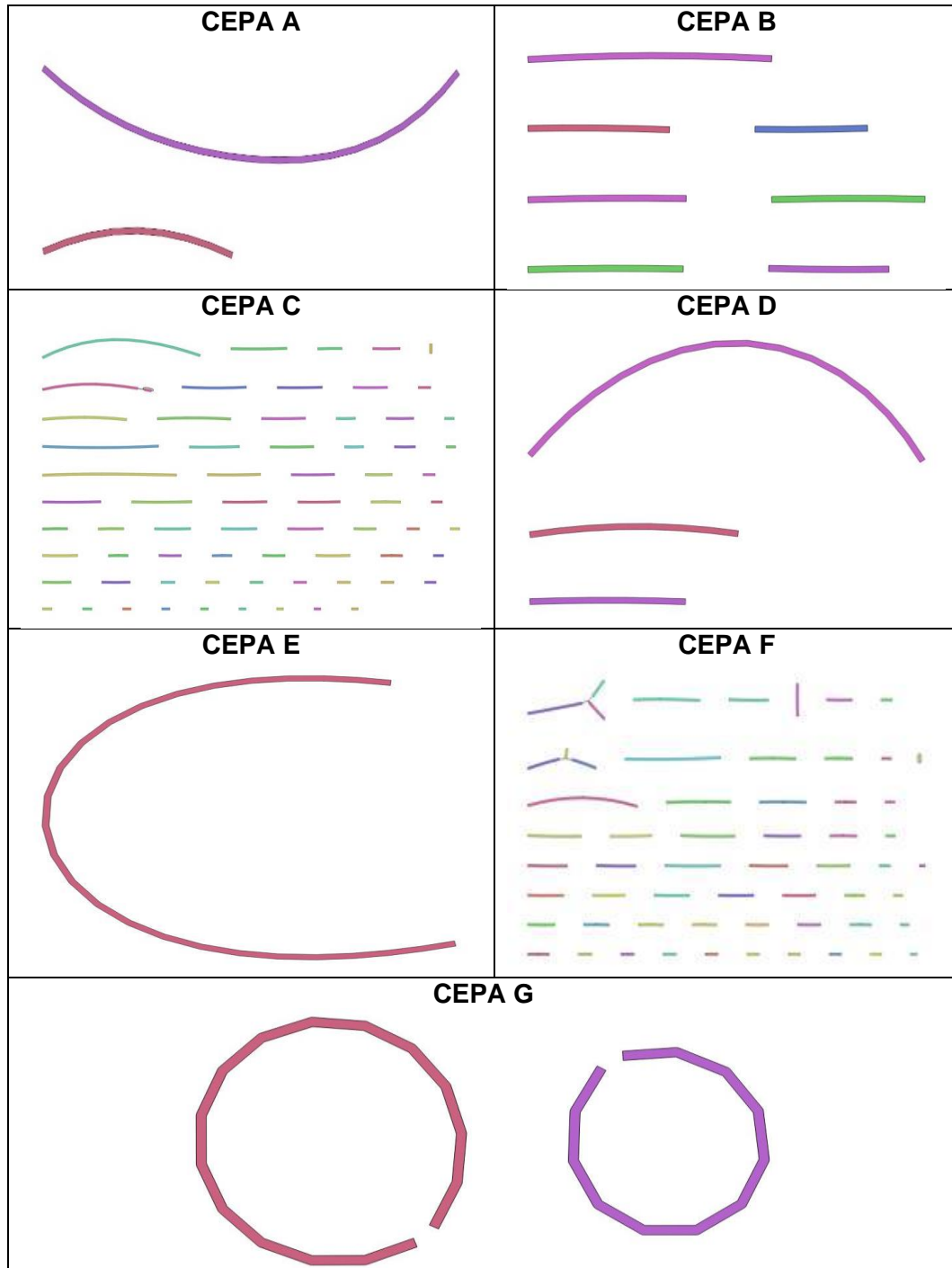


#### Resumen estadístico

Medida	Valor
Número de lecturas	9 076
Número de bases	50 361 271,0
Longitud de lectura media	3 181,5
Longitud media de lectura	5 548,8
Desv. estand. de la longitud de lectura	6 655,5
n50	10 773,0
Lecturas > Q10	4 174 (46,0 %) 30,7 Mb
Lecturas > Q15	59 (0,7 %) 0,6 Mb

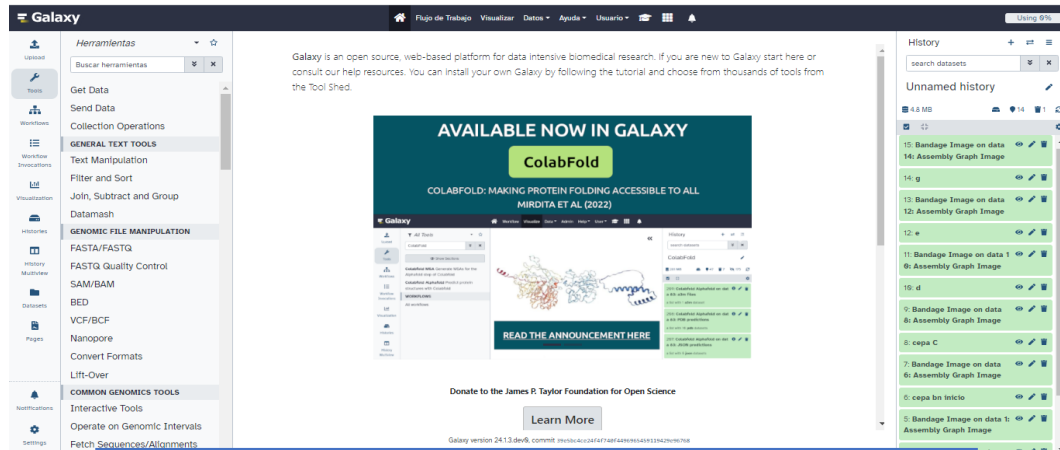
*Nota.* Se utilizó *NanoPlot* para analizar la relación entre la longitud de lectura y la calidad promedio de las secuencias, representando la distribución de lecturas en función de su longitud (eje x) y calidad (eje y). Las métricas n50 y los valores de Q (calidad) permiten evaluar la confiabilidad de las secuencias generadas.

**Anexo 21.** Visualización de *contigs* generados tras el ensamblaje del ADN de siete cepas endofíticas aisladas de *Cannabis* sp. con *Flye* y representados con *Bandage*, Ayacucho 2024.

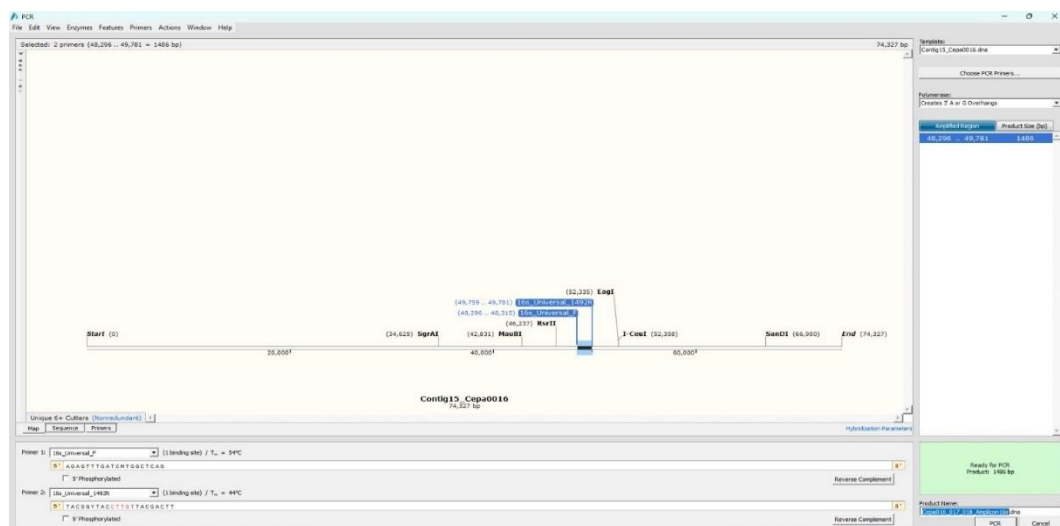


*Nota.* Los colores representan diferentes segmentos del ensamblaje reflejando variaciones en cobertura, estructuras o regiones no resueltas, mientras que las formas reflejan la continuidad y organización del genoma. Los *contigs* más largos y curvos sugieren posibles replicones completos, mientras que los más fragmentados pueden indicar regiones menos cubiertas o estructuralmente complejas.

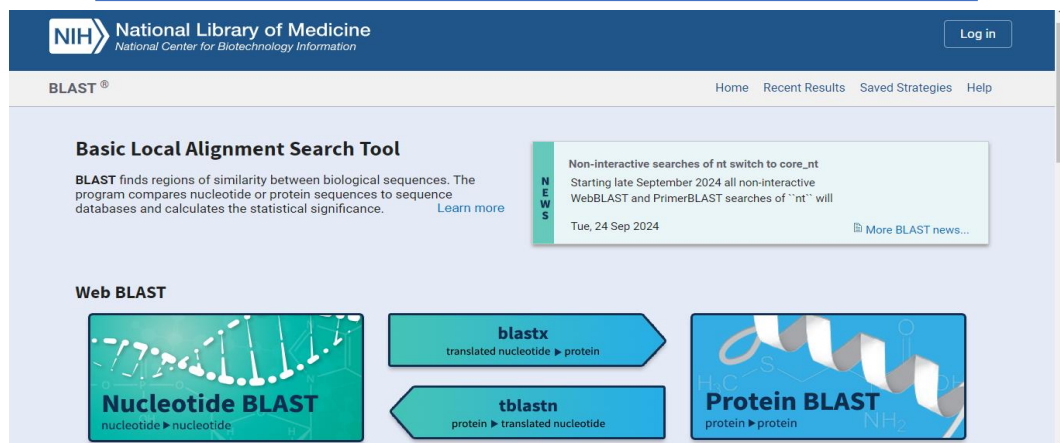
**Anexo 22.** Herramientas bioinformáticas utilizadas en la ubicación taxonómica *in silico* de las siete cepas bacterianas aisladas de la raíz de *Cannabis* sp. mediante Galaxy, SnapGene y NCBI BLAST, Ayacucho 2024.



Ventana de la plataforma Galaxy de código abierto.



Ventana del software SnapGene para el PCR *in silico* (16S).



Ventana de la plataforma de código abierto NCBI para el BLAST.

**Anexo 23.** Ubicación taxonómica de la cepa A aislada de *Cannabis* sp. mediante análisis bioinformático con Kraken2 (genoma total) y NCBI BLAST (región 16S ARNr), Ayacucho 2024.

Kraken2					
3,55	29	29	U	0	unclassified
96,45	789	2	R	1	root
96,21	787	0	R1	131 567	cellular organisms
96,21	787	0	D	2	Bacteria
96,09	786	1	P	1 224	Proteobacteria
95,97	785	2	C	1 236	Gammaproteobacteria
94,87	776	0	O	72 274	Pseudomonadales
94,87	776	0	F	135 621	Pseudomonadaceae
94,87	776	38	G	286	<i>Pseudomonas</i>
48,17	394	2	G1	136 841	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> group
44,87	367	367	S	53 408	<i>Pseudomonas citronellolis</i>

NCBI BLAST				
Descripción	Nombre Científico	Query Cover	E value	Per. Ident
<i>Pseudomonas citronellolis</i> strain G5.80 chromosome, complete genome	<i>Pseudomonas citronellolis</i>	100 %	1e-160	96,82 %
<i>Pseudomonas citronellolis</i> strain C12 chromosome, complete genome	<i>Pseudomonas citronellolis</i>	100 %	1e-160	96,82 %

*Nota.* Kraken2 analizó el conjunto completo de lecturas obtenidas en el secuenciamiento, clasificando el 94,87 % de las lecturas dentro del género *Pseudomonas*, con una alta asignación a *Pseudomonas citronellolis* (44,87 %). El análisis con NCBI BLAST, basado en la región 16S RNAr amplificada, confirmó la identificación de *Pseudomonas citronellolis* con un 100 % de cobertura de consulta y 96,82 % de identidad. La combinación de estos métodos refuerza la ubicación taxonómica de la Cepa A dentro de esta especie.

**Anexo 24.** Ubicación taxonómica de la cepa B aislada de *Cannabis* sp. mediante análisis bioinformático con Kraken2 (genoma total) y NCBI BLAST (región 16S ARNr), Ayacucho 2024.

<b>Kraken2</b>				
Bacteria				722
Bacteria_Proteobacteria				720
Bacteria_Proteobacteria_Gammaproteobacteria				720
Bacteria_Proteobacteria_Gammaproteobacteria_Moraxellales				706
Proteobacteria_Gammaproteobacteria_Moraxellales_Moraxellaceae				706
Gammaproteobacteria_Moraxellales_Moraxellaceae_Acinetobacter				706
Moraxellaceae_Acinetobacter_Acinetobacter calcoaceticus				423
Moraxellaceae_Acinetobacter_Acinetobacter pittii				80
Moraxellaceae_Acinetobacter_Acinetobacter baumannii				61
Moraxellaceae_Acinetobacter_Acinetobacter seifertii				38
Moraxellaceae_Acinetobacter_Acinetobacter lactucae				16
Moraxellaceae_Acinetobacter_Acinetobacter nosocomialis				4
Moraxellaceae_Acinetobacter_Acinetobacter oleivorans				63
<b>NCBI BLAST</b>				
<b><i>Acinetobacter calcoaceticus/baumannii</i> complex</b>				
Descripción	Nombre Científico	Query Cover	E value	Per. Ident
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> strain ATCC 23055 16S ribosomal RNA, partial sequence	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	100 %	0,0	86,53 %
<i>Acinetobacter lactucae</i> isolate QL-1 chromosome, complete genome	<i>Acinetobacter lactucae</i>	100 %	0,0	86,27 %
<i>Acinetobacter pittii</i> strain XJ88 chromosome, complete genome	<i>Acinetobacter pittii</i>	100 %	0,0	86,02 %
<i>Acinetobacter oleivorans</i> strain r303 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Acinetobacter oleivorans</i>	100 %	0,0	85,91 %
<i>Acinetobacter seifertii</i> strain AS23 chromosome, complete genome	<i>Acinetobacter seifertii</i>	100 %	0,0	85,61 %
<i>Acinetobacter nosocomialis</i> strain 2014S01-097 chromosome, complete genome	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	100 %	0,0	85,48 %

*Nota.* Kraken2 analizó el conjunto completo de lecturas obtenidas en el secuenciamiento, clasificando el 97,78 % de las lecturas dentro de la familia Moraxellaceae, con una asignación predominante al género *Acinetobacter*. La especie con mayor representación fue *Acinetobacter calcoaceticus* (58,65 %), seguida de otras especies del *Acinetobacter calcoaceticus/baumannii* complex. El análisis con NCBI BLAST, basado en la región 16S rRNA confirmó la identificación de *Acinetobacter calcoaceticus*, con un 100 % de cobertura de consulta y una identidad del 86,53 %, además de otras especies relacionadas con una identidad superior al 85 %. La combinación de estos métodos refuerza la ubicación taxonómica de la Cepa B dentro de dicho complejo bacteriano.

**Anexo 25.** Ubicación taxonómica de la cepa C aislada de *Cannabis* sp mediante análisis bioinformático con Kraken2 (genoma total) y NCBI BLAST (región 16S ARNr), Ayacucho 2024.

Kraken2					
2,57	96	96	U	0	unclassified
97,43	3 639	6	R	1	root
97,19	3 630	0	R1	131 567	cellular organisms
97,11	3 627	0	D	2	Bacteria
97,03	3 624	1	P	1 224	Proteobacteria
96,92	3 620	12	C	1 236	Gammaproteobacteria
94,59	3 533	0	O	72 274	Pseudomonadales
94,59	3 533	2	F	135 621	Pseudomonadaceae
94,54	3 531	89	G	286	<i>Pseudomonas</i>
89,96	3 360	26	G1	136 845	<i>Pseudomonas putida</i> group
88,43	3 303	1 773	S	303	<i>Pseudomonas putida</i>

NCBI BLAST				
Descripción	Nombre Científico	Query Cover	E value	Per. Ident
<i>Pseudomonas putida</i> NBRC 14164 DNA, complete genome	<i>Pseudomonas putida</i> NBRC 14164	100 %	7e-163	97,12 %
<i>Pseudomonas putida</i> strain L1-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Pseudomonas putida</i>	100 %	7e-163	97,12 %

*Nota.* Kraken2 analizó el conjunto completo de lecturas obtenidas en el secuenciamiento, clasificando el 94,54 % dentro del género *Pseudomonas*, con una alta asignación a *Pseudomonas putida* (88,43 %). El análisis con NCBI BLAST, basado en la región 16S ARNr amplificada, confirmó la identificación de *Pseudomonas putida* con un 100 % de cobertura de consulta y 97,12 % de identidad. La combinación de estos métodos refuerza la ubicación taxonómica de la Cepa C dentro de esta especie.

**Anexo 26.** Ubicación taxonómica de la cepa D aislada de *Cannabis* sp mediante análisis bioinformático con Kraken2 (genoma total) y NCBI BLAST (región 16S ARNr), Ayacucho 2024.

<b>Kraken2</b>				
Bacteria				444
Bacteria_Proteobacteria				443
Bacteria_Proteobacteria_Gammaproteobacteria				443
Bacteria_Proteobacteria_Gammaproteobacteria_Moraxellales				440
Proteobacteria_Gammaproteobacteria_Moraxellales_Moraxellaceae				440
Moraxellales_Moraxellaceae_Acinetobacter				440
Moraxellaceae_Acinetobacter_Acinetobacter calcoaceticus				248
Moraxellaceae_Acinetobacter_Acinetobacter pittii				51
Moraxellaceae_Acinetobacter_Acinetobacter baumannii				34
Moraxellaceae_Acinetobacter_Acinetobacter seifertii				17
Moraxellaceae_Acinetobacter_Acinetobacter lactucae				13
Moraxellaceae_Acinetobacter_Acinetobacter nosocomialis				2
Moraxellaceae_Acinetobacter_Acinetobacter oleivorans				54
<b>NCBI BLAST</b>				
<b><i>Acinetobacter calcoaceticus/baumannii</i> complex</b>				
Descripción	Nombre Científico	Query Cover	E value	Per. Ident
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> strain NCIMB13260 chromosome, complete genome	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	99 %	0,0	90,26 %
<i>Acinetobacter lactucae</i> QL-1 chromosome, complete genome	<i>Acinetobacter lactucae</i>	99 %	0,0	88,00 %
<i>Acinetobacter pittii</i> PHEA-2 chromosome, complete genome	<i>Acinetobacter pittii</i> PHEA-2	98 %	0,0	87,97 %
<i>Acinetobacter baumannii</i> strain SHOU-Ab01 chromosome, complete genome	<i>Acinetobacter baumannii</i>	99 %	0,0	87,06 %
<i>Acinetobacter seifertii</i> strain AS79 chromosome, complete genome	<i>Acinetobacter seifertii</i>	90 %	0,0	86,08 %
<i>Acinetobacter nosocomialis</i> M2 chromosome, complete genome	<i>Acinetobacter nosocomialis</i> M2	97 %	0,0	84,34 %

*Nota.* Kraken2 analizó el conjunto completo de lecturas obtenidas en el secuenciamiento, clasificando la mayoría de las lecturas dentro de la familia Moraxellaceae, con una asignación predominante al género *Acinetobacter*. La especie con mayor representación fue *Acinetobacter calcoaceticus* (56,36 %), seguida de otras especies del *Acinetobacter calcoaceticus/baumannii* complex. El análisis con NCBI BLAST, basado en la región 16S rRNA confirmó la identificación de *Acinetobacter calcoaceticus*, con un 99 % de cobertura de consulta y una identidad del 90,26 %, además de otras especies relacionadas con una identidad superior al 84 %. La combinación de estos métodos refuerza la ubicación taxonómica de la Cepa B dentro de dicho complejo bacteriano.

**Anexo 27.** Ubicación taxonómica de la cepa E aislada de *Cannabis* sp. mediante análisis bioinformático con Kraken2 (genoma total) y NCBI BLAST (región 16S ARNr), Ayacucho 2024.

<b>Kraken2</b>				
Bacteria				212
Bacteria_Proteobacteria				212
Bacteria_Proteobacteria_Gammaproteobacteria				212
Bacteria_Proteobacteria_Gammaproteobacteria_Pseudomonadales				203
Gammaproteobacteria_Pseudomonadales_Pseudomonadaceae				203
Pseudomonadales_Pseudomonadaceae_Pseudomonas				203
Pseudomonadaceae_Pseudomonas_Pseudomonas sp. FDAARGOS_380				98

<b>NCBI BLAST</b>				
<b>Descripción</b>	<b>Nombre Científico</b>	<b>Query Cover</b>	<b>E value</b>	<b>Per. Ident</b>
<i>Pseudomonas</i> sp. FP215 chromosome, complete genome	<i>Pseudomonas</i> sp. FP215	100 %	0,0	96,31 %
<i>Pseudomonas salmasensis</i> strain POE54 chromosome, complete genome	<i>Pseudomonas salmasensis</i>	100 %	0,0	95,51 %
<i>Pseudomonas salmasensis</i> strain SWRI126 chromosome, complete genome	<i>Pseudomonas salmasensis</i>	100 %	0,0	95,08 %
<i>Pseudomonas</i> sp. FJ2-5-13 chromosome, complete genome	<i>Pseudomonas</i> sp. FJ2-5-13	100 %	0,0	94,11 %
<i>Pseudomonas</i> sp. FDAARGOS_380 chromosome, complete genome	<i>Pseudomonas</i> sp. FDAARGOS_380	100 %	0,0	93,80 %

*Nota.* Kraken2 analizó el conjunto completo de lecturas obtenidas en el secuenciamiento, clasificando el 95,75 % dentro del género *Pseudomonas*, con una alta asignación a *Pseudomonas* sp. FDAARGOS\_380 (46,23 %). El análisis con NCBI BLAST, basado en la región 16S ARNr amplificada, reveló como mejor coincidencia a *Pseudomonas* sp. FP215 con un 100 % de cobertura de consulta y 96,31 % de identidad, seguido de otras coincidencias con *Pseudomonas salmasensis*. La combinación de estos métodos confirma que la Cepa E pertenece al género *Pseudomonas*, aunque las discrepancias observadas sugieren la necesidad de estudios adicionales para precisar su ubicación a nivel de especie.

**Anexo 28.** Ubicación taxonómica de la cepa F aislada de *Cannabis* sp. mediante análisis bioinformático con Kraken2 (genoma total) y NCBI BLAST (región 16S ARNr), Ayacucho 2024.

<b>Kraken2</b>				
Bacteria				58
Bacteria_Proteobacteria				58
Bacteria_Proteobacteria_Gammaproteobacteria				58
Bacteria_Proteobacteria_Gammaproteobacteria_Moraxellales				58
Proteobacteria_Gammaproteobacteria_Moraxellales_Moraxellaceae				58
Gammaproteobacteria_Moraxellales_Moraxellaceae_Acinetobacter				58
Moraxellaceae_Acinetobacter_Acinetobacter calcoaceticus				45
Moraxellaceae g__Acinetobacter s__Acinetobacter pittii				4
Moraxellaceae g__Acinetobacter s__Acinetobacter seifertii				3
Moraxellaceae g__Acinetobacter s__Acinetobacter baumannii				2
<b>NCBI BLAST</b>				
Descripción	Nombre Científico	Query Cover	E value	Per. Ident
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> strain ARu19 chromosome, complete genome	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	100 %	0,0	95,68 %
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> strain NCIMB13260 chromosome, complete genome	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	100 %	0,0	95,55 %
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> strain ATCC 23055 16S ribosomal RNA, partial sequence	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	100 %	0,0	95,55 %
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> strain UTMR2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	100 %	0,0	95,55 %

*Nota.* Kraken2 analizó el conjunto completo de lecturas obtenidas en el secuenciamiento, clasificando el 100 % dentro del género *Acinetobacter*, con una alta asignación a *Acinetobacter calcoaceticus* (77,6 %). El análisis con NCBI BLAST, basado en la región 16S ARNr amplificada, confirmó la identificación de *Acinetobacter calcoaceticus* con un 100 % de cobertura de consulta y 95,68 % de identidad. La combinación de estos métodos refuerza la ubicación taxonómica de la Cepa C dentro de esta especie.

**Anexo 29.** Ubicación taxonómica de la cepa G aislada de *Cannabis* sp. mediante análisis bioinformático con Kraken2 (genoma total) y NCBI BLAST (región 16S ARNr), Ayacucho 2024.

<b>Kraken2</b>				
Bacteria				517
Bacteria_Proteobacteria				514
Bacteria_Proteobacteria_Gammaproteobacteria				514
Bacteria_Proteobacteria_Gammaproteobacteria_Moraxellales				496
Proteobacteria_Gammaproteobacteria_Moraxellales_Moraxellaceae				496
Gammaproteobacteria_Moraxellales_Moraxellaceae_Acinetobacter				496
Gammaproteobacteria_Moraxellales_Moraxellaceae_Acinetobacter_ <i>Acinetobacter schindleri</i>				423
<b>NCBI BLAST</b>				
Descripción	Nombre Científico	Query Cover	E value	Per. Ident
<i>Acinetobacter schindleri</i> strain BDT2091 chromosome, complete genome	<i>Acinetobacter schindleri</i>	100 %	0,0	90,08 %
<i>Acinetobacter schindleri</i> strain HZE30-1 chromosome, complete genome	<i>Acinetobacter schindleri</i>	100 %	0,0	89,95 %

*Nota.* Kraken2 analizó el conjunto completo de lecturas obtenidas en el secuenciamiento, clasificando el 100 % dentro del género *Acinetobacter*, con una alta asignación a *Acinetobacter schindleri* (81,7 %). El análisis con NCBI BLAST, basado en la región 16S ARNr amplificada, confirmó la identificación de *Acinetobacter schindleri* con un 100 % de cobertura de consulta y 90,08 % de identidad. La combinación de estos métodos refuerza la ubicación taxonómica de la Cepa C dentro de esta especie.

## Anexo 30. Decreto supremo N° 018-2022-EM sobre la comercialización de petróleo diésel ultra bajo en azufre, El Peruano.

62

NORMAS LEGALES

Viernes 30 de diciembre de 2022 /  El Peruano

N° 1252, Decreto Legislativo que crea el Sistema Nacional de Programación Multianual y Gestión de Inversiones, aprobado por el Decreto Supremo N° 284-2018-EF y su modificatoria; el Reglamento que establece disposiciones relativas a la publicidad, publicación de Proyectos Normativos y Difusión de Normas Legales de Carácter General, aprobado por Decreto Supremo N° 001-2009-JUS, el Decreto Supremo que aprueba el Reglamento de la Ley Marco para la Producción y Sistematización Legislativa, aprobado por Decreto Supremo N° 007-2022-JUS, el Reglamento de Organización y Funciones del Ministerio de Educación, aprobado por el Decreto Supremo N° 001-2015-MINEDU y la Resolución de Secretaría General N° 090-2020-MINEDU;

SE RESUELVE:

**Artículo 1.-** Disponer la publicación del proyecto de Norma Técnica "Criterios de Diseño para Institutos y Escuelas de Educación Superior Tecnológica, y Centros de Educación Técnico-Productiva", que modifica la Norma Técnica denominada "Criterios de Diseño para Institutos y Escuelas de Educación Superior Tecnológica" aprobada por Resolución Viceministerial N° 140-2021-MINEDU, asimismo su exposición de motivos y la descripción de los temas que involucra dicho proyecto normativo, que como Anexo I forman parte de la presente Resolución, en el portal institucional del Ministerio de Educación ([www.gob.pe/minedu](http://www.gob.pe/minedu)).

**Artículo 2.-** Establecer el plazo de quince (15) días hábiles, contados a partir del día siguiente de la publicación de la presente Resolución, para recibir las sugerencias y aportes de las entidades públicas y privadas, y de la ciudadanía en general.

**Artículo 3.-** Los comentarios al proyecto normativo se realizan a través del "Formato de Observaciones, Consultas y/o Recomendaciones" que, como Anexo II forma parte de la presente resolución, a las direcciones electrónicas: [DINOR01@minedu.gob.pe](mailto:DINOR01@minedu.gob.pe) y/o [ELEON@minedu.gob.pe](mailto:ELEON@minedu.gob.pe), de la arquitecta Pamela Claudia Jara Acosta y la abogada Elizabeth Diana León Salazar, respectivamente.

**Artículo 4.-** Encargar a la Dirección General de Infraestructura Educativa el seguimiento y la supervisión de las actividades relacionadas al proceso de difusión del mencionado proyecto normativo hasta finalizar el mismo.

**Artículo 5.-** Disponer la publicación de la presente Resolución y sus anexos en el Sistema de Información Jurídica de Educación - SIJE, ubicado en el Portal Institucional del Ministerio de Educación ([www.gob.pe/minedu](http://www.gob.pe/minedu)), el mismo día su publicación en el Diario Oficial "El Peruano".

Regístrese, comuníquese y publíquese.

JOSÉ LUIS GARGUREVICH VALDEZ  
Viceministro de Gestión Institucional

2138989-1

### ENERGIA Y MINAS

#### Decreto Supremo que modifica los plazos de adecuación para la implementación de la comercialización de Gasolinas y Gasoholes regular y premium

DECRETO SUPREMO  
N° 018-2022-EM

LA PRESIDENTA DE LA REPÚBLICA

CONSIDERANDO:

Que, el artículo 3 del Texto Único Ordenado de la Ley Orgánica de Hidrocarburos, aprobado por Decreto Supremo N° 042-2005-EM, establece que el Ministerio

de Energía y Minas es el encargado de elaborar, aprobar, proponer y aplicar la política del Sector, así como de dictar las demás normas pertinentes;

Que, el artículo 76 del Texto Único Ordenado de la Ley Orgánica de Hidrocarburos, aprobado por Decreto Supremo N° 042-2005-EM, señala que, entre otras actividades, la comercialización de los productos derivados de los hidrocarburos se regirá por las normas que apruebe el Ministerio de Energía y Minas, las cuales deberán contener mecanismos que satisfagan el abastecimiento del mercado interno;

Que, mediante el artículo 1 del Decreto Supremo N° 014-2021-EM, modificado por Decreto Supremo N° 006-2022-EM se establecen medidas relacionadas al uso y comercialización de Gasolinas y Gasoholes; disponiéndose, a partir del 01 de enero de 2023, el uso y comercialización obligatoria a nivel nacional de Gasolinas y Gasoholes para uso automotor, Regular y Premium;

Que, asimismo, el artículo 2 del Decreto Supremo N° 014-2021-EM modificado mediante Decreto Supremo N° 006-2022-EM establece el uso y comercialización de Gasolinas y Gasoholes con un contenido de azufre no mayor de 50 ppm a partir del 01 de enero de 2023;

Que, adicionalmente, la Única Disposición Complementaria Transitoria del Decreto Supremo N° 014-2021-EM establece de manera temporal el uso y comercialización de Gasolina 84 en los departamentos de Amazonas, Loreto, Madre de Dios y San Martín, hasta el 30 de junio de 2023;

Que, por su parte, la Octava Disposición Complementaria Final del Decreto Supremo N° 002-2022-EM dispone que, los Productores, Importadores, responsables de Plantas de Abastecimiento, Terminales y Distribuidores Mayoristas tienen un plazo de treinta (30) días calendario contado a partir de la entrada en vigencia del artículo 1 del Decreto Supremo N° 014-2021-EM, para cumplir con las disposiciones del citado artículo. Asimismo, los operadores de los Establecimientos de Venta al Público de Combustibles y de Consumidores Directos tienen un plazo de treinta (30) días calendario adicional, a efectos de cumplir con lo establecido en el artículo 1 de la citada norma;

Que, como consecuencia del incremento de los Precios de Referencia de Importación, los precios finales de la Gasolina/Gasohol 84 se incrementaron entre mayo de 2020 y noviembre de 2022 en más del 50%, lo cual viene impactando negativamente en la economía de los usuarios finales; circunstancia que se agravaría por el diferencial de precios que tendría que asumir el usuario final debido a la migración del Gasolina/Gasohol 84 hacia la Gasolina/Gasohol Regular;

Que, considerando la capacidad limitada de tanques de almacenamiento en los Terminales y Plantas y que los volúmenes de inventarios deben ser los más reducidos posibles para lograr obtener los colores de las Gasolinas Regular y Premium, es necesario establecer plazos mayores para la adecuación de los agentes del mercado, así como para contar con el tiempo necesario para llevar a cabo el proceso de adquisición de colorantes de manera oportuna para la comercialización de dichos combustibles;

Que, en ese contexto, y de conformidad con la normativa citada, resulta pertinente modificar el Decreto Supremo N° 014-2021-EM y Decreto Supremo N° 002-2022-EM a efectos de ampliar los plazos de adecuación para la implementación de la comercialización de Gasolinas y Gasoholes Regular y Premium por parte de los agentes de la cadena de comercialización de Combustibles Líquidos, así como para permitir el uso temporal del Gasohol 84 octanos, considerando su implicancia en el desarrollo adecuado del mercado de los combustibles a nivel nacional; y con ello, la exigencia del uso y comercialización de los citados productos;

Que, en uso de las atribuciones previstas en los incisos 8) y 24) del artículo 118 de la Constitución Política del Perú; el Texto Único Ordenado de la Ley N° 26221, Ley Orgánica de Hidrocarburos, aprobado mediante Decreto Supremo N° 042-2005-EM y el Decreto Ley N° 25909;

Nota. Adaptado del Decreto Supremo N° 018-2022-EM (2022), publicado en el diario oficial El Peruano, el cual establece disposiciones y plazos de adecuación para la comercialización de diésel con bajo contenido de azufre en el territorio nacional.

## Anexo 31. Especificaciones técnicas del petróleo diésel B5 S-50 Ultra Petroperú.

Petróleos del Perú - PETROPERÚ S.A.



### ESPECIFICACIONES TÉCNICAS PETROPERÚ

<b>CLASE DE PRODUCTO</b> <b>COMBUSTIBLE</b>		Fecha efectiva: Febrero 2024		
<b>TIPO DE PRODUCTO</b> <b>DESTILADO MEDIO ULTRA BAJO AZUFRE + 5% BIODIESEL B100</b>		Reemplaza edición de: Enero 2019		
<b>NOMBRE DE PRODUCTO</b> <b>DIESEL B5 S-50</b>				
PROPIEDADES	ESPECIFICACIONES (a)		MÉTODO DE ENSAYO	
	MIN.	MAX.	ASTM	OTROS
<b>APARIENCIA</b>	Clara y brillante, libre de agua y partículas en suspensión		D-4176	Visual
Color ASTM (b)	3.0		D-1500, D-6045	Visual
<b>VOLATILIDAD</b>				
Gravedad API a 60 °F	Reportar		D-1298, D-4052	
Destilación, °C (a 760 mmHg)				
Punto inicial de ebullición	Reportar		D86	ISO 3405
5 %V recuperado	Reportar			
10 %V recuperado	Reportar			
20 %V recuperado	Reportar			
50 %V recuperado	Reportar			
90 %V recuperado	282	360		
95 %V recuperado	Reportar			
Punto final de ebullición	Reportar			
Punto de inflamación, °C	52		D93, D3828, D7094	ISO 2719
<b>FLUIDEZ</b>				
Viscosidad cinemática a 40°C, cSt (c)	1.9	4.1	D-445	ISO 3104
Punto de escurrimiento, °C	+4		D-97, D-5949, D-5950	ISO 3016
Punto de nube	Reportar		D-2500, D-5771, D-5772, D-5773	
<b>COMBUSTIÓN</b>				
Número de cetano (d)	45		D613	ISO 5165
Índice de cetano (e)	40		D-4737, D-976	ISO 4264
<b>COMPOSICIÓN</b>				
Cenizas, % masa	0.01		D-482	ISO 6245
Residuo de carbón, 10% residuo destilación, %masa	0.35		D4530, D189, D524	ISO 6615
Azufre total, mg/Kg	50		D-5453, D-2622, D-7039, D-7220	ISO 20846, ISO 14596
<b>CORROSIVIDAD</b>				
Corrosión lámina de cobre, 3h, 50°C, N°	3		D-130	ISO 2160
<b>CONTAMINANTES</b>				
Agua y Sedimentos, %V	0.05		D-2709	
<b>ESTABILIDAD A LA OXIDACIÓN</b>				
Estabilidad a la oxidación, mg/100mL	Reportar		D-2274	
<b>LUBRICIDAD</b>				
Lubricidad, diámetro rasgado de uso corregido, HFRR a 60°C, micras	520		D6079, D7688	ISO 12156-1
<b>REQUERIMIENTOS DE OPERATIVIDAD</b>				
Punto de Obstrucción del Filtro, Flujo en Frio, (CFPP ó POFF), °C	-8		D-6371	UNE-EN-116
<b>CONDUCTIVIDAD</b>				
Conductividad, pS/m	25		D-2624, D-4308	
<b>BIODIESEL 100 (B100)</b>				
Contenido, % Vol.	5		D-7371	UNE EN 14078
<b>OBSERVACIONES:</b>				
(a) De conformidad con el D.S. N° 092-2009-EM y su Fe de Erratas.				
(b) Se aplicará colorante verde en las Plantas de Vents, según decisión de la Geencia Comercial.				
(c) La viscosidad cinemática a 40°C puede ser 1,7 cSt, si el Punto de Nube especificado es menor a -12°C para los meses fríos.				
(d) De no contar con el equipo del método ASTM D-613 (Número de Cetano), se calculará el Índice de Cetano con el método ASTM D-4737.				
(e) El método ASTM D-976, se usará únicamente para combustibles Diesel de rango de N° Cetano entre 56.5 a 60.0.				

Pág. 1 de 1

Nota. Adaptado de Petroperú (2024), en la que se describe las características, estándares de calidad y requisitos técnicos del diésel B5 S-50 Ultra utilizado en el mercado nacional.

**Anexo 32. Decreto supremo N° 005-2019-SA – Ley N° 30681: Respaldo legal para el transporte de *Cannabis* sp. no psicoactivo.**

No. 005-2019-SA

MINISTERIO DE SALUD



# Decreto Supremo

**DECRETO SUPREMO QUE APRUEBA EL REGLAMENTO DE LA LEY N° 30681, LEY QUE REGULA EL USO MEDICINAL Y TERAPÉUTICO DEL CANNABIS Y SUS DERIVADOS**



EL PRESIDENTE DE LA REPÚBLICA

CONSIDERANDO:



N. Santillán R.

Que, la Ley N° 30681, Ley que regula el uso medicinal y terapéutico del Cannabis y sus derivados, establece como objetivo garantizar el derecho fundamental a la salud y permitir el acceso, exclusivamente para uso medicinal y terapéutico, del cannabis y sus derivados. Asimismo, aborda disposiciones sobre el uso informado, la investigación, la producción, la importación y la comercialización del cannabis y sus derivados destinados exclusivamente para fines medicinales y terapéuticos;



S. YANCOURT

Que, la Segunda Disposición Complementaria Final de la Ley N° 30681, señala que el Poder Ejecutivo publica el proyecto de reglamento de la citada ley, a efectos de recoger las opiniones de los ciudadanos e instituciones en general;



H. VASQUEZ S.

Que, la Defensoría del Pueblo, la Sociedad Civil y las diferentes Asociaciones de Pacientes, vienen solicitando adoptar urgentemente las medidas correspondientes para impulsar la pronta aprobación del reglamento precitado, motivado en los pacientes que requieren tal medicación para ser mejorados y aliviados de los problemas de salud que vienen padeciendo muchos años, como epilepsia refractaria, síndrome Lennox-Gastaut, dolor crónico, efectos secundarios de la quimioterapia y otros, considerándose además, la existencia de evidencia científica suficiente para el uso medicinal de esta planta y sus derivados en condiciones médicas como; dolor crónico neuropático en adultos, náuseas y vómitos inducidos por quimioterapia, síntomas de espasticidad por esclerosis múltiple reportados por el paciente y epilepsia refractaria en pacientes pediátricos; calculándose que un mínimo de 7,596 personas requiere con carácter de urgencia, acceder a Cannabis o algún derivado como tratamiento por lo menos paliativo para estas condiciones médicas que generan sufrimientos severos y duraderos, conforme se desprende de lo señalado en el Informe N° 019-2019-DSAME-DGIESP/MINSA, de la Dirección Ejecutiva de Salud Mental de la Dirección General de Intervenciones Estratégicas en Salud Pública del Viceministerio de Salud Pública del Ministerio de Salud;



IFZ L.

Que, mediante Resolución Ministerial N° 435-2018/MINSA, se dispuso la publicación del Proyecto de Reglamento de la Ley N° 30681, Ley que regula el uso medicinal y terapéutico del Cannabis y sus derivados, en el Portal Institucional del Ministerio de Salud, a efecto de recibir las sugerencias, comentarios o recomendaciones de las entidades



G. Rosell



R. TAPIA



M. Larrea S.



6

**REGLAMENTO DE LA LEY N° 30681, LEY QUE REGULA EL USO MEDICINAL Y  
TERAPÉUTICO DEL CANNABIS Y SUS DERIVADOS**

**CAPÍTULO I**

**DISPOSICIONES GENERALES**

**Artículo 1.- Objeto**

El presente Reglamento regula las disposiciones establecidas en la Ley N° 30681, Ley que regula el uso medicinal y terapéutico del Cannabis y sus derivados, con el objeto de garantizar el uso medicinal y terapéutico del Cannabis y sus derivados.

El Estado garantiza el acceso al Cannabis y sus derivados con fines medicinales y terapéuticos, promoviendo su uso racional.

**Artículo 2.- Definiciones**

Para la aplicación del presente Reglamento se señalan las siguientes definiciones:

**2.1 Administrados:** Para los efectos del presente Reglamento, son personas naturales o jurídicas, autorizadas como establecimientos farmacéuticos, universidades, e instituciones de investigación agraria y en salud, entidades públicas, según corresponda, por la autoridad competente, para realizar actividades de investigación, producción, importación y comercialización del Cannabis y sus derivados, destinados exclusivamente con fines medicinales y terapéuticos. También se considera como administrados a los pacientes que hacen uso informado del producto terminado derivado del Cannabis para fines terapéuticos y medicinales, o sus familiares, tutores, curadores, o apoyos cuando deban obrar por aquellos.

**2.2 Planta de Cannabis:** Toda planta herbácea del género *Cannabis*. Se divide en dos (2) variedades según la siguiente clasificación para efectos de la regulación.

a) **Cannabis psicoactivo:** Sumidades, floridas o con fruto, de la planta de Cannabis (a excepción de las semillas y las hojas no unidas a las sumidades) de las cuales no se ha extraído la resina, cualquiera que sea el nombre con que se las designe, cuyo contenido de delta-9-tetrahidrocannabinol (THC) es igual o superior al 1% en peso seco, y que son utilizadas para fines medicinales y terapéuticos, como terapia paliativa para algunas enfermedades. Se excluye el uso combustionado o fumado del Cannabis psicoactivo. Es parte del proceso de fiscalización en la presente normatividad con el nombre de "Cannabis para uso medicinal".

b) **Cannabis no psicoactivo:** La planta de Cannabis, y cualquier parte de dicha planta, cuyo contenido de delta-9-tetrahidrocannabinol (THC) es inferior a 1% en peso seco. El Cannabis no psicoactivo, sus partes y sus derivados, son sustancias no controladas, y por ende están excluidos del Reglamento de Estupefacientes, Psicotrópicos y otras Sustancias Sujetas a Fiscalización Sanitaria, aprobado con Decreto Supremo N° 023-2001-SA. En la presente normatividad denominado como "cáñamo" o "hemp".

**2.3 Materia prima:** Planta de Cannabis para uso medicinal o sus derivados, que contienen y proporcionan los principios activos como metabolitos, llamados cannabinoides (entre ellos el tetrahidrocannabinol o THC y cannabidiol o CBD).

**2.4 Derivados de Cannabis para uso medicinal:** Se refiere a todo compuesto, mezcla o preparación, o producto derivado del Cannabis para uso medicinal, entendiéndose,



N. Santillan R



H. VASQUEZ S



S. VASQUEZ L



G. Rosell

*Nota.* Adaptado de Decreto Supremo N° 005-2019-SA - Ley N° 30681 (2019), que establece las normativas y condiciones para el transporte y comercialización de *Cannabis* sp. no psicoactivo.

**Anexo 33. Matriz de consistencia.**

**Título:** Capacidad biodegradadora de petróleo diésel por bacterias endofíticas aisladas de *Cannabis* sp., Ayacucho 2023.

PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES	METODOLOGÍA
<p><b>P. General:</b> ¿Cuál será la capacidad biodegradadora de petróleo diésel por bacterias endofíticas de <i>Cannabis</i> sp.?</p> <p><b>P. Específico:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• ¿Cuál será la capacidad degradadora, a concentraciones de 1, 3, 5 y 7 % del petróleo diésel, por cepas bacterianas endofíticas de <i>Cannabis</i> sp.?</li> <li>• ¿Cuál será la capacidad degradadora a diferentes concentraciones del petróleo diésel por el consorcio de las bacterias endofíticas de <i>Cannabis</i> sp.?</li> <li>• ¿Cuál será la cinética de degradación del petróleo diésel por cepas y consorcios bacterianos endofíticos de <i>Cannabis</i> sp.?</li> <li>• ¿Cuáles serán las bacterias endofíticas de <i>Cannabis</i> sp. degradadoras del petróleo diésel identificadas molecularmente?</li> </ul>	<p><b>O. General:</b> Evaluar la capacidad biodegradadora de petróleo diésel por las bacterias endofíticas aisladas de <i>Cannabis</i> sp.</p> <p><b>O. Específicos:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Evaluar la capacidad degradadora, a diferentes concentraciones de 1, 3, 5 y 7 % del petróleo diésel, por cepas bacterianas endofíticas de <i>Cannabis</i> sp.</li> <li>• Evaluar la capacidad degradadora, a diferentes concentraciones del petróleo diésel, por el consorcio de las bacterias endofíticas de <i>Cannabis</i> sp.</li> <li>• Evaluar la cinética de degradación del petróleo diésel por cepas y consorcios bacterianos endofíticos de <i>Cannabis</i> sp.</li> <li>• Identificar molecularmente las bacterias endofíticas de <i>Cannabis</i> sp. degradantes del petróleo diésel.</li> </ul>	<p><b>ANTECEDENTES</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Antecedentes internacionales</li> <li>• Antecedentes nacionales</li> <li>• Antecedentes locales</li> </ul> <p><b>MARCO CONCEPTUAL</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hidrocarburo</li> <li>• Petróleo</li> <li>• Diésel</li> <li>• Microorganismos endofíticos</li> <li>• Cepa</li> <li>• Consorcio microbiano</li> <li>• Biodegradación</li> <li>• Biorremediación</li> <li>• Modelado cinético en biología</li> </ul> <p><b>BASE TEÓRICA</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Clasificación y características de los hidrocarburos en el diésel</li> <li>• Contaminación por petróleo y derivados</li> <li>• Remediación del ambiente</li> <li>• <i>Cannabis</i> sp.</li> <li>• Identificación de cepas microbianas</li> <li>• Secuenciación de genoma completo (WGS) para la identificación microbiana</li> <li>• Enfoque bioinformático</li> </ul>	<p><b>H. General:</b></p> <p>Las bacterias endofíticas aisladas de <i>Cannabis</i> sp. tienen la capacidad de degradar las concentraciones de 1, 3, 5 y 7 % del petróleo diésel, disminuyendo su capacidad a medida que aumenta el porcentaje de petróleo diésel.</p>	<p><b>V. Independiente</b></p> <p>= Bacterias endofíticas de <i>Cannabis</i> sp.</p> <p><b>INDICADOR</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Identificación molecular - Género y especie</li> <li>• Consorcio bacteriano - N° de géneros en el consorcio</li> </ul> <p><b>V. Dependiente</b></p> <p>= Capacidad de degradación del petróleo diésel.</p> <p><b>INDICADOR</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Gramos de CO<sub>2</sub> producidos.</li> <li>• Porcentaje degradación - %</li> <li>• Cinética de degradación - orden</li> </ul>	<p><b>TIPO DE INVESTIGACIÓN</b></p> <p>Experimental</p> <p><b>NIVEL DE INVESTIGACIÓN</b></p> <p>Aplicada</p> <p><b>MÉTODO</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Preparación de reactivos y medios de cultivo</li> <li>• Obtención, transporte y manejo de la muestra vegetal</li> <li>• Aislamiento y cultivo de cepas bacterianas endofíticas</li> <li>• Adaptación y selección de cepas bacterianas con capacidad degradadora del petróleo diésel</li> <li>• Evaluación experimental de la biodegradación del petróleo diésel</li> <li>• Determinación de la cinética de degradación</li> <li>• Purificación de ADN genómico</li> <li>• Análisis de pureza de ADN</li> <li>• Análisis de integridad de ADN</li> <li>• Secuenciamiento de ADN</li> <li>• Ubicación taxonómica <i>in silico</i></li> <li>• Análisis estadístico e interpretación de datos</li> </ul>



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS  
Bach. Maximo Rafael SOSA GARCIA  
RESOLUCIÓN DECANAL N° 138-2025-UNSCH-FCB-D

En la ciudad de Ayacucho, siendo las cuatro de la tarde del día viernes treinta de mayo del año dos mil veinticinco; se reunieron los miembros del Jurado Evaluador en el Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, participando como presidente el Dr. Saturnino Martín Tenorio Bautista, el Dr. Fidel Rodolfo Mujica Lengua (miembro – jurado), el Mg. Ruth Elsa Huamán De La Cruz (miembro – jurado), el Mg. Rilder Nemesio Gastelú Quispe (miembro – jurado), el Dr. Saúl Alonso Chuchón Martínez (miembro – asesor), actuando como secretaria docente encargada la Mg. Roxana Karen Carhuaz Condori con memorando N° 104-2025-UNSCH (IN) – FCB de fecha veintinueve de mayo del año dos mil veinticinco; para presenciar la sustentación de tesis titulada: **Capacidad biodegradadora de petróleo diésel por bacterias endofíticas aisladas de Cannabis sp., Ayacucho 2023**, presentado por el Bach. Maximo Rafael SOSA GARCIA; el presidente luego de verificar la documentación presentada, indicó al secretario docente dar lectura a la documentación generada que refrenda el presente acto académico, luego de ello dispuso el inicio del acto de sustentación, indicando al sustentante que dispone de cuarenta y cinco minutos para exponer su trabajo de investigación tal como establece en el Reglamento de Grados y Títulos de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Culminada la exposición, el presidente invitó a cada uno de los Miembros del Jurado a participar con sus observaciones, sugerencias y preguntas a la sustentante. Culminada esta etapa, el presidente invitó al sustentante y al público asistente a abandonar momentáneamente el Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga para que los miembros del jurado evaluador puedan realizar las deliberaciones y calificaciones; cuyos resultados son los que se consignan a continuación:

Miembros del Jurado Evaluador	Exposición	Respuesta/preguntas	Promedio
Dr. Fidel Rodolfo Mujica Lengua	18	18	18
Mg. Ruth Elsa Huamán De La Cruz	18	18	18
Mg. Rilder Nemesio Gastelú Quispe	18	18	18
<b>PROMEDIO</b>			18

El sustentante alcanzó el promedio de 18 aprobatorio. Acto seguido, el presidente autorizó el ingreso del sustentante y el público al Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga dando a conocer los resultados e indicando que de este modo se da por finalizado el presente acto académico, siendo las seis de la noche con veinte minutos; firmando al pie del presente en señal de conformidad.

Dr. Saturnino Martín Tenorio Bautista  
Presidente

Dr. Fidel Rodolfo Mujica Lengua  
Miembro – jurado

Mg. Ruth Elsa Huamán De La Cruz  
Miembro – jurado

Mg. Rilder Nemesio Gastelú Quispe  
Miembro – jurado

Dr. Saúl Alonso Chuchón Martínez  
Miembro – asesor

Mg. Roxana Karen Carhuaz Condori  
Secretaria Docente (e)



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

DECANATURA - ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE TRABAJO DE TESIS

N° 029-2025-FCB-D

Yo, FIDEL RODOLFO MUJICA LENGUA, Director de la Escuela Profesional de Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; autoridad encargada de verificar la tesis titulada: **Capacidad biodegradadora de petróleo diésel por bacterias endofíticas aisladas de *Cannabis sp.*, Ayacucho 2023**, por MAXIMO RAFAEL SOSA GARCIA; he constatado por medio del uso de la herramienta TURNITIN, procesado CON DEPÓSITO, una similitud de 2%, grado de coincidencia, menor a lo que determina la ausencia de plagio definido por el Reglamento de Originalidad de Trabajos de Investigación de la UNSCH, aprobado con Resolución del Consejo Universitario N° 039-2021-UNSCH-CU.

En consecuencia, la tesis cumple con las normas para el uso de citas y referencias establecidas por la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Se acompaña el INFORME FINAL DE TURNITIN correspondiente.

Ayacucho, 20 de junio de 2025.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
Escuela Profesional de Biología  
  
Dr. Fidel R. Mujica Lengua  
DIRECTOR

# Capacidad biodegradadora de petróleo diésel por bacterias endofíticas aisladas de Cannabis sp., Ayacucho 2023

*por* MAXIMO RAFAEL SOSA GARCIA

---

**Fecha de entrega:** 16-jun-2025 07:50a.m. (UTC-0500)

**Identificador de la entrega:** 2696196913

**Nombre del archivo:** SOSA\_GARCIA-Maximo\_Rafael-pregrado-2025\_TURNITIN.docx (3.6M)

**Total de palabras:** 18089

**Total de caracteres:** 97886

# Capacidad biodegradadora de petróleo diésel por bacterias endofíticas aisladas de Cannabis sp., Ayacucho 2023

## INFORME DE ORIGINALIDAD

2%

INDICE DE SIMILITUD

1%

FUENTES DE INTERNET

0%

PUBLICACIONES

1%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga Trabajo del estudiante	1%
2	docslib.org Fuente de Internet	<1%
3	Submitted to ITESM: Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey Trabajo del estudiante	<1%
4	Submitted to Universidad Anahuac México Sur Trabajo del estudiante	<1%
5	www.coursehero.com Fuente de Internet	<1%
6	Submitted to Universidad Politécnica Estatal de Carchi Trabajo del estudiante	<1%
7	nanoporetech.com Fuente de Internet	<1%

---

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 30 words

Excluir bibliografía

Activo