

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA
ESCUELA DE POSGRADO
UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS:

Efecto de la bioestimulación de consorcios microbianos
en la capacidad degradativa del petróleo crudo,
Ayacucho 2019.

Para optar el grado académico de:
MAESTRO EN CIENCIAS, MENCIÓN MICROBIOLOGÍA

PRESENTADO POR:
Bach. Pedro Mauricio DELGADILLO CORONADO

ASESOR:
Dr. Saul Alonso CHUCHON MARTINEZ

AYACUCHO - PERÚ
2024

A mis padres Fidel y Filomena, mi
pareja Diana e hijo Sergio, a mi
hermano Alvaro.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, mi *Alma Mater*, por darme la oportunidad de estudiar en sus aulas y por ayudarme a desarrollarme académicamente, cultivando en mí una actitud de perseverancia y superación.

También quiero agradecer a todos los profesores de la Escuela de Posgrado de la Maestría en Ciencias, Mención en Microbiología por compartir sus conocimientos y enseñanzas conmigo durante mi formación como Maestro, y por transmitirme su optimismo y apoyo en todo momento.

Quiero mencionar especialmente al Dr. Saúl Alonso Chuchon Martínez por su paciencia, apoyo y asesoramiento en la elaboración de esta tesis, así como a Diana Castañeda Pinco, egresada de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, por su ayuda durante su ejecución.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE ANEXOS	x
RESUMEN	xiii
I. INTRODUCCIÓN	14
II. MARCO TEÓRICO	16
2.1. Antecedentes	16
2.2. Marco conceptual	24
2.2.1. Suelo	24
2.2.2. Petróleo	25
2.2.3. Petróleo y la biodegradación microbiana	28
2.2.4. Marco legal	34
III. MATERIALES Y MÉTODOS	36
3.1. Ubicación	36
3.2. Procedencia de las cepas microbianas	36
3.3. Ensayos de degradación del petróleo Diesel	36
3.3.1. Preparación del inóculo de las cepas	36
3.3.2. Preparación de la muestra de suelo	37
3.3.3. Preparación de las concentraciones de petróleo Diesel	37
3.3.4. Evaluación de los tratamientos	41
3.4. Análisis de la arena fina sometida a degradación del petróleo Diesel	41
3.4.1. Determinación del porcentaje de humedad de la arena fina	41
3.4.2. Preparación de las muestras de arena fina para la extracción de petróleo Diesel	41
3.4.3. Extracción del petróleo Diesel mediante la técnica agitación-centrifugación	42
3.4.4. Cálculo de hidrocarburos totales de petróleo Diesel (HTPs)	42
3.5. Identificación de microorganismos	43
3.6. Análisis estadístico	45
3.6.1. Registro de datos	45

3.6.2.	Análisis de similaridad	45
IV.	RESULTADOS	46
V.	DISCUSIÓN	66
VI.	CONCLUSIONES	76
VII.	RECOMENDACIONES	77
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
	ANEXOS	82

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación de las partículas del suelo, según sistemas de USA e Internacionales.	25
Tabla 2. Composición de las fracciones químicas contenidas en un crudo de petróleo.	26
Tabla 3. Bacterias reportadas en biorremediación de suelos y agua contaminados con hidrocarburos.	34
Tabla 4. Cantidad en mL que se preparó de cada cepa en caldo nutritivo para los distintos tratamientos.	37
Tabla 5. Preparación de los tratamientos para Nitrato de Amonio.	38
Tabla 6. Preparación de los tratamientos para Superfosfato Triple.	39
Tabla 7. Preparación de los tratamientos para el Control Positivo.	40
Tabla 8. Preparación de los tratamientos para el Control Negativo.	41
Tabla 9. Porcentajes de remoción neta de petróleo Diesel en los diferentes tratamientos y subtratamientos con microorganismos degradadores de petróleo Diesel. Ayacucho-2019.	61
Tabla 10. Identificación por análisis BlastN de los primers de la Muestra.	65

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.	Esquema de un hábitat microbiano del suelo. 25
Figura 2.	Estructura química de los principales grupos de hidrocarburos del petróleo. 27
Figura 3.	Procesamiento de reacciones complejas por (a) una población o (b) un consorcio microbiano. 30
Figura 4.	Actividad monooxigenasa y beta oxidación. (a) Pasos en la oxidación de un hidrocarburo alifático, el primero de los cuales está catalizado por una monooxigenasa. (b) La oxidación de ácidos grasos por beta-oxidación conduce a la formación sucesiva de acetil-CoA. 32
Figura 5.	Concentraciones promedio de petróleo Diesel residual (mg/kg-1 s.s.) en los subtratamientos con bioestimulación (nitrato de amonio y superfosfato triple), blanco positivo y blanco negativo con microorganismos degradadores del tratamiento M1, Ayacucho-2019. 47
Figura 6.	Porcentajes de remoción de petróleo Diesel en los diferentes subtratamientos con microorganismos degradadores del tratamiento M1, Ayacucho-2019. 48
Figura 7.	Concentraciones promedio de petróleo Diesel residual (mg/kg-1 s.s.) en los subtratamientos con bioestimulación (nitrato de amonio y superfosfato triple), blanco positivo y blanco negativo con microorganismos degradadores del tratamiento M2, Ayacucho-2019. 49
Figura 8.	Porcentajes de remoción de petróleo Diesel en los diferentes subtratamientos con microorganismos degradadores del tratamiento M2, Ayacucho-2019. 50
Figura 9.	Concentraciones promedio de petróleo Diesel residual (mg/kg-1 s.s.) en los subtratamientos con bioestimulación (nitrato de amonio y superfosfato triple), blanco positivo y blanco negativo con microorganismos degradadores del tratamiento M3, Ayacucho-2019. 51

Figura 10.	Porcentajes de remoción de petróleo Diesel en los diferentes subtratamientos con microorganismos degradadores del tratamiento M3, Ayacucho-2019.	52
Figura 11.	Concentraciones promedio de petróleo Diesel residual (mg/kg-1 s.s.) en los subtratamientos con bioestimulación (nitrato de amonio y superfosfato triple), blanco positivo y blanco negativo con microorganismos degradadores del tratamiento M12, Ayacucho-2019.	53
Figura 12.	Porcentajes de remoción de petróleo Diesel en los diferentes subtratamientos con microorganismos degradadores del tratamiento M12, Ayacucho-2019.	54
Figura 13.	Concentraciones promedio de petróleo Diesel residual (mg/kg-1 s.s.) en los subtratamientos con bioestimulación (nitrato de amonio y superfosfato triple), blanco positivo y blanco negativo con microorganismos degradadores del tratamiento M13, Ayacucho-2019.	55
Figura 14.	Porcentajes de remoción de petróleo Diesel en los diferentes subtratamientos con microorganismos degradadores del tratamiento M13, Ayacucho-2019.	56
Figura 15.	Concentraciones promedio de petróleo Diesel residual (mg/kg-1 s.s.) en los subtratamientos con bioestimulación (nitrato de amonio y superfosfato triple), blanco positivo y blanco negativo con microorganismos degradadores del tratamiento M23, Ayacucho-2019.	57
Figura 16.	Porcentajes de remoción de petróleo Diesel en los diferentes subtratamientos con microorganismos degradadores del tratamiento M23, Ayacucho-2019.	58
Figura 17.	Concentraciones promedio de petróleo Diesel residual (mg/kg-1 s.s.) en los subtratamientos con bioestimulación (nitrato de amonio y superfosfato triple), blanco positivo y blanco negativo con microorganismos degradadores del tratamiento M123, Ayacucho-2019.	59
Figura 18.	Porcentajes de remoción de petróleo Diesel en los diferentes subtratamientos con microorganismos degradadores del tratamiento M123, Ayacucho-2019.	60

Figura 19. Calidad de ADN revelado mediante electroforesis de agarosa al 1%. En el cual 1 es el Marcador de peso molecular de 1Kb, 2; ADN de la muestra control positivo, 3; ADN de la muestra C-1(R1), 4; ADN de la muestra C-2(R1) y 5 ADN de la muestra C-3(R1).

63

Figura 20. Productos de PCR amplificados para el gen 16S rRNA. En el cual 1 es el Marcador de 1Kb, 2; ADN de la muestra control negativo, 3; ADN de la muestra control positivo, 4; ADN de la muestra C-1(R1), 5; ADN de la muestra C-2(R1) y 6 ADN de la muestra C-3(R1).

64

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Diagrama de la técnica de extracción agitación-centrifugación	82
Anexo 2. Diagrama del método gravimétrico.	83
Anexo 3. Muestras de arena fina colocadas en sus respectivos recipientes y posteriormente se contaminaron con petróleo Diesel.	84
Anexo 4. Preparación y adición de bioestimulantes a las muestras de arena fina.	85
Anexo 5. Toma de muestras para la extracción y cuantificación de petróleo Diesel de los diferentes tratamientos.	86
Anexo 6. Promedios de las concentraciones de petróleo Diesel residual (mg/kg-1 s.s.) en los subtratamientos sometidos a bioestimulación con nitrato de amonio, superfosfato triple, blanco positivo y blanco negativo con microorganismos degradadores de petróleo Diesel del tratamiento M1, Ayacucho-2019.	87
Anexo 7. Porcentajes de remoción de petróleo Diesel en los diferentes subtratamientos con microorganismos degradadores de petróleo Diesel del tratamiento M1, Ayacucho-2019.	88
Anexo 8. Promedios de las concentraciones de petróleo Diesel residual (mg/kg-1 s.s.) en los subtratamientos sometidos a bioestimulación con nitrato de amonio, superfosfato triple, blanco positivo y blanco negativo con microorganismos degradadores de petróleo Diesel del tratamiento M2, Ayacucho-2019.	89
Anexo 9. Porcentajes de remoción de petróleo Diesel en los diferentes subtratamientos con microorganismos degradadores de petróleo Diesel del tratamiento M2, Ayacucho-2019.	90
Anexo 10. Promedios de las concentraciones de petróleo Diesel residual (mg/kg-1 s.s.) en los subtratamientos sometidos a bioestimulación con nitrato de amonio, superfosfato triple, blanco positivo y blanco negativo con microorganismos degradadores de petróleo Diesel del tratamiento M3, Ayacucho-2019.	91

Anexo 11.	Porcentajes de remoción de petróleo Diesel en los diferentes subtratamientos con microorganismos degradadores de petróleo Diesel del tratamiento M3, Ayacucho-2019.	92
Anexo 12.	Promedios de las concentraciones de petróleo Diesel residual (mg/kg-1 s.s.) en los subtratamientos sometidos a bioestimulación con nitrato de amonio, superfosfato triple, blanco positivo y blanco negativo con microorganismos degradadores de petróleo Diesel del tratamiento M12, Ayacucho-2019.	93
Anexo 13.	Porcentajes de remoción de petróleo Diesel en los diferentes subtratamientos con microorganismos degradadores de petróleo Diesel del tratamiento M12, Ayacucho-2019.	94
Anexo 14.	Promedios de las concentraciones de petróleo Diesel residual (mg/kg-1 s.s.) en los subtratamientos sometidos a bioestimulación con nitrato de amonio, superfosfato triple, blanco positivo y blanco negativo con microorganismos degradadores de petróleo Diesel del tratamiento M13, Ayacucho-2019.	95
Anexo 15.	Porcentajes de remoción de petróleo Diesel en los diferentes subtratamientos con microorganismos degradadores de petróleo Diesel del tratamiento M13, Ayacucho-2019.	96
Anexo 16.	Promedios de las concentraciones de petróleo Diesel residual (mg/kg-1 s.s.) en los subtratamientos sometidos a bioestimulación con nitrato de amonio, superfosfato triple, blanco positivo y blanco negativo con microorganismos degradadores de petróleo Diesel del tratamiento M23, Ayacucho-2019.	97
Anexo 17.	Porcentajes de remoción de petróleo Diesel en los diferentes subtratamientos con microorganismos degradadores de petróleo Diesel del tratamiento M23, Ayacucho-2019.	98
Anexo 18.	Promedios de las concentraciones de petróleo Diesel residual (mg/kg-1 s.s.) en los subtratamientos sometidos a bioestimulación con nitrato de amonio, superfosfato triple, blanco positivo y blanco negativo con microorganismos	

	degradadores de petróleo Diesel del tratamiento M123, Ayacucho-2019.	99
Anexo 19.	Porcentajes de remoción de petróleo Diesel en los diferentes subtratamientos con microorganismos degradadores de petróleo Diesel del tratamiento M123, Ayacucho-2019.	100
Anexo 20.	Pruebas de normalidad para de la concentración de petróleo Diesel de 10%.	101
Anexo 21.	Pruebas de normalidad para de la concentración de petróleo Diesel de 15%.	102
Anexo 22.	Pruebas de normalidad para de la concentración de petróleo Diesel de 20%.	103
Anexo 23.	Análisis de varianza para los porcentajes 10%, 15% y 20% de petróleo Diesel tratamientos y subtratamientos.	104
Anexo 24.	Comparaciones múltiples Tukey para el porcentaje de petróleo Diesel 10 % entre tratamientos y subtratamientos.	105
Anexo 25.	Comparaciones múltiples Tukey para el porcentaje de petróleo Diesel 15 % entre tratamientos y subtratamientos.	106
Anexo 26.	Comparaciones múltiples Tukey para el porcentaje de petróleo Diesel 20 % entre tratamientos y subtratamientos.	107
Anexo 27.	Cuantificación para 16S rRNA como producto de la PCR.	108
Anexo 28.	Decreto Supremo N° 011-2017-MINAM.	109
Anexo 29.	Matriz de consistencia.	113

RESUMEN

El objetivo de la investigación fue evaluar el efecto de la bioestimulación en la capacidad degradativa del petróleo Diesel (PD) por parte de consorcios microbianos e identificar los microorganismos involucrados en la degradación de este mediante PCR. Para la investigación, se seleccionaron las cepas obtenidas en trabajos previos provenientes del Laboratorio de Microbiología Ambiental de la E.P. de Biología de la UNSCH. Estas cepas fueron seleccionadas en base a investigaciones anteriores y se tuvo en cuenta la capacidad de biodegradación de petróleo Diesel que habían demostrado previamente. Se instalaron cuatro tratamientos, dos con bioestimulantes, nitrato de amonio y superfosfato triple (NH_4NO_3 y SFT) y dos controles (negativo y positivo). Cada tratamiento consistió en cuatro subgrupos de 21 unidades experimentales cada uno, a los cuales se les agregó petróleo Diesel en diferentes concentraciones (5%, 10%, 15% y 20%). Los recipientes fueron inoculados con los microorganismos individualmente y en grupo, lo que dio lugar a siete subtratamientos diferentes (M1, M2, M3, M12, M13, M23 y M123). El propósito era obtener diferentes concentraciones de PD en cada subgrupo para los cuatro tratamientos iniciales. Se utilizó la técnica de extracción agitación-centrifugación para extraer PD de muestras de suelo con concentraciones diferentes (5%, 10%, 15%, 20%). La cuantificación del PD se realizó por medio del método gravimétrico y se expresaron las concentraciones en mg/Kg de suelo seco (mg kg^{-1} de s.s.). Se logró identificar a las bacterias *Stenotrophomonas acidaminiphila*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas aeruginosa*, correspondientes a la cepa 1, cepa 2 y cepa 3 respectivamente. Los tratamientos bioestimulados con NH_4NO_3 y SFT alcanzaron una mayor tasa de remoción neta (RN) de petróleo Diesel que el control positivo. A concentraciones del 5% y 10%, todos los tratamientos bioestimulados alcanzaron una tasa de RN del 54,716% y 83,662%, respectivamente, en un tiempo de 28 a 70 días, mientras que el control positivo tardó 56 días en alcanzar el mismo nivel de RN para la concentración 5%. Para concentraciones más altas de petróleo Diesel, la tasa de RN disminuyó para todos los tratamientos, pero los tratamientos bioestimulados aún lograron una mayor tasa de RN que el control positivo. El tratamiento M123 fue el que presentó el mejor desempeño en todos los casos, lo que indica que la combinación de las tres cepas bacterianas fue la más efectiva para la biodegradación del PD. El análisis de ANOVA se realizó para los resultados del día 70 en cada una de las concentraciones de PD, el valor de significancia para las tres concentraciones de petróleo Diesel fue menor a 0.001, lo que indica que hay diferencia estadística.

Palabras clave: Bioestimulación, petróleo Diesel, PCR, superfosfato triple, nitrato de amonio, agitación-centrifugación, gravimétrico, biodegradación.

I. INTRODUCCIÓN

La contaminación por hidrocarburos es una problemática global y ampliamente distribuida geográficamente. Los derrames de petróleo son una de las causas principales de la contaminación del suelo y el agua, y se producen debido al uso y transporte de petróleo y sus derivados, roturas de contenedores, fallas en tuberías subterráneas y diversos procesos industriales. Estos eventos ocurren con una frecuencia cada vez mayor, aumentando el riesgo de problemas de salud para las personas, incluyendo la inhalación de vapores, la ingestión de hidrocarburos disueltos en el agua y el contacto dérmico (Acosta et al., 2011, citando a Chen y Liao, 2006).

Según Cárdenas (2017), las consecuencias de un derrame de petróleo afectan especialmente a las algas y las plantas, las cuales son parte fundamental del ecosistema. La presencia de una capa de petróleo sobre el agua impide la entrada de la luz solar y, por lo tanto, la realización de la fotosíntesis, lo que genera una afectación en los organismos primarios y una contaminación en toda la cadena alimentaria. Además, la película de petróleo crudo sobre la superficie del agua y la tierra forma una capa que impide el crecimiento de nuevas plantas y animales. Según Honty (2016), citado por Cárdenas (2017), la exploración petrolera se encuentra actualmente paralizada debido a la necesidad de implementar múltiples herramientas ambientales en cada etapa de la industria, que se requieren para mitigar los daños ambientales causados por la explotación de este recurso. Se informa que en los últimos 15 años hasta el 2016 se han registrado más de 150 derrames de petróleo en nuestro país. Por consiguiente, se han generado iniciativas para abordar la problemática de la contaminación ambiental, las cuales son de gran relevancia y han generado gran interés, puesto que permiten mejorar el equilibrio del ecosistema y, por ende, el bienestar de toda la población (Samanez, 2008). Según Arcilla (2016), existen diversos productos para llevar a cabo la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos, sin embargo,

es necesario hacer un análisis previo de las características fisicoquímicas específicas del suelo que se desea tratar, la concentración del contaminante, el potencial de los microorganismos degradadores presentes y la cantidad de nutrientes disponibles, entre otros factores que pueden limitar el proceso. De esta forma, se puede determinar si es suficiente incentivar el crecimiento de las bacterias autóctonas de la zona o si es necesario la inoculación de bacterias exógenas, lo que resulta indispensable para asegurar la eficacia del tratamiento y cumplir con los tiempos de ejecución adecuados.

En este estudio cuantitativo se evaluó la capacidad degradadora de bacterias, obtenidas del Cepario del Laboratorio de Microbiología Ambiental, en suelos contaminados artificialmente con petróleo crudo. Para estimular el crecimiento de microorganismos nativos y exógenos, se utilizó la bioestimulación, un método de biorremediación que incorpora nutrientes inorgánicos como nitratos y fosfatos. La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Biología de la UNSCH. La comprensión del proceso permitirá diseñar estrategias para aprovechar las propiedades degradativas de los microorganismos y, por lo tanto, se justifica el interés en este estudio como un aporte al conocimiento de microorganismos degradadores de petróleo. Con estos resultados, se podrán establecer mecanismos potenciales de biorremediación que contribuyan a la conservación de nuestro medio ambiente.

Los objetivos fueron.

Objetivo general:

Evaluar el efecto de la bioestimulación en la capacidad degradativa por consorcios microbianos del petróleo Diesel, Ayacucho 2019.

Objetivos específicos:

1. Evaluar el efecto del nitrato de amonio (bioestimulador) en la actividad degradativa de consorcios microbianos sobre el petróleo Diesel.
2. Evaluar el efecto del superfosfato triple (bioestimulador) en la actividad degradativa de consorcios microbianos sobre el petróleo Diesel.
3. Identificar los microorganismos de mejor respuesta a la bioestimulación en la degradación del petróleo Diesel.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Samanez (2008), en su trabajo titulado “Biodegradación bacteriana por bioestimulación en suelos contaminados con petróleo crudo”, menciona que se ha evaluado la capacidad degradadora de bacterias, frente a los hidrocarburos componentes del petróleo de manera cuantitativa y cualitativa, mediante el uso de la bioestimulación con nitrógeno, fósforo y potasio y la bioaumentación. Para el proceso de biodegradación bacteriana, se seleccionaron consorcios bacterianos de acuerdo con su capacidad degradativa y emulsificante (*Pseudomonas aeruginosa* TX-5, *Acinetobacter calcoaceticus* T2X-1, *Bacillus sp.* TX-4) y, por otro lado, para el proceso de bioestimulación se seleccionó una mezcla de componentes inorgánicos y se formuló la concentración de estos fertilizantes inorgánicos, de la siguiente manera (C/N: 100:1 y NPK: 20:20:1). Los resultados en los terrarios de experimentación determinaron que el terrario B+F, tuvo mayor porcentaje de biodegradación (71,4%), seguido del terrario N+F (66,7%), el terrario B-F (61,9%), N-F (52,3%) y CA (28%). Los componentes del petróleo que sufrieron mayor degradación fueron: n-pentano, n-hexano y n-decano. La población bacteriana tanto heterótrofa como oleofílica llegó a su mayor cantidad a los 30 días del experimento. La reintroducción de microorganismos nativos tiene mayor efectividad en la biodegradación de crudo de petróleo, cuando el microorganismo dispone de fertilizantes inorgánicos.

Roy et al. (2018), en su estudio llamado “Biostimulation and bioaugmentation of native microbial community accelerated bioremediation of oil refinery sludge”, indican que la investigación consistió en una estrategia de biorremediación diseñada para el tratamiento de residuos de refinerías de petróleo ricas en hidrocarburos, se investigó mediante enfoques de bioestimulación y bioaumentación. La atenuación total (46-55%) de hidrocarburos de petróleo (TPH) se logró mediante la modificación de fosfato, nitrato o nitrato + fosfato en el lodo

con una mayor abundancia (hasta un 12%) de fermentativos, degradación de hidrocarburos, reducción de sulfatos, asimilación de CO₂ y Microorganismos metanogénicos (*Bacillus*, *Coprothermobacter*, *Rhodobacter*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Desulfitobacter*, *Desulfosporosinus*, *T78*, *Methanobacterium*, *Methanosaeta*, etc.). Junto con los nutrientes, la bioaugmentación con biosurfactante y los hidrocarburos que utilizan las cepas de *Bacillus* originaron una reducción del 57% al 75% de TPH. La investigación filogenética de las comunidades mediante la reconstrucción de estados no observados (PICRUSt) reveló una asignación de genes mejorada para transportadores (0,45-3,07%), transportadores ABC (0,38-2,07%), metano (0,16-1,06%), ácido graso (0,018-0,15%), nitrógeno (0,07-0,17%), butanoato (0,06-0,35%), propanoato (0,004-0,26%) y degradación de algunos xenobióticos (0,007-0,13%).

Safdari et al. (2018), en su investigación denominada “Development of bioreactors for comparative study of natural attenuation, biostimulation, and bioaugmentation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil”, mencionan que las modalidades del estudio fueron: (1) atenuación natural (NA); (2) bioestimulación (BS) con oxígeno y nutrientes; (3) bioaugmentación (BA) con aislamientos que degradan los hidrocarburos; (4) una combinación de bioestimulación y bioaugmentación (BS-BA). El balance de masa total de hidrocarburos de petróleo (TPH) sobre los biorreactores mostró que aproximadamente el 2% de los 20,000 mg/Kg de suelo inicial se eliminó por advección debido a las aguas subterráneas sintéticas que fluían a través del suelo, y el resto de la disminución de TPH fue provocado por la biodegradación. Los modos BS-BA mostraron el mayor porcentaje de biodegradación de TPH ($89,7 \pm 0,3\%$) en comparación con los modos NA ($51,4 \pm 0,6\%$), BS ($81,9 \pm 0,3\%$) y BA ($62,9 \pm 0,5\%$). Además, un aumento en la población microbiana fue una evidencia de la biodegradación de TPH por microorganismos. Arcilla (2016), en su estudio llamado “Análisis comparativo de la eficiencia de productos para la biorremediación de suelos contaminados con Diesel (un 1202) utilizando métodos de bioestimulación y bioaugmentación a escala piloto”, indica que tuvo como objeto realizar un análisis comparativo de la eficiencia de productos para la biorremediación de suelos contaminados con diésel. Mediante la simulación de área, dispersión de productos comerciales y monitoreo durante 98 días en microcosmos, se evaluaron los tres tratamientos de biorremediación (atenuación natural, bioaugmentación y bioestimulación). Se evidenciaron que los tres presentaron resultados eficientes con porcentajes de reducción de TPH's

mayores al 70%, teniendo en cuenta las ventajas costo-beneficio se propone como alternativa de biorremediación para este caso la atenuación natural, al presentar una población inicial de microorganismos nativos que se adaptaron a la concentración del diésel, lo toleraron y lo redujeron al 90% de TPH's, dentro de las condiciones (temperatura, pH, humedad, tipo de suelo) empleadas en este estudio.

Benyahia y Embaby (2016), en su trabajo titulado "Bioremediation of Crude Oil Contaminated Desert Soil: Effect of Biostimulation, Bioaugmentation and Bioavailability in Biopile Treatment Systems", mencionan que la investigación tuvo como objetivo evaluar los méritos relativos de la bioaumentación, la bioestimulación y la biodisponibilidad aumentada de surfactante de un suelo desértico contaminado por petróleo crudo a través del tratamiento con biopilas. El sistema de biopila bioaumentado condujo a una reducción total del hidrocarburo del petróleo (TPH) del 77% durante 156 días, mientras que el sistema con monooleato de polioxietileno (20) sorbitán (Tween 80) produjo una disminución del 56% en el TPH. El sistema bioestimulado con microorganismos autóctonos produjo una reducción del 23% en la TPH. El sistema de control dio un 4% de reducción de TPH. La adición de Tween 80 llevó a una tasa de respiración que alcanzó su punto máximo en 48 días en comparación con 88 días para el sistema bioaumentado y la respiración disminuyó rápidamente debido al agotamiento del nitrógeno. El hidrocarburo residual en los sistemas de biopilas estudiados contenía poliaromática (HAP) en cantidades que pueden considerarse peligrosas. Se descubrió que el nitrógeno es un nutriente limitante en la biorremediación de suelos del desierto.

Jiang et al. (2016), en su investigación denominada "Insights into the biodegradation of weathered hydrocarbons in contaminated soils by bioaugmentation and nutrient stimulation", indican que se estudió el potencial para la biotransformación de residuos de hidrocarburos degradados en los suelos recolectados en dos sitios comerciales de refinería de petróleo (Suelo A y B) se estudió en experimentos de microcosmos. El suelo A había sido sometido previamente a biorremediación en el sitio y se creía que no era posible una degradación adicional mientras que el suelo B no había sido sometido a ningún tratamiento. Se aplicaron a los microcosmos una serie de estrategias de enmienda, que incluyeron bioaumentación con degradador de hidrocarburos, bioestimulación con nutrientes y molienda del suelo, como estrategias de mejora

de la posible biodegradación. Las concentraciones de hidrocarburos en cada grupo de enmienda se controlaron a lo largo de 112 días de incubación. Los microcosmos tratados con bioestimulación (BS) y bioestimulación / bioaumentación (BS p BA) mostraron las reducciones más significativas en las fracciones de hidrocarburos alifáticos y aromáticos. Sin embargo, se demostró que la molienda del suelo reduce la efectividad de un tratamiento con nutrientes en la extensión de la biotransformación hasta en un 25% y un 20% para las fracciones de hidrocarburos alifáticos y aromáticos, respectivamente.

Sarkar et al. (2016), en su trabajo titulado “Enrichment and Characterization of Hydrocarbon-Degrading Bacteria from Petroleum Refinery Waste as Potent Bioaugmentation Agent for In Situ Bioremediation”, mencionan que su objetivo fue caracterizar la comunidad microbiana en los residuos de refinería y evaluar el alcance de la bioestimulación basada en la biorremediación *in situ*. Las muestras recuperadas de la laguna de aguas residuales de la refinería de Guwahati revelaron un ambiente de reducción de hidrocarburo enriquecido, limitado por el oxígeno y la humedad. La capacidad de biodegradación intrínseca de los microorganismos indígenas mejoró significativamente (> 80% de reducción en TPH en 90 días) con la enmienda de nitrato. La utilización preferida de ambos hidrocarburos de longitud más alta (> C30) y de cadena media (C20-30) fue evidente a partir del análisis GC-MS. La electroforesis en gel de gradiente desnaturante y los análisis de perfiles fisiológicos a nivel comunitario indicaron un claro cambio en la composición de la comunidad y las capacidades metabólicas después de la enmienda de nitrógeno (N). La secuenciación profunda de alto rendimiento del gen 16S rRNA mostró que la comunidad nativa estaba compuesta principalmente por bacterias anaerobias facultativas que reducen los hidrocarburos, syntrophic, methanogenic, nitrato / hierro / azufre, y archaeobacteria, afiliadas a g- y d- Proteobacteria y Euryarchaeota respectivamente. Se detectaron genes para el metabolismo de alcanos aeróbicos y anaeróbicos (alkB y bssA), metanogénesis (mcrA), desnitrificación (nirS y narG) y fijación de N₂ (nifH). Concomitante con la degradación de hidrocarburos, la disminución de la disolución de O₂ y el aumento del potencial de oxidación-reducción (ORP) marcado con un enriquecimiento de fijación de N₂, los miembros anaeróbicos aeróbicos / facultativos reductores de nitratos [por ejemplo, *Azovibrio*, *Pseudoxanthomonas* y *Comamonadaceae* miembros] fueron evidentes en microcosmos modificados en N.

Colla et al. (2014), en su estudio llamado “Bioremediation assessment of diesel–biodiesel-contaminated soil using an alternative bioaugmentation strategy”, mencionan que investigaron la efectividad de la bioaumentación sucesiva, la bioaumentación convencional y la bioestimulación de la biodegradación de B10 en el suelo. Además, la estructura de la comunidad microbiana del suelo se evaluó mediante electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización de la reacción en cadena de la polimerasa. El experimento se realizó durante 32 días. El consorcio Themicrobial se identificó basándose en la secuenciación del gen 16S rRNA y consistió en *Pseudomonas aeruginosa*, *Achromobacter xylosoxidans* y *Ochrobactrum intermedium*. La introducción de nutrientes (bioestimulación) promovió un efecto positivo en las poblaciones microbianas. Los resultados indican que la estructura y dinámica de la comunidad edáfica fueron diferentes según los tratamientos empleados. El análisis de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) indicó un nivel de biodegradación de 35,7 y 32,2% para los tratamientos de bioestimulación y bioaumentación sucesiva, respectivamente. La bioaumentación sucesiva mostró efectos positivos sobre la biodegradación, con una reducción sustancial en los niveles de TPH.

Jasmine & Mukherji (2014), en su investigación denominada “Evaluation of bioaugmentation and biostimulation effects on the treatment of refinery oily sludge using 2n full factorial design”, mencionan que probaron tres estrategias, las cuales fueron la bioaumentación con consorcios microbianos indígenas (MO) aislados de lodos aceitosos, bioestimulación con nutrientes (NP) y bioestimulación con el surfactante Triton X-100 (TX). Los principales efectos y los efectos de varias interacciones de los factores sobre la degradación del petróleo y el crecimiento microbiano en suspensión se evaluaron durante un estudio de 30 días. El principal efecto de la bioestimulación con nutrientes en forma de nitrato y fosfato, así como la bioestimulación con Triton X-100, fue positivo y significativo cuando se seleccionaron la degradación del aceite y el crecimiento microbiano en suspensión como las variables de respuesta. Sin embargo, el principal efecto de la bioaumentación solo fue significativo para la degradación del aceite, pero fue insignificante para el crecimiento microbiano a un nivel de confianza del 90%. La interacción binaria MO NP y las interacciones ternarias MO NP-TX fueron positivas y significativas, lo que indica el efecto sinérgico de estas estrategias sobre la degradación del petróleo y el crecimiento microbiano.

Asquith y cols. (2012), en su trabajo titulado “Comparative Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon-contaminated Soil by Biostimulation, Bioaugmentation and Surfactant Addition”, indican que se realizó un experimento de biopilado a escala de banco para comparar la capacidad de diferentes técnicas para mejorar la biorremediación de hidrocarburos de petróleo en un suelo contaminado crónicamente. Después de 195 días, se produjo una eliminación del 10% -32% de los TPH (hidrocarburos totales de petróleo) en el suelo no modificado (control). La bioestimulación mediante la adición de nutrientes inorgánicos mejoró la eliminación de TPH (49%). La adición de enmiendas orgánicas que incluyen residuos verdes al 25% y 50% (p / p) y un producto comercial llamado Daramend™ tuvo un efecto bioestimulador adicional (50% -66%, 34% -59% y 69% -80% de eliminación de TPH respectivamente). La bioaumentación con dos cultivos microbianos degradantes de hidrocarburos de petróleo disponibles en el mercado con nutrientes mejoró la eliminación de TPH en el caso de RemActiv™ (60% -69%), pero tuvo un efecto marginal con Recycler 102 (49% -55%). El efecto de un surfactante no iónico en el suelo modificado con residuos verdes fue variable (52% -72% de reducción de TPH), pero se demostró su potencial para mejorar la biodegradación al promover la biodisponibilidad de contaminantes. La alta degradación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) agregados artificialmente ocurrió después de 106 días (75% -84%), pero las diferencias significativas entre el control y los tratamientos no fueron aparentes.

Lladó et al. (2012), en su investigación denominada “A diversified approach to evaluate biostimulation and bioaugmentation strategies for heavy-oil-contaminated soil”, señalan que con el objetivo de mejorar la degradación de los hidrocarburos, ensayaron los siguientes tratamientos de biorremediación: i) adición de nutrientes inorgánicos; ii) adición del biosurfactant MAT10 a base de ramnolípidos; iii) inoculación de un consorcio microbiano (TD) degradador de hidrocarburos alifáticos; y iv) la inoculación de una cepa conocida del hongo de la podredumbre blanca de *Trametes versicolor*. Después de 200 días, todos los ensayos de biorremediación lograron entre un 30% y un 50% de biodegradación de hidrocarburos de petróleo (TPH), con la inoculación de *T. versicolor* que más la degradó. La bioestimulación y la inoculación de *T. versicolor* promovieron el género *Brevundimonas* al mismo tiempo que otras α -proteobacterias, β proteobacterias y *Cytophaga Flexibacter-Bacteroides* (CFB), así como los grupos *Actinobacteria*. Sin embargo, la inoculación de *T. versicolor*, que produjo la mayor

degradación de hidrocarburos en el suelo, también promovió grupos bacterianos grampositivos autóctonos, como *Firmicutes* y *Actinobacteria*.

Pino et al. (2012), en su estudio llamado “Comparación entre bioestimulación y bioaumentación para la recuperación de suelos contaminados con Diesel*”, señalan que el objetivo del trabajo fue evaluar la biorremediación con bioestimulación y bioaumentación como metodología para la recuperación de suelos contaminados con Diesel. Durante 30 días se monitoreó la concentración de microorganismos, y de hidrocarburos dando como resultado que el mejor tratamiento fue el de adición de nutrientes con cáscara de banano, logrando una degradación del 93%, la más alta con respecto a los otros tratamientos. Los resultados sugieren que una adecuada aplicación de nutrientes contribuye al desarrollo de la población microbiana en el suelo con capacidad de degradar Diesel aumentando la efectividad del proceso.

García et al. (2011), en su trabajo titulado “Evaluación de la bioestimulación (nutrientes) en suelos contaminados con hidrocarburos utilizando respirometría”, evidencian que se evaluó el proceso de bioestimulación por nutrientes utilizando fertilizantes inorgánicos compuestos (FIC) N:P:K 28:12:7 y sales inorgánicas simples (SIS) NH_4NO_3 y K_2HPO_4 en suelos contaminados con hidrocarburos utilizando respirometría. El suelo fue contaminado con lodos aceitosos a una concentración 40.000 mgTPH/kgps. Para cuantificar el consumo de oxígeno se utilizaron dos respirómetros de medición manométrica HACH® 2173b y OXITOP® PF600 durante ensayos de 13 días (n=3). Se analizaron parámetros fisicoquímicos (pH, nutrientes y TPH) y microbiológicos (heterótrofos y degradadores) al inicio y al final de cada ensayo. SIS y el control sin nutrientes presentaron las mayores tasas de respiración, en el equipo HACH se obtuvieron valores de 802,28 y 850,72 mgO₂kgps-1d-1 respectivamente, y en OXITOP fueron de 936,65 y 502,05 mgO₂kgps-1d-1, respectivamente, indicando que los nutrientes de SIS estimularon el metabolismo microbiano. Por otro lado, FIC presentó los recuentos y tasas de respiración más bajas (188,18 y 139,87 mgO₂kgps⁻¹d⁻¹ en HACH y OXITOP, respectivamente), esto pudo estar relacionado a un efecto inhibitorio generado por la acumulación de amoníaco, limitando el crecimiento de la población degradadora.

Couto et al. (2010), en su investigación denominada “Mesocosm trials of bioremediation of contaminated soil of a petroleum refinery: comparison of natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation”, mencionan que para evaluar la

eficiencia de la biorremediación se realizaron los siguientes procedimientos de la siguiente manera: (1) atenuación natural; (2) aireación manual; (3) bioestimulación agregando (3.1) solo nutrientes; y (3.2) nutrientes y un surfactante no iónico; y (4) la bioaumentación en presencia de (4.1) nutrientes agregados o (4.2) nutrientes y un surfactante no iónico se evaluaron después de un período de 9 meses de experimento. Para la bioaumentación, se utilizó un producto bacteriano comercial. Para la evaluación de la degradación de TPH, el suelo se dividió en cuatro fracciones correspondientes a diferentes profundidades: 0–5; 5–10; 10–15; y 15–20 cm. Los valores medios de los porcentajes de degradación de PHC variaron entre 20 y 50% en la superficie y entre 10 y 35% por debajo de 5 cm de profundidad. La atenuación natural fue tan eficiente como la mayoría de los tratamientos probados (aproximadamente el 30% de degradación de TPH) que se superaron solo por bioaumentación combinada con nutrientes y agentes tensioactivos (aproximadamente el 50% de degradación de TPH). Una mayor degradación de TPH en la superficie sugiere que una combinación de suficiente dióxígeno propicia para la degradación aeróbica, con luz solar necesaria para la producción de oxidantes fotoquímicos fuertes como el ozono, contribuyó a mejorar la degradación. Una combinación de suelo que gira con bioaumentación junto con nutrientes y enmiendas de surfactante puede resultar en una mejora adicional de la tasa de degradación de PHC.

Xu & Lu (2010), en su trabajo titulado “Bioremediation of crude oil-contaminated soil: Comparison of differen biostimulation and bioaugmentation treatments”, señalan que la bioestimulación con fertilizante inorgánico y la bioaumentación con hidrocarburos que utilizan bacterias indígenas se emplearon como opciones de remediación durante 12 semanas en un suelo contaminado con petróleo crudo. La biodegradación se mejoró con el cultivo de bacterias de vida libre y el biportador con una eliminación total de hidrocarburos del petróleo que oscila entre el 26% y el 61% después de un tratamiento de 12 semanas. La eliminación de aceite también se mejoró cuando el polvo de cáscara de maní solo se usó como agente de carga, lo que aceleró la velocidad de transferencia de masa de agua, oxígeno, nutrientes e hidrocarburos, y proporcionó nutrición para la microflora. La actividad de la deshidrogenasa en el suelo se mejoró notablemente mediante la aplicación de material portador.

Gómez et al. (2009), en su estudio denominado “Evaluación de la bioestimulación frente a la atenuación natural y la bioaumentación en un suelo contaminado con

una mezcla de gasolina - Diesel”, evidencian que se realizó la biorremediación de un suelo contaminado con la mezcla de combustibles gasolina-Diesel a escala de laboratorio, para evaluar la bioestimulación frente a la atenuación natural y la bioaumentación. La reducción en la concentración de los Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP) en un periodo de tres meses fue del 52,79 % para el tratamiento por atenuación natural, 60,45 % para el tratamiento por bioestimulación y del 64,92 % para el tratamiento por bioaumentación. Para la inoculación del tratamiento por bioaumentación se aisló una bacteria con capacidad para degradar hidrocarburos, la cual fue identificada como *Bacillus sp.*

2.2. Marco conceptual

2.2.1. Suelo

Según Ramírez (1997), el suelo es una combinación de componentes naturales que incluyen materiales orgánicos y minerales que cubren una gran parte de la superficie terrestre. El suelo es fundamental para el crecimiento de la vegetación en áreas abiertas y en lugares modificados por la actividad humana, y contiene una variedad de materiales vivos. El suelo es un sistema abierto, trifásico y tridimensional. De acuerdo con Smith y Smith (2007) la formación del suelo comienza con la meteorización de las rocas y los minerales, que incluye tanto la degradación mecánica de los materiales rocosos como su modificación química. La meteorización mecánica es causada por la acción combinada del agua, el viento y la temperatura, que fragmentan la superficie de las rocas. La meteorización química, por otro lado, se refiere a la alteración de los minerales por reacciones químicas., las partículas transportadas por el viento, como el polvo y la arena, también pueden contribuir al desgaste de la superficie de la roca.

- **Composición del suelo**

Lladó Fernández (2012), propone que el suelo es un medio altamente complejo que se compone principalmente de tres fases: sólida, líquida y gaseosa. Estas fases pueden organizarse de diversas formas y adquirir diferentes proporciones para dar lugar a una gran variedad de tipos de suelo. Una de las formas de clasificación de los suelos es según el tamaño de las partículas que forman su fase sólida, tal como se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de las partículas del suelo, según sistemas de USA e Internacional (Sierra, 2019).

Fracción de suelo	Sistema del Dpto. USA	Sistema internacional
	Diámetro en mm	Diámetro en mm
Arena muy gruesa	1,0 – 2,0	
Arena gruesa	0,5 – 1,0	0,2 – 2,0
Arena mediana	0,25 – 0,5	
Arena fina	0,1 – 0,25	0,02 – 0,2
Arena muy fina	0,1 – 0,005	0,002 – 0,02
Limo	0,002 – 0,05	
Arcilla	< 0,002	< 0,002

Piedras y graba > 2,0 mm, ya no son considerados como parte del suelo.

De acuerdo con Lladó Fernández (2012), la materia orgánica y los compuestos minerales presentes en el suelo se disponen en el espacio formando una estructura porosa que puede contener agua y aire. El agua que se encuentra en estos poros contiene sales minerales y nutrientes, lo que permite el desarrollo de la actividad metabólica de los microorganismos que habitan el suelo.

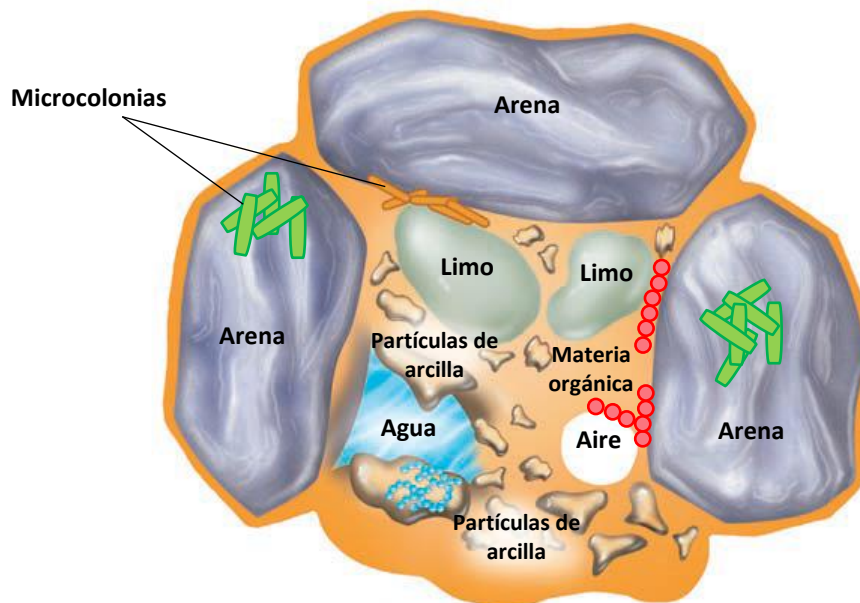


Figura 1. Esquema de un hábitat microbiano del suelo (Madigan et al., 2015).

2.2.2. Petróleo

La comunidad de Madrid (2002), explican que la historia del petróleo se remonta a hace más de 200 millones de años, cuando gran parte de la Tierra estaba cubierta de agua. Los procesos geológicos y la acción bacteriana sobre la materia

orgánica en el fondo del mar dieron origen a esta mezcla de hidrocarburos que ha sido fundamental para el desarrollo de la sociedad occidental moderna. El petróleo es un líquido viscoso, que puede ser verde, amarillo, marrón o negro, y está compuesto por hidrocarburos con diferentes proporciones de átomos de carbono e hidrógeno. Aunque siempre hay hidrocarburos en los yacimientos petrolíferos, no se han encontrado nunca dos yacimientos con exactamente la misma composición, debido a la presencia de otros compuestos orgánicos con elementos como el azufre, el níquel o el vanadio.

- **Composición del petróleo crudo**

Composición general

Según Cárdenas (2017), Caselles y sus colaboradores (1995), señalaron que el petróleo crudo es una sustancia líquida de color oscuro y alta viscosidad que posee una compleja composición, compuesta principalmente por hidrocarburos. Estos compuestos representan entre el 50 y el 98% de la composición del petróleo, lo que lo convierte en uno de los principales contaminantes en diferentes ambientes. Asimismo, indicaron que la composición elemental del petróleo crudo está compuesta principalmente por carbono, hidrógeno, azufre, oxígeno y nitrógeno, en proporciones que oscilan entre el 84 y el 87%, el 11 y el 14%, el 0 y el 8%, y el 0 y el 4%, respectivamente. Los principales componentes del petróleo están divididos en grupos, tal como se muestra en la Tabla 2:

Tabla 2. Composición de las fracciones químicas contenidas en un crudo de petróleo (Casellas y cols., 1995 citado por Cárdenas 2017).

Fracción	Composición
Saturados	n-alcanos, alcanos ramificados e isoprenoides y cicloparafinas o cicloalcanos, hopanos.
Aromáticos	Monoaromáticos, diaromáticos, hidrocarburos aromáticos Policíclicos
Resinas	Agregado de piridinas, quinilinas, carbazonles, tiofenos, sulfóxidos y amidas
Asfaltenos	Agregados de HAP, ácidos naftalénicos, sulfuros, ácidos grasos, metaloporfirinas, fenoles polihidratados

Composición por familias de hidrocarburos

Según Torres y Zuluaga (2009), Clarck y Brown (1977) y Howe-Grant (1996), nos mencionan que el estudio más detallado del petróleo agrupó los hidrocarburos del petróleo en diferentes familias. Estas familias incluyen parafinas volátiles (alcanos

no ramificados y ramificados, hasta C₁₀), parafinas no volátiles (alcanos lineales y ramificados entre C₁₀- C₄₀), naftenos (cicloalcanos o cicloparafinas), oleofinas (alquenos) y aromáticos (monoaromáticos y poliaromáticos). Asimismo, componentes de las resinas y los asfaltenos se clasifican en un grupo aparte.

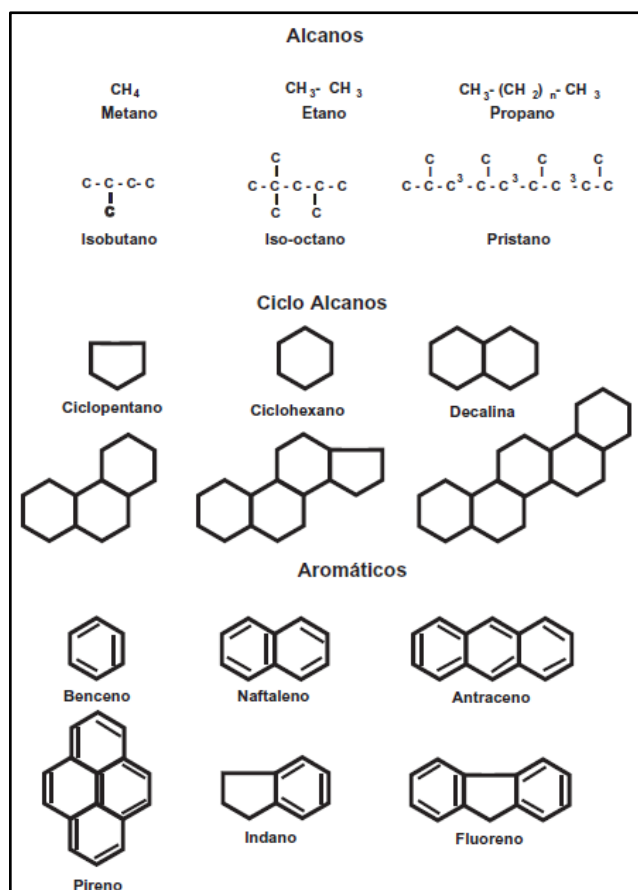


Figura 2. Estructura química de los principales grupos de hidrocarburos del petróleo (Botello, 2005).

De acuerdo con lo propuesto por Howe-Grant (1996) y mencionada por Torres y Zuluaga (2009), los hidrocarburos del petróleo se agrupan en diferentes familias:

- **Parafinas volátiles**

Representan hasta un 30% del crudo de petróleo. Son n-alcanos e isoprenoides (alcanos ramificados) de un tamaño C₁-C₁₀ (de 1 a 10 átomos de carbono). Es la fracción más volátil del crudo y por lo tanto la más susceptible de pérdidas abióticas por volatilización.

- **Parafinas no volátiles**

Son aquellos n-alcanos e isoprenoides entre C_{11} - C_{40} . Los componentes entre C_{11} - C_{15} son de volatilidad intermedia. Los n-alcanos oscilan entre C_{11} - C_{40} , aunque se han descrito cadenas más largas y pueden constituir entre el 15-20% de crudos no degradados. Los isoprenoides varían de C_{12} - C_{22} y constituyen entre 1-2% del crudo, llegando a 15% en crudos degradados.

- **Naftenos (cicloalcanos)**

Esta familia está compuesta por las cicloparafinas o cicloalcanos. Los compuestos más abundantes de esta familia son los ciclopentanos alquilados (fundamentalmente metilados), que pueden llegar a representar un 31% del crudo. Los compuestos mono y dicíclicos corresponden al 50-55% de esta fracción, los tricíclicos al 20% y los tetracíclicos al 25%.

- **Oleofinas (alquenos)**

Están poco presentes en el crudo de petróleo, encontrándose en concentraciones traza. Adquieren importancia en los productos resultantes del refinado, ya que se generan durante el proceso de cracking, existiendo hasta un 30% en gasolinas y un 1% en fueles.

- **Hidrocarburos aromáticos**

El crudo de petróleo contiene una mezcla muy compleja de hidrocarburos aromáticos. Esta fracción la componen moléculas que contienen uno o varios anillos bencénicos en su estructura. Así encontramos hidrocarburos monoaromáticos (un anillo bencénico), diaromáticos (2 anillos bencénicos) y poliaromáticos (HAPs, con más de dos anillos bencénicos).

- **Resinas y asfáltenos**

Se trata de mezclas complejas, integradas por núcleos policíclicos o naftenoaromáticos. Contienen cadenas hidrocarbonadas con heteroátomos de oxígeno, nitrógeno y azufre (componentes NOS del petróleo) y a veces están asociadas con pequeñas concentraciones de metales como el vanadio y el níquel. Constituyen entre un 10% en crudos poco degradados o ligeros, hasta un 60% en crudos muy degradados.

2.2.3. Petróleo y la biodegradación microbiana

Según Dua et al. (2002) mencionado por Vallejo et al. (2005), la presencia de hidrocarburos en el ambiente representa graves problemas tanto para los ecosistemas como para las compañías. Por lo tanto, es necesario buscar y aplicar

procesos como la biorremediación, la cual proporciona una solución segura, efectiva y económica para remediar los suelos contaminados con petróleo. El objetivo principal de la biorremediación es acelerar la degradación total o parcial del contaminante orgánico, disminuyendo su toxicidad, movilidad e impacto ambiental.

Vallejo et al. (2005), indican que la degradación microbiana es uno de los procesos más importantes de descontaminación natural, que puede ser mejorado mediante la aplicación de tecnologías de biorremediación. El petróleo crudo es un contaminante complejo que contiene una variedad de compuestos, lo que lo hace útil como un sustrato para evaluar el potencial de las cepas microbianas de interés en la biorremediación.

- **Consortio microbiano**

Según Ochoa y Montoya (2010), un consorcio microbiano es una comunidad natural formada por dos o más poblaciones microbianas de diferentes especies que actúan juntas en un sistema complejo y que se benefician de las actividades de los demás. La asociación refleja un estilo de vida sinérgico o sintrófico en el que el crecimiento y el flujo de nutrientes se llevan a cabo de manera más efectiva y eficiente que en poblaciones individuales. Los consorcios microbianos pueden realizar funciones complicadas que las poblaciones individuales no pueden, y la vida en asociación puede aumentar la resistencia a las fluctuaciones ambientales y promover la estabilidad de los miembros. Los miembros del consorcio se comunican entre sí mediante el intercambio de sustancias o señales moleculares y ejercen un control positivo o negativo sobre el crecimiento y el metabolismo de otros miembros. La producción total del consorcio depende de la combinación de tareas realizadas por los miembros individuales. Los consorcios también tienen la capacidad de realizar funciones que requieren múltiples pasos gracias a especies microbianas especializadas. Esta información se puede observar en la Figura 3.

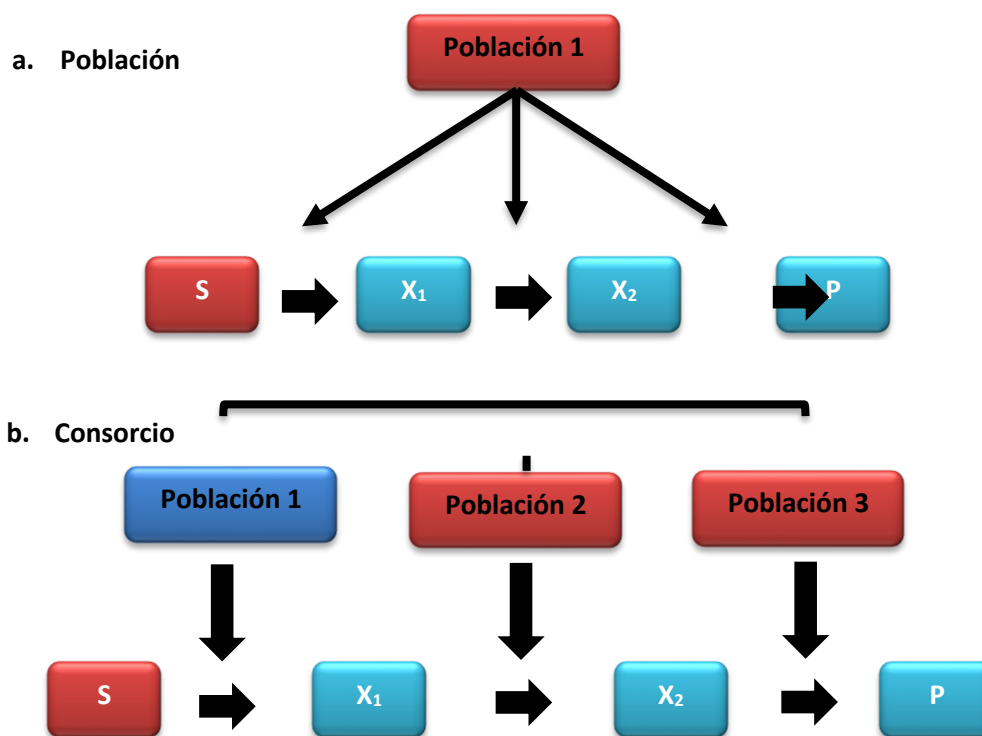


Figura 3. Procesamiento de reacciones complejas por (a) una población o (b) un consorcio microbiano (Ochoa & Montoya, 2010).

La generación de un producto (P) puede requerir de múltiples pasos para convertir el sustrato (S), a través de la síntesis secuencial de intermediarios (X_1 y X_2). (a) Una población individual es responsable de la síntesis de todas las enzimas necesarias para llevar a cabo las reacciones intermedias. (b) Cada población está dedicada a un solo paso. Las reacciones desempeñadas por cada población pueden coordinarse por la comunicación intercelular. Un consorcio microbiano como el que se ilustra en (b) tiene dos ventajas potenciales. Primero, limita el número de elementos externos en cada población, lo cual protege de un desequilibrio metabólico. Tal desequilibrio, con frecuencia, deriva en un retardo del crecimiento y en una baja producción. Segundo, la división del trabajo simplificará la optimización de cada reacción en la conversión, mediante la especialización de la maquinaria bioquímica de cada población (Ochoa & Montoya, 2010).

- **Biorremediación**

Madigan et al. (2015), definen la biorremediación como el proceso microbiano para la eliminación de contaminantes ambientales, ya sean materiales naturales como los productos derivados del petróleo, o químicos xenobióticos. Este proceso

estimula las actividades de los microorganismos autóctonos en el medio ambiente. Si bien existen muchas sustancias tóxicas que pueden ser eliminadas mediante la biorremediación, los mayores logros se han observado en la eliminación de vertidos de petróleo crudo o fugas de grandes tanques de almacenamiento de hidrocarburos.

- **Metabolismo aeróbico de hidrocarburos**

Oxigenasas y oxidación de hidrocarburos alifáticos.

Las oxigenasas son enzimas que facilitan la incorporación de oxígeno molecular (O_2) a compuestos orgánicos e inorgánicos. Existen dos clases principales de oxigenasas: las dioxigenasas, que incorporan ambos átomos de O_2 en la molécula, y las monooxigenasas, que introducen solo uno de los dos átomos de O_2 en un compuesto orgánico, reduciendo el segundo átomo de O_2 a agua, para la mayoría de las monooxigenasas, el donante de electrones requerido es NADH o NADPH (Madigan et al., 2015).

En el proceso inicial de oxidación de un hidrocarburo alifático saturado, un átomo de O_2 se incorpora típicamente en un átomo de carbono terminal, catalizado por una monooxigenasa. El producto resultante es un ácido graso de la misma longitud que el hidrocarburo original. Posteriormente, el ácido graso se somete a la beta-oxidación, que implica la separación de dos carbonos del ácido graso en cada paso. Durante este proceso, se genera NADH, que luego se utiliza en la cadena de transporte de electrones para la conservación de energía. Cada ciclo de beta-oxidación libera acetil-CoA y un nuevo ácido graso dos carbonos más cortos que el original. El acetil-CoA producido en la beta-oxidación se oxida a través del ciclo del ácido cítrico o se destina a la síntesis de nuevos componentes celulares (Madigan et al., 2015).

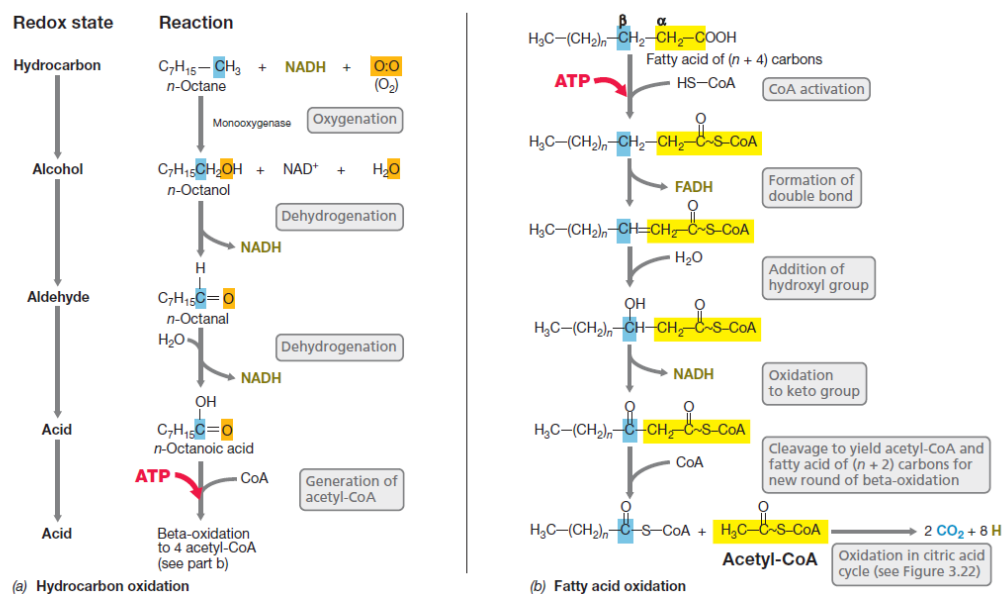


Figura 4. Actividad monooxigenasa y beta oxidación. (a) Pasos en la oxidación de un hidrocarburo alifático, el primero de los cuales está catalizado por una monooxigenasa. (b) La oxidación de ácidos grasos por beta-oxidación conduce a la formación sucesiva de acetyl-CoA (adaptado de Madigan et al., 2015).

Factores que influyen en la biorremediación

Los factores ambientales que se requieren para crear condiciones ideales de crecimiento microbiano incluyen, según Rodríguez (2008):

- pH: Afecta de manera importante la actividad microbiana. No existen condiciones preestablecidas que sean óptimas para todos los tipos de microorganismos, pero en general el crecimiento es efectivo en un intervalo de pH entre 6.0 y 8.0.
- Temperatura: Uno de los factores más importantes que afecta el metabolismo de los microorganismos y la tasa de biodegradación. Las bacterias crecen en intervalos de temperatura entre 20 y 30 °C (condiciones mesófilas). En temperaturas superiores a 40°C decrece la biodegradación por desnaturalización de las enzimas y se inhibe a temperaturas menores de 0°C.
- Humedad: Se requieren condiciones mínimas de humedad para el crecimiento de microorganismos. El agua es un elemento fundamental en la estructura bacteriana (protoplasma) y una de sus funciones es ser medio de transporte de compuestos orgánicos y nutrientes hasta el interior de la célula. Cuando hay exceso de humedad se inhibirá el crecimiento bacteriano por reducción en la concentración del oxígeno en el suelo.

- Oxígeno: Empleado en procesos biológicos e importante en ciertas reacciones de oxidación -reducción catalizada por enzimas. Los microorganismos oxidan compuestos orgánicos e inorgánicos, de donde obtienen energía para cumplir con sus funciones para el crecimiento. En este proceso de oxidación se liberan electrones que ayudan a una cadena de reacciones al interior de la bacteria. Un ejemplo en el metabolismo aerobio el oxígeno (O_2) es el aceptor y el agua (H_2O) es el producto.
- Importancia de nutrientes inorgánicos: El metabolismo microbiano se dirige principalmente a la reproducción y requieren que los nutrientes se encuentren disponibles para ser asimilados y sintetizados. Entre los más importantes están el fósforo y el nitrógeno.

- **Microorganismos degradadores de HTPs**

Según Lladó Fernández (2012), actualmente se han descrito numerosos géneros bacterianos como capaces de degradar HAPs, con una gran diversidad de bacterias capaces de degradar los HAPs de bajo peso molecular. Aunque en los últimos veinte años se ha avanzado mucho en el conocimiento del metabolismo bacteriano de HAPs, el conocimiento actual sobre el metabolismo fúngico es mucho menor. No obstante, en la biorremediación de HAPs en ambientes acuáticos y en suelos, los hongos son igual de importantes que las bacterias. En la Tabla 3 se presentan los principales microorganismos degradadores de petróleo.

Tabla 3. Bacterias reportadas en biorremediación de suelos y agua contaminados con hidrocarburos (Rodríguez Gonzales, Zarate Villarro, & Bastida Codina, 2022) (García y Aguirre, 2014).

Bacteria biorremediadora	
<i>Acidovorax carolinensis</i>	<i>Ochrobactrum intermedium</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Planctomyces</i> sp.
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Planococcus</i>
<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Pseudomona putida</i>
<i>Actinobacteria</i>	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>
<i>Actinomycetes</i>	<i>Pseudomonas butanavora</i>
<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.
<i>Alcanivorax borkumensis</i>	<i>Ralstonia picketii</i>
<i>Alcanivorax dieselolei</i>	<i>Ralstonia</i> sp.
<i>Alcanivorax hongdengensis</i>	<i>Rhizobium pakna-mense</i>
<i>Altererythrobacter</i> sp.	<i>Rhizobium</i> sp.
<i>Alteromonas</i> sp.	<i>Rhizobium tropici</i>
<i>Arthrobacter</i> sp.	<i>Rhodococcus aetherivorans</i>
<i>Bacillus</i> sp.	<i>Rhodococcus jostii</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Rhodococcus opacus</i>
<i>Burkholderia kururiensis</i>	<i>Rhodococcus</i> sp.
<i>Burkholderia</i> sp.	<i>Rhodococcus wratislaviensis</i>
<i>Burkholderia unamae</i>	<i>Rhodococcus aetherivorans</i>
<i>Burkholderia xenovorans</i>	<i>Rhodococcus opacus</i>
<i>Dietzia</i>	<i>Sinorhizobium</i> sp.
<i>Janibacter</i> sp.	<i>Sphingobium yanoikuyae</i>
<i>Micrococcus</i> sp.	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
<i>Mycobacterium Gilvum</i>	<i>Sphingomonas</i> sp.
<i>Mycobacterium</i> sp.	<i>Sphingomonas Paucimobilis</i>
<i>Mycobacterium Gilvum</i>	<i>Stenotrophomonas</i>
<i>Nocardioides</i> sp. Strain	<i>Yersinia frederiksenii</i>
<i>Novosphingobiumaromaticivorans</i>	

2.2.4. Marco Legal

En el Decreto Supremo N° 011-2017-MINAM, se establecen los Límites Máximos Permisibles para parámetros orgánicos e inorgánicos de muestras de suelo; donde se indica que los hidrocarburos de petróleo deben tener como Límites Máximos Permisibles valores que van de 200 a 6 000 mg/kg de peso seco, de

acuerdo con el uso de suelo y tipo de fracción de hidrocarburo (Decreto Supremo N° 011-2017-MINAM, 2017).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación

El trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Microbiología Ambiental del Área Académica de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga

3.2. Procedencia de las cepas microbianas

Los inóculos empleados en el estudio fueron obtenidos del cepario del Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Escuela Profesional de Biología de la UNSCH. Para la selección de las cepas utilizadas en el trabajo, se tuvieron en cuenta trabajos previos realizados, y uno de los criterios utilizados fue la capacidad de biodegradación de petróleo Diesel que presentaron dichas cepas en investigaciones anteriores. En base a este criterio, se seleccionaron las siguientes cepas:

- Código: C1
- Código: C2
- Código: C3

3.3. Ensayos de degradación del petróleo Diesel

3.3.1. Preparación del inóculo de las cepas

Los inóculos de las cepas fueron obtenidos siguiendo el protocolo descrito por Vásquez et al. (2010) y Narváez et al. (2008):

- Se seleccionó una cepa del cepario y se realizó su reactivación.
- Los inóculos de las cepas fueron preparados realizando la resuspensión de la cepa en 10 mL de caldo nutritivo y se incubó a 37°C durante 24 h para obtener un cultivo joven.
- Luego, se añadió el cultivo joven a 612 mL de caldo nutritivo (dependiendo del tratamiento que se esté preparando, se agregaron 612, 306 o 204 mL de caldo nutritivo) y se incubó a 37°C hasta alcanzar una concentración de 15×10^8 UFC/mL en la escala de Mc Farland.

- Una vez que se obtuvo la concentración deseada, se conservó la solución para su posterior inoculación en los diferentes tratamientos.
- Estos pasos se repitieron para cada una de las cepas de acuerdo con la cantidad de inóculo requerida, según se indica en la Tabla 4.

Tabla 4. Cantidad en mL que se preparó de cada cepa en caldo nutritivo para los distintos tratamientos.

TRATAMIENTO	CEPAS		
	C1	C2	C3
M1	612mL		
M2		612mL	
M3			612mL
M12	306mL	306mL	
M13	306mL		306mL
M23		306mL	306mL
M123	204mL	204mL	204mL

3.3.2. Preparación de la muestra de arena fina

Se recolectaron muestras de arena fina y se procedió a su preparación de la siguiente manera:

- La muestra de arena fina fue recolectada en bolsas de polietileno, con un peso de 850 g por bolsa. Luego, se procedió a esterilizar la muestra para eliminar los microorganismos presentes.
- Después de 24 h a la esterilización, se colocó 850 g de muestra de arena fina en cada taper con dimensiones de 20cm x 15cm x 10cm (largo, ancho y alto).
- Se formaron cuatro grupos de 84 tapers cada uno, y una vez que se tuvo un grupo completo de 84 tapers, se dividió en cuatro subgrupos de 21 tapers cada uno. A cada subgrupo se le agregó petróleo Diesel en diferentes concentraciones (5%, 10%, 15% y 20%, respectivamente), con el objetivo de obtener las diferentes concentraciones en cada subgrupo para los tres tratamientos que se habían formado inicialmente.

3.3.3. Preparación de las concentraciones de petróleo Diesel

Una vez que se preparó la muestra de suelo y el inóculo, se llevó a cabo el procedimiento indicado en las tablas 5, 6, 7 y 8.

Tabla 5. Preparación de los tratamientos para nitrato de amonio.

TRATAMIENTO	Muestra de arena fina (g)	% PD			
		5%	10%	15%	20%
M1*	850**	M1-5A	M1-10A	M1-15A	M1-20A
	850**	M1-5B	M1-10B	M1-15B	M1-20B
	850**	M1-5C	M1-10C	M1-15C	M1-20C
M2*	850**	M2-5A	M2-10A	M2-15A	M2-20A
	850**	M2-5B	M2-10B	M2-15B	M2-20B
	850**	M2-5C	M2-10C	M2-15C	M2-20C
M3*	850**	M3-5A	M3-10A	M3-15A	M3-20A
	850**	M3-5B	M3-10B	M3-15B	M3-20B
	850**	M3-5C	M3-10C	M3-15C	M3-20C
M12*	850**	M12-5A	M12-10A	M12-15A	M12-20A
	850**	M12-5B	M12-10B	M12-15B	M12-20B
	850**	M12-5C	M12-10C	M12-15C	M12-20C
M13*	850**	M13-5A	M13-10A	M13-15A	M13-20A
	850**	M13-5B	M13-10B	M13-15B	M13-20B
	850**	M13-5C	M13-10C	M13-15C	M13-20C
M23*	850**	M23-5A	M23-10A	M23-15A	M23-20A
	850**	M23-5B	M23-10B	M23-15B	M23-20B
	850**	M23-5C	M23-10C	M23-15C	M23-20C
M123*	850**	M123-5A	M123-10A	M123-15A	M123-20A
	850**	M123-5B	M123-10B	M123-15B	M123-20B
	850**	M123-5C	M123-10C	M123-15C	M123-20C

1. **A:** repetición uno del tratamiento.
2. **B:** repetición dos del tratamiento.
3. **C:** repetición tres del tratamiento.
4. **%PC:** porcentaje de petróleo Diesel en cada subtratamiento.
5. *****: contienen 50 mL de microorganismos aislados a partir del consorcio.
6. ******: concentración de nitrato de amonio (0,06g/Kg)

Tabla 6. Preparación de los tratamientos para superfosfato triple.

TRATAMIENTO	Muestra de arena fina (g)	% PD			
		5%	10%	15%	20%
M1*	850**	M1-5A	M1-10 ^a	M1-15A	M1-20A
	850**	M1-5B	M1-10B	M1-15B	M1-20B
	850**	M1-5C	M1-10C	M1-15C	M1-20C
M2*	850**	M2-5A	M2-10 ^a	M2-15A	M2-20A
	850**	M2-5B	M2-10B	M2-15B	M2-20B
	850**	M2-5C	M2-10C	M2-15C	M2-20C
M3*	850**	M3-5A	M3-10 ^a	M3-15A	M3-20A
	850**	M3-5B	M3-10B	M3-15B	M3-20B
	850**	M3-5C	M3-10C	M3-15C	M3-20C
M12*	850**	M12-5A	M12-10A	M12-15A	M12-20 ^a
	850**	M12-5B	M12-10B	M12-15B	M12-20B
	850**	M12-5C	M12-10C	M12-15C	M12-20C
M13*	850**	M13-5A	M13-10A	M13-15A	M13-20 ^a
	850**	M13-5B	M13-10B	M13-15B	M13-20B
	850**	M13-5C	M13-10C	M13-15C	M13-20C
M23*	850**	M23-5A	M23-10A	M23-15A	M23-20 ^a
	850**	M23-5B	M23-10B	M23-15B	M23-20B
	850**	M23-5C	M23-10C	M23-15C	M23-20C
M123*	850**	M123-5A	M123-10A	M123-15A	M123-20 ^a
	850**	M123-5B	M123-10B	M123-15B	M123-20B
	850**	M123-5C	M123-10C	M123-15C	M123-20C

1. A: repetición uno del tratamiento.

2. B: repetición dos del tratamiento.

3. C: repetición tres del tratamiento.

4. %PC: porcentaje de petróleo Diesel en cada subtratamiento.

5. *: contienen 50 mL de microorganismos aislados a partir del consorcio.

6. **: concentración de superfosfato triple (0,048g/Kg)

Tabla 7. Preparación de los tratamientos para el control positivo.

TRATAMIENTO	Muestra de arena fina (g)	% PD			
		5%	10%	15%	20%
M1*	850	M1-5A	M1-10A	M1-15A	M1-20A
	850	M1-5B	M1-10B	M1-15B	M1-20B
	850	M1-5C	M1-10C	M1-15C	M1-20C
M2*	850	M2-5A	M2-10A	M2-15A	M2-20A
	850	M2-5B	M2-10B	M2-15B	M2-20B
	850	M2-5C	M2-10C	M2-15C	M2-20C
M3*	850	M3-5A	M3-10A	M3-15A	M3-20A
	850	M3-5B	M3-10B	M3-15B	M3-20B
	850	M3-5C	M3-10C	M3-15C	M3-20C
M12*	850	M12-5A	M12-10A	M12-15A	M12-20A
	850	M12-5B	M12-10B	M12-15B	M12-20B
	850	M12-5C	M12-10C	M12-15C	M12-20C
M13*	850	M13-5A	M13-10A	M13-15A	M13-20A
	850	M13-5B	M13-10B	M13-15B	M13-20B
	850	M13-5C	M13-10C	M13-15C	M13-20C
M23*	850	M23-5A	M23-10A	M23-15A	M23-20A
	850	M23-5B	M23-10B	M23-15B	M23-20B
	850	M23-5C	M23-10C	M23-15C	M23-20C
M123*	850	M123-5A	M123-10A	M123-15A	M123-20A
	850	M123-5B	M123-10B	M123-15B	M123-20B
	850	M123-5C	M123-10C	M123-15C	M123-20C

1. A: repetición uno del tratamiento.

2. B: repetición dos del tratamiento.

3. C: repetición tres del tratamiento.

4. %PC: porcentaje de petróleo Diesel en cada subtratamiento.

5. *: contienen 50 mL de microorganismos aislados a partir del consorcio.

Tabla 8. Preparación de los tratamientos para el control negativo.

TRATAMIENTO	Muestra de arena fina (g)	% PD			
		5%	10%	15%	20%
T1	850	T1-5A	T1-10 ^a	T1-15A	T1-20A
	850	T1-5B	T1-10B	T1-15B	T1-20B
	850	T1-5C	T1-10C	T1-15C	T1-20C

1. A: repetición uno del tratamiento.

2. B: repetición dos del tratamiento.

3. C: repetición tres del tratamiento.

4. %PC: porcentaje de petróleo Diesel en cada subtratamiento.

3.3.4. Evaluación de los tratamientos

Los tratamientos fueron evaluados en intervalos de 14 días durante un período de 70 días para obtener información sobre la degradación del petróleo crudo.

3.4. Análisis de la arena fina sometida a degradación del petróleo Diesel

3.4.1. Determinación del porcentaje de humedad de la arena fina (Fernández et al., 2006)

En la medición de la cantidad de agua presente en los suelos, se utilizó el método gravimétrico. El proceso llevado a cabo fue el siguiente:

- Se pesó 1 g de muestra sobre un papel o charola de aluminio a peso constante.
- Posteriormente, la muestra fue sometida a una temperatura de 80°C en la estufa durante un tiempo de 12 a 24 h.
- Después de sacar la muestra de la estufa, se enfrió en un desecador y se pesó junto con el papel.
- Los porcentajes de humedad en el suelo se calcularon mediante la diferencia de pesos utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Humedad del suelo} = (\text{peso inicial} - \text{peso final}) / \text{peso inicial} * 100$$

3.4.2. Preparación de las muestras de arena fina para la extracción de petróleo Diesel (Fernández et al., 2006)

Aunque el análisis de hidrocarburos puede hacerse con muestras húmedas, se recomienda secarlas y molerlas para obtener muestras más homogéneas. El secado de suelo para extracción fue llevado a cabo de la siguiente manera:

- La muestra (5-10g de arena fina) fue extendida en papel aluminio y puesta a secar a 30°C, a la sombra, durante 48 h.
- Luego, la muestra fue molida en un mortero hasta obtener partículas finas.
- Finalmente, la muestra seca fue colocada en un frasco seco y limpio.

3.4.3. Extracción del petróleo Diesel mediante la técnica agitación-centrifugación (Fernández et al., 2006)

El método utilizado se basó en la extracción de hidrocarburos no volátiles y semivolátiles de muestras sólidas (arena fina), mediante la agitación de la muestra con un solvente en un matraz o tubo para producir extracciones sucesivas, y separando el solvente del suelo por centrifugación. El proceso de extracción se llevó a cabo de la siguiente manera:

- Se tomó una muestra de 2 g de arena fina seca y previamente triturada en un mortero, y se colocó en un tubo eppendorf para centrifugar de 15mL. A esta muestra se le agregaron 3g de Na_2SO_4 anhidro, y se mezcló con agitación en un vórtex hasta homogenizar.
- Se agregaron 5 ml de diclorometano y se volvió a agitar en el vórtex durante 45 segundos para que el solvente se incorporara bien con el suelo.
- La muestra se centrifugó a 150 x g durante 10 minutos. Luego se retiró el sobrenadante y se colocó en un vial de vidrio.
- Se lavó la arena fina dos veces más, y se obtuvieron aproximadamente 15 ml de sobrenadante (extracto orgánico).

3.4.4. Cálculo de los hidrocarburos totales del petróleo Diesel (HTPs) (Fernández et al., 2006)

El método gravimétrico es recomendado para la medición de HTPs en muestras muy aceitosas o acuosas que contienen hidrocarburos pesados, o cuando se utiliza el hexano como solvente. El procedimiento para la extracción y cuantificación de HTPs se llevó a cabo de la siguiente manera:

- Se puso a peso constante el vial donde se colocó el extracto orgánico obtenido. Para ello se colocó el vial en la estufa a 80°C durante 4 horas. Luego se retiró el vial y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se pesó el recipiente y se repitió el proceso hasta que el peso no cambiara, anotando el peso del recipiente (RA).
- Una vez que el extracto orgánico estuvo en un vial a peso constante, se evaporó completamente el solvente (diclorometano) en una estufa a 80°C durante 48 h.
- Se pesó nuevamente el vial con el extracto libre de solvente, anotando el peso (RB).

Para calcular la concentración de hidrocarburos totales del petróleo en la muestra, se consideró la cantidad de suelo que se utilizó para la extracción y la humedad de la muestra. El resultado se expresó en mg de HTP/kg de suelo seco y se calculó de la siguiente manera:

$$\text{HTPs (mg kg}^{-1} \text{ de s.s.)} = (\text{RB} - \text{RA}) * (\text{FC}) / (\text{P} * \text{FH}).$$

Donde:

- HTPs (mg kg⁻¹ de s.s.) = hidrocarburos totales del petróleo en mg/ kg de suelo seco.
- RA = peso (g) del recipiente vacío a peso constante.
- RB = peso (g) del recipiente con el extracto orgánico concentrado.
- P = cantidad de suelo extraído (g).
- FH = factor de corrección de humedad (1-(%humedad/100)).
- FC = factor de corrección para transformar a kg de s.s. = 1 000.

3.5. Identificación de microorganismos

Se trabajó con tres cepas catalogadas de la siguiente manera:

- C1 dos muestras (R1) (R2)
- C2 dos muestras (R1) (R2)
- C3 dos muestras (R1) (R2)

Todas las muestras fueron remitidas al laboratorio Umbrella Genomics Company para su identificación. En el cual se procedió de la siguiente manera para la extracción de ADN:

- Se recolectó una muestra de 1 mL de un cultivo bacteriano joven en un tubo estéril de 1,5 mL. Posteriormente, esta muestra fue sometida a una centrifugación a 800 x g durante 10 min. El sobrenadante resultante se trasvasó a un nuevo tubo estéril de 1,5 mL, y se procedió a eliminar el pellet.
- En una etapa posterior, se llevó a cabo una segunda centrifugación a 8 000 x g durante 15 min. Después de esto, se eliminó el sobrenadante y se procedió a eluir el pellet en 0,2 mL de PBS (Phosphate Buffer Saline).
- Seguidamente, se realizaron las siguientes acciones: se añadieron 0,18 mL de solución de Digestión y 0,02 mL de solución de Proteinasa K, y se homogeneizó la mezcla suavemente mediante un vortex. La mezcla se incubó a 56°C durante 40 minutos con agitación a 600 rpm.

- A continuación, se añadieron 0,02 mL de solución de RNasa A, y se homogeneizó nuevamente con un vortex suave, permitiendo una incubación adicional de 10 minutos a temperatura ambiente sin agitación.
- Posteriormente, se incorporaron 0,2 mL de solución de Lisis a la muestra. Se homogeneizó suavemente durante 30 segundos y se añadieron 0,4 mL de etanol al 50%, seguido de una homogeneización por vortex.
- La mezcla total se transfirió a una columna de purificación insertada en un microtubo colector de 2 mL, que se centrifugó a 6 000 x g durante 1 min. Luego, se desechó el tubo colector que contenía el líquido de desecho, y la columna de purificación se transfirió a un nuevo microtubo colector de 2 mL.
- En la siguiente etapa, se añadieron 0,5 mL de Wash Buffer I (que incluye etanol absoluto) y se sometió a una centrifugación a 8 000 x g. Nuevamente, se eliminó el tubo colector con el líquido de desecho, y la columna de purificación se transfirió a un nuevo microtubo colector de 2 mL.
- Seguidamente, se añadieron 0,5 mL de Wash Buffer II (que también contiene etanol absoluto) y se sometió a una centrifugación a 20 000 x g durante 3 minutos. Luego, se descartó el tubo colector que contenía el líquido de desecho, y la columna de purificación se transfirió a un microtubo de 1,5 mL.
- Finalmente, se añadieron 0,1 mL de Elution Buffer en el centro de la columna de purificación, y se incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente. Luego, se realizó una última centrifugación a 8 000 x g durante 1 minuto. La columna de purificación fue descartada, y el ADN extraído se almacenó a una temperatura de -20°C

Se evaluó la calidad del ADN extraído de las 08 muestras en función de su tamaño molecular. Luego, se llevó a cabo el PCR convencional utilizando primers universales para el Gen 16S rRNA. Posteriormente, se procedió al secuenciamiento del gen 16S rRNA. Este proceso de secuenciación del ADN del gen 16S rRNA se realizó utilizando los primers externos 785F y 907R. La calidad de los resultados de secuenciación se consideró óptima cuando el valor de calidad era superior a 20 (QV>20). El ensamblaje de las secuencias de ADN se llevó a cabo utilizando el software Geneious Prime.

3.6. Análisis estadístico

3.6.1. Registro de datos

Se registraron los datos de lectura de cada uno de los tratamientos.

3.6.2. Análisis de similaridad

Los resultados obtenidos en el estudio fueron presentados en tablas y/o gráficos, que fueron generados mediante técnicas de estadística descriptiva, análisis de varianza ($p < 0.05$) y Tukey utilizando el software estadístico SPSS 23.

IV. RESULTADOS

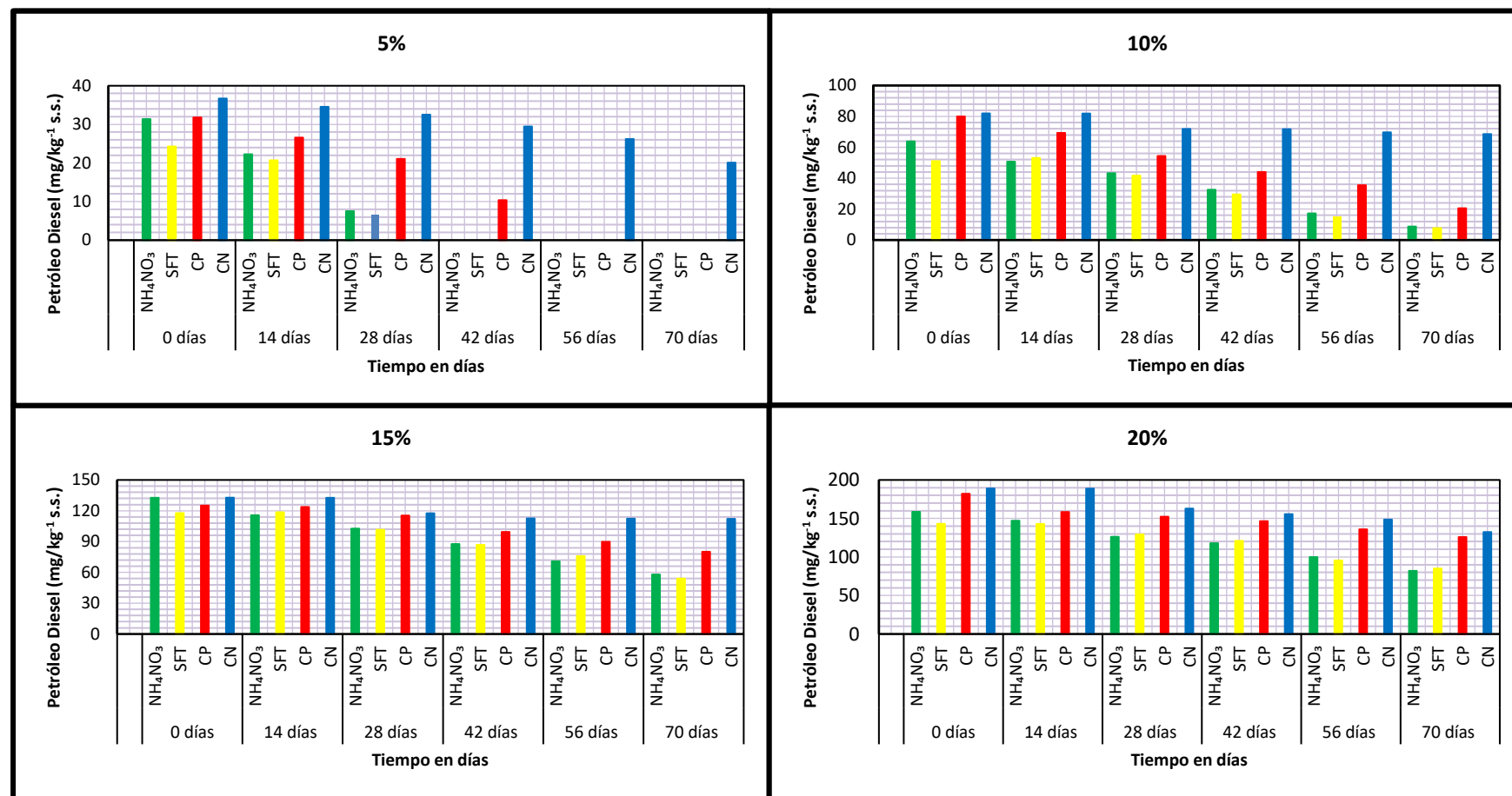


Figura 5. Concentraciones promedio de petróleo Diesel residual (mg/kg-1 s.s.) en los subtratamientos con bioestimulación (nitrato de amonio y superfosfato triple), blanco positivo y blanco negativo con microorganismos degradadores del tratamiento M1, Ayacucho-2019.

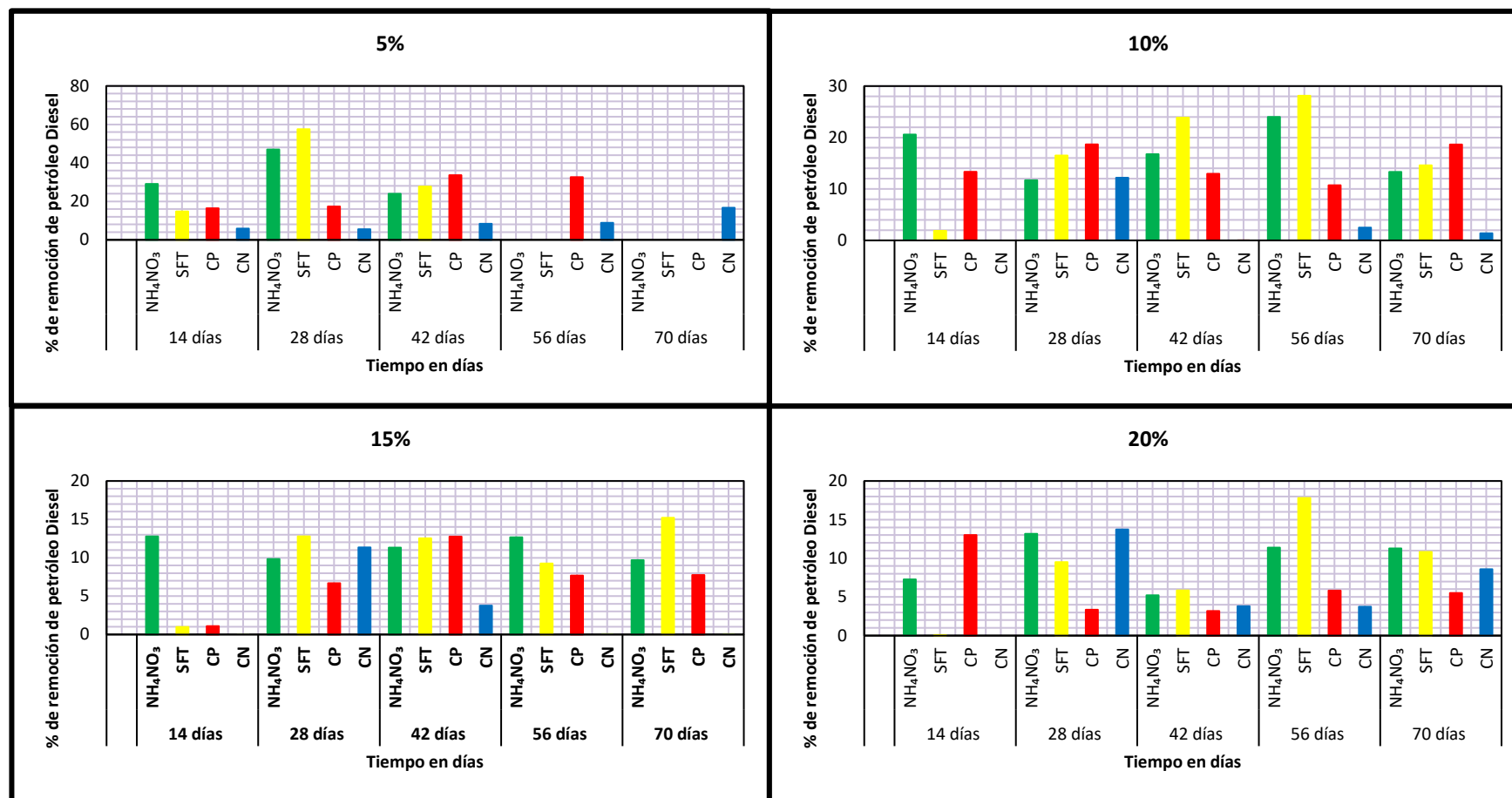


Figura 6. Porcentajes de remoción de petróleo Diesel en los diferentes subtratamientos con microorganismos degradadores del tratamiento M1, Ayacucho-2019.

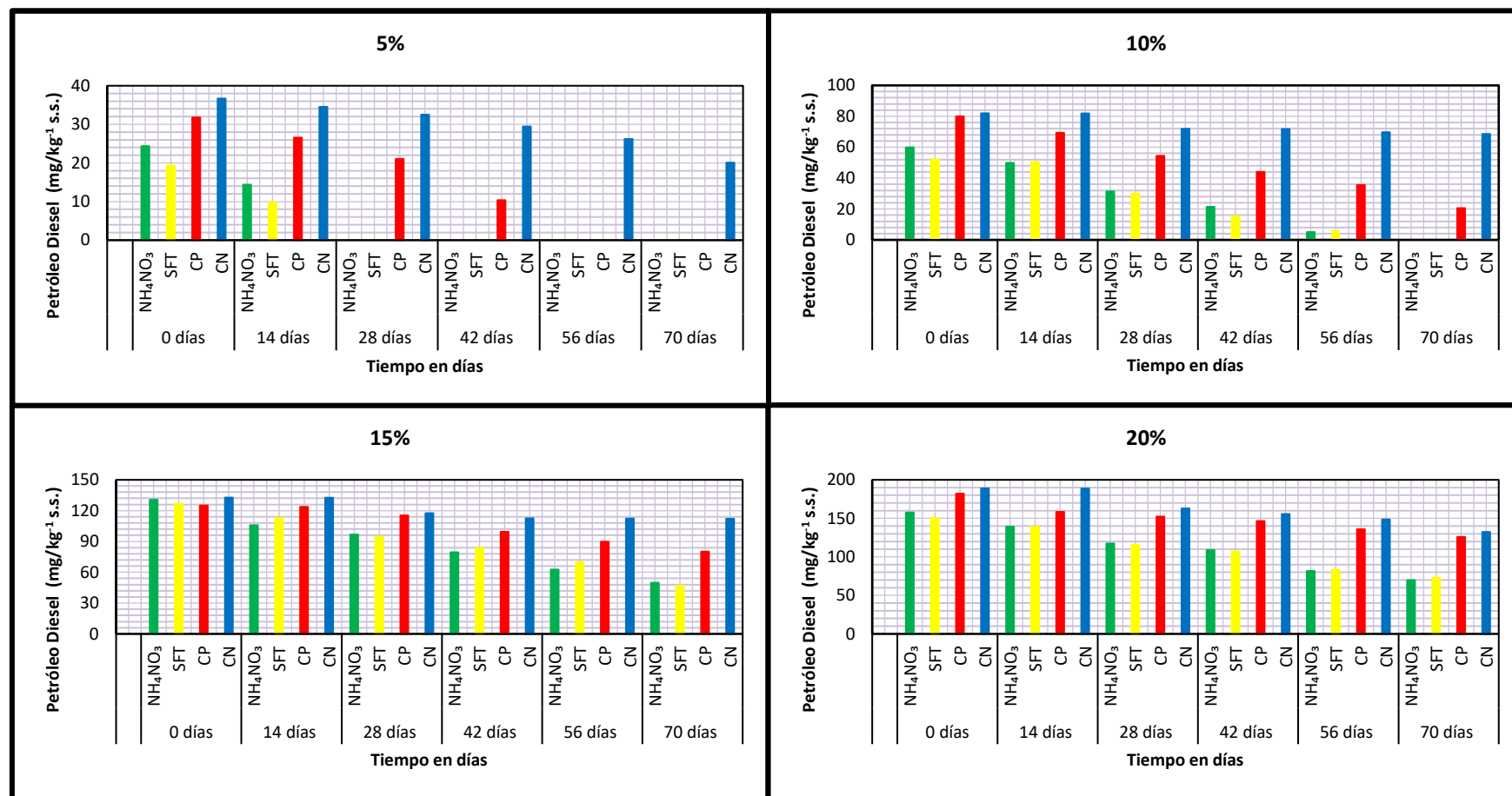


Figura 7. Concentraciones promedio de petróleo Diesel residual (mg/kg-1 s.s.) en los subtratamientos con bioestimulación (nitrato de amonio y superfosfato triple), blanco positivo y blanco negativo con microorganismos degradadores del tratamiento M2, Ayacucho-2019.

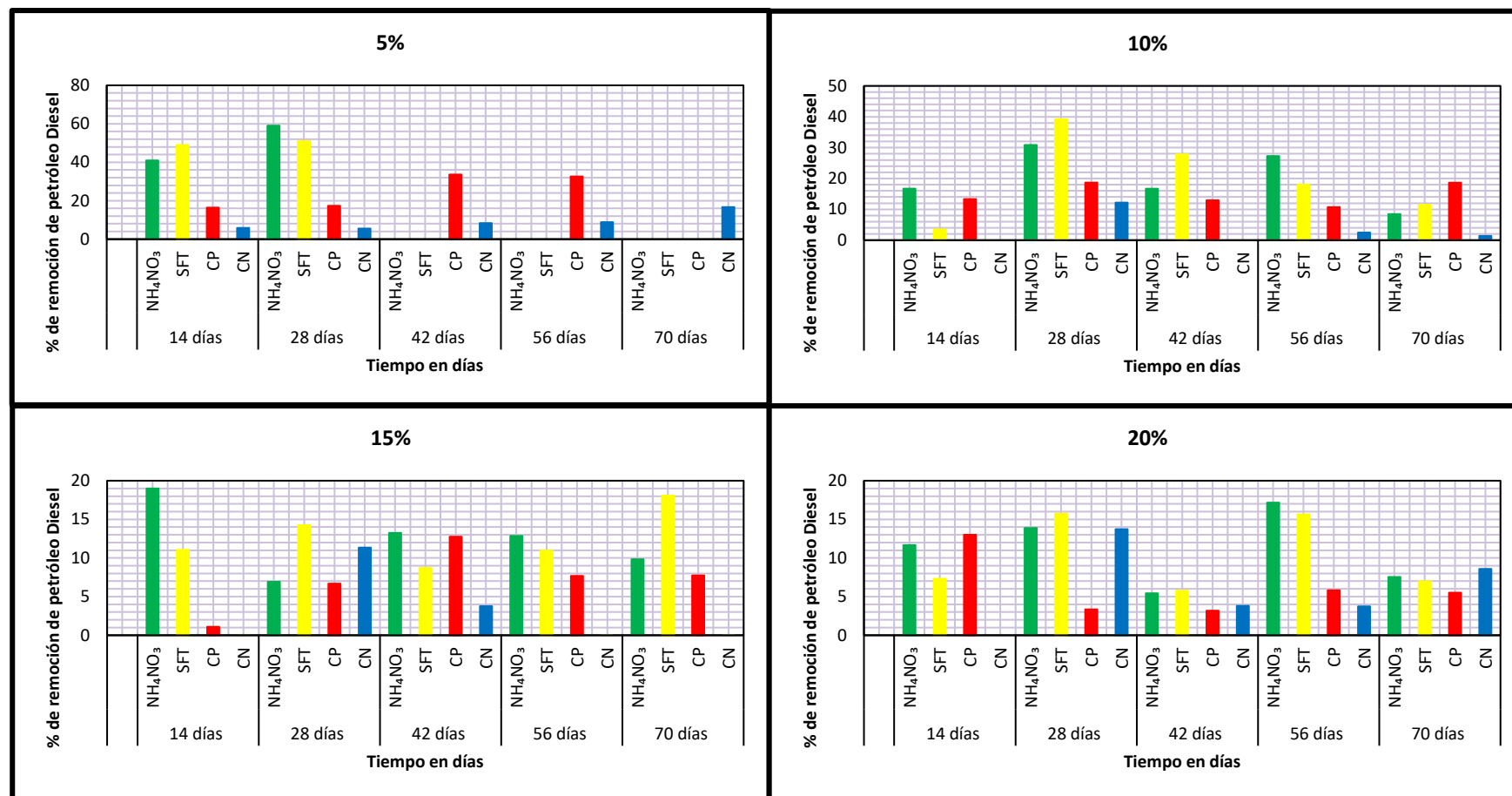


Figura 8. Porcentajes de remoción de petróleo Diesel en los diferentes subtratamientos con microorganismos degradadores del tratamiento M2, Ayacucho-2019.

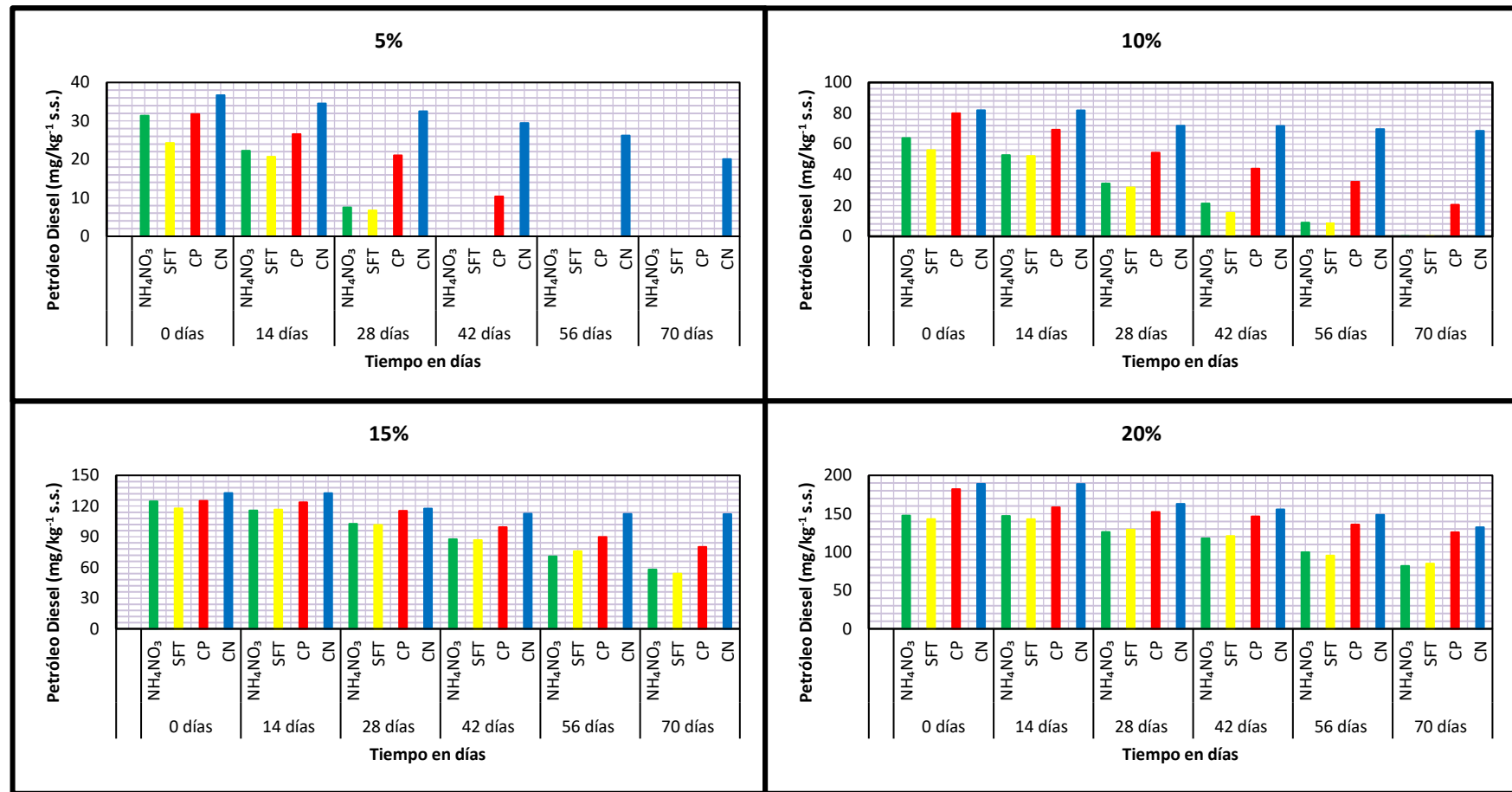


Figura 9. Concentraciones promedio de petróleo Diesel residual (mg/kg-1 s.s.) en los subtratamientos con bioestimulación (nitrato de amonio y superfosfato triple), blanco positivo y blanco negativo con microorganismos degradadores del tratamiento M3, Ayacucho-2019.

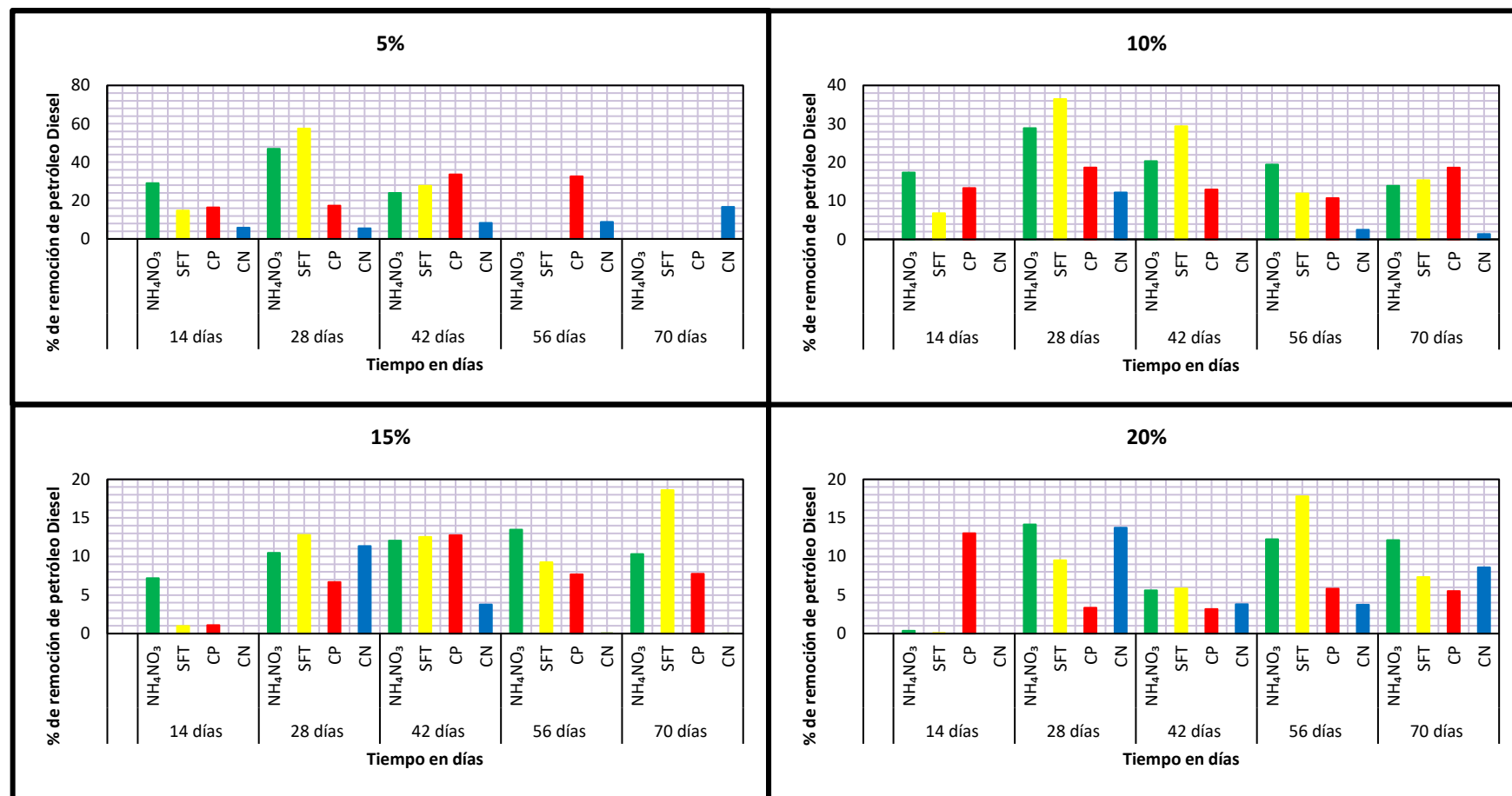


Figura 10. Porcentajes de remoción de petróleo Diesel en los diferentes subtratamientos con microorganismos degradadores del tratamiento M3, Ayacucho-2019.

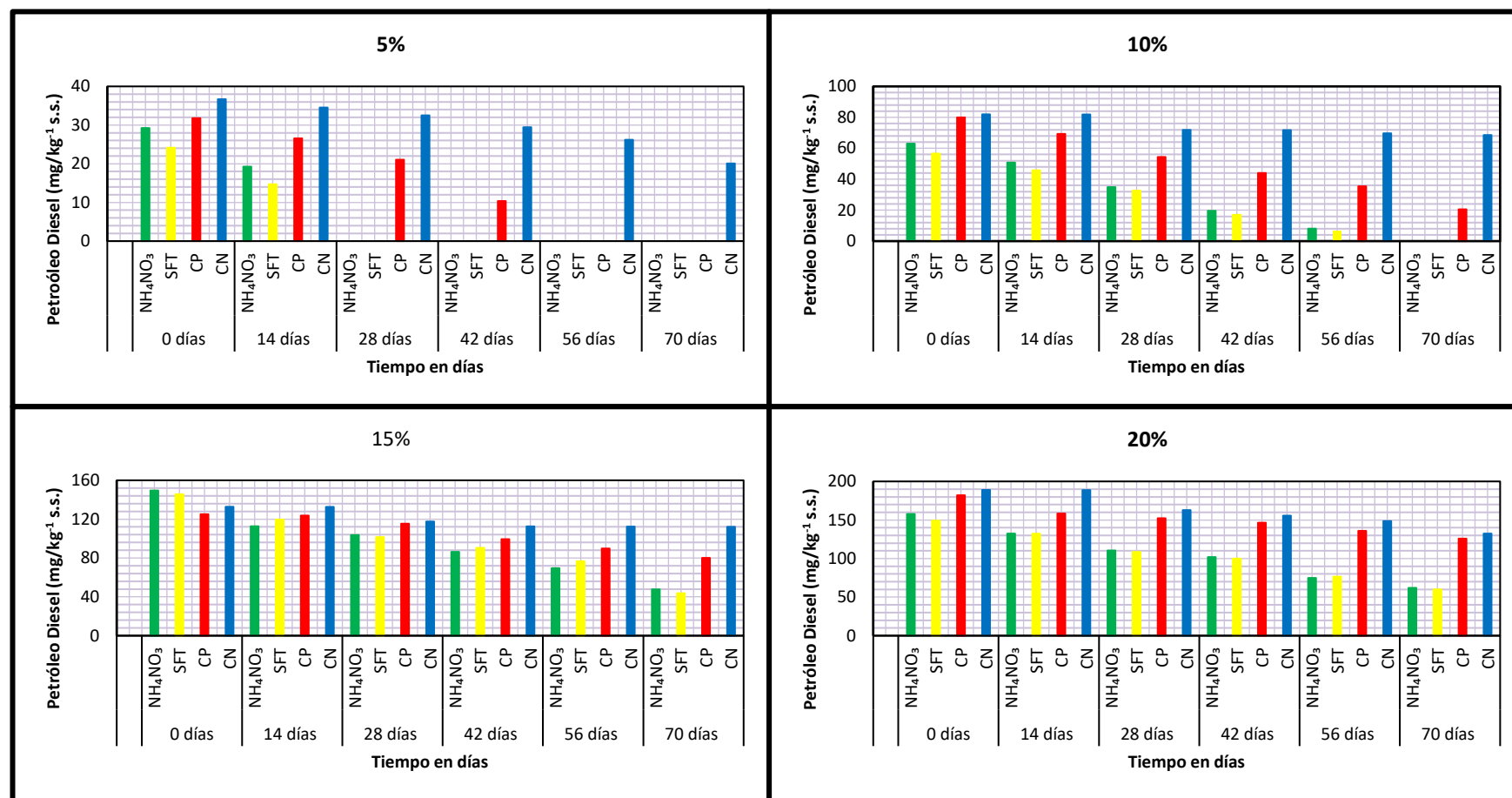


Figura 11. Concentraciones promedio de petróleo Diesel residual (mg/kg-1 s.s.) en los subtratamientos con bioestimulación (nitrato de amonio y superfosfato triple), blanco positivo y blanco negativo con microorganismos degradadores del tratamiento M12, Ayacucho-2019.

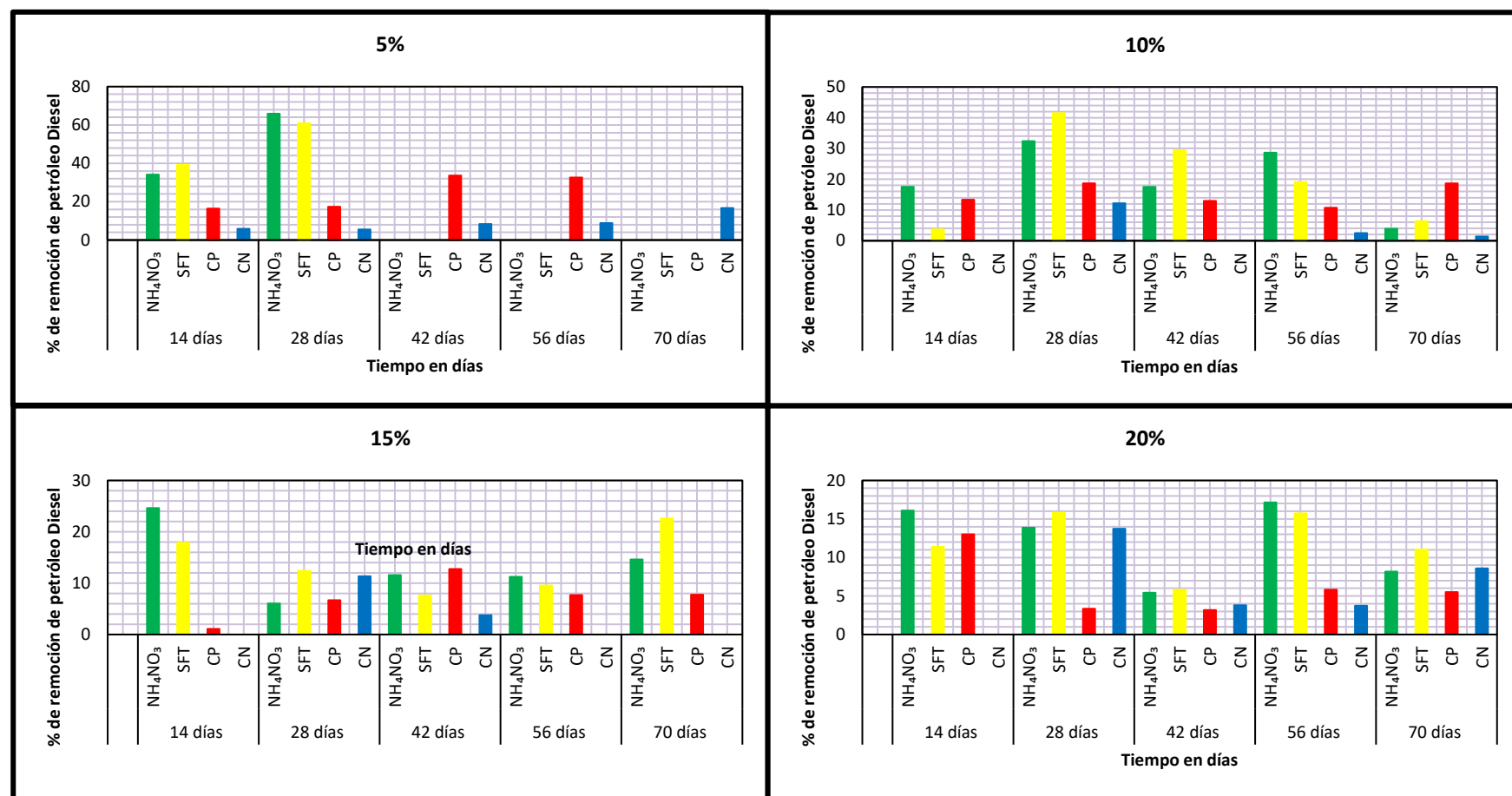


Figura 12. Porcentajes de remoción de petróleo Diesel en los diferentes subtratamientos con microorganismos degradadores del tratamiento M12, Ayacucho-2019.

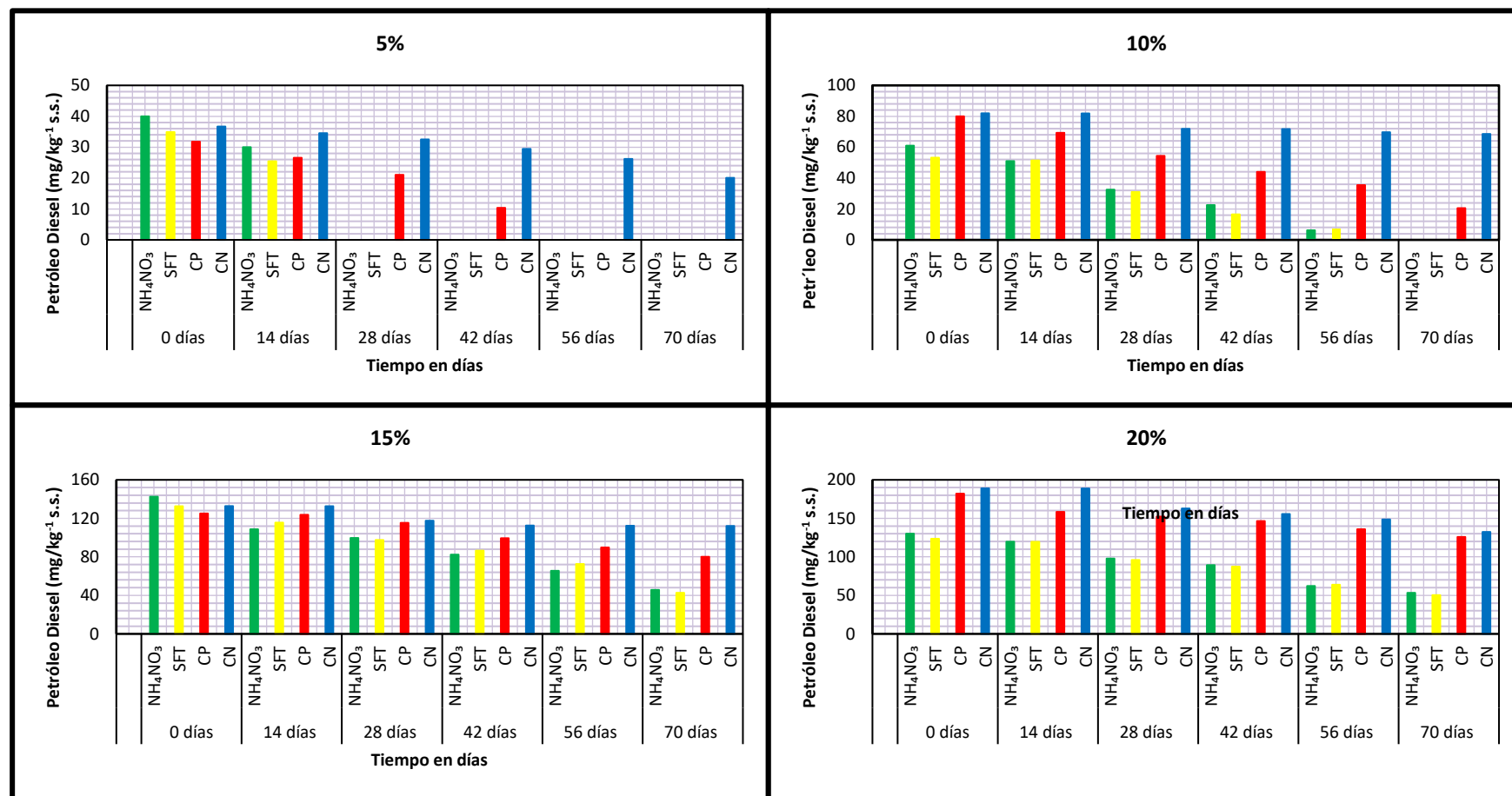


Figura 13. Concentraciones promedio de petróleo Diesel residual (mg/kg-1 s.s.) en los subtratamientos con bioestimulación (nitrato de amonio y superfosfato triple), blanco positivo y blanco negativo con microorganismos degradadores del tratamiento M13, Ayacucho-2019.

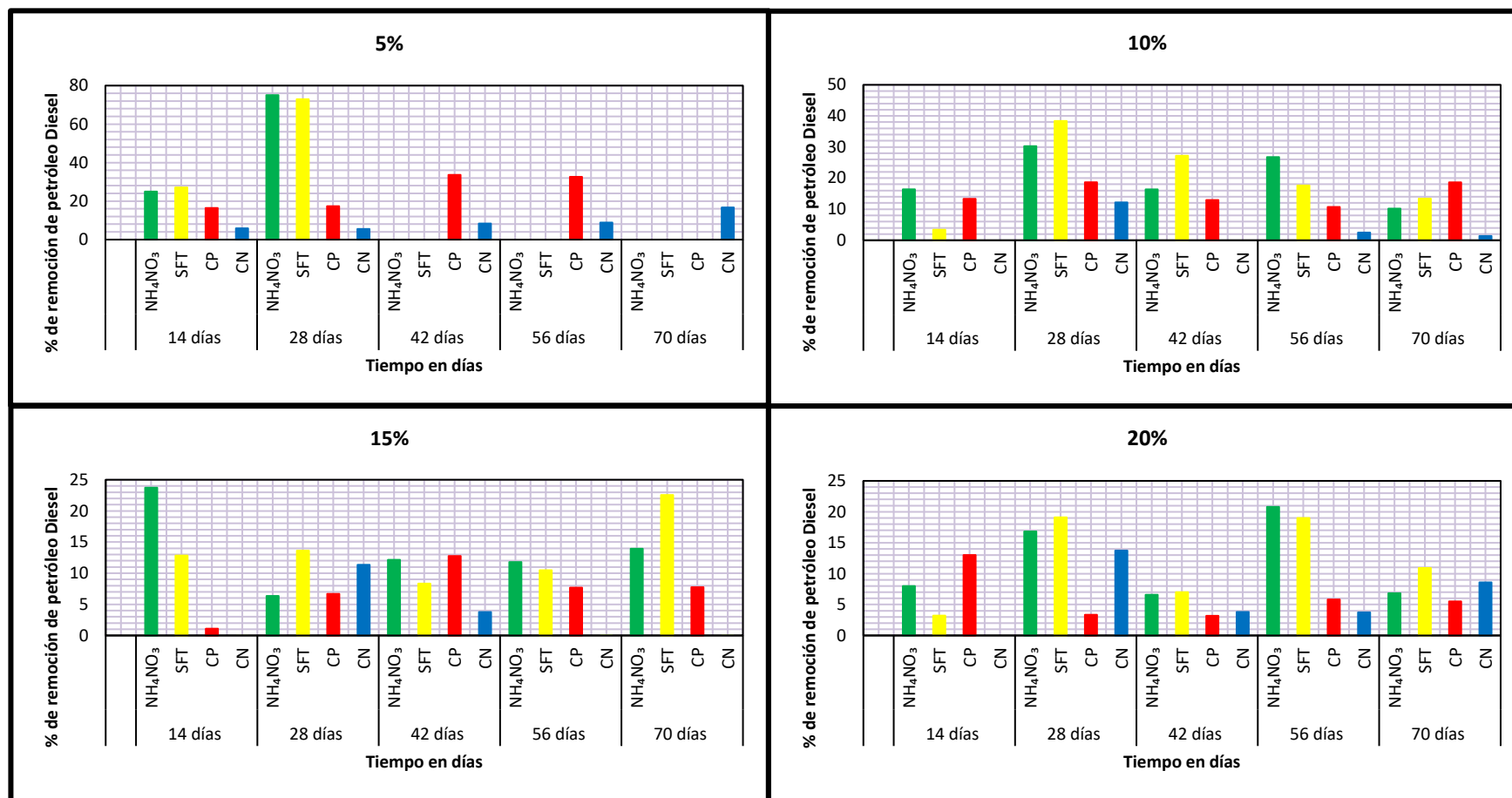


Figura 14. Porcentajes de remoción de petróleo Diesel en los diferentes subtratamientos con microorganismos degradadores del tratamiento M13, Ayacucho-2019.

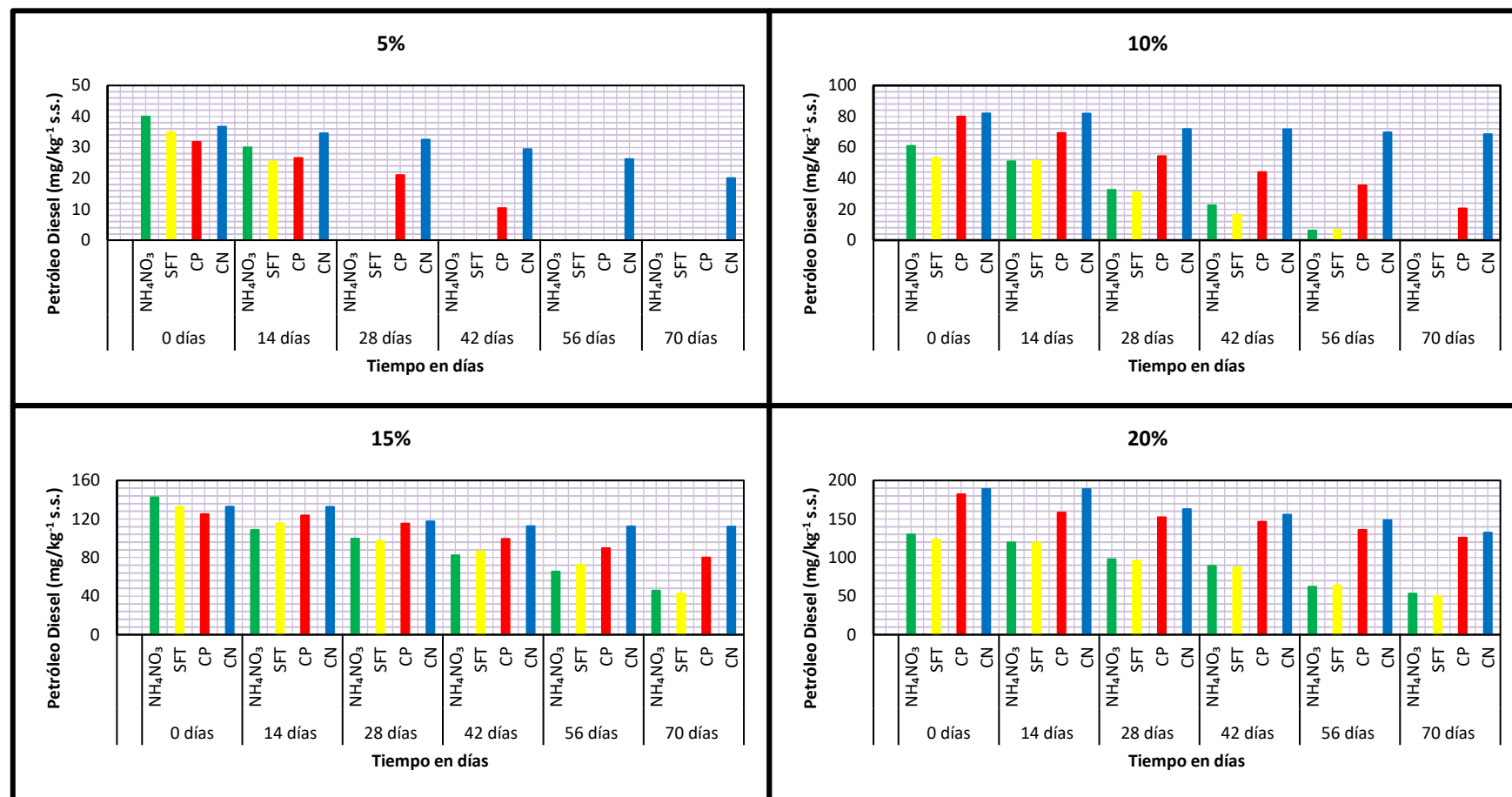


Figura 15. Concentraciones promedio de petróleo Diesel residual (mg/kg-1 s.s.) en los subtratamientos con bioestimulación (nitrato de amonio y superfosfato triple), blanco positivo y blanco negativo con microorganismos degradadores del tratamiento M23, Ayacucho-2019.

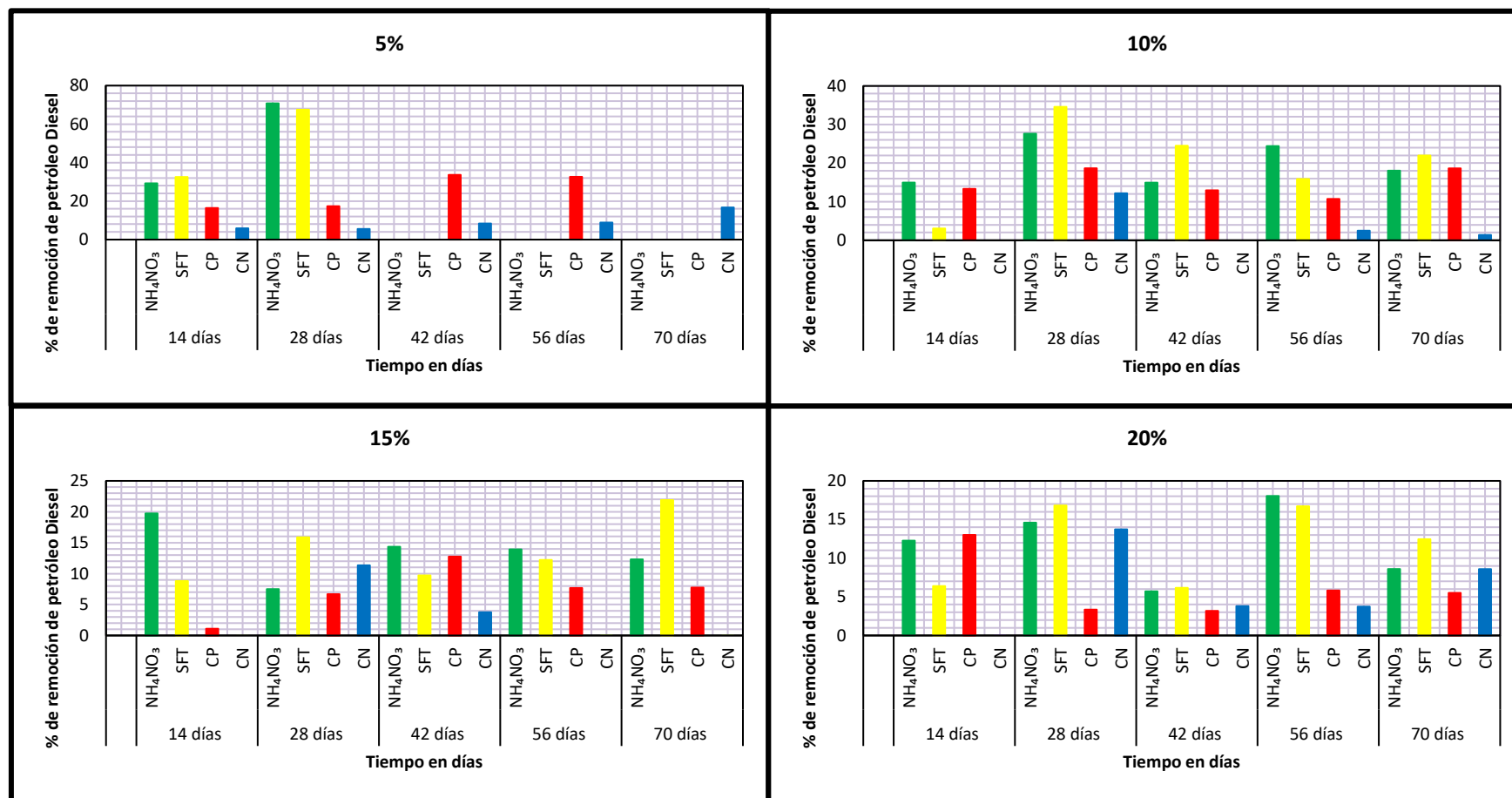


Figura 16. Porcentajes de remoción de petróleo Diesel en los diferentes subtratamientos con microorganismos degradadores del tratamiento M23, Ayacucho-2019.

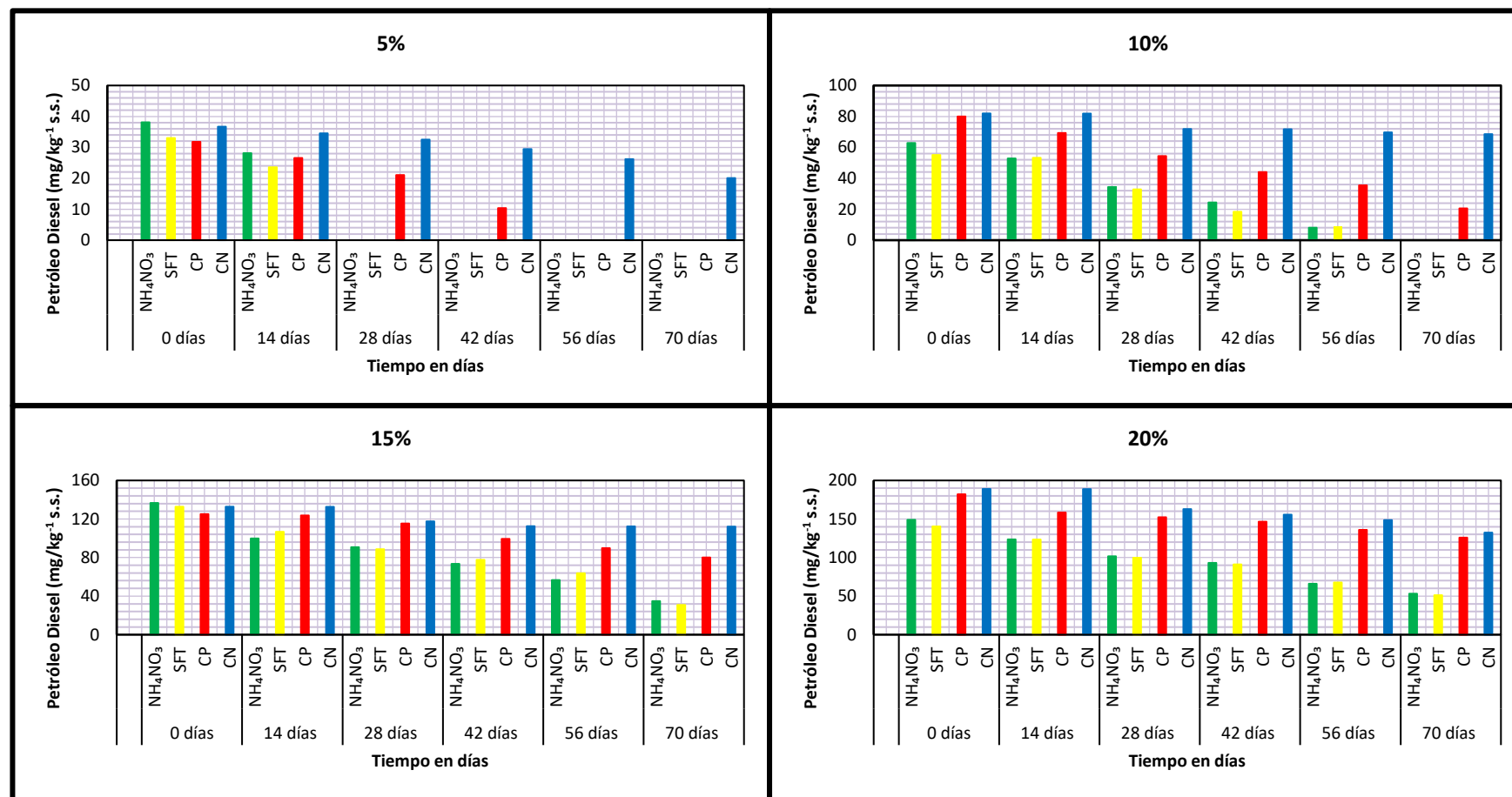


Figura 17. Concentraciones promedio de petróleo Diesel residual (mg/kg-1 s.s.) en los subtratamientos con bioestimulación (nitrato de amonio y superfosfato triple), blanco positivo y blanco negativo con microorganismos degradadores del tratamiento M123, Ayacucho-2019.

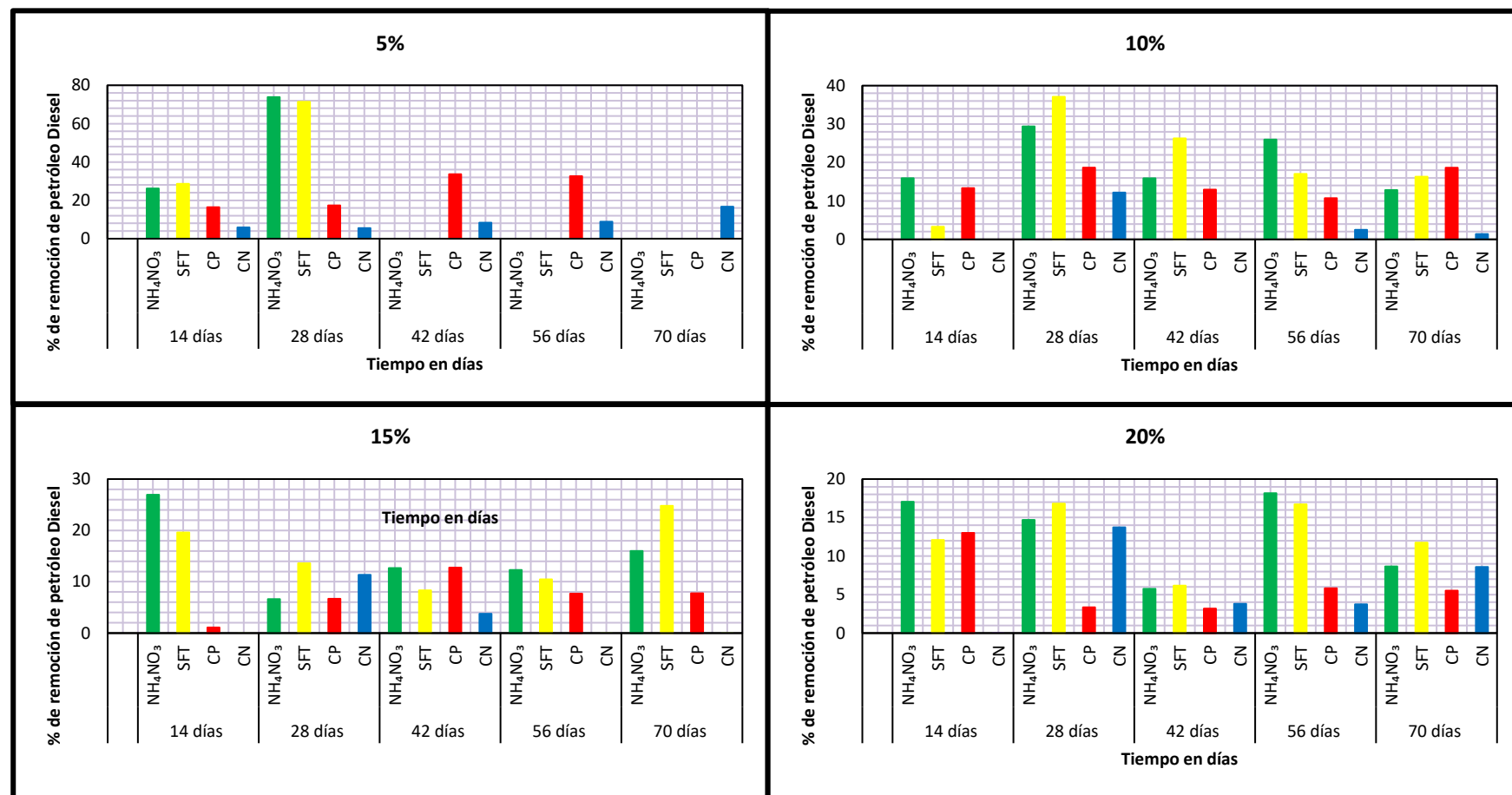


Figura 18. Porcentajes de remoción de petróleo Diesel en los diferentes subtratamientos con microorganismos degradadores del tratamiento M123, Ayacucho-2019.

Tabla 9. Porcentajes de remoción neta de petróleo Diesel en los diferentes tratamientos y subtratamientos con microorganismos degradadores de petróleo Diesel. Ayacucho-2019.

TX	STX	TIEMPO		%PD			
				5%	10%	15%	20%
M1	%NH ₄ NO ₃	70 días	% de remoción Total	100,000	100,000	54,565	48,769
	%SFT			100,000	100,000	57,709	47,507
	%CP			100,000	74,312	35,962	30,868
	%CN			45,284	16,338	15,551	29,960
	%NH ₄ NO ₃	70 días	% de remoción neta	54,716	83,662	39,014	18,809
	%SFT			54,716	83,662	42,158	17,547
M2	%CP			54,716	57,974	20,411	0,908
	%NH ₄ NO ₃	70 días	% de remoción Total	100,000	100,000	61,863	55,699
	%SFT			100,000	100,000	63,057	51,433
	%CP			100,000	76,255	37,905	32,811
	%CN			45,284	16,338	15,551	29,960
	%NH ₄ NO ₃	70 días	% de remoción neta	54,716	83,662	46,312	25,739
M3	%SFT			54,716	83,662	47,506	21,473
	%CP			54,716	59,917	22,354	2,851
	%NH ₄ NO ₃	70 días	% de remoción Total	100,000	100,000	53,486	44,468
	%SFT			100,000	100,000	54,159	40,563
	%CP			100,000	74,123	35,773	30,679
	%CN			45,284	16,338	15,551	29,960
M12	%NH ₄ NO ₃	70 días	% de remoción neta	54,716	83,662	37,935	14,508
	%SFT			54,716	83,662	38,608	10,603
	%CP			54,716	57,785	20,222	0,719
	%NH ₄ NO ₃	70 días	% de remoción Total	100,000	100,000	68,105	60,712
	%SFT			100,000	100,000	69,997	59,764
	%CP			100,000	78,286	39,936	34,842
	%CN			45,284	16,338	15,551	29,960
	%NH ₄ NO ₃	70 días	% de remoción neta	54,716	83,662	52,554	30,752
	%SFT			54,716	83,662	54,446	29,804
	%CP			54,716	61,948	24,385	4,882

Continuación de la Tabla 9. Porcentajes de remoción neta de petróleo Diesel en los diferentes tratamientos y subtratamientos con microorganismos degradadores de petróleo Diesel. Ayacucho-2019.

TX	STX	TIEMPO		%PD			
				5%	10%	15%	20%
M13	%NH ₄ NO ₃	70 días	% de remoción Total	100,000	100,000	67,940	59,021
	%SFT			100,000	100,000	67,810	59,232
	%CP			100,000	77,332	38,982	33,888
	%CN			45,284	16,338	15,551	29,960
	%NH ₄ NO ₃	70 días	% de remoción neta	54,716	83,662	52,389	29,061
	%SFT			54,716	83,662	52,259	29,272
	%CP			54,716	60,994	23,431	3,928
	%CN			54,716	60,994	23,431	3,928
M23	%NH ₄ NO ₃	70 días	% de remoción Total	100,000	100,000	67,815	59,216
	%SFT			100,000	100,000	68,502	58,539
	%CP			100,000	76,568	38,218	33,124
	%CN			45,284	16,338	15,551	29,960
	%NH ₄ NO ₃	70 días	% de remoción neta	54,716	83,662	52,264	29,256
	%SFT			54,716	83,662	52,951	28,579
	%CP			54,716	60,230	22,667	3,164
	%CN			54,716	60,230	22,667	3,164
M123	%NH ₄ NO ₃	70 días	% de remoción Total	100,000	100,000	74,511	64,314
	%SFT			100,000	100,000	76,775	63,526
	%CP			100,000	81,265	42,915	37,821
	%CN			45,284	16,338	15,551	29,960
	%NH ₄ NO ₃	70 días	% de remoción neta	54,716	83,662	58,960	34,354
	%SFT			54,716	83,662	61,224	33,566
	%CP			54,716	64,927	27,364	7,861
	%CN			54,716	64,927	27,364	7,861

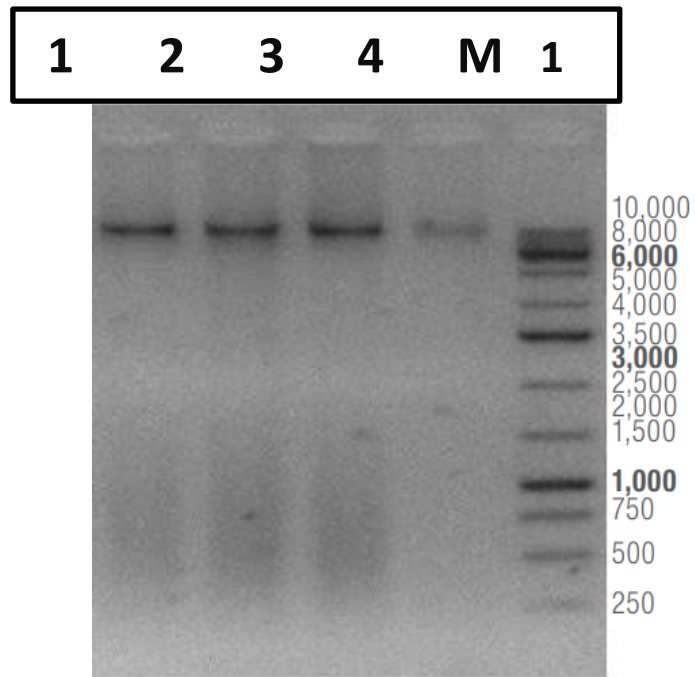


Figura 19. Calidad de ADN revelado mediante electroforesis de agarosa al 1%. En el cual M es el Marcador de tamaño molecular de 1Kb, 4; ADN de la muestra control positivo, 3; ADN de la muestra C-1(R1), 2; ADN de la muestra C-2(R1) y 1 ADN de la muestra C-3(R1).

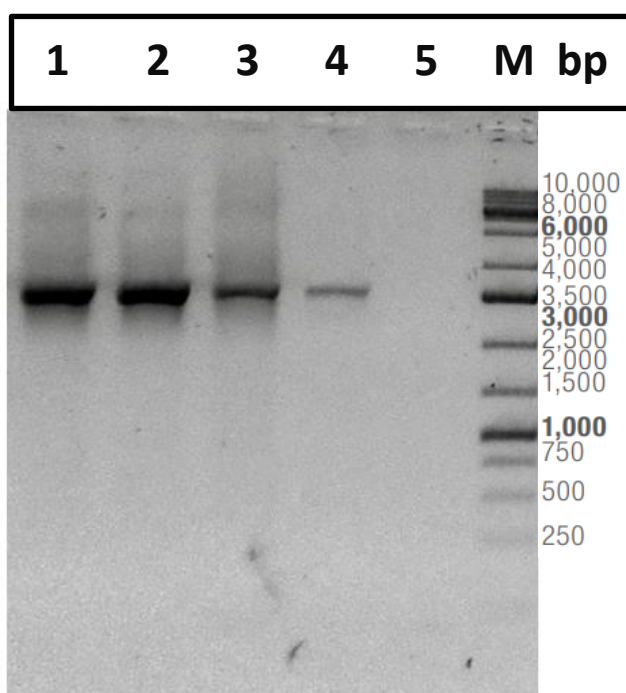


Figura 20. Productos de PCR amplificados para el gen 16S rRNA. En el cual M es el Marcador de tamaño molecular de 1Kb, 5; ADN de la muestra control negativo, 4; ADN de la muestra control positivo, 3; ADN de la muestra C-1(R1), 2; ADN de la muestra C-2(R1) y 1 ADN de la muestra C-3(R1).

Tabla 10. Identificación por análisis BlastN de los primers de la Muestra.

Nombre	Cobertura	Similaridad (%)	Identificación
PD1_785F	100%	96.50%	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i> (KT380546.1)
PD1_907R	100%	95.36%	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i> (KT380546.1)
PD2_785F	100%	99.06%	<i>Pseudomonas putida</i> (JX276777.1)
PD2_907R	100%	96.50%	<i>Pseudomonas putida</i> (LC507960.1)
PD3_785F	100%	100.00%	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CP093395.1)
PD3_907R	100%	100.00%	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CP093395.1)

V. DISCUSIÓN

Se realizó la extracción de petróleo Diesel de muestras de suelo contaminadas intencionalmente con diferentes concentraciones (5%, 10%, 15% y 20%) utilizando la técnica de extracción agitación-centrifugación, que demostró ser efectiva incluso para concentraciones muy bajas de esta mezcla de hidrocarburos, lo que la hace una técnica rápida y simple para estos propósitos. La medición de la cantidad del petróleo Diesel se llevó a cabo mediante el método gravimétrico, expresándose las concentraciones en mg/kg de suelo seco (mg kg^{-1} de s.s.). Se advierte la importancia de repetir las mediciones de peso y controlar la temperatura durante la evaporación del solvente para obtener resultados precisos. Autores como Fernández et al. (2006), destacan el desarrollo de técnicas económicas y rápidas para la extracción de contaminantes en suelos, como la técnica de extracción agitación-centrifugación. La gravimetría, aunque sencilla y económica, no es adecuada para la medición precisa de hidrocarburos en bajas concentraciones y se recomienda su uso por encima de $50,000 \text{ mg kg}^{-1}$ (5%). Además, Pardo et al. (2004), mencionan que el método gravimétrico utilizado siguió el procedimiento descrito en la sección 5520E de los *Standard Methods*. La extracción de hidrocarburos del suelo se realizó mediante agitación orbital (SHAKER) utilizando diclorometano como solvente.

En la presente investigación se han evaluado la capacidad de degradación de petróleo Diesel de tres cepas microbianas individuales y combinadas en consorcios, estimuladas con nitrato de amonio (NH_4NO_3) o superfosfato triple (SFT), en concentraciones de $0,06 \text{ g/Kg}$ y $0,048 \text{ g/Kg}$, respectivamente, a temperatura ambiente por un lapso de 70 días.

En las Figuras 6, 8 y 10, se reportan los porcentajes de remoción de petróleo Diesel con las cepas C1, C2 y C3 bioestimuladas, correspondientes a los tratamientos M1, M2 y M3 respectivamente. Para el caso de la biorremediación del suelo contaminado con 5% de diésel de petróleo, la cepa C1 (M1) logró

remover el 100 % del contaminante a los 28 días, al igual que la cepa C2 (M2) y en el caso de la cepa C3 (M3) logró eliminar el 100% del contaminante a los 42 días; en los tres tratamientos el comportamiento fue similar con ambas sustancias bioestimulantes; mientras que en el control (diésel de petróleo al 5% más cepas microbianas y sin bioestimulantes) la degradación del 100% del contaminante fue a los 56 días; estos resultados evidencian que las sustancias utilizadas bioestiman positivamente a las cepas indicadas logrando mejorar la capacidad degradativa. Para el caso de la biorremediación del suelo contaminado con 10% de diésel de petróleo, la cepa C1 (M1) logró remover el 100 % del contaminante a los 70 días, al igual que las cepas C2 y C3 (M2 y M3); en los tres tratamientos el comportamiento fue similar con ambas sustancias bioestimulantes; mientras que en el control (diésel de petróleo al 10% más cepas microbianas y sin bioestimulantes) la degradación del contaminante estuvo dentro del rango de 74,123 a 76,255% a los 70 días para los tres tratamientos; estos resultados evidencian que las sustancias utilizadas bioestiman positivamente a las cepas indicadas logrando mejorar la capacidad degradativa.

La evaluación de la biorremediación del suelo contaminado con 15% de petróleo Diesel, a los 70 días de observación se ha logrado remover el 54,565% y 57,709% con la cepa C1 (M1) bioestimuladas con NH_4NO_3 o SFT, respectivamente; el 61,863% y 63,057% con la cepa C2 (M2) respectivamente y el 53,486% y 54,159% con la cepa C3 (M3), respectivamente; valores más altos en comparación a los obtenidos en el control con un rango de 35,773 a 37,905% de degradación del contaminante, resultados que evidencian la capacidad bioestimuladora de las sustancias utilizadas. La evaluación de la biorremediación del suelo contaminado con 20% de petróleo Diesel, a los 70 días de observación se ha logrado remover el 48,769% y 47,507% con la cepa C1 (M1) bioestimuladas con NH_4NO_3 o SFT, respectivamente; el 55,699% y 51,433% con la cepa C2 (M2) respectivamente y el 44,468% y 40,563% con la cepa C3 (M3) respectivamente; valores mayores en comparación a los obtenidos en el control con un rango de 30,679 a 32,811% de degradación del contaminante, resultados que evidencian la capacidad bioestimuladora de las sustancias utilizadas.

En las figuras 12, 14, 16 y 18 se reportan los porcentajes de remoción de petróleo Diesel con los consorcios C1-C2, C1-C3, C2-C3 y C1-C2-C3 bioestimuladas, correspondientes a los tratamientos M12, M13, M23 y M123, respectivamente. Para el caso de la biorremediación del suelo contaminado con 5% de diésel de

petróleo, los consorcios C1-C2 (M12), C1-C3 (M13), C2-C3 (M23) y C1-C2-C3 (M123), lograron remover el 100 % del contaminante a los 28 días,; en los cuatro tratamientos el comportamiento fue similar con ambas sustancias bioestimulantes; mientras que en el control (diésel de petróleo al 5% más cepas microbianas y sin bioestimulantes) , en el mismo días, la degradación solo alcanzó el 33,772% del contaminante; estos resultados evidencian que las sustancias utilizadas bioestiman positivamente a las cepas indicadas logrando mejorar la capacidad degradativa. Para el caso de la biorremediación del suelo contaminado con 10% de diésel de petróleo, los consorcios C1-C2 (M12), C1-C3 (M13), C2-C3 (M23) y C1-C2-C3 (M123) lograron remover el 100 % del contaminante a los 70 días, en los cuatro tratamientos el comportamiento fue similar con ambas sustancias bioestimulantes; mientras que en el control (diésel de petróleo al 10% más cepas microbianas y sin bioestimulantes) la degradación alcanzó un rango de 76,568 a 81,265% del contaminante; estos resultados evidencian que las sustancias utilizadas bioestiman positivamente a las cepas indicadas logrando mejorar la capacidad degradativa.

La evaluación de la biorremediación del suelo contaminado con 15% de petróleo Diesel, a los 70 días de observación se ha logrado remover el 68,105% y 69,997% con el consorcio C1-C2 (M12) bioestimuladas con NH_4NO_3 o SFT, respectivamente; el 67,940% y 67,810% con el consorcio C1-C3 (M13) respectivamente; el 67,815 y 68,502% con el consorcio C2-C3 (M23) respectivamente; y, el 74,511 y 76,775% con el consorcio C1-C2-C3 (M1,2,3) respectivamente; valores más altos en comparación a los obtenidos en el control con un rango de 38,218 a 42,915% de degradación del contaminante, resultados que evidencian la capacidad bioestimuladora de las sustancias utilizadas. La evaluación de la biorremediación del suelo contaminado con 20% de petróleo Diesel, a los 70 días de observación se ha logrado remover el 60,712% y 59,764% con el consorcio C1-C2 (M12) bioestimuladas con NH_4NO_3 o SFT, respectivamente; el 59,021% y 59,232% con el consorcio C1-C3 (M13) respectivamente; el 59,216% y 58,539% con el consorcio C2-C3 (M23) respectivamente; y, el 64,314% y 63,526% con el consorcio C1-C2-C3 (M1,2,3) respectivamente; valores más altos en comparación a los obtenidos en el control con un rango de 33,124 a 37,821% de degradación del contaminante, resultados que evidencian la capacidad bioestimuladora de las sustancias utilizadas.

Entre los tratamientos con cepas individuales (M1, M2 y M3), se observó que el tratamiento M2 presentó los mejores resultados en términos de degradación del petróleo Diesel, mientras que en el tratamiento M3 se obtuvo un menor porcentaje de degradación. En cuanto a los tratamientos con consorcios microbianos (M12, M13, M23 y M123), el tratamiento M123 fue el que presentó los mejores resultados de remoción en comparación al resto de los tratamientos, alcanzando el 100% de degradación del petróleo Diesel para las concentraciones de 5 y 10% a los 28 y 70 días, respectivamente; además, se obtuvieron porcentajes de degradación del 74,511% y 64,314% con NH_4NO para las concentraciones de 15 y 20%, respectivamente, y con SFT los porcentajes de remoción fueron del 76,775 y 63,526% para las concentraciones de 15 y 20%, respectivamente. En comparación, el tratamiento sin bioestimulación para las mismas concentraciones tuvo porcentajes de remoción del 42,915 y 37,821%, respectivamente. Por lo tanto, se puede afirmar que los bioestimulantes mejoran la capacidad degradadora de estos microorganismos.

Referente al tema, Baca (2019), realizó un estudio que evaluó las características químicas, microbiológicas y la toxicidad del suelo experimental (suelo más petróleo), además de la eficacia de la bioaumentación y la bioestimulación en la degradación biológica del contaminante. Encontró que las bacterias hidrocarbonoclásticas lograron utilizar el petróleo en un lapso de entre 60 y 90 días, El suelo tenía un contenido de hidrocarburos totales de 38,899 mg kg^{-1} (3,89%), una población microbiana total de $2,4 \times 10^6$ NMP g^{-1} y una población de bacterias hidrocarbonoclásticas de $1,5 \times 10^5$ NMP g^{-1} . La mayor población de microorganismos totales e hidrocarbonoclásticos se logró a los 60 y 90 días, respectivamente, evidenciándose este hecho mediante un bioensayo en donde se utilizó semillas de *Raphanus sativus* L. “rabanito” lo que resultó en un aumento en los índices de germinación y una disminución en los niveles de toxicidad. El tratamiento de bioaumentación con un consorcio mixto más bioestimulación logró una baja toxicidad a los 90 días y una eficacia del 78% en la degradación del petróleo, demostrando su eficacia en la biodegradación del petróleo; estos resultados son similares a los obtenidos en la presente investigación, donde el consorcio C1-C2-C3, a los 70 días logró remover el 76,775% bioestimulado con nitrato de amonio.

Por otro lado, Recalde y Cóndor (2017), examinaron tres técnicas de remediación *ex situ* para eliminar hidrocarburos totales de petróleo (TPH) de suelos en el

proyecto Amazonía Viva de Petroamazonas E.P. Considerando cuatro tratamientos; el tratamiento de bioestimulación de consorcios microbianos (tratamiento 3) mostró la mayor tasa de degradación del TPH, con una reducción del 38%; el compostaje en biopilas (tratamiento 1) tuvo una tasa de degradación del 37%, mientras que la bioaumentación y bioestimulación combinadas (tratamiento 4) obtuvieron una reducción del 35%. El tratamiento de bioaumentación (tratamiento 2) mostró la menor tasa de degradación del contaminante en un tiempo periodo de 240 días; como se puede apreciar, la bioestimulación incrementa la capacidad degradadora del TPH por los microorganismos, situación similar a lo hallado en la presente investigación.

Así mismo, Castaño (2018), evaluó la eficiencia de la bioestimulación frente a la atenuación natural en la degradación de Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP) en lodos de una estación de servicio en Girardot - departamento de Cundinamarca (Colombia). Se implementaron cuatro tratamientos experimentales, y los resultados mostraron una degradación del HTP en todos los tratamientos, con los tratamientos bioestimulados mostrando una degradación mayor en comparación con el tratamiento de atenuación natural. El tratamiento suplementado con Fosfato Dibásico de Potasio y Urea logró una degradación del 96,8%, siendo el más adecuado para la técnica de bioestimulación. Los otros tratamientos tuvieron porcentajes de remoción del 74%, 93,9% y 78,4%, respectivamente, en comparación con el tratamiento de control, que tuvo una remoción del 41,4% el experimento tubo un periodo de evaluación de 75 días; situación muy similar a lo observado en la presente investigación.

En la Tabla 9, se reportan los porcentajes de remoción neta (%RN) de petróleo Diesel en los diferentes tratamientos, y los valores que arrojaron los controles positivos y negativos; para el caso del control positivo (CP) se inocularon las diferentes cepas microbianas, al igual que los tratamientos problema pero no se les agregaron los bioestimulantes y para el caso del control negativo (CN) no se agregó cepas microbianas y tampoco el bioestimulante con la finalidad de conocer cuánto petróleo se pierde por factores abióticos y así determinar el %RN a cargo de las cepas microbianas y los consorcios.

Los %RN alcanzados fueron: para los tratamientos M1, M2, M12, M13, M23 y M123 a la concentración 5% de petróleo Diesel el %RN tanto para los tratamientos bioestimulados con NH_4NO_3 o SFT fue de 54,716% a los 28 días, el tratamiento

M3 logró el mismo %RN a los 42 días, mientras que, el CP alcanzó el mismo %RN a los 56 días.

Para los tratamientos M1, M2, M3, M12, M13, M23 y M123 a la concentración 10% de petróleo Diesel el %RN, en todos los casos bioestimulados con NH_4NO o SFT fue de 83,662% a los 70 días mientras que los CP, en el mismo tiempo, alcanzaron un %RN en un rango de 57,785 a 64,927%, evidenciando que estas cepas y consorcios cuando son bioestimulados realizan de manera más eficiente el proceso de degradación de petróleo Diesel.

Al día 70 y con concentración de petróleo Diesel de 15% los resultados fueron, para el control positivo el %RN varió en un rango de 20,222% a 27,364%; en el tratamiento M1, bioestimulado con NH_4NO o SFT el %RN fue de 39,014% y 42,158% respectivamente, en el tratamiento M2 el %RN fue de 46,312 y 47,506% respectivamente, en el tratamiento M3 el %RN fue de 37,935 y 38,608% respectivamente, en el tratamiento M12 el %RN fue de 52,554 y 54,446% respectivamente, en el tratamiento M13 %RN fue de 52,389 y 52,259% respectivamente, en el tratamiento M23 el %RN fue de 52,264 y 52,951% respectivamente y en el tratamiento M123 el %RN fue de 58,960 y 61,224% respectivamente; pudiéndose evidenciar que los tratamientos bioestimulados presentan mejor %RN en comparación al CP y de los tratamientos bioestimulados el que mejor %RN alcanzó fue el tratamiento M123 (consorcio de tres cepas microbianas).

Al día 70 y con concentración de petróleo Diesel de 20% los resultados fueron, para el CP el %RN varió en un rango de 0,719% a 7,861%, para el tratamiento M1 bioestimulado con NH_4NO o SFT el %RN fue de 18,809 y 17,547% respectivamente, para el tratamiento M2 el %RN fue de 25,739 y 21,473% respectivamente, para el tratamiento M3 el %RN fue de 14,508 y 10,603% respectivamente, para el tratamiento M12 el %RN fue de 30,752 y 29,804% respectivamente, para el tratamiento M13 el %RN fue de 29,061 y 29,272% respectivamente, para el tratamiento M23 el %RN fue de 29,256 y 28,579% respectivamente y para el tratamiento M123 el %RN fue de 34,354 y 33,566% respectivamente; podemos observar que en el CP se obtiene un %RN mucho menor, cuando la concentración de contaminante es alta puede ocurrir que se produzca inhibición del desarrollo microbiano (disminuya su capacidad de metabolización) o si es muy alta que intoxique a los microorganismos y estos mueran (LaGrega et al, 1996); también mencionar que los tratamientos

bioestimulados presentan mejor %RN en comparación al CP y de los tratamientos bioestimulados el que mejor %RN presenta es el tratamiento M123 que es la combinación de todos los microorganismos.

El análisis de varianza a un intervalo de confianza del 95%, arroja un valor de significancia para las tres concentraciones de petróleo Diesel (10, 15 y 20%) menor a 0,001, lo que indica que hay diferencias significativas entre los grupos analizados; esto indica que al menos uno de los tratamientos es estadísticamente diferente de los demás en términos de la variable que se está estudiando. Para poder saber qué tratamientos son diferentes estadísticamente se utilizó la prueba de Tukey a una confianza del 95%, en donde observamos que para la concentración de petróleo Diesel (PD) al 10% no existe diferencia entre los tratamientos sometidos a bioestimulación con NH_4NO_3 o SFT, pero si existe diferencia significativa de los tratamientos bioestimulados con el control positivo. Para la concentración de PD al 15 y 20 % encontramos que si hay diferencias significativas entre los tratamientos sometidos a bioestimulación y los controles positivos a excepción de los tratamientos M13- NH_4NO_3 , M23- NH_4NO_3 y M13-SFT los cuales no presenta diferencia para la concentración de PD al 15% y para la concentración de PD al 20% los que no presentan diferencia son M13-SFT y M23- NH_4NO_3 ; por lo cual, podemos mencionar que los tratamientos sometidos a bioestimulación presentan mejores resultados que los tratamientos controles para las tres concentraciones mayores de petróleo Diesel.

Respecto al tema, Narváez et al. (2008), observaron una reducción total del 92,15% de n-alcanos alifáticos en ensayos de degradación al final del período de incubación de 21 días. La contribución bacteriana fue del 68,61% (%RN), mientras que los factores abióticos representaron el 23,54%. No se encontraron diferencias significativas en la remoción de hidrocarburos aromáticos entre el control abiótico y el tratamiento con bacterias, con valores de biodegradación poco relevantes. Estos resultados son similares a los obtenidos en la presente investigación.

Además, Ruberto et al. (2003), en una investigación similar realizada en la presente tesis, informaron una disminución inicial significativa en la concentración de hidrocarburos en el suelo en todos los sistemas durante los primeros 10 días del estudio, con una pérdida del 54% al 61%. La actividad microbiana indígena redujo el THC en un 35%, mientras que la bioaumentación con la cepa B-2-2 causó una disminución del 65%, eliminando el 75% de la fracción del contaminante del suelo al final del estudio.

Por otro lado, Samanez (2008), investigó la biodegradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo utilizando la bioestimulación con nitrógeno, fósforo y potasio y la bioaumentación con bacterias. Los resultados mostraron que la reintroducción de bacterias nativas con fertilizantes inorgánicos tuvo la mayor tasa de biodegradación de petróleo (71,4%), seguida de bacterias nativas con fertilizantes inorgánicos (66,7%), bacterias bioaumentadas sin fertilizantes inorgánicos (61,9%), bacterias nativas sin fertilizantes inorgánicos (52,3%), y un control abiótico (28%); podemos indicar también, que en este caso, la tendencia de los resultados son similares a los reportados en la presente investigación.

Roy et al. (2018), lograron una atenuación total del 46-55% de hidrocarburos de petróleo (TPH) mediante enfoques de bioestimulación y bioaumentación en residuos de refinería ricos en hidrocarburos. La modificación de fosfato, nitrato o nitrato + fosfato en el lodo y la interacción metabólica de los microorganismos nativos fueron clave para esta biorremediación acelerada. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en la presente investigación ya que también se empleó fuente de nitrógeno y fosforo como bioestimulante y se obtuvieron resultados similares.

Sarkar et al. (2016), en su estudio se destacó que la comunidad indígena de lodos de refinería era intrínsecamente diversa, pero se podía lograr una tasa apreciable de biorremediación in situ al suministrar fuentes adecuadas de N, algo similar ocurre en la presente investigación donde al adicionar fuentes de nitrógeno incrementa el proceso de degradación.

Jasmine & Mukherji (2014), probaron tres estrategias de degradación de aceite: bioaumentación con consorcios microbianos indígenas (MO), bioestimulación con nutrientes (NP) y bioestimulación con el surfactante Triton X-100 (TX). La bioestimulación con nutrientes y Triton X-100 tuvo un efecto sinérgico positivo y significativo en la degradación del petróleo y el crecimiento microbiano; estos resultados evidencian la importancia del uso de fuentes de P y N para una bioestimulación de microorganismos degradadores de petróleo; corroborado también con lo indicado por Rodríguez (2008), quien menciona que el metabolismo microbiano se dirige principalmente a la reproducción y requieren que los nutrientes se encuentren disponibles para ser asimilados y sintetizados. Entre los más importantes están el fósforo y el nitrógeno.

En la Tabla 10, se muestran los resultados de la identificación de las cepas microbianas, utilizadas en los diversos tratamientos, mediante el análisis BlastN;

lográndose identificar las siguientes bacterias: Cepa 1 *Stenotrophomonas acidaminiphila*, Cepa 2 *Pseudomonas putida* y Cepa 3 *Pseudomonas aeruginosa*. En el tratamiento M1 se empleó *Stenotrophomonas acidaminiphila*, tratamiento M2 *Pseudomona putida*, tratamiento M3 *Pseudomona aeruginosa*, tratamiento M12 *Stenotrophomonas acidaminiphila* y *Pseudomona putida*, tratamiento M13 *Stenotrophomonas acidaminiphila* y *Pseudomona aeruginosa*, tratamiento M23 y *Pseudomona putida* y *Pseudomona aeruginosa* y tratamiento M123 *Stenotrophomonas acidaminiphila*, *Pseudomona putida* y *Pseudomona aeruginosa*.

Las cepas bacterianas, degradadoras de petróleo Diesel, identificadas en la presente investigación fueron también reportadas como tal por otros investigadores; a mencionar, Mangwani et al. (2014), llevaron a cabo un estudio sobre la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) utilizando la bacteria marina *Stenotrophomonas acidaminihila* NCW-702 en biopelículas. Los resultados mostraron que las biopelículas bacterianas de *Sten. acidaminiphila* NCW-702 fueron más eficientes que las células planctónicas para la degradación de PAH, degradando el 71.1% de fenantreno y el 40.2% de pireno, en comparación con el cultivo planctónico que degradó el 38.7% de fenantreno y el 29.7% de pireno.

En el estudio de Hakima et al. (2017), se aislaron microorganismos capaces de utilizar hidrocarburos a partir de suelo contaminado de una refinería de petróleo en Libia. *Pseudomonas putida* mostró un desempeño superior en términos de crecimiento en hidrocarburos ($1,0 \times 10^{10}$ CFU (ml)), actividad emulsionante E24 (86%) y capacidad para transformar hidrocarburos en cultivo puro. Este estudio sugiere el potencial uso de *P. putida* como inoculante en la biorremediación del suelo contaminado con petróleo.

Además, Ajeel et al. (2017), aislaron 24 cepas bacterianas Gram negativas de suelos contaminados y observaron una tasa de biorremediación superior al 80% al utilizar una cepa identificada como *Pseudomonas aeruginosa*.

Por otro lado, Ebadi et al. (2017), trabajaron con cuatro cepas de *Pseudomonas aeruginosa* que producían biosurfactantes y observaron que la inoculación del suelo contaminado con este consorcio bacteriano ayudó a mitigar los efectos perjudiciales de la salinidad sobre la biodegradación de hidrocarburos de petróleo, aumentando la tasa de degradación en un 30%; además, Almamoori et al. (2018), utilizaron bacterias *Pseudomonas aeruginosa* y hongos *Penicillium expansum*

para tratar suelo contaminado con petróleo crudo. Los resultados mostraron que el tratamiento con bacterias llevó a una eliminación completa de muchos compuestos de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), mientras que el tratamiento con hongos no fue efectivo en la degradación de los HAP.

VI. CONCLUSIONES

1. El uso de nitrato de amonio y superfosfato triple como bioestimulantes demostró aumentar la actividad degradativa de los consorcios microbianos en el petróleo Diesel. Los tratamientos bioestimulados lograron tasas de remoción neta más altas que el control positivo, especialmente a concentraciones del 5% y 10%, todos los tratamientos bioestimulados alcanzaron una tasa de RN del 54,716% y 83,662%, respectivamente, en un tiempo de 28 a 70 días, mientras que el control positivo tardó 56 días en alcanzar el mismo nivel de RN para la concentración 5%.
2. La combinación de tres cepas bacterianas (Tratamiento M123) fue la más efectiva en la biodegradación del Diesel. Estos hallazgos sugieren que la bioestimulación puede ser una estrategia valiosa para mejorar la degradación microbiana del petróleo Diesel, pero se necesita más investigación para su aplicación óptima y su impacto ambiental y en la salud humana. Además, la identificación de microorganismos eficaces en la degradación es fundamental para el éxito de esta técnica.
3. El estudio identificó las cepas bacterianas, como *Stenotrophomonas acidaminiphila*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas aeruginosa*, que fueron más efectivas en la degradación del Diesel. Comprender la composición microbiana y su respuesta a la bioestimulación podría llevar al desarrollo de estrategias más específicas y efectivas para la eliminación del petróleo Diesel en el medio ambiente.

VII. RECOMENDACIONES

1. Mejorar la técnica de extracción agitación-centrifugación: Además de seguir el protocolo establecido, se recomienda realizar una cuidadosa selección de los volúmenes de diclorometano y pesos de tierra utilizados en el proceso. Estos parámetros pueden afectar los resultados finales, por lo que es importante garantizar su precisión y consistencia.
2. Se recomienda que cada laboratorio realice una validación de la técnica de extracción agitación-centrifugación para asegurar la calidad de los resultados obtenidos. Esto implica verificar la exactitud y precisión de los datos generados en comparación con estándares reconocidos. Además, se recomienda implementar un control de calidad interno utilizando muestras de suelo de referencia para monitorear y mejorar la precisión y exactitud de los resultados.
3. Establecer un sistema de organización y registro de las cepas bacterianas aisladas durante el proceso de biorremediación y bioestimulación. Esto permitirá acceder fácilmente a información relevante sobre las características y capacidades de degradación de cada cepa. Esto ampliará las posibilidades de contar con una variedad de cepas eficientes y adaptadas a diferentes situaciones de contaminación.
4. Se recomienda continuar la investigación y desarrollo de nuevas técnicas y enfoques para mejorar la eficiencia y efectividad de la degradación de hidrocarburos en el petróleo Diesel. Esto puede incluir la exploración de nuevas cepas bacterianas, la optimización de los procesos de estimulación y la integración de tecnologías complementarias.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acosta-Rodríguez, I., Moctezuma-Zárate, M. G., Tovar-Oviedo, J., & Cárdenas-González, J. F. (2011). Aislamiento e identificación de bacterias y levaduras resistentes a petróleo. *Información tecnológica*, 22(6), 103-110.
2. Ajeel, N. S., & Mohammed, A. J. (2017) Isolate and identification of *Pseudomonas aeruginosa* from contaminated soil with hydrocarbons discharged from gas filling refineries. *G.J.B.B.*, Vol.6 (2). 303-308
3. Almamoori, A. M., Saleh, M. M., & Salman, J. M. (2018). Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons polluted soils using augmentation by inoculating with bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*) and fungi (*Penicillium expansum*). *Mesopotamia Environmental Journal (mesop. environ. j)* ISSN: 2410-2598, 4(3), 60-71.
4. Arcila Quiroga, L. A. (2016). Análisis comparativo de la eficiencia de productos para la biorremediación de suelos contaminados con diesel (UN 1202) utilizando métodos de bioestimulación y bioaumentación a escala piloto (Tesis de Pregrado). Universidad De La Salle; Bogotá.
5. Asquith, E. A., Geary, P. M., Nolan, A. L., & Evans, C. A. (2012). Comparative bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by biostimulation, bioaugmentation and surfactant addition. *Journal of Environmental Science and Engineering A*, 1(5), 637-650.
6. Baca, K. (2019). Eficiencia de la bioaumentación y bioestimulación en la biodegradación de petróleo por bacterias nativas, provincia de Talara, región Piura (Tesis de Maestría): Universidad Nacional de Trujillo; Perú.
7. Benyahia, F., & Embaby, A. S. (2016). Bioremediation of crude oil contaminated desert soil: effect of biostimulation, bioaugmentation and bioavailability in biopile treatment systems. *International journal of environmental research and public health*, 13(2), 219.
8. Botello, A. V. (2005). Características, composición y propiedades fisicoquímicas del petróleo. *Golfo de México contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias*, 1(1), 261-268.
9. Cardenas Moscol, P. G. (2017). Biodegradación de hidrocarburos totales de petróleo por bioestimulación con Cachaza y Guano de Islas en suelos de la Refinería Conchan-Petroperú, Lima, 2017 (Tesis de Pregrado). Universidad Cesar Vallejo; Lima.
10. Casellas, M., Fernandez, P., Bayona, J. M., & Solanast, A. M. (1995). Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in urban airborne particulate matter from Barcelona (Spain). *Chemosphere*, 30(4), 725-740.
11. Castaño Zambrano, P. A. (2018). Evaluación de la bioestimulación en la degradación de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) de lodos provenientes de una estación de servicio del Municipio De Girardot Cundinamarca (Tesis Doctoral). Universidad de Cundinamarca; Colombia.
12. Chen, S. C., & Liao, C. M. (2006). Health risk assessment on human exposed to environmental polycyclic aromatic hydrocarbons pollution sources. *Science of the total environment*, 366(1), 112-123.
13. Clark, R. C., & Brown, D. W. (1977). *Petroleum: Properties and Analyses in Biotic and Abiotic Systems, Effects of Petroleum on Arctic and Subarctic Marine Environments and Organisms*. Vol. 1. Nature and Fate of Petroleum. I: Nature and Fate of Petroleum.
14. Comunidad de Madrid. (2002). *EL PETRÓLEO: El recorrido de la energía*. Madrid: EiSE Domenech, SA.

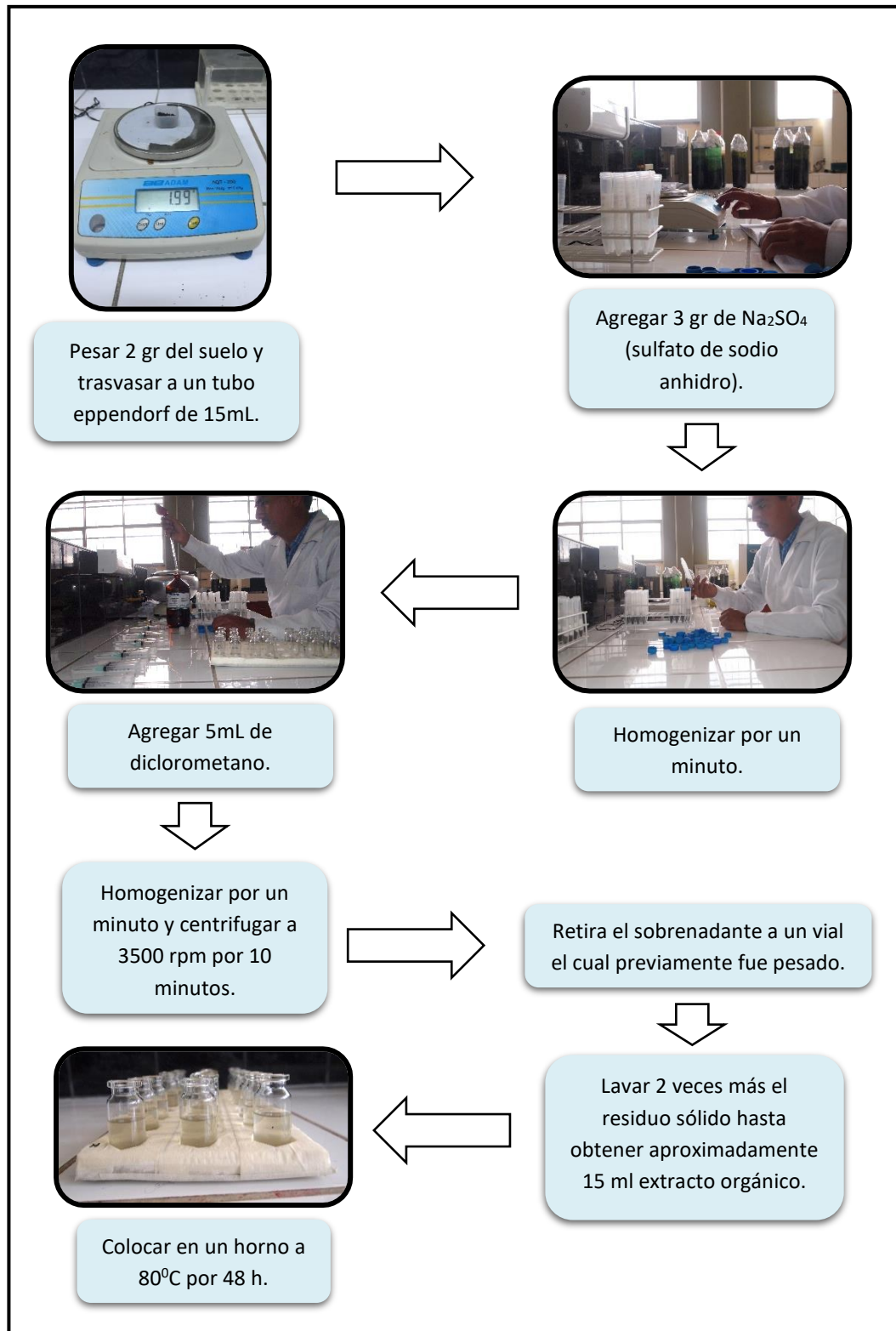
15. Couto, M. N. P., Monteiro, E., & Vasconcelos, M. T. S. (2010). Mesocosm trials of bioremediation of contaminated soil of a petroleum refinery: comparison of natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Environmental science and pollution research*, 17, 1339-1346.
16. Dua, M., Singh, A., Sethunathan, N., & Johri, A. (2002). Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Applied microbiology and biotechnology*, 59, 143-152.
17. Ebadi, A., Sima, N. A. K., Olamaee, M., Hashemi, M., & Nasrabadi, R. G. (2017). Effective bioremediation of a petroleum-polluted saline soil by a surfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* consortium. *Journal of advanced research*, 8(6), 627-633.
18. Fernández Linares, L. C., Avelizapa, R., Carrillo, R., Islas, R., & Elenacoaut, M. (2006). Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados (No. C/631.41 M3). México: Instituto Mexicano del Petróleo Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales Instituto Nacional de Ecología.
19. García, E., Roldan, F., & Garzón, L. (2011). Evaluación de la bioestimulación (nutrientes) en suelos contaminados con hidrocarburos utilizando respirometría. *Acta Biológica Colombiana*, 16(1), 195-208.
20. García-Cruz, N. U., & Aguirre-Macedo, M. L. (2014). Biodegradación de petróleo por bacterias: algunos casos de estudio en el Golfo de México. *Golfo de México: Contaminación e Impacto Ambiental, Diagnóstico y Tendencias*; Botello, AV, Rendón von Osten, J., Benítez, JA, Gold-Bouchot, G., Eds, 641-652.
21. Gómez, W., Gaviria, J., & Gallo, S. A. C. (2009). Evaluación de la bioestimulación frente a la atenuación natural y la bioalimentación en un suelo contaminado con una mezcla de Gasolina-Diesel. *DYNA: revista de la Facultad de Minas. Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín*, 76(160), 83-93.
22. Hakima, A., & Ian, S. (2017). Isolation of indigenous hydrocarbon transforming Bacteria from oil contaminated soils in Libya: selection for use as potential inocula for soil bioremediation. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, 5(1).
23. HONTY, G. (2016). Cronología de derrames petroleros e Perú. *Energía sur*, Vol. 10.
24. Howe-Grant, M. (1996). Petroleum. *Encyclopedia of chemical technology* 4th ed.
25. Jasmine, J., & Mukherji, S. (2014). Evaluation of bioaugmentation and biostimulation effects on the treatment of refinery oily sludge using 2 n full factorial design. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 16(8), 1889-1896.
26. Jiang, Y., Brassington, K. J., Prpich, G., Paton, G. I., Semple, K. T., Pollard, S. J., & Coulon, F. (2016). Insights into the biodegradation of weathered hydrocarbons in contaminated soils by bioaugmentation and nutrient stimulation. *Chemosphere*, 161, 300-307.
27. LaGrega, M. D., Buckingham, P. L. C., & Evans, J. C. C. (1996). *Gestión de Residuos Tóxicos: Tratamiento, eliminación y recuperación de suelos* (No. 628.5 L138g Vol. 1). McGraw-Hill.
28. Lladó Fernández, S. (2012). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos pesados y caracterización de comunidades microbianas implicadas (Tesis Doctoral). Universidad De Barcelona; Barcelona.
29. Lladó, S., Solanas, A. M., De Lapuente, J., Borrás, M., & Viñas, M. (2012). A diversified approach to evaluate biostimulation and bioaugmentation

- strategies for heavy-oil-contaminated soil. *Science of the total environment*, 435, 262-269.
30. Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., y Stahl, D. A. (2015). *Brock Biology of Microorganisms*. Pearson, 14th edn.
 31. Mangwani, N., Shukla, S. K., Kumari, S., Rao, T. S., & Das, S. (2014). Characterization of *Stenotrophomonas acidaminiphila* NCW-702 biofilm for implication in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of applied microbiology*, 117(4), 1012-1024.
 32. MINAM. (2 de diciembre De 2017). Decreto Supremo N° 011-2017-Minam. El Peruano, Págs. 12-15.
 33. Narváez-Flórez, S., L Gómez, M., & Martínez, M. M. (2008). Selección de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos aisladas a partir de sedimentos del caribe colombiano. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras-INVEMAR*, 37(1), 61-75.
 34. 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: Investigación y Reflexión*, 18(2), 55-74.
 35. Pardo, J., Perdomo, M., & López, J. (2004). Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo a nivel laboratorio. *Nova - Publicación Científica*, 2(2), 40-49.
 36. Pino Rodríguez, N. J., Carvajal, S., Gallo, A., & Peñuela, G. (2012). Comparación entre bioestimulación y bioaumentación para la recuperación de suelos contaminados con Diesel. *Producción+ Limpia*, 7(1), 101-108.
 37. Ramírez Carvajal, R. (1997). *Propiedades físicas químicas y biológicas de los suelos*. Santafé De Bogotá: Produmedios.
 38. Recalde, C., & Córdor, J. (2017, December). Diseño Metodológico para el Análisis Comparativo de Técnicas de Remediación *Ex-Situ*: Compostaje en Biopilas, Bioaumentación, y Bioestimulación aplicadas para la Degradación de Hidrocarburos en los Procesos de Remediación de Suelos que Ejecuta el Proyecto Amazonía Viva de Petroamazonas EP. In V CONGRESO REDU (p. 317).
 39. Rodríguez-Gonzales, A., Zárate-Villarroe, S. G., & Bastida-Codina, A. (2022). Biodiversidad bacteriana presente en suelos contaminados con hidrocarburos para realizar biorremediación. *Revista de Ciencias Ambientales*, 56(1), 178-208.
 40. Rodríguez Muñoz, L. P. (2008). Evaluación de dos sustratos de Landfarming para el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos (Tesis de Pregrado). Escuela Superior Politécnica De Chimborazo; Riobamba-Ecuador.
 41. Roy, A., Dutta, A., Pal, S., Gupta, A., Sarkar, J., Chatterjee, A., ... & Kazy, S. K. (2018). Biostimulation and bioaugmentation of native microbial community accelerated bioremediation of oil refinery sludge. *Bioresource technology*, 253, 22-32.
 42. Ruberto, L., Vazquez, S. C., & Mac Cormack, W. P. (2003). Effectiveness of the natural bacterial flora, biostimulation and bioaugmentation on the bioremediation of a hydrocarbon contaminated Antarctic soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 52(2), 115-125.
 43. Safdari, M. S., Kariminia, H. R., Rahmati, M., Fazlollahi, F., Polasko, A., Mahendra, S., ... & Fletcher, T. H. (2018). Development of bioreactors for comparative study of natural attenuation, biostimulation, and bioaugmentation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 342, 270-278.

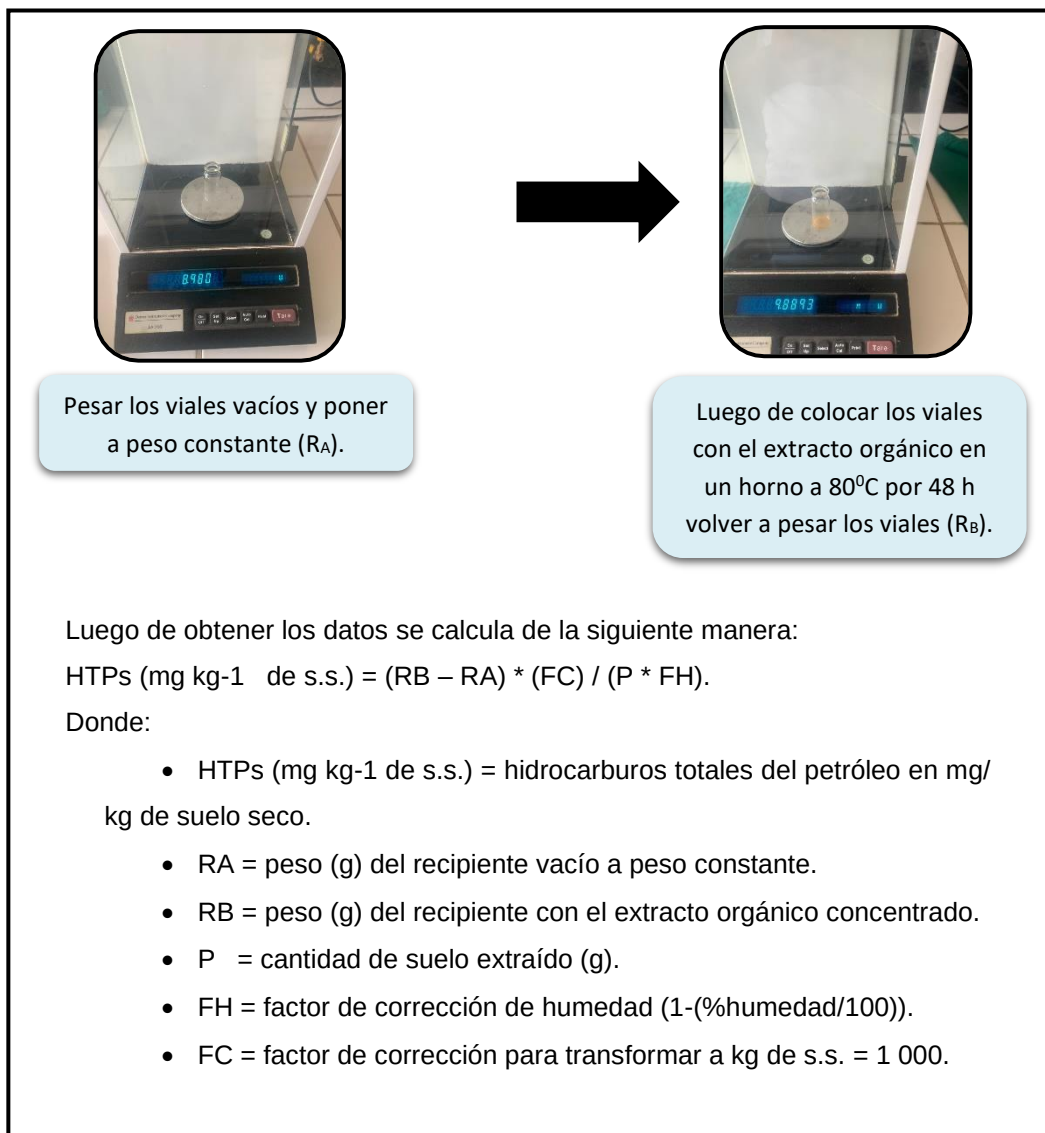
44. Samanez Gibaja, E. (2008). Biodegradación bacteriana por bioestimulación en suelos contaminados con petróleo crudo (Tesis de Maestría). UNMSM; Lima.
 45. Sarkar, J., Kazy, S. K., Gupta, A., Dutta, A., Mohapatra, B., Roy, A., ... & Sar, P. (2016). Biostimulation of indigenous microbial community for bioremediation of petroleum refinery sludge. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1407.
 46. Sierra, C. (01 de febrero De 2019). El Mercurio. Recuperado el 03 de mayo de 2019, de sitio Wep El Mercurio: <https://www.elmercurio.com/campo/noticias/analisis/2018/04/25/textura-la-principal-propiedad-fisica-del-suelo.aspx>
 47. Colla, T. S., Andreadza, R., Bückner, F., de Souza, M. M., Tramontini, L., Prado, G. R., ... & Bento, F. M. (2014). Bioremediation assessment of diesel–biodiesel-contaminated soil using an alternative bioaugmentation strategy. *Environmental science and pollution research*, 21, 2592-2602.
 48. Smith, T. M., Y Smith, R. L. (2007). *Ecología*. 6ª edición Madrid: Pearson Educación.
 49. Torres Delgado, K., & Zuluaga Montoya, T. (2009). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos. Medellín, Colombia: Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín.
 50. Vallejo, V., Salgado, L., & Roldan, F. (2005). Evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de TPHs en suelos contaminados con petróleo. *Revista colombiana de biotecnología*, 7(2), 67-78.
 51. Vásquez, M. C., Guerrero Figueroa, J. T., & Quintero, A. D. P. (2010). Biorremediación de lodos contaminados con aceites lubricantes usados. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(1), 141-157.
- Xu, Y., & Lu, M. (2010). Bioremediation of crude oil-contaminated soil: comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. *Journal of hazardous materials*, 183(1-3), 395-401.

ANEXOS

Anexo 1. Diagrama de la técnica de extracción agitación-centrifugación



Anexo 2. Diagrama del método gravimétrico.



Anexo 3. Muestras de arena fina colocadas en sus respectivos recipientes y posteriormente se contaminaron con petróleo Diesel.



Anexo 4. Preparación y adición de bioestimulantes a las muestras de arena fina.



Anexo 5. Toma de muestras para la extracción y cuantificación de petróleo Diesel de los diferentes tratamientos.



Anexo 6. Promedios de las concentraciones de petróleo Diesel residual (mg/kg⁻¹ s.s.) en los subtratamientos sometidos a bioestimulación con nitrato de amonio, superfosfato triple, blanco positivo y blanco negativo con microorganismos degradadores de petróleo Diesel del tratamiento M1, Ayacucho-2019.

TX	STX	TIEMPO	Concentraciones de petróleo Diesel			
			5%	10%	15%	20%
M1	NH ₄ NO ₃	0 días	27,474	62,996	118,332	148,018
	SFT		21,591	56,613	120,563	142,634
	CP		31,787	79,969	125,073	184,080
	CN		36,691	81,946	132,766	188,991
	NH ₄ NO ₃	14 días	12,746	50,784	110,392	139,247
	SFT		10,104	45,768	112,732	138,396
	CP		26,569	69,306	123,707	158,396
	CN		34,539	81,863	132,630	188,795
	NH ₄ NO ₃	28 días	0,000	34,897	94,193	118,348
	SFT		0,000	32,653	96,725	119,476
	CP		21,052	54,380	115,350	152,300
	CN		32,513	71,878	117,564	162,848
	NH ₄ NO ₃	42 días	0,000	19,585	82,873	104,783
	SFT		0,000	16,980	81,318	101,824
	CP		10,365	44,023	99,395	146,508
	CN		29,448	71,732	112,567	155,661
	NH ₄ NO ₃	56 días	0,000	8,054	65,347	86,724
	SFT		0,000	6,789	67,286	86,358
	CP		0,000	35,450	89,787	135,910
	CN		26,199	69,692	112,336	148,597
	NH ₄ NO ₃	70 días	0,000	0,000	53,764	75,832
	SFT		0,000	0,000	50,987	74,873
	CP		0,000	20,542	80,095	125,875
	CN		20,076	68,557	112,120	132,370

1. TX: Tratamiento.
2. STX: Subtratamiento
3. M1: Tratamiento con microorganismos de la Cepa 1 (C1)
4. NH₄NO₃: Nitrato de Amonio
5. SFT: Superfosfato triple
6. CP: Control positivo
7. CN: Control negativo

Anexo 7. Porcentajes de remoción de petróleo Diesel en los diferentes subtratamientos con microorganismos degradadores de petróleo Diesel del tratamiento M1, Ayacucho-2019.

TX	STX	TIEMPO	%PD			
			5%	10%	15%	20%
			Porcentaje de remoción de petróleo Diesel en los diferentes tratamientos			
M1	%NH ₄ NO ₃	14 días	53,607	19,385	6,710	5,926
	%SFT		53,203	19,156	6,495	2,971
	%CP		16,416	13,334	1,092	13,007
	%CN		5,865	0,101	0,102	0,104
	%NH ₄ NO ₃	28 días	46,393	25,219	13,689	14,119
	%SFT		46,797	23,166	13,277	13,265
	%CP		17,356	18,665	6,682	3,348
	%CN		5,522	12,185	11,348	13,729
	%NH ₄ NO ₃	42 días	0,000	24,306	9,566	9,164
	%SFT		0,000	27,684	12,779	12,376
	%CP		33,621	12,951	12,757	3,181
	%CN		8,354	0,178	3,764	3,803
	%NH ₄ NO ₃	56 días	0,000	18,304	14,811	12,201
	%SFT		0,000	18,001	11,639	10,843
	%CP		32,608	10,720	7,682	5,821
	%CN		8,855	2,489	0,174	3,738
	%NH ₄ NO ₃	70 días	0,000	12,785	9,789	7,359
	%SFT		0,000	11,992	13,519	8,052
	%CP		0,000	18,642	7,749	5,511
	%CN		16,688	1,385	0,163	8,586

1. TX: Tratamiento.
2. STX: Subtratamiento
3. %PD: Porcentaje de remoción de petróleo Diesel residual en mg/kg⁻¹ s.s.
4. M1: Tratamiento con microorganismos de la Cepa 1 (C1)
5. %NH₄NO₃: Porcentaje de remoción de petróleo Diesel por bioestimulación con nitrato de Amonio
6. %SFT: Porcentaje de remoción de petróleo Diesel por bioestimulación con superfosfato triple
7. %CP: Porcentaje de remoción de petróleo Diesel sin bioestimulación de microorganismos
8. %CN: porcentaje de remoción del control negativo del experimento, no contiene microorganismos

Anexo 8. Promedios de las concentraciones de petróleo Diesel residual (mg/kg^{-1} s.s.) en los subtratamientos sometidos a bioestimulación con nitrato de amonio, superfosfato triple, blanco positivo y blanco negativo con microorganismos degradadores de petróleo Diesel del tratamiento M2, Ayacucho-2019.

TX	STX	TIEMPO	Concentraciones de petróleo Diesel			
			5%	10%	15%	20%
M2	NH ₄ NO ₃	0 días	24,364	59,836	130,642	157,634
	SFT		19,274	52,074	126,746	150,047
	CP		31,787	79,969	125,073	182,08
	CN		36,691	81,946	132,766	188,991
	NH ₄ NO ₃	14 días	14,387	49,837	105,827	139,236
	SFT		9,826	50,265	112,73	139,074
	CP		26,569	69,306	123,707	158,396
	CN		34,539	81,863	132,63	188,795
	NH ₄ NO ₃	28 días	0	31,372	96,782	117,348
	SFT		0	29,837	94,671	115,476
	CP		21,052	54,38	115,35	152,3
	CN		32,513	71,878	117,564	162,848
	NH ₄ NO ₃	42 días	0	21,384	79,473	108,783
	SFT		0	15,363	83,623	106,824
	CP		10,365	44,023	99,395	146,508
	CN		29,448	71,732	112,567	155,661
	NH ₄ NO ₃	56 días	0	5,063	62,675	81,724
	SFT		0	5,982	69,729	83,358
	CP		0	35,45	89,787	135,91
	CN		26,199	69,692	112,336	148,597
	NH ₄ NO ₃	70 días	0	0	49,824	69,832
	SFT		0	0	46,823	72,873
	CP		0	20,542	80,095	125,875
	CN		20,076	68,557	112,12	132,37

1. TX: Tratamiento.
2. STX: Subtratamiento
3. %PD: Promedio de porcentaje de petróleo Diesel residual en mg/kg^{-1} s.s.
4. M2: Tratamiento con microorganismos de la Cepa 2 (C2)
5. NH₄NO₃: Nitrato de Amonio
6. SFT: Superfosfato triple
7. CP: Control positivo
8. CN: Control negativo

Anexo 9. Porcentajes de remoción de petróleo Diesel en los diferentes subtratamientos con microorganismos degradadores de petróleo Diesel del tratamiento M2, Ayacucho-2019.

TX	STX	TIEMPO	%PD			
			5%	10%	15%	20%
			Porcentaje de remoción de petróleo Diesel en los diferentes tratamientos			
M2	%NH ₄ NO ₃	14 días	40,950	16,711	18,995	11,671
	%SFT		49,019	3,474	11,058	7,313
	%CP		16,416	13,334	1,092	13,007
	%CN		5,865	0,101	0,102	0,104
	%NH ₄ NO ₃	28 días	59,050	30,859	6,924	13,885
	%SFT		50,981	39,229	14,248	15,727
	%CP		17,356	18,665	6,682	3,348
	%CN		5,522	12,185	11,348	13,729
	%NH ₄ NO ₃	42 días	0,000	16,692	13,249	5,433
	%SFT		0,000	27,795	8,717	5,766
	%CP		33,621	12,951	12,757	3,181
	%CN		8,354	0,178	3,764	3,803
	%NH ₄ NO ₃	56 días	0,000	27,276	12,858	17,166
	%SFT		0,000	18,015	10,962	15,639
	%CP		32,608	10,720	7,682	5,821
	%CN		8,855	2,489	0,174	3,738
	%NH ₄ NO ₃	70 días	0,000	8,461	9,837	7,544
	%SFT		0,000	11,487	18,072	6,988
	%CP		0,000	18,642	7,749	5,511
	%CN		16,688	1,385	0,163	8,586

1. TX: Tratamiento.
2. STX: Subtratamiento
3. %PD: Promedio de porcentaje de petróleo Diesel residual en mg/kg⁻¹ s.s.
4. M2: Tratamiento con microorganismos de la Cepa 2 (C2)
5. %NH₄NO₃: Porcentaje de remoción de petróleo Diesel por bioestimulación con nitrato de Amonio
6. %SFT: Porcentaje de remoción de petróleo Diesel por bioestimulación con superfosfato triple
7. %CP: Porcentaje de remoción de petróleo Diesel sin bioestimulación de microorganismos
8. %CN: porcentaje de remoción del control negativo del experimento, no contiene microorganismos

Anexo 10. Promedios de las concentraciones de petróleo Diesel residual (mg/kg⁻¹ s.s.) en los subtratamientos sometidos a bioestimulación con nitrato de amonio, superfosfato triple, blanco positivo y blanco negativo con microorganismos degradadores de petróleo Diesel del tratamiento M3, Ayacucho-2019.

TX	STX	TIEMPO	Concentraciones de petróleo Diesel			
			5%	10%	15%	20%
M3	NH ₄ NO ₃	0 días	31,364	63,897	124,642	147,634
	SFT		24,274	56,038	117,746	143,047
	CP		31,787	79,969	125,073	182,08
	CN		36,691	81,946	132,766	188,991
	NH ₄ NO ₃	14 días	22,249	52,801	115,689	147,098
	SFT		20,688	52,229	116,592	142,936
	CP		26,569	69,306	123,707	158,396
	CN		34,539	81,863	132,63	188,795
	NH ₄ NO ₃	28 días	7,515	34,336	102,644	126,21
	SFT		6,725	31,801	101,533	129,338
	CP		21,052	54,38	115,35	152,3
	CN		32,513	71,878	117,564	162,848
	NH ₄ NO ₃	42 días	0	21,348	87,625	117,935
	SFT		0	15,327	86,775	120,976
	CP		10,365	44,023	99,395	146,508
	CN		29,448	71,732	112,567	155,661
	NH ₄ NO ₃	56 días	0	8,927	70,827	99,876
	SFT		0	8,646	75,881	95,51
	CP		0	35,45	89,787	135,91
	CN		26,199	69,692	112,336	148,597
	NH ₄ NO ₃	70 días	0	0,032	57,976	81,984
	SFT		0	0,029	53,975	85,025
	CP		0	20,542	80,095	125,875
	CN		20,076	68,557	112,12	132,37

1. TX: Tratamiento.
2. STX: Subtratamiento
3. M3: Tratamiento con microorganismos de la Cepa 3 (C3)
4. NH₄NO₃: Nitrato de Amonio
5. SFT: Superfosfato triple
6. CP: Control positivo
7. CN: Control negativo

Anexo 11. Porcentajes de remoción de petróleo Diesel en los diferentes subtratamientos con microorganismos degradadores de petróleo Diesel del tratamiento M3, Ayacucho-2019.

TX	STX	TIEMPO	%PD			
			5%	10%	15%	20%
			Porcentaje de remoción de petróleo Diesel en los diferentes tratamientos			
M3	%NH ₄ NO ₃	14 días	29,062	17,365	7,183	0,363
	%SFT		14,773	6,797	0,980	0,078
	%CP		16,416	13,334	1,092	13,007
	%CN		5,865	0,101	0,102	0,104
	%NH ₄ NO ₃	28 días	46,977	28,898	10,466	14,149
	%SFT		57,522	36,454	12,789	9,506
	%CP		17,356	18,665	6,682	3,348
	%CN		5,522	12,185	11,348	13,729
	%NH ₄ NO ₃	42 días	23,961	20,326	12,050	5,605
	%SFT		27,705	29,398	12,534	5,846
	%CP		33,621	12,951	12,757	3,181
	%CN		8,354	0,178	3,764	3,803
	%NH ₄ NO ₃	56 días	0,000	19,439	13,477	12,232
	%SFT		0,000	11,922	9,252	17,803
	%CP		32,608	10,720	7,682	5,821
	%CN		8,855	2,489	0,174	3,738
	%NH ₄ NO ₃	70 días	0,000	13,921	10,310	12,119
	%SFT		0,000	15,377	18,604	7,330
	%CP		0,000	18,642	7,749	5,511
	%CN		16,688	1,385	0,163	8,586

1. TX: Tratamiento.
2. STX: Subtratamiento
3. %PD: Promedio de porcentaje de petróleo Diesel residual en mg/kg⁻¹ s.s.
4. M3: Tratamiento con microorganismos de la Cepa 3 (C3)
5. %NH₄NO₃: Porcentaje de remoción de petróleo Diesel por bioestimulación con nitrato de Amonio
6. %SFT: Porcentaje de remoción de petróleo Diesel por bioestimulación con superfosfato triple
7. %CP: Porcentaje de remoción de petróleo Diesel sin bioestimulación de microorganismos
8. %CN: porcentaje de remoción del control negativo del experimento, no contiene microorganismos

Anexo 12. Promedios de las concentraciones de petróleo Diesel residual (mg/kg^{-1} s.s.) en los subtratamientos sometidos a bioestimulación con nitrato de amonio, superfosfato triple, blanco positivo y blanco negativo con microorganismos degradadores de petróleo Diesel del tratamiento M12, Ayacucho-2019.

TX	STX	TIEMPO	%PD			
			5%	10%	15%	20%
M12	NH ₄ NO ₃	0 días	29,237	56,989	149,505	157,798
	SFT		24,147	49,227	145,609	149,211
	CP		31,787	79,969	125,073	182,08
	CN		36,691	81,946	132,766	188,991
	NH ₄ NO ₃	14 días	19,26	46,99	112,69	132,4
	SFT		14,699	47,418	119,593	132,238
	CP		26,569	69,306	123,707	158,396
	CN		34,539	81,863	132,63	188,795
	NH ₄ NO ₃	28 días	0	28,525	103,645	110,512
	SFT		0	26,99	101,534	108,64
	CP		21,052	54,38	115,35	152,3
	CN		32,513	71,878	117,564	162,848
	NH ₄ NO ₃	42 días	0	18,537	86,336	101,947
	SFT		0	12,516	90,486	99,988
	CP		10,365	44,023	99,395	146,508
	CN		29,448	71,732	112,567	155,661
	NH ₄ NO ₃	56 días	0	2,216	69,538	74,888
	SFT		0	3,135	76,592	76,522
	CP		0	35,45	89,787	135,91
	CN		26,199	69,692	112,336	148,597
	NH ₄ NO ₃	70 días	0	0	47,687	61,996
	SFT		0	0	43,686	60,037
	CP		0	20,542	80,095	125,875
	CN		20,076	68,557	112,12	132,37

1. TX: Tratamiento.
2. STX: Subtratamiento
3. %PD: Promedio de porcentaje de petróleo Diesel residual en mg/kg^{-1} s.s.
4. M12: Tratamiento con microorganismos de la Cepa 1 (C1) y Cepa 2 (C2)
5. NH₄NO₃: Nitrato de Amonio
6. SFT: Superfosfato triple
7. CP: Control positivo
8. CN: Control negativo

Anexo 13. Porcentajes de remoción de petróleo Diesel en los diferentes subtratamientos con microorganismos degradadores de petróleo Diesel del tratamiento M12, Ayacucho-2019.

TX	STX	TIEMPO	%PD			
			5%	10%	15%	20%
			Porcentaje de remoción de petróleo crudo en los diferentes tratamientos			
M12	%NH ₄ NO ₃	14 días	34,125	17,545	24,625	16,095
	%SFT		39,127	3,675	17,867	11,375
	%CP		16,416	13,334	1,092	13,007
	%CN		5,865	0,101	0,102	0,104
	%NH ₄ NO ₃	28 días	65,875	32,401	6,050	13,871
	%SFT		60,873	41,498	12,402	15,815
	%CP		17,356	18,665	6,682	3,348
	%CN		5,522	12,185	11,348	13,729
	%NH ₄ NO ₃	42 días	0,000	17,526	11,578	5,428
	%SFT		0,000	29,403	7,587	5,799
	%CP		33,621	12,951	12,757	3,181
	%CN		8,354	0,178	3,764	3,803
	%NH ₄ NO ₃	56 días	0,000	28,639	11,236	17,148
	%SFT		0,000	19,057	9,542	15,727
	%CP		32,608	10,720	7,682	5,821
	%CN		8,855	2,489	0,174	3,738
	%NH ₄ NO ₃	70 días	0,000	3,888	14,616	8,170
	%SFT		0,000	6,368	22,599	11,048
	%CP		0,000	18,642	7,749	5,511
	%CN		16,688	1,385	0,163	8,586

1. TX: Tratamiento.
2. STX: Subtratamiento
3. %PD: Promedio de porcentaje de petróleo Diesel residual en mg/kg⁻¹ s.s.
4. M12: Tratamiento con microorganismos de la Cepa 1 (C1) y Cepa 2 (C2)
5. %NH₄NO₃: Porcentaje de remoción de petróleo Diesel por bioestimulación con nitrato de Amonio
6. %SFT: Porcentaje de remoción de petróleo Diesel por bioestimulación con superfosfato triple
7. %CP: Porcentaje de remoción de petróleo Diesel sin bioestimulación de microorganismos
8. %CN: porcentaje de remoción del control negativo del experimento, no contiene microorganismos

Anexo 14. Promedios de las concentraciones de petróleo Diesel residual (mg/kg^{-1} s.s.) en los subtratamientos sometidos a bioestimulación con nitrato de amonio, superfosfato triple, blanco positivo y blanco negativo con microorganismos degradadores de petróleo Diesel del tratamiento M13, Ayacucho-2019.

TX	STX	TIEMPO	%PD			
			5%	10%	15%	20%
M13	NH ₄ NO ₃	0 días	39,983	60,989	142,505	130,126
	SFT		34,893	53,227	132,609	123,539
	CP		31,787	79,969	125,073	182,08
	CN		36,691	81,946	132,766	188,991
	NH ₄ NO ₃	14 días	30,006	50,99	108,69	119,728
	SFT		25,445	51,418	115,593	119,566
	CP		26,569	69,306	123,707	158,396
	CN		34,539	81,863	132,63	188,795
	NH ₄ NO ₃	28 días	0	32,525	99,645	97,84
	SFT		0	30,99	97,534	95,968
	CP		21,052	54,38	115,35	152,3
	CN		32,513	71,878	117,564	162,848
	NH ₄ NO ₃	42 días	0	22,537	82,336	89,275
	SFT		0	16,516	86,486	87,316
	CP		10,365	44,023	99,395	146,508
	CN		29,448	71,732	112,567	155,661
	NH ₄ NO ₃	56 días	0	6,216	65,538	62,216
	SFT		0	7,135	72,592	63,85
	CP		0	35,45	89,787	135,91
	CN		26,199	69,692	112,336	148,597
	NH ₄ NO ₃	70 días	0	0	45,687	53,324
	SFT		0	0	42,686	50,365
	CP		0	20,542	80,095	125,875
	CN		20,076	68,557	112,12	132,37

1. TX: Tratamiento.
2. STX: Subtratamiento
3. %PD: Promedio de porcentaje de petróleo Diesel residual en mg/kg^{-1} s.s.
4. M13: Tratamiento con microorganismos de la Cepa 1 (C1) y Cepa 3 (C3)
5. NH₄NO₃: Nitrato de Amonio
6. SFT: Superfosfato triple
7. CP: Control positivo
8. CN: Control negativo

Anexo 15. Porcentajes de remoción de petróleo Diesel en los diferentes subtratamientos con microorganismos degradadores de petróleo Diesel del tratamiento M13, Ayacucho-2019.

TX	STX	TIEMPO	%PD			
			5%	10%	15%	20%
			Porcentaje de remoción de petróleo crudo en los diferentes tratamientos			
M13	%NH ₄ NO ₃	14 días	24,953	16,395	23,729	7,991
	%SFT		27,077	3,399	12,832	3,216
	%CP		16,416	13,334	1,092	13,007
	%CN		5,865	0,101	0,102	0,104
	%NH ₄ NO ₃	28 días	75,047	30,276	6,347	16,821
	%SFT		72,923	38,379	13,618	19,102
	%CP		17,356	18,665	6,682	3,348
	%CN		5,522	12,185	11,348	13,729
	%NH ₄ NO ₃	42 días	0,000	16,377	12,146	6,582
	%SFT		0,000	27,193	8,331	7,003
	%CP		33,621	12,951	12,757	3,181
	%CN		8,354	0,178	3,764	3,803
	%NH ₄ NO ₃	56 días	0,000	26,761	11,788	20,794
	%SFT		0,000	17,625	10,477	18,995
	%CP		32,608	10,720	7,682	5,821
	%CN		8,855	2,489	0,174	3,738
	%NH ₄ NO ₃	70 días	0,000	10,192	13,930	6,833
	%SFT		0,000	13,405	22,552	10,916
	%CP		0,000	18,642	7,749	5,511
	%CN		16,688	1,385	0,163	8,586

1. TX: Tratamiento.
2. STX: Subtratamiento
3. %PD: Promedio de porcentaje de petróleo Diesel residual en mg/kg⁻¹ s.s.
4. M13: Tratamiento con microorganismos de la Cepa 1 (C1) y Cepa 3 (C3)
5. %NH₄NO₃: Porcentaje de remoción de petróleo Diesel por bioestimulación con nitrato de Amonio
6. %SFT: Porcentaje de remoción de petróleo Diesel por bioestimulación con superfosfato triple
7. %CP: Porcentaje de remoción de petróleo Diesel sin bioestimulación de microorganismos
8. %CN: porcentaje de remoción del control negativo del experimento, no contiene microorganismos

Anexo 16. Promedios de las concentraciones de petróleo Diesel residual (mg/kg^{-1} s.s.) en los subtratamientos sometidos a bioestimulación con nitrato de amonio, superfosfato triple, blanco positivo y blanco negativo con microorganismos degradadores de petróleo Diesel del tratamiento M23, Ayacucho-2019.

TX	STX	TIEMPO	%PD			
			5%	10%	15%	20%
M23	NH ₄ NO ₃	0 días	39,983	60,989	142,505	130,126
	SFT		34,893	53,227	132,609	123,539
	CP		31,787	79,969	125,073	182,08
	CN		36,691	81,946	132,766	188,991
	NH ₄ NO ₃	14 días	30,006	50,99	108,69	119,728
	SFT		25,445	51,418	115,593	119,566
	CP		26,569	69,306	123,707	158,396
	CN		34,539	81,863	132,63	188,795
	NH ₄ NO ₃	28 días	0	32,525	99,645	97,84
	SFT		0	30,99	97,534	95,968
	CP		21,052	54,38	115,35	152,3
	CN		32,513	71,878	117,564	162,848
	NH ₄ NO ₃	42 días	0	22,537	82,336	89,275
	SFT		0	16,516	86,486	87,316
	CP		10,365	44,023	99,395	146,508
	CN		29,448	71,732	112,567	155,661
	NH ₄ NO ₃	56 días	0	6,216	65,538	62,216
	SFT		0	7,135	72,592	63,85
	CP		0	35,45	89,787	135,91
	CN		26,199	69,692	112,336	148,597
	NH ₄ NO ₃	70 días	0	0	45,687	53,324
	SFT		0	0	42,686	50,365
	CP		0	20,542	80,095	125,875
	CN		20,076	68,557	112,12	132,37

1. TX: Tratamiento.
2. STX: Subtratamiento
3. %PD: Promedio de porcentaje de petróleo Diesel residual en mg/kg^{-1} s.s.
4. M23: Tratamiento con microorganismos de la Cepa 2 (C2) y Cepa 3 (C3)
5. NH₄NO₃: Nitrato de Amonio
6. SFT: Superfosfato triple
7. CP: Control positivo
8. CN: Control negativo

Anexo 17. Porcentajes de remoción de petróleo Diesel en los diferentes subtratamientos con microorganismos degradadores de petróleo Diesel del tratamiento M23, Ayacucho-2019.

TX	STX	TIEMPO	%PD			
			5%	10%	15%	20%
			Porcentaje de remoción de petróleo crudo en los diferentes tratamientos			
M23	%NH ₄ NO ₃	14 días	29,224	14,961	19,739	12,268
	%SFT		32,523	3,062	8,805	6,392
	%CP		16,416	13,334	1,092	13,007
	%CN		5,865	0,101	0,102	0,104
	%NH ₄ NO ₃	28 días	70,776	27,627	7,497	14,596
	%SFT		67,477	34,580	15,876	16,811
	%CP		17,356	18,665	6,682	3,348
	%CN		5,522	12,185	11,348	13,729
	%NH ₄ NO ₃	42 días	0,000	14,944	14,347	5,711
	%SFT		0,000	24,501	9,712	6,163
	%CP		33,621	12,951	12,757	3,181
	%CN		8,354	0,178	3,764	3,803
	%NH ₄ NO ₃	56 días	0,000	24,419	13,923	18,044
	%SFT		0,000	15,880	12,214	16,717
	%CP		32,608	10,720	7,682	5,821
	%CN		8,855	2,489	0,174	3,738
	%NH ₄ NO ₃	70 días	0,000	18,049	12,309	8,597
	%SFT		0,000	21,976	21,895	12,456
	%CP		0,000	18,642	7,749	5,511
	%CN		16,688	1,385	0,163	8,586

1. TX: Tratamiento.
2. STX: Subtratamiento
3. %PD: Promedio de porcentaje de petróleo Diesel residual en mg/kg⁻¹ s.s.
4. M23: Tratamiento con microorganismos de la Cepa 2 (C2) y Cepa 3 (C3)
5. %NH₄NO₃: Porcentaje de remoción de petróleo Diesel por bioestimulación con nitrato de Amonio
6. %SFT: Porcentaje de remoción de petróleo Diesel por bioestimulación con superfosfato triple
7. %CP: Porcentaje de remoción de petróleo Diesel sin bioestimulación de microorganismos
8. %CN: porcentaje de remoción del control negativo del experimento, no contiene microorganismos

Anexo 18. Promedios de las concentraciones de petróleo Diesel residual (mg/kg^{-1} s.s.) en los subtratamientos sometidos a bioestimulación con nitrato de amonio, superfosfato triple, blanco positivo y blanco negativo con microorganismos degradadores de petróleo Diesel del tratamiento M123, Ayacucho-2019.

TX	STX	TIEMPO	%PD			
			5%	10%	15%	20%
M123	NH ₄ NO ₃	0 días	38,11	62,836	136,649	148,962
	SFT		33,02	55,074	132,753	140,375
	CP		31,787	79,969	125,073	182,08
	CN		36,691	81,946	132,766	188,991
	NH ₄ NO ₃	14 días	28,133	52,837	99,834	123,564
	SFT		23,572	53,265	106,737	123,402
	CP		26,569	69,306	123,707	158,396
	CN		34,539	81,863	132,63	188,795
	NH ₄ NO ₃	28 días	0	34,372	90,789	101,676
	SFT		0	32,837	88,678	99,804
	CP		21,052	54,38	115,35	152,3
	CN		32,513	71,878	117,564	162,848
	NH ₄ NO ₃	42 días	0	24,384	73,48	93,111
	SFT		0	18,363	77,63	91,152
	CP		10,365	44,023	99,395	146,508
	CN		29,448	71,732	112,567	155,661
	NH ₄ NO ₃	56 días	0	8,063	56,682	66,052
	SFT		0	8,982	63,736	67,686
	CP		0	35,45	89,787	135,91
	CN		26,199	69,692	112,336	148,597
	NH ₄ NO ₃	70 días	0	0	34,831	53,16
	SFT		0	0	30,83	51,201
	CP		0	20,542	80,095	125,875
	CN		20,076	68,557	112,12	132,37

1. TX: Tratamiento.
2. STX: Subtratamiento
3. %PD: Promedio de porcentaje de petróleo Diesel residual en mg/kg^{-1} s.s.
4. M123: Tratamiento con microorganismos de la Cepa 1 (C1), Cepa 2 (C2) y Cepa 3 (C3)
5. NH₄NO₃: Nitrato de Amonio
6. SFT: Superfosfato triple
7. CP: Control positivo
8. CN: Control negativo

Anexo 19. Porcentajes de remoción de petróleo Diesel en los diferentes subtratamientos con microorganismos degradadores de petróleo Diesel del tratamiento M123, Ayacucho-2019.

TX	STX	TIEMPO	%PD			
			5%	10%	15%	20%
			Porcentaje de remoción de petróleo crudo en los diferentes tratamientos			
M123	%NH ₄ NO ₃	14 días	26,179	15,913	26,941	17,050
	%SFT		28,613	3,285	19,597	12,091
	%CP		16,416	13,334	1,092	13,007
	%CN		5,865	0,101	0,102	0,104
	%NH ₄ NO ₃	28 días	73,821	29,386	6,619	14,694
	%SFT		71,387	37,092	13,603	16,811
	%CP		17,356	18,665	6,682	3,348
	%CN		5,522	12,185	11,348	13,729
	%NH ₄ NO ₃	42 días	0,000	15,895	12,667	5,750
	%SFT		0,000	26,281	8,322	6,163
	%CP		33,621	12,951	12,757	3,181
	%CN		8,354	0,178	3,764	3,803
	%NH ₄ NO ₃	56 días	0,000	25,974	12,293	18,165
	%SFT		0,000	17,033	10,466	16,717
	%CP		32,608	10,720	7,682	5,821
	%CN		8,855	2,489	0,174	3,738
	%NH ₄ NO ₃	70 días	0,000	12,832	15,991	8,655
	%SFT		0,000	16,309	24,787	11,744
	%CP		0,000	18,642	7,749	5,511
	%CN		16,688	1,385	0,163	8,586

1. TX: Tratamiento.
2. STX: Subtratamiento
3. %PD: Promedio de porcentaje de petróleo Diesel residual en mg/kg⁻¹ s.s.
4. M123: Tratamiento con microorganismos de la Cepa 1 (C1), Cepa 2 (C2) y Cepa 3 (C3)
5. %NH₄NO₃: Porcentaje de remoción de petróleo Diesel por bioestimulación con nitrato de Amonio
6. %SFT: Porcentaje de remoción de petróleo Diesel por bioestimulación con superfosfato triple
7. %CP: Porcentaje de remoción de petróleo Diesel sin bioestimulación de microorganismos
8. %CN: porcentaje de remoción del control negativo del experimento, no contiene microorganismos

Anexo 20. Pruebas de normalidad para de la concentración de petróleo Diesel de 10%.

	TRATAMIENTO	Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
10% PD	M123-CP	.901	3	.389
	M123-NH ₄ NO ₃	.964	3	.637
	M123-SFT	.962	3	.625
	M12-CP	.911	3	.421
	M12-NH ₄ NO ₃	.994	3	.847
	M12-SFT	.832	3	.194
	M13-CP	.948	3	.559
	M13-NH ₄ NO ₃	.893	3	.363
	M13-SFT	.852	3	.246
	M1-CP	.949	3	.563
	M1-NH ₄ NO ₃	.969	3	.661
	M1-SFT	.817	3	.156
	M23-CP	.919	3	.449
	M23-NH ₄ NO ₃	.953	3	.584
	M23-SFT	.959	3	.613
	M2-CP	1.000	3	1.000
	M2-NH ₄ NO ₃	.958	3	.605
	M2-SFT	.943	3	.540
	M3-CP	.842	3	.220
	M3-NH ₄ NO ₃	.812	3	.144
	M3-SFT	.805	3	.126

Anexo 21. Pruebas de normalidad para de la concentración de petróleo Diesel de 15%.

	TRATAMIENTO	Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
15% PD	M123-CP	.963	3	.629
	M123-NH ₄ NO ₃	.890	3	.353
	M123-SFT	.982	3	.743
	M12-CP	.993	3	.843
	M12-NH ₄ NO ₃	.959	3	.613
	M12-SFT	.959	3	.608
	M13-CP	.994	3	.848
	M13-NH ₄ NO ₃	.901	3	.389
	M13-SFT	.936	3	.511
	M1-CP	.981	3	.734
	M1-NH ₄ NO ₃	.875	3	.310
	M1-SFT	.996	3	.883
	M23-CP	.836	3	.203
	M23-NH ₄ NO ₃	.986	3	.774
	M23-SFT	.998	3	.925
	M2-CP	.992	3	.833
	M2-NH ₄ NO ₃	1.000	3	.963
	M2-SFT	.826	3	.178
	M3-CP	.951	3	.574
	M3-NH ₄ NO ₃	.982	3	.744
	M3-SFT	.839	3	.213

Anexo 22. Pruebas de normalidad para de la concentración de petróleo Diesel de 20%.

	TRATAMIENTO	Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
20% PD	M123-CP	.992	3	.830
	M123-NH ₄ NO ₃	.901	3	.388
	M123-SFT	.935	3	.507
	M12-CP	.945	3	.547
	M12-NH ₄ NO ₃	.987	3	.783
	M12-SFT	.988	3	.794
	M13-CP	.953	3	.580
	M13-NH ₄ NO ₃	.999	3	.952
	M13-SFT	.939	3	.525
	M1-CP	.999	3	.947
	M1-NH ₄ NO ₃	.954	3	.587
	M1-SFT	.873	3	.304
	M23-CP	.983	3	.753
	M23-NH ₄ NO ₃	.867	3	.287
	M23-SFT	.986	3	.778
	M2-CP	1.000	3	.962
	M2-NH ₄ NO ₃	.934	3	.505
	M2-SFT	.916	3	.437
	M3-CP	.998	3	.918
	M3-NH ₄ NO ₃	.888	3	.347
	M3-SFT	.815	3	.150

Anexo 23. Análisis de varianza para los porcentajes 10%, 15% y 20% de petróleo Diesel tratamientos y subtratamientos.

ANÁLISIS DE VARIANZA

		Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
10% PD	Entre grupos	7594.551	20	379.728	338593.631	<.001
	Dentro de grupos	0.047	42	0.001		
	Total	7594.598	62			
15% PD	Entre grupos	11903.170	20	595.158	333820.173	<.001
	Dentro de grupos	0.075	42	0.002		
	Total	11903.245	62			
20% PD	Entre grupos	8855.222	20	442.761	331679.315	<.001
	Dentro de grupos	0.056	42	0.001		
	Total	8855.278	62			

Anexo 24. Comparaciones múltiples Tukey para el porcentaje de petróleo Diesel 10 % entre tratamientos y subtratamientos.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

TRATAMIENTO	N	Media	Agrupación
M12-NH ₄ NO ₃	3	83.662	A
M12-SFT	3	83.662	A
M13-NH ₄ NO ₃	3	83.662	A
M3-NH ₄ NO ₃	3	83.662	A
M3-SFT	3	83.662	A
M123-NH ₄ NO ₃	3	83.662	A
M23-SFT	3	83.662	A
M2-SFT	3	83.662	A
M1-NH ₄ NO ₃	3	83.662	A
M23-NH ₄ NO ₃	3	83.662	A
M2-NH ₄ NO ₃	3	83.662	A
M13-SFT	3	83.662	A
M123-SFT	3	83.662	A
M1-SFT	3	83.662	A
M123-CP	3	64.927	B
M12-CP	3	61.948	C
M13-CP	3	60.994	D
M23-CP	3	60.230	E
M2-CP	3	59.917	F
M1-CP	3	57.974	G
M3-CP	3	57.785	H

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 25. Comparaciones múltiples Tukey para el porcentaje de petróleo Diesel 15 % entre tratamientos y subtratamientos.

TRATAMIENTO	N	Media	Agrupación
M123-SFT	3	61.224	A
M123-NH ₄ NO ₃	3	58.960	B
M12-SFT	3	54.446	C
M23-SFT	3	52.951	D
M12-NH ₄ NO ₃	3	52.554	E
M13-NH ₄ NO ₃	3	52.389	F
M23-NH ₄ NO ₃	3	52.264	F
M13-SFT	3	52.259	F
M2-SFT	3	47.506	G
M2-NH ₄ NO ₃	3	46.312	H
M1-SFT	3	42.158	I
M1-NH ₄ NO ₃	3	39.014	J
M3-SFT	3	38.608	K
M3-NH ₄ NO ₃	3	37.935	L
M123-CP	3	27.364	M
M12-CP	3	24.385	N
M13-CP	3	23.431	O
M23-CP	3	22.667	P
M2-CP	3	22.354	Q
M1-CP	3	20.411	R
M3-CP	3	20.222	S

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 26. Comparaciones múltiples Tukey para el porcentaje de petróleo Diesel 20 % entre tratamientos y subtratamientos.

TRATAMIENTO	N	Media	Agrupación
M123-NH ₄ NO ₃	3	34.354	A
M123-SFT	3	33.566	B
M12-NH ₄ NO ₃	3	30.752	C
M12-SFT	3	29.804	D
M13-SFT	3	29.272	E
M23-NH ₄ NO ₃	3	29.256	E
M13-NH ₄ NO ₃	3	29.061	F
M23-SFT	3	28.579	G
M2-NH ₄ NO ₃	3	25.739	H
M2-SFT	3	21.473	I
M1-NH ₄ NO ₃	3	18.809	J
M1-SFT	3	17.547	K
M3-NH ₄ NO ₃	3	14.508	L
M3-SFT	3	10.603	M
M123-CP	3	7.861	N
M12-CP	3	4.882	O
M13-CP	3	3.928	P
M23-CP	3	3.164	Q
M2-CP	3	2.851	R
M1-CP	3	0.908	S
M3-CP	3	0.719	T

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 27. Cuantificación para 16S rRNA como producto de la PCR.

Muestra	Cuantificación (ng/uL)
C-1 (R1)	38,5 ng/uL
C-2 (R2)	45 ng/uL
C-3 (R3)	56,7 ng/uL

Anexo 28. Decreto Supremo N° 011-2017-MINAM

12

NORMAS LEGALES

Sábado 2 de diciembre de 2017 /  El Peruano

Que, de conformidad con lo previsto en el artículo 14 del 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, y el artículo 39 del Reglamento sobre Transparencia, Acceso a la Información Pública Ambiental y Participación y Consulta Ciudadana en Asuntos Ambientales, aprobado por Decreto Supremo N° 002-2009-MINAM; corresponde disponer la publicación de la propuesta de metodología en el Diario Oficial El Peruano, antes de la fecha prevista para su entrada en vigencia, con la finalidad de permitir a las personas interesadas formular los comentarios y aportes respectivos;

Con los vistos de la Secretaría General, la Dirección de Gestión de Calidad de los Recursos Hídricos, la Oficina de Asesoría Jurídica, y en uso de las facultades conferidas en la Ley de Recursos Hídricos, el Reglamento de Organización y Funciones de esta autoridad, aprobado por Decreto Supremo N° 06-2010-AG, y modificado por Decreto Supremo N° 012-2016-MINAGRI;

SE RESUELVE:

Artículo 1.- Dispóngase la publicación de la presente resolución en el Diario Oficial El Peruano y del documento denominado "Metodología para la determinación del índice de calidad de agua para los recursos hídricos superficiales en el Perú ICA-PE", en el portal web de la Autoridad Nacional del Agua: www.ana.gob.pe, por el plazo de quince (15) días hábiles, a fin que los interesados remitan sus opiniones y sugerencias a la dirección electrónica siguiente: IndiceCalidadAgua@ana.gob.pe.

Artículo 2.- Encargar a la Dirección de Gestión de Calidad de los Recursos Hídricos, la recepción y análisis de los aportes y comentarios que se presenten respecto al documento citado en el artículo precedente.

Regístrese, comuníquese y publíquese,

ABELARDO DE LA TORRE VILLANUEVA
Jefe
Autoridad Nacional del Agua

1593024-1

AMBIENTE

Aprueban Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Suelo

DECRETO SUPREMO
N° 011-2017-MINAM

EL PRESIDENTE DE LA REPÚBLICA

CONSIDERANDO:

Que, el numeral 22 del artículo 2 de la Constitución Política del Perú establece que toda persona tiene derecho a gozar de un ambiente equilibrado y adecuado al desarrollo de su vida;

Que, de acuerdo con lo establecido en el artículo 3 de la Ley N° 28611, Ley General del Ambiente, en adelante la Ley, el Estado, a través de sus entidades y órganos correspondientes, diseña y aplica, entre otros, las normas que sean necesarias para garantizar el efectivo ejercicio de los derechos y el cumplimiento de las obligaciones y responsabilidades contenidas en la Ley;

Que, el numeral 31.1 del artículo 31 de la Ley define al Estándar de Calidad Ambiental (ECA) como la medida que establece el nivel de concentración o del grado de elementos, sustancias o parámetros físicos, químicos y biológicos, presentes en el aire, agua o suelo, en su condición de cuerpo receptor, que no representa riesgo significativo para la salud de las personas ni al ambiente; asimismo, el numeral 31.2 del artículo 31 de la Ley establece que el ECA es obligatorio en el diseño de las normas legales y las políticas públicas, así como un referente obligatorio en el diseño y aplicación de todos los instrumentos de gestión ambiental;

Que, según lo dispuesto en el numeral 33.1 del artículo 33 de la Ley, la Autoridad Ambiental Nacional dirige el proceso de elaboración y revisión de ECA y, en coordinación con los sectores correspondientes, elabora o encarga las propuestas de ECA, las que serán remitidas a la Presidencia del Consejo de Ministros para su aprobación mediante decreto supremo;

Que, en virtud a lo dispuesto por el numeral 33.4 del artículo 33 de la Ley, en el proceso de revisión de los parámetros de contaminación ambiental, con la finalidad de determinar nuevos niveles de calidad, se aplica el principio de gradualidad, permitiendo ajustes progresivos a dichos niveles para las actividades en curso;

Que, de conformidad con el literal d) del artículo 7 del Decreto Legislativo N° 1013, que aprueba la Ley de Creación, Organización y Funciones del Ministerio del Ambiente, esta entidad tiene como función específica elaborar los ECA, los cuales deberán contar con la opinión del sector correspondiente y ser aprobados mediante decreto supremo;

Que, mediante Decreto Supremo N° 002-2013-MINAM se aprueban los ECA para Suelo y, a través del Decreto Supremo N° 002-2014-MINAM se aprueban las disposiciones complementarias para su aplicación;

Que, asimismo, mediante Decreto Supremo N° 013-2015-MINAM se dictan las reglas para la presentación y evaluación del Informe de Identificación de Sitios Contaminados;

Que, mediante Resolución Ministerial N° 331-2016-MINAM se crea el Grupo de Trabajo encargado

— DIARIO OFICIAL DEL Bicentenario —


El Peruano

REQUISITO PARA PUBLICACIÓN DE NORMAS LEGALES Y SENTENCIAS

Se comunica a las entidades que conforman el Poder Legislativo, Poder Ejecutivo, Poder Judicial, Organismos constitucionales autónomos, Organismos Públicos, Gobiernos Regionales y Gobiernos Locales, que para efectos de la publicación de sus disposiciones en general (normas legales, reglamentos jurídicos o administrativos, resoluciones administrativas, actos de administración, actos administrativos, etc) con o sin anexos, que contengan más de una página, se adjuntará un CD o USB en formato Word con su contenido o éste podrá ser remitido al correo electrónico normaslegales@editoraperu.com.pe.

LA DIRECCIÓN

de establecer medidas para optimizar la calidad ambiental, siendo una de sus funciones específicas, analizar y proponer medidas para mejorar la calidad ambiental del país;

Que, en mérito a la evaluación técnica realizada por el citado Grupo de Trabajo, se identificó la necesidad de actualizar los ECA para Suelo;

Que, mediante Resolución Ministerial N° 182-2017-MINAM, el Ministerio del Ambiente dispuso la prepublicación del proyecto de Decreto Supremo que aprueba los ECA para Suelo, en cumplimiento del artículo 39 del Reglamento sobre Transparencia, Acceso a la Información Pública Ambiental y Participación y Consulta Ciudadana en Asuntos Ambientales, aprobado por Decreto Supremo N° 002-2009-MINAM, y el artículo 14 del 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; en virtud de la cual se recibieron aportes y comentarios al mismo;

De conformidad con lo dispuesto en el numeral 8 del artículo 118 de la Constitución Política del Perú; la Ley N° 29158, Ley Orgánica del Poder Ejecutivo; el Decreto Legislativo N° 1013, que aprueba la Ley de Creación, Organización, y Funciones del Ministerio del Ambiente; y la Ley N° 28611, Ley General del Ambiente;

DECRETA:

Artículo 1.- Aprobación de los Estándares de Calidad Ambiental para Suelo

Apruébase los Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Suelo, que como Anexo forman parte integrante del presente decreto supremo.

Artículo 2.- Los Estándares de Calidad Ambiental para Suelo como referente obligatorio

Los ECA para Suelo constituyen un referente obligatorio para el diseño y aplicación de los Instrumentos de gestión ambiental, y son aplicables para aquellos parámetros asociados a las actividades productivas, extractivas y de servicios.

Artículo 3.- De la superación de los ECA para Suelo

De superarse los ECA para Suelo, en aquellos parámetros asociados a las actividades productivas, extractivas y de servicios, las personas naturales y jurídicas a cargo de estas deben realizar acciones de evaluación y, de ser el caso, ejecutar acciones de remediación de sitios contaminados, con la finalidad de proteger la salud de las personas y el ambiente.

Lo indicado en el párrafo anterior no aplica cuando la superación de los ECA para Suelo sea inferior a los niveles de fondo, los cuales proporcionan información acerca de las concentraciones de origen natural de las sustancias químicas presentes en el suelo, que pueden incluir el aporte de fuentes antrópicas no relacionadas al sitio en evaluación.

Artículo 4.- Refrendo

El presente decreto supremo es refrendado por la Ministra del Ambiente, la Ministra de Energía y Minas, el Ministro de Salud, el Ministro de Vivienda, Construcción y Saneamiento, el Ministro de la Producción, el Ministro de Transportes y Comunicaciones, y el Ministro de Agricultura y Riego.

DISPOSICIONES COMPLEMENTARIAS FINALES

Primera.- Criterios para la gestión de sitios contaminados

Mediante decreto supremo, a propuesta del Ministerio del Ambiente y en coordinación con los sectores competentes, se aprobarán los criterios para la gestión de sitios contaminados, los mismos que regulan las acciones señaladas en el artículo 3 del presente decreto supremo.

Segunda.- Aplicación del ECA para Suelo en los Instrumentos de gestión ambiental aprobados

La aplicación de los ECA para Suelo en los Instrumentos de gestión ambiental aprobados, que sean de carácter preventivo, se realiza en la actualización o modificación de los mismos, en el marco de la normativa vigente del Sistema Nacional de Evaluación del Impacto Ambiental (SEIA). En el caso de Instrumentos correctivos, la aplicación de los ECA para Suelo se realiza conforme a la normativa ambiental sectorial correspondiente.

DISPOSICIONES COMPLEMENTARIAS TRANSITORIAS

Primera.- Instrumento de gestión ambiental en trámite ante la Autoridad Competente

Los/as titulares que, antes de la entrada en vigencia de la presente norma, hayan iniciado un procedimiento administrativo para la aprobación del Instrumento de gestión ambiental ante la autoridad competente, tomarán en consideración los ECA para Suelo vigentes a la fecha de inicio del procedimiento.

Luego de aprobado el Instrumento de gestión ambiental por la autoridad competente, los/as titulares deberán considerar lo establecido en la Segunda Disposición Complementaria Final, a efectos de aplicar los ECA para Suelo aprobados mediante el presente decreto supremo.

Segunda.- De los procedimientos en trámite para la adecuación de los Instrumentos de gestión ambiental a los ECA

Los procedimientos de adecuación de los Instrumentos de gestión ambiental a los estándares de calidad ambiental (ECA), iniciados con anterioridad a la vigencia del presente decreto supremo, se resuelven conforme a las disposiciones normativas vigentes al momento de su inicio.

DISPOSICIÓN COMPLEMENTARIA DEROGATORIA

Única.- Derogación

Derógase el Decreto Supremo N° 002-2013-MINAM, que aprueba los Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Suelo, y el Decreto Supremo N° 003-2014-MINAM, que aprueba la Directiva que establece el procedimiento de adecuación de los Instrumentos de gestión ambiental a nuevos Estándares de Calidad Ambiental (ECA).

Dado en la Casa de Gobierno, en Lima, al primer día del mes de diciembre del año dos mil diecisiete.

PEDRO PABLO KUCZYNSKI GODARD
Presidente de la República

JOSÉ MANUEL HERNÁNDEZ CALDERÓN
Ministro de Agricultura y Riego

ELSA GALARZA CONTRERAS
Ministra del Ambiente

CAYETANA ALJOVÍN GAZZANI
Ministra de Energía y Minas

PEDRO OLAECHEA ÁLVAREZ CALDERÓN
Ministro de la Producción

FERNANDO ANTONIO D'ALESSIO IPINZA
Ministro de Salud

BRUNO GIUFFRÀ MONTEVERDE
Ministro de Transportes y Comunicaciones

CARLOS RICARDO BRUCE MONTES DE OCA
Ministro de Vivienda, Construcción y Saneamiento

ANEXO
ESTÁNDARES DE CALIDAD AMBIENTAL (ECA) PARA SUELO

Parámetros en mg/kg PS ⁽²⁾	Usos del Suelo ⁽¹⁾			Métodos de ensayo ^{(7),(8)}
	Suelo Agrícola ⁽³⁾	Suelo Residencial/ Parques ⁽⁴⁾	Suelo Comercial ⁽⁵⁾ / Industrial/ Extractivo ⁽⁶⁾	
ORGÁNICOS				
Hidrocarburos aromáticos volátiles				
Benceno	0,03	0,03	0,03	EPA 8260 ⁽⁸⁾ EPA 8021
Tolueno	0,37	0,37	0,37	EPA 8260 EPA 8021
Etilbenceno	0,062	0,062	0,062	EPA 8260 EPA 8021
Xilenos ⁽¹⁰⁾	11	11	11	EPA 8260 EPA 8021
Hidrocarburos poliaromáticos				
Naftaleno	0,1	0,6	22	EPA 8260 EPA 8021 EPA 8270
Benzo(a) pireno	0,1	0,7	0,7	EPA 8270
Hidrocarburos de Petróleo				
Fracción de hidrocarburos F1 ⁽¹¹⁾ (C6-C10)	200	200	500	EPA 8015
Fracción de hidrocarburos F2 ⁽¹²⁾ (>C10-C28)	1200	1200	5000	EPA 8015
Fracción de hidrocarburos F3 ⁽¹³⁾ (>C28-C40)	3000	3000	6000	EPA 8015
Compuestos Organoclorados				
Bifenilos policlorados - PCB ⁽¹⁴⁾	0,5	1,3	33	EPA 8082 EPA 8270
Tetracloroetileno	0,1	0,2	0,5	EPA 8260
Tricloroetileno	0,01	0,01	0,01	EPA 8260
INORGÁNICOS				
Arsénico	50	50	140	EPA 3050 EPA 3051
Bario total ⁽¹⁵⁾	750	500	2 000	EPA 3050 EPA 3051
Cadmio	1,4	10	22	EPA 3050 EPA 3051
Cromo total	**	400	1 000	EPA 3050 EPA 3051
Cromo VI	0,4	0,4	1,4	EPA 3060/ EPA 7199 ó DIN EN 15192 ⁽¹⁶⁾
Mercurio	6,6	6,6	24	EPA 7471 EPA 8020 ó 200,6
Plomo	70	140	600	EPA 3050 EPA 3051
Cianuro Libre	0,9	0,9	6	EPA 9013 SEMWW-AWWA-WEF 4500 CN F ó ASTM D7237 y/o ISO 17680:2015

Notas:

- [**] Este símbolo dentro de la tabla significa que el parámetro no aplica para el uso de suelo agrícola.
- (1) **Suelo:** Material no consolidado compuesto por partículas inorgánicas, materia orgánica, agua, aire y organismos, que comprende desde la capa superior de la superficie terrestre hasta diferentes niveles de profundidad.
- (2) **PS:** Peso seco.
- (3) **Suelo agrícola:** Suelo dedicado a la producción de cultivos, forrajes y pastos cultivados. Es también aquel suelo con aptitud para el crecimiento de cultivos y el desarrollo de la ganadería. Esto incluye tierras clasificadas como agrícolas, que mantienen un hábitat para especies permanentes y transitorias, además de flora y fauna nativa, como es el caso de las áreas naturales protegidas.

- (4) **Suelo residencial/parques:** Suelo ocupado por la población para construir sus viviendas, incluyendo áreas verdes y espacios destinados a actividades de recreación y de esparcimiento.
- (5) **Suelo comercial:** Suelo en el cual la actividad principal que se desarrolla está relacionada con operaciones comerciales y de servicios.
- (6) **Suelo industrial/extractivo:** Suelo en el cual la actividad principal que se desarrolla abarca la extracción y/o aprovechamiento de recursos naturales (actividades mineras, hidrocarburos, entre otros) y/o, la elaboración, transformación o construcción de bienes.
- (7) **Métodos de ensayo estandarizados vigentes o métodos validados** que cuentan con la acreditación nacional e internacional correspondiente, en el marco del Acuerdo de Reconocimiento Mutuo de la Internacional Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC). Los métodos de ensayo deben contar con límites de cuantificación que estén por debajo del ECA.

- correspondiente al parámetro bajo análisis.
- (8) Para aquellos parámetros respecto de los cuales no se especifican los métodos de ensayo empleados para la determinación de las muestras, se deben utilizar métodos que cumplan con las condiciones señaladas en la nota (7).
- (9) EPA: Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (Environmental Protection Agency, por sus siglas en inglés).
- (10) Esta parámetro comprende la suma de Xilenos: o-xileno, m-xileno y p-xileno. En el respectivo informe de ensayo se debe reportar la suma de los Xilenos, así como las concentraciones y límites de cuantificación de los tres (3) isómeros de manera individual.
- (11) **Fracción de hidrocarburos F1 o fracción ligera:** Mezcla de hidrocarburos cuyas moléculas contienen entre seis y diez átomos de carbono (C6 a C10). Los hidrocarburos de fracción ligera deben analizarse en los siguientes productos: mezcla de productos desconocidos derivados del petróleo, petróleo crudo, solventes, gasolina, gas nafta, entre otros.
- (12) **Fracción de hidrocarburos F2 o fracción media:** Mezcla de hidrocarburos cuyas moléculas contienen mayor a diez y hasta veintiocho átomos de carbono (>C10 a C28). Los hidrocarburos fracción media deben analizarse en los siguientes productos: mezcla de productos desconocidos derivados del petróleo, petróleo crudo, gasóleo, diesel, turbosina, queroseno, mezcla de cerosa, gasolvente, gasolina, gas nafta, entre otros.
- (13) **Fracción de hidrocarburos F3 o fracción pesada:** Mezcla de hidrocarburos cuyas moléculas contienen mayor a veintiocho y hasta cuarenta átomos de carbono (>C28 a C40). Los hidrocarburos fracción pesada deben analizarse en los siguientes productos: mezcla de productos desconocidos derivados del petróleo, petróleo crudo, parafinas, petrolatos, aceites del petróleo, entre otros.
- (14) Suma de siete PCB indicadores: PCB 20, PCB 52, PCB 101, PCB 118, PCB 135, PCB 153 y PCB 180.
- (15) De acuerdo con la metodología de Alberta Environment (2009): Soil remediation guidelines for barite: environmental health and human health. ISBN No. 978-0-7785-7691-4. En el caso de sitios con presencia de baritina se podrán aplicar los valores establecidos para Bario total/real en la Tabla 1. Un sitio con presencia de baritina se determina cuando todas las muestras de suelo cumplen con los valores establecidos para Bario extraíble, de acuerdo con lo indicado en la tabla 1.

Tabla 1. Valores para bario en sitios con presencia de baritina^(a)

Parámetros en mg/kg PS	Uso del suelo		
	Suelo Agrícola ^(b)	Suelo Residencial/Parques ^(c)	Suelo Comercial ^(d) /Industrial/Extractivo ^(e)
Bario extraíble ^(f) (Extractable Barium)	250	250	450
Bario total real en sitios con presencia de baritina ^(g) (True total Barium at Barite Sites)	10 000	10 000	15 000 ^(h) 140 000 ⁽ⁱ⁾

Notas:

- (a) A efectos de aplicar los valores establecidos para el Bario total, Bario extraíble o Bario total real en sitios con presencia de baritina, corresponde utilizar el procedimiento detallado por Alberta Environment (2009): Soil remediation guidelines for barite: environmental health and human health. ISBN No. 978-0-7785-7691-4.
- (b) **Suelo agrícola:** Suelo dedicado a la producción de cultivos, forrajes y pastos cultivados. Es también aquel suelo con aptitud para el crecimiento de cultivos y el desarrollo de la ganadería. Esto incluye tierras clasificadas como agrícolas, que mantienen un hábitat para especies permanentes y transitorias, además de flora y fauna nativa, como es el caso de las áreas naturales protegidas.
- (c) **Suelo residencial/parques:** Suelo ocupado por la población para construir sus viviendas, incluyendo áreas verdes y espacios destinados a actividades de recreación y de esparcimiento.
- (d) **Suelo comercial:** Suelo en el cual la actividad principal que se desarrolla está relacionada con operaciones comerciales y de servicios.
- (e) **Suelo industrial/extractivo:** Suelo en el cual la actividad principal que se desarrolla abarca la extracción y/o

aprovechamiento de recursos naturales (actividades mineras, hidrocarburos, entre otros) y/o, la elaboración, transformación o construcción de bienes.

- (f) Se determina mediante la medición en solución extractora 0,1 M CaCl₂, de acuerdo con la metodología establecida por Alberta Environment (2009): Soil remediation guidelines for barite: environmental health and human health. ISBN No. 978-0-7785-7691-4.
- (g) Valores aplicables en sitios que cumplen con las concentraciones de Bario extraíble. La concentración del Bario total real se determina mediante las técnicas de fusión XRF o por fusión ICP, de acuerdo con la metodología establecida por Alberta Environment (2009): Soil remediation guidelines for barite: environmental health and human health. ISBN No. 978-0-7785-7691-4.
- (h) Suelo comercial.
- (i) Suelo industrial/extractivo.
- (16) DIN: Instituto Alemán de Normalización (Deutsches Institut für Normung, por sus siglas en alemán).

1593392-5

Aprueban Criterios para la Gestión de Sitios Contaminados

DECRETO SUPREMO
N° 012-2017-MINAM

EL PRESIDENTE DE LA REPÚBLICA

CONSIDERANDO:

Que, el numeral 22 del artículo 2 de la Constitución Política del Perú, establece que toda persona tiene derecho a gozar de un ambiente equilibrado y adecuado al desarrollo de su vida;

Que, el artículo I del Título Preliminar de la Ley N° 28611, Ley General del Ambiente, en adelante la Ley, señala que toda persona tiene el derecho irrenunciable a vivir en un ambiente saludable, equilibrado y adecuado para el pleno desarrollo de la vida, y el deber de contribuir a una efectiva gestión ambiental y de proteger el ambiente, así como sus componentes, asegurando particularmente la salud de las personas en forma individual y colectiva, la conservación de la diversidad biológica, el aprovechamiento sostenible de los recursos naturales y el desarrollo sostenible del país;

Que, de acuerdo a lo establecido en el artículo 3 de la Ley, el Estado, a través de sus entidades y órganos correspondientes, diseña y aplica, entre otros, las normas que sean necesarias para garantizar el efectivo ejercicio de los derechos y el cumplimiento de las obligaciones y responsabilidades contenidas en la citada Ley;

Que, en virtud del numeral 16.2 del artículo 16 de la Ley, los instrumentos de gestión ambiental constituyen medios operativos que son diseñados, normados y aplicados con carácter funcional o complementario para efectivizar el cumplimiento de la Política Nacional Ambiental y las normas ambientales que rigen en el país;

Que, asimismo, según lo dispuesto por el numeral 17.2 del artículo 17 de la Ley, los planes de remediación constituyen un tipo de instrumento de gestión ambiental;

Que, el numeral 30.1 del artículo 30 de la Ley, referido a los planes de descontaminación y el tratamiento de pasivos ambientales, señala que estos están dirigidos a remediar impactos ambientales originados por uno o varios proyectos de inversión o actividades, pasados o presentes; asimismo, precisa que los citados planes deben considerar el financiamiento y las responsabilidades que correspondan a los titulares de las actividades contaminantes, incluyendo la compensación por los daños generados, bajo el principio de responsabilidad ambiental;

Que, de conformidad con el numeral 30.2 del artículo 30 de la Ley, las entidades con competencias ambientales promueven y establecen planes de descontaminación y recuperación de ambientes degradados, y la Autoridad Ambiental Nacional establece los criterios para su elaboración;

Anexo 29: Matriz de consistencia.

Problema	Objetivo	Hipótesis	Variables e indicadores	Metodología
¿Cuál será el efecto de la bioestimulación de consorcios microbianos en la capacidad degradativa del petróleo crudo, Ayacucho 2019?	Objetivo general: Evaluar el efecto de la bioestimulación en la capacidad degradativa por consorcios microbianos del petróleo Diesel, Ayacucho 2019. Objetivos específicos: - Evaluar el efecto del Nitrato de Amonio (bioestimulador) en la actividad degradativa de consorcios microbianos sobre el petróleo Diesel. - Evaluar el efecto del superfosfato triple (bioestimulador) en la actividad degradativa de consorcios microbianos sobre el petróleo Diesel. - Identificar los microorganismos de mejor respuesta a la bioestimulación en la degradación del petróleo Diesel.	La bioestimulación de consorcios bacterianos nativos tiene un efecto positivo significativo en la capacidad degradativa del petróleo Diesel.	Variable independiente • Cepas y consorcios de microorganismos degradadores de petróleo crudo. Indicador: Bacterias • Concentración de nutrientes Indicadores: Nitrato de Amonio (0,06g/Kg) Superfosfato triple (0,048g/Kg) • Tiempo Indicador: Días Variable dependiente • Capacidad degradadora de petróleo crudo por parte de las cepas y consorcios microbianos. Indicadores: Porcentaje de remoción	Tipo de investigación Experimental-Aplicativo Población Todos los microorganismos degradadores de petróleo crudo. Muestra Cepas de microorganismos degradadores de petróleo crudo del cepario del Laboratorio de Microbiología Ambiental. Metodología - Ubicación - Procedencia de las cepas - ensayos de degradación del petróleo Diesel - Análisis de la arena fina sometida a degradación del petróleo Diesel - Identificación de microorganismos - Análisis estadístico



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR
AL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO (A) EN CIENCIAS, MENCIÓN MICROBIOLOGÍA
RÉSOLUCIÓN DIRECTORAL N° 00876-2023-UNSCH-EPG/D

Siendo las 11:00 a.m. del 30 de Noviembre de 2023 se reunieron en el auditorium de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, el Jurado Examinador y Calificador de tesis, presidido por el **Dr. Oscar GUTIÉRREZ HUAMANÍ** director (e) de la Escuela de Posgrado, el **Dr. Jesús DE LA CRUZ ARANGO** Director de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas, e integrado por los siguientes miembros: **Dr. Fidel RODOLFO MUJICA LENGUA** y el **Dr. Víctor Luis CARDENAS LOPEZ**; para la sustentación oral y pública de la tesis titulada: **EFFECTO DE LA BIOESTIMULACIÓN DE CONSORCIOS MICROBIANOS EN LA CAPACIDAD DEGRADATIVA DEL PETROLEO CRUDO, AYACUCHO 2019**. En la Ciudad de Ayacucho del 2023 presentado por el **Bach. Pedro Mauricio DELGADILLO CORONADO**. Teniendo como asesor al **Dr. Saúl Alonso CHUCHON MARTINEZ**.

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **MAESTRO (A) EN CIENCIAS, MENCIÓN MICROBIOLOGÍA**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.

A continuación el Jurado Examinador y Calificador de tesis procedió a la votación, la que dio resultado el siguiente calificativo: 18 - DIECHOCHO

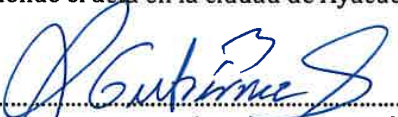
CALIFICACION (*)

Aprobado por unanimidad	<u>X</u>
Aprobado por Mayoría	<u>—</u>
Desaprobada por Unanimidad	<u>—</u>
Desaprobada por mayoría	<u>—</u>

(*) Marcar con aspa

Luego, el presidente del Jurado recomienda que la que la Escuela de Posgrado proponga que se le otorgue a al **Bach. Pedro Mauricio DELGADILLO CORONADO**, el Grado Académico de **MAESTRO (A) EN CIENCIAS, MENCIÓN MICROBIOLOGÍA**. Siendo las ...13:00 hrs. Se levanta la sesión.

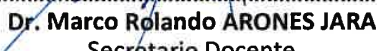
Se extiende el acta en la ciudad de Ayacucho, a las.....13:00 hrs. Del 30 de noviembre 2023.


.....
Dr. Oscar GUTIÉRREZ HUAMANÍ
Director (e) de la Escuela de Posgrado


.....
Dr. Jesús DE LA CRUZ ARANGO
Director de la Unidad de Posgrado – UPG-FCB


.....
Dr. Fidel RODOLFO MUJICA LENGUA
Miembro


.....
Dr. Víctor Luis CARDENAS LOPEZ
Miembro


.....
Dr. Marco Rolando ARONES JARA
Secretario Docente

Observaciones:



ESCUELA DE

POSGRADOUNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD 32-2024-UNSCH-EPG/OGH**

El que suscribe; responsable verificador de originalidad de trabajo de tesis de Posgrado en segunda instancia para la **Escuela de Posgrado – UNSCH**; en cumplimiento a la Resolución De Consejo Directivo N°109-2024-UNSCH-EPG/CD, Reglamento de Originalidad de trabajos de Investigación de la UNSCH, otorga lo siguiente:

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD

AUTOR	Bach. Pedro Mauricio Delgadillo Coronado
DENOMINACIÓN DEL PROGRAMA DE ESTUDIOS	MAESTRÍA EN CIENCIAS
GRADO ACADÉMICO QUE OTORGA	MAESTRO
DENOMINACIÓN DEL GRADO ACADÉMICO	MAESTRO(A) EN CIENCIAS, MENCIÓN MICROBIOLOGÍA
TÍTULO DE TESIS	Efecto de la bioestimulación de consorcios microbianos en la capacidad degradativa del petróleo crudo, Ayacucho 2019
EVALUACIÓN DE ORIGINALIDAD	16% de similitud
N° DE TRABAJO	2514895651
FECHA	10 de noviembre de 2024

Por tanto, según los artículos 12, 13 y 17 del Reglamento de Originalidad de Trabajos de Investigación, es procedente otorgar la constancia de originalidad con depósito.

Se expide la presente constancia, a solicitud del interesado para los fines que crea conveniente.

10 de noviembre de 2024.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA
Escuela de Posgrado
Dr. Oscar Gutiérrez HuamaniCC.
Archivo
OGH

Efecto de la bioestimulación de consorcios microbianos en la capacidad degradativa del petróleo crudo, Ayacucho 2019

por Pedro Mauricio DELGADILLO CORONADO

Fecha de entrega: 10-nov-2024 06:48p.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 2514895651

Nombre del archivo: TESIS_MAESTRIA_2022_1.pdf (2.87M)

Total de palabras: 27288

Total de caracteres: 133013

Efecto de la bioestimulación de consorcios microbianos en la capacidad degradativa del petróleo crudo, Ayacucho 2019

INFORME DE ORIGINALIDAD

16%	16%	2%	6%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	hdl.handle.net Fuente de Internet	3%
2	repositorio.lamolina.edu.pe Fuente de Internet	1%
3	ciencia.lasalle.edu.co Fuente de Internet	1%
4	tesis.ula.ve Fuente de Internet	1%
5	www.scielo.org.co Fuente de Internet	1%
6	repositorio.unas.edu.pe Fuente de Internet	1%
7	revistas.unal.edu.co Fuente de Internet	1%
8	www.dspace.uce.edu.ec Fuente de Internet	1%
9	dspace.unitru.edu.pe Fuente de Internet	

		1 %
10	Submitted to Universidad Politecnica Salesiana del Ecuador Trabajo del estudiante	1 %
11	www.coursehero.com Fuente de Internet	1 %
12	repositorio.unsch.edu.pe Fuente de Internet	1 %
13	repositoriousco.co Fuente de Internet	<1 %
14	worldwidescience.org Fuente de Internet	<1 %
15	mriuc.bc.uc.edu.ve Fuente de Internet	<1 %
16	repositorio.ucundinamarca.edu.co Fuente de Internet	<1 %
17	repositorio.uap.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
18	tesis.ipn.mx Fuente de Internet	<1 %
19	www.bdigital.unal.edu.co Fuente de Internet	<1 %
20	qdoc.tips Fuente de Internet	

<1 %

21

www.uv.mx

Fuente de Internet

<1 %

22

colposdigital.colpos.mx:8080

Fuente de Internet

<1 %

23

pt.scribd.com

Fuente de Internet

<1 %

24

repositorio.ug.edu.ec

Fuente de Internet

<1 %

25

repositorio.uis.edu.co

Fuente de Internet

<1 %

26

Submitted to Universidad Autónoma de Chiapas

Trabajo del estudiante

<1 %

27

idoc.pub

Fuente de Internet

<1 %

28

www.revistas.unitru.edu.pe

Fuente de Internet

<1 %

29

cdigital.uv.mx

Fuente de Internet

<1 %

30

prevencionar.com.pe

Fuente de Internet

<1 %

31

repobib.ubiobio.cl

Fuente de Internet

<1%

Excluir citas Activo

Excluir bibliografía Activo

Excluir coincidencias < 30 words