

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

FACULTAD DE INGENIERÍA DE PROCESOS

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA PETROQUÍMICA



TESIS

**BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON DIÉSEL
UTILIZANDO BACTERIAS PSEUDOMONAS**

PRESENTADO POR:

Br. AURORA MILENA ALVAREZ BARRIGA

PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL

DE INGENIERO PETROQUÍMICO

ASESORA:

Dra. AMANDA ROSA MALDONADO FARFÁN

COASESORA:

Dra. RUBY ANTONIETA VEGA RAVELLO

CUSCO – PERÚ

2024

INFORME DE ORIGINALIDAD

(Aprobado por Resolución Nro.CU-303-2020-UNSAAC)

La que suscribe, asesora del trabajo de investigación: **“BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON DIÉSEL UTILIZANDO BACTERIAS PSEUDOMONAS”** presentado por: **Aurora Milena ALVAREZ BARRIGA** con DNI 71251920, para optar al Título Profesional de Ingeniero Petroquímico. Informo que el trabajo de investigación ha sido sometido a revisión por 02 vez, mediante el software Antiplagio, conforme al Art. 6° del **Reglamento para Uso de Sistema Antiplagio de la UNSAAC** y de la evaluación de originalidad se tiene un porcentaje de **8 %**.

Evaluación y acciones del reporte de coincidencia para trabajos de investigación conducentes a grado académico o título profesional, tesis

Porcentaje	Evaluación y Acciones	Marque con una (X)
Del 1 al 10%	No se considera plagio.	X
Del 11 al 30 %	Devolver al usuario para las correcciones.	
Mayor a 31%	El responsable de la revisión del documento emite un informe al inmediato jerárquico, quien a su vez eleva el informe a la autoridad académica para que tome las acciones correspondientes. Sin perjuicio de las sanciones administrativas que correspondan de acuerdo a Ley.	

Por tanto, en condición de asesora, firmo el presente informe en señal de conformidad y **adjunto** la primera página del reporte del Sistema Antiplagio.

Cusco, 13 de mayo de 2025



Dra. Ing. Amanda Rosa MALDONADO FARFAN

DNI: 23822559

ORCID: 0000-0002-4870-7078

Se adjunta:

1. Reporte generado por el Sistema Antiplagio.
2. Enlace del Reporte Generado por el Sistema Antiplagio:
<https://unsaac.turnitin.com/viewer/submissions/oid:27259:458941490?locale=es-MX>

AURORA MILENA ALVAREZ BARRIGA

BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON DIÉSEL B5 S-50.pdf

 Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid:::27259:458941490

102 Páginas

Fecha de entrega

13 may 2025, 6:24 p.m. GMT-5

25.162 Palabras

131.133 Caracteres

Fecha de descarga

13 may 2025, 6:34 p.m. GMT-5

Nombre de archivo

BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON DIÉSEL B5 S-50.pdf

Tamaño de archivo

2.4 MB

8% Overall Similarity

The combined total of all matches, including overlapping sources, for each database.

Filtered from the Report

- ▶ Bibliography
- ▶ Quoted Text
- ▶ Cited Text
- ▶ Small Matches (less than 20 words)

Top Sources

- 7%  Internet sources
- 0%  Publications
- 5%  Submitted works (Student Papers)

Integrity Flags

1 Integrity Flag for Review

-  **Replaced Characters**
117 suspect characters on 19 pages
Letters are swapped with similar characters from another alphabet.

Our system's algorithms look deeply at a document for any inconsistencies that would set it apart from a normal submission. If we notice something strange, we flag it for you to review.

A Flag is not necessarily an indicator of a problem. However, we'd recommend you focus your attention there for further review.

Dedicatoria

Me dedico a mí. Me dedico a mí este logro más en mi carrera profesional. Gracias a no dejar de creer en mí y en mis capacidades. Gracias por levantarme en cada caída y seguir. Gracias a luchar siempre por mis sueños. Un sueño más cumplido.

A mis padres, Walter y María Elena, que amo inmensamente. Gracias por nunca dudar de mí y mis capacidades. El apoyo continuo en cada uno de mis proyectos, en especial éste. Espero tenerlos siempre conmigo en cada uno de mis logros.

A mi hermana Yanela, que amo inmensamente. Gracias por creer en mí y siempre estar presente.

A mi perrita Yayi, que amo inmensamente. Ella estuvo presente durante mucho tiempo en mi formación, sobre todo en pandemia, tiempos difíciles para todos.

A mi familia que siempre me presume y hablan orgullosamente de su prima, sobrina, nieta, bisnieta, etc. Esto es para Uds. también.

Agradecimiento

En primer lugar, quiero agradecerme a mí. Por el esfuerzo duro, por las amanecidas, por seguir siempre adelante y porque sin importar las dificultades lo logré. Me agradezco porque a pesar de los noes, siempre seguí creyendo en mí levantando la mirada buscando los síes. Gracias por creer en mí.

Agradezco a mis dos asesoras, Dra. Amanda Rosa Maldonado Farfán (UNSAAC) y Dra. Ruby Antonieta Vega Ravello (UNALM), por el apoyo desinteresado y estar para mi persona durante cualquier inquietud que se presentase.

Agradezco al universo por permitirme dar este paso para mi crecimiento profesional y personal.

Agradezco a mi familia por el apoyo incondicional y el amor infinito. Gracias por apoyarme en todos mis proyectos. Gracias por siempre guiarme a terminar los proyectos que inicio. Todo esto es por y para Uds.

Agradezco a mis amigos por impulsarme a seguir mis sueños.

¡Por más mujeres en la ingeniería! Nosotras siempre podemos.

Tabla de Contenidos

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABLAS	ix
Nomenclatura	xi
Resumen	xiii
Abstract	xiv
CAPÍTULO I: GENERALIDADES	1
1.1 Planteamiento del problema	1
1.1.1 Descripción del problema.....	1
1.1.2 Formulación del problema.....	2
1.1.2.1 Problema General	2
1.1.2.2 Problemas Específicos.....	2
1.1.3 Justificación e importancia	2
1.1.3.1 Justificación teórica.....	2
1.3.2 Justificación práctica	3
1.4 Objetivos	3
1.4.1 Objetivo General	3
1.4.2 Objetivos Específicos	3
1.5. Hipótesis.....	4
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	5
2.1 Antecedentes del problema.....	5
2.2 Bases teóricas	9
2.2.1 Suelo.....	9
2.2.1.1 Composición del suelo	9
2.2.1.2 Propiedades físicas del suelo.....	11
2.2.1.3 Propiedades químicas del suelo.....	12
2.2.1.4 Propiedades biológicas	12

2.2.1.5 Fuentes de contaminación de suelos.....	12
2.2.2 Efectos de los hidrocarburos en el suelo	13
2.2.3 Diésel.....	14
2.2.4 Biorremediación	15
2.2.5 Pasos y pautas para optar la técnica apropiada y como aplicarla	18
2.2.6 Acción de las bacterias en los hidrocarburos.....	22
2.2.7 <i>Pseudomonas putida</i>	27
2.2.8 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	30
2.2.15 Respiración basal.....	31
2.2.8 Significancia de microorganismos durante la descomposición de materia orgánica.....	33
2.2.10 Normas legales del Perú.....	35
2.3. Marco Conceptual o Glosario.....	36
CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
3.1 Tipo, alcance y diseño de la investigación	37
3.2 Muestra.....	37
3.3 Materiales	37
3.3.1 Fase de campo	37
3.3.1.1 Instrumentos	37
3.3.1.2 Materiales	37
3.3.2 Fase de laboratorio	38
3.3.2.1 Reactivos	38
3.3.2.2 Equipos.....	38
3.3.2.3 Instrumentos	38
3.3.2.4 Materiales	38
3.4 Ámbito espacial y temporal.....	39
3.5 Identificación de variables.....	39

3.5.1 Variables independientes	39
3.5.2 Variable dependiente	39
3.5.3 Parámetros	39
3.6. Operacionalización de variables.....	39
3.7 Métodos	46
3.7.1 Fase de campo	46
3.7.1.1 Recolección de la muestra.....	46
3.7.1.2 Caracterización fisicoquímica del suelo y agua de riego	46
-Caracterización fisicoquímica del suelo	46
-Caracterización fisicoquímica del agua de riego.....	48
3.7.1.3 Preparación de suelo.....	49
3.7.1.4 Acondicionamiento de diésel.....	49
3.7.1.5 Caracterización de TPH inicial del suelo contaminado.....	48
3.7.1.6 Preparación del suelo para la inoculación de las bacterias <i>Pseudomonas fluorescens</i> y <i>Pseudomonas putida</i>	49
3.7.1.7 Inoculación con las bacterias <i>Pseudomonas fluorescens</i> y <i>Pseudomonas putida</i>	51
3.7.1.8 Capacidad de retención del agua (CRA)	55
3.7.1.9 Biorremediación del suelo.....	56
3.7.1.10 Caracterización de TPH final del suelo contaminado.....	56
3.7.2 Fase de laboratorio	57
3.7.2.1 Preparación de incubación.....	58
3.7.2.2 Incubación.	59
3.7.2.4 Lectura de respiración basal (titulación)	62
3.7.3 Correlación entre la respiración basal y la dosis de diésel inicial	63
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	64
4.1 Características fisicoquímicas de suelo y el agua de riego.....	64

4.2 Proceso de biorremediación en función del TPH.....	65
4.3 Proceso de biorremediación en función del RB	74
4.4 Correlación entre respiración basal y dosis inicial de diésel.....	88
CONCLUSIONES.....	92
RECOMENDACIONES	93
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	94
Anexo 1. Hoja de seguridad Consorcio Microbiano Bacniphos (parte 1).....	99
Anexo 2. Hoja de seguridad Consorcio Microbiano Bacniphos (parte 2).....	100
Anexo 3. Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Suelo.	101
Anexo 4. Method 8015 C: método usado en el analisis de TPH en Slab Perú.....	102
APENDICES	103
Apéndice 1. Resultados análisis TPH inicial.....	103
Apéndice 2. Resultados análisis TPH final.	104
Apéndice 3. Resultados análisis fisicoquimico del suelo- LASPAF.....	105
Apéndice 4. Resultados análisis fisicoquimico del suelo- LASPAF (parte 2).....	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 <i>Triángulo textural (Clasificación USDA)</i>	10
Figura 2 <i>Ruta de degradación de n-alcanos e hidroxilación</i>	17
Figura 3 <i>Biodegradación mediante microorganismos en el suelo.</i>	26
Figura 4 <i>Pseudomonas putida</i>	28
Figura 5 <i>Desde 1960 la Pseudomonas putida abarca diversas industrias</i>	29
Figura 6 <i>Reacción química de la respiración del suelo</i>	31
Figura 7 <i>Reacción química entre el NaOH y CO₂</i>	32
Figura 8 <i>Secado de suelo al aire libre en el CONSAS</i>	46
Figura 9 <i>Proceso de preparación de suelo</i>	49
Figura 10 <i>Acondicionamiento de diésel</i>	50
Figura 11 <i>Muestra 1 y 2 iniciales para llevar a laboratorio</i>	48
Figura 12 <i>Preparación del suelo para la inoculación de las bacterias Pseudomonas fluorescens y Pseudomonas putida</i>	49
Figura 13 <i>Inoculación con las bacterias Pseudomonas fluorescens y Pseudomonas putida</i>	55
<hr style="border-top: 1px dotted black;"/>	
Figura 14 <i>Preparación de hidróxido de sodio (NaOH) 1N</i>	58
Figura 15 <i>Preparación de implementos de la incubación</i>	59
Figura 16 <i>Incubación de la respiración basal</i>	60
Figura 17 <i>Preparación de cloruro de bario 1N</i>	61
Figura 18 <i>Preparación de ácido clorhídrico (HCl) 0.5N</i>	62
Figura 19 <i>Grafico de barras de TPHe(%) en cada muestra</i>	68
Figura 20 <i>Datos de entrada Statgraphics 18 con licencia trial</i>	69
Figura 21 <i>Diagrama de Pareto estandarizada para %TPHe</i>	71
Figura 22 <i>Gráfica de efectos principales para %TPHe</i>	71
Figura 23 <i>Contornos de la superficie de respuesta estimada</i>	73
Figura 24 <i>Gráfico dinámico de respiración basal para 65 y 73 días de la biorremediación</i>	79
<hr style="border-top: 1px dotted black;"/>	
Figura 25 <i>% Diésel por respiración basal a 65 días (mgCO₂ kg suelo-1 día-1)</i>	82
Figura 26 <i>% Diésel por respiración basal a 73 días (mgCO₂ kg suelo -1día-1)</i>	83
Figura 27 <i>Gráfico dinámico de los promedios de respiración basal para 65 y 73 días de la biorremediación</i>	85
Figura 28 <i>Correlación entre TPH inicial y respiración basal</i>	89

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 <i>Densidades de derivados de petróleo</i>	14
Tabla 2 <i>Calificación de ciertos parámetros de caracterización</i>	16
Tabla 3 <i>Clasificación de métodos de remediación según el impacto respecto a los componentes infectantes</i>	18
Tabla 4 <i>Clasificación de técnicas restauradoras según su principio funcional</i>	19
Tabla 5 <i>Tecnologías para la biorremediación de suelos infectados</i>	20
Tabla 6 <i>Géneros de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos</i>	23
Tabla 7 <i>Organismos involucrados durante el procedimiento de desintegración</i>	34
Tabla 8 <i>Operacionalización de variables</i>	41
Tabla 9 <i>Indicadores y metodología empleada en la caracterización fisicoquímica del suelo</i>	47
Tabla 10 <i>Caracterización fisicoquímica del agua de riego</i>	48
Tabla 11	50
Tabla 12 <i>Método utilizado en el análisis de TPH inicial</i>	48
Tabla 13 <i>Distribución de la solución bacteriana (Bacniphos + solución de agua azucarada) por tratamiento</i>	51
Tabla 14 <i>Equivalencias de concentración de bacteria</i>	52
Tabla 15 <i>Lista de las pruebas experimentales (contenido de 2kg)</i>	53
Tabla 16 <i>Lista de las pruebas experimentales (contenido de 1kg)</i>	54
Tabla 17 <i>Variables y niveles del diseño experimental 3²</i>	54
Tabla 18 <i>Diseño experimental 3²</i>	54
Tabla 19 <i>Plan experimental</i>	56
Tabla 20 <i>Resultados finales TPH</i>	57
Tabla 21 <i>Análisis fisicoquímico del suelo del CONSAS</i>	64
Tabla 22 <i>Características químicas del agua</i>	65
Tabla 23 <i>Resultados iniciales TPH</i>	66
Tabla 24 <i>Resultados TPH finales</i>	66
Tabla 25 <i>TPHe % en cada muestra</i>	67
Tabla 26 <i>Efectos estimados para %TPHe (%)</i>	70
Tabla 27 <i>Análisis de varianza para %TPHe</i>	72

Tabla 28 <i>Promedio de respiración basal en cada dosis de bacteria en maceta de contenido de 2kg</i>	75
Tabla 29 <i>Promedio de respiración basal en cada dosis de diésel en maceta de contenido de 2kg y 1kg</i>	75
Tabla 30 <i>Promedio de respiración basal en cada dosis de bacteria en maceta de contenido de 1 kg</i>	76
Tabla 31 <i>Promedio de respiración basal con y sin diésel en maceta de contenido de 2 kg y 1 kg</i>	76
Tabla 32 <i>Promedio de respiración basal de cada lectura, días de incubación y días de biorremediación en macetas de contenido de 2 kg y 1 kg</i>	77
Tabla 33 <i>Promedio respiración basal para día 65 y 73 de la biorremediación con sus respectivas desviaciones estándar y error estándar.</i>	78
Tabla 34 <i>Significancia respecto las variables y su interacción</i>	80
Tabla 35 <i>Datos tukey de la interacción diésel bacteria a 65 días</i>	81
Tabla 36 <i>Promedio respiración basal para día 65 y 73 de la biorremediación</i>	84
Tabla 37 <i>Desviación estándar y error estándar para respiraciones basales en 65 y 73 días de biorremediación para suelos sin presencia de diésel</i>	86
Tabla 38 <i>Significancia respecto las variables y su interacción</i>	87

Nomenclatura

ANOVA Análisis de Varianza

B dosis de bacteria Bacniphos

BaCl₂ Cloruro de Bario

CG Cromatografía de Gases

C: N o C/ N Relación Carbono Nitrógeno

CONSAS Taller de Conservación de Suelos y Agricultura Sostenible.

CRA Capacidad de Retención de Agua

D dosis de diésel

DIGESA Dirección General de Salud Ambiental e Inocuidad Alimentaria

Dst Desviación estándar

D*B Interacción entre dosis de diésel y dosis de bacteria

Es Error estándar

ECA o ACE Estándar de Calidad Ambiental

Gl Grado de libertad

HCl Ácido clorhídrico

TPH Total de Hidrocarburos de Petróleo

IR Espectroscopía Infrarroja

LASPAF Laboratorio de Suelos, Aguas, Plantas y Fertilizantes

MINAM Ministerio del Ambiente

NaOH Hidróxido de Sodio

OEFA Organismo de Evaluación y Fiscalización Ambiental

RB65 Respiración Basal a 65 días de biorremediación

RB73 Respiración Basal a 73 días de biorremediación

TPHe Total Petroleum Hydrocarbon eliminado

TPH Total Petroleum Hydrocarbon

UFC Unidad Formadora de Colonias

UNSAAC Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco

UNALM Universidad Nacional Agraria La Molina

Resumen

El objetivo de la investigación fue recuperar la calidad de los suelos contaminados con diésel B5 S-50; para ello se hizo uso de la bioaumentación con las bacterias *Pseudomonas fluorescens* cepa AMCB54 y *Pseudomonas putida* cepa AMCB38, y un aditivo como la melaza.

Las pruebas experimentales se realizaron en el CONSAS (Taller de Conservación y Agricultura Sostenible) de la Facultad de Agronomía de la UNALM. Se desarrollaron 9 tratamientos con 3 repeticiones cada uno; teniendo como variables la dosis de la bacteria *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens* ($0 \cdot 10^8$ UFC/kg, $0.05 \cdot 10^8$ UFC/kg, $0.1 \cdot 10^8$ UFC/kg y $0.2 \cdot 10^8$ UFC/kg) y la dosis de diésel en el suelo (0 g kg^{-1} , 21.25 g kg^{-1} , 42.5 g kg^{-1} y 85 g kg^{-1}).

Se logró la eliminación de 70-94% de diésel medido como %TPH eliminado. Siendo la variable más significativa la dosis de diésel inoculada al suelo. No mostrando alta significancia la dosis de bacteria.

Considerando la determinación de la respiración basal en $\text{mgCO}_2 \text{ kgsuelo}^{-1} \text{ día}^{-1}$, se logró determinar la presencia de microorganismos en el suelo que dieron evidencia de la degradación del diésel obteniéndose valores hasta $104 \text{ mgCO}_2 \text{ kgsuelo}^{-1} \text{ día}^{-1}$. Mostrando que a mayor respiración hay mayor degradación.

Asimismo, se demostró que existe una correlación de dosis inicial de diésel y la respiración basal ($R=0.89$).

PALABRAS CLAVE: Biorremediación, diésel, suelos contaminados, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, respiración basal, TPH.

Abstract

The aim of the research was to restore the quality of soils contaminated with diesel B5 S-50; for this purpose, bioaugmentation with the bacteria *Pseudomonas fluorescens* strain AMCB54 and *Pseudomonas putida* strain AMCB38, and an additive such as molasses were used.

The experimental tests were carried out at CONSAS (Conservation and Sustainable Agriculture Workshop) of the Faculty of Agronomy of UNALM. 9 treatments were developed with 3 repetitions each; having as variables the concentration of the bacteria *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* ($0 \cdot 10^8$ UFC/kg, $0.05 \cdot 10^8$ UFC/kg, $0.1 \cdot 10^8$ UFC/kg y $0.2 \cdot 10^8$ UFC/kg) and the concentration of diesel in the soil (0 g kg^{-1} , 21.25 g kg^{-1} , 42.5 g kg^{-1} and 85 g kg^{-1}).

The elimination of 70-94% of diesel measured as % TPH eliminated was achieved. The most significant variable is the dose of diesel inoculated to the soil. Not showing high significance of the dose of bacteria.

Considering the determination of basal respiration in $\text{mgCO}_2 \text{ kgsuelo}^{-1} \text{ day}^{-1}$, it was possible to determine the presence of microorganisms in the soil that gave evidence of the degradation of diesel up to $104 \text{ mgCO}_2 \text{ kgsuelo}^{-1} \text{ day}^{-1}$. Showing that the more you breathe, the more degradation there is.

It was also shown that there is a correlation between initial diesel concentration and basal respiration ($R=0.89$).

KEYWORDS: Bioremediation, diesel, contaminated soils, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, basal respiration, TPH

CAPÍTULO I: GENERALIDADES

1.1 Planteamiento del problema

Introducción

El petróleo y sus derivados son fuentes de energía y materias primas que mueven evidentemente la economía del mundo, pero la contaminación de los ecosistemas terrestres y acuáticos por la fuga de hidrocarburos del petróleo y sus derivados es uno de los problemas más importantes en la actualidad. Los hidrocarburos reducen o impiden el desarrollo de la vegetación en el suelo, provocan cambios en la dinámica poblacional de la fauna, la flora y la vida microbiana y dañan las formaciones subterráneas al penetrarlas. Los métodos tradicionales de remediación de suelos se caracterizan por la producción de subproductos que tienen mayor toxicidad que los conocidos actualmente y necesitan procesamientos junto a gestiones adicionales, aumentando los costos, no siendo rentables antiguamente (Meneses, 2014). Sin embargo, en el presente los métodos de biorremediación vienen a ser una alternativa rentable; recientemente ha incrementado no solo en la región, si no en el mundo (Alvarez y Polti, 2014). Según Meneses (2014), el uso combinado de microbianos y nutrientes en técnicas de biorremediación promueve positivamente la aceleración del proceso de descomposición de los hidrocarburos que ingresaron al suelo en confrontación con la descomposición natural, que en circunstancias favorables funciona sin manipulación humana (Gallego et al., 2006); pero puede tardar de 30 a 100 años (Speight y Arjoon, 2012)(Xu y Obbard, 2004). La base bioquímica de la biorremediación es una serie de reacciones redox que ocurren en la cadena respiratoria celular o en la cadena de transporte de electrones. Esta cadena es iniciada por un sustrato orgánico o compuesto de hidrocarburo que ejerce como donador de electrones, y la actividad metabólica de la célula consume y descompone los hidrocarburos. El aceptor más utilizado es el oxígeno, pero también el nitrato, el hierro férrico, el sulfato y el dióxido de carbono durante la respiración y los procesos anaeróbicos, respectivamente.

1.1.1 Descripción del problema

Uno de los problemas menos notados a nivel mundial es el aumento constante de desechos industriales provenientes de los sistemas de alcantarillado in situ, gasolineras, talleres mecánicos, depósito final de residuos sólidos, industrias metalúrgicas, madereras, tintorerías, producción de pesticidas, curtiembres, explotación y extracción de salinidad, esto causa impactos ambientales porque afecta el suelo, las aguas superficiales y las fuentes de agua subterránea (Contreras y Carreño, 2018). Es importante considerar como influyen los hidrocarburos en la sustracción de

macronutrientes y micronutrientes de suelos por medio de las plantas. Contaminar por emisiones provoca la degradación del suelo, lo que cambia sus propiedades físicas y químicas porque contiene hidrocarburos químicamente diferentes: compuestos alifáticos, aromáticos y compuestos policondensados, que cambian la estructura del suelo, el pH, conductividad eléctrica, la materia orgánica, entre otros parámetros del suelo. Los suelos contaminados son peligrosos para la salud humana, debido a la evaporación de los contaminantes al respirar, especialmente en verano debido al aumento de temperatura. Por lo tanto, en esta investigación se propuso una remediación de los suelos que cumpla con los ECAs (Estándares de Calidad Ambiental) y los indicadores de contaminación del suelo. Problema que plantea las siguientes preguntas a continuación.

1.1.2 Formulación del problema

1.1.2.1 Problema General

¿Cuál es la capacidad de biorremediación mediante bioaumentación de cepas de las bacterias *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida* en los suelos contaminados con diésel B5 S-50 en una parcela de la Facultad de Agronomía de la UNALM?

1.1.2.2 Problemas Específicos

- ¿Cuáles son las características fisicoquímicas del suelo de una parcela de la Facultad de Agronomía de la UNALM y del agua de riego?
- ¿Cuál es la capacidad de biorremediación (remoción de diésel y respiración basal), mediante bioaumentación del suelo contaminado de la UNALM en función a la dosis de cepa de las bacterias *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida* y la dosis inicial de diésel B5 S-50?
- ¿Cuál es la correlación entre la respiración basal ($\text{mgCO}_2 \text{ kg}_{\text{suelo}}^{-1} \text{ día}^{-1}$) y la dosis de diésel inicial (mg kg^{-1})?

1.1.3 Justificación e importancia

1.1.3.1 Justificación teórica

Este problema adquiere un carácter irreversible y difícil de resolver debido al impacto negativo que generan los derrames de hidrocarburos en el suelo, el agua, la flora y la fauna. Esto ocurre porque los métodos y procedimientos de degradación no logran abarcar todas las áreas afectadas. Además, las zonas afectadas tampoco reciben ningún tipo de disposición. Mientras que en otros casos se tratan a destiempo cuando el petróleo ya modificó el ecosistema y llegó hasta al acuífero. Pueden cambiar las propiedades físicas y químicas, pH, permeabilidad, estructura, pérdida de crecimiento de plantas y afectar el paisaje cuando los hidrocarburos están en contacto

con un tipo de suelo. Existen múltiples tratamientos químicos, físicos y biológicos para la remediación de suelos afectados con hidrocarburos que son ambientalmente seguros y económicamente viables en términos de biorremediación. Los métodos biológicos utilizan microorganismos (plantas y bacterias) para transformar las zonas contaminadas en sólidos y reciclar los medios. En tanto que no sean sometidos a procesos de remediación o suprimidos, los contaminantes seguirán degradando el suelo, causando deterioro no solo al suelo sino también a los cuerpos de agua, aumentando su huella negativa en el medio ambiente. Posteriormente se introdujeron microorganismos cuyo tratamiento ex situ fue muy importante e interesante por ser de mínimo costo y ambientalmente provechoso (Simbaña, 2016) . Por consiguiente, la biorremediación mediante el uso de cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida* demostró ser una alternativa ambiental factible y con gran potencial para degradar este contaminante (León & Velásquez, 2022)

1.3.2 Justificación práctica

Gracias a la aplicación de las cepas de las bacterias *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida*, la bioaumentación se considera un procedimiento sencillo de realizar y, lo que es más valioso, asequible. Poder cooperar a degradar estos contaminantes sería un logro importante, dados los obstáculos de polución por hidrocarburos del país.

Encontrar una solución que nos permitan remediar las áreas contaminadas, para que sigan permitiendo sostener a una gran variedad de microorganismos, mediante el método de biorremediación es lo que compone la justificación ambiental. La biorremediación de suelos constituye una alternativa viable, ecológica y ampliamente aceptada.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

Evaluar la capacidad de biorremediación mediante bioaumentación de cepas de las bacterias *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida* en los suelos contaminados con diésel B5 S-50 en una parcela de la Facultad de Agronomía de la UNALM.

1.4.2 Objetivos Específicos

- Determinar las características fisicoquímicas del suelo de una parcela de la Facultad de Agronomía de la UNALM y del agua de riego.
- Determinar la capacidad de biorremediación (remoción de diésel y respiración basal), mediante bioaumentación del suelo contaminado de la UNALM en función

de la dosis de cepa de las bacterias *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida* y la dosis inicial de diésel B5 S-50.

- Precisar la correlación entre la respiración basal ($\text{mgCO}_2 \text{ kgsuelo}^{-1} \text{ día}^{-1}$) y la dosis de diésel inicial (mg kg^{-1}).

1.5. Hipótesis

La capacidad de biorremediación mediante bioaumentación de cepas de las bacterias *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida* en los suelos contaminados con diésel B5 S-50 de una parcela de la Facultad de Agronomía de la UNALM depende significativamente de la dosis de cepa *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida* y de la dosis de diésel B5 S-50.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes del problema

En el trabajo de León & Velásquez (2022) titulado “Eficiencia degradadora de hidrocarburos por *Pseudomona putida* y *Pseudomona fluorescens* en suelos contaminados por talleres mecánicos en Carabayllo, 2022”, con el objetivo de determinar la eficiencia de biodegradación de hidrocarburos por *Pseudomona putida* y *Pseudomona fluorescens* en suelos contaminados por talleres mecánicos en Carabayllo, 2022. Se obtuvo la degradación de suelos contaminados con hidrocarburos con la dosis de 300 ml en un periodo de 45 días, es la que obtuvo una mayor eficiencia alcanzando un valor porcentual de 82.38%. El estudio se llevó a cabo por 3 periodos de 15, 30 y 45 días. El diseño estuvo conformado por 3 etapas, cada etapa tuvo 9 muestras, 3 de ellas fueron inoculadas por 100 g de las *Pseudomonas* estudiadas, las 3 siguientes por 200 ml y las 3 finales por 300 ml de las mismas. Se finaliza indicando como un buen remediador a las bacterias *Pseudomona putida* y *Pseudomona fluorescens*.

Los resultados en Chang (2020), “Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburo mediada por *Pseudomonas spp.* en biorreactores.”, fueron diferentes a León & Velásquez (2022). El objetivo es determinar la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos, medida por *Pseudomonas spp.* en biorreactores. Por lo tanto, se tuvo un sistema experimental con un suelo contaminado con una dosis de hidrocarburo (S1), tres inóculos de *Pseudomonas spp.* ($Ps1=20 \text{ g L}^{-1}$, $Ps2=40 \text{ g L}^{-1}$ y $Ps3=80 \text{ g L}^{-1}$), se realizaron tres mediciones (0 días, 7 días y 14 días) para determinar 6 parámetros (pH, OD, Bio, T° y Re). Se llevaron a cabo tres repeticiones. Dando lugar a 3 tratamientos más un testigo o control. La presencia de colonias de *Pseudomona spp.* disminuyó con el tiempo y esto se evidenció en los tratamientos con mayor eficiencia de degradación de los hidrocarburos totales del petróleo, sugiriendo que cuanto menor sea la presencia de hidrocarburos totales del petróleo o, alternativamente, cuanto mayor sea su pobre biodisponibilidad, mayor será la presencia de colonias formando unidades de *Pseudomonas spp.*

Además, en un estudio llevado a cabo por Bracho et al (2004), “Biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y heterocíclicos por *Pseudomonas spp.*”, se empleó 14 cepas de *Pseudomonas* para degradar hidrocarburos aromáticos dicíclicos, tricíclicos y heterocíclicos tales como: naftaleno, antraceno, fenantreno y dibenzotiofeno. Se incubaron las cepas en fiolas de 125 ml conteniendo 50 ml de medio mínimo mineral, con una composición por litro de solución

NH₄ Cl 1,2 g; KNO₃ 2,4 g; CaCl₂ 2H₂O 0,00067 g; Na₂SO₄ 2,4g; MgSO₄ 7H₂O 0,04g; K₂HPO₄ 3H₂O 0,65 g; KH₂PO₄ 3H₂O 0,5 g; FeSO₄ 7H₂O 0,02 g. Como fuente de carbono se emplearon los hidrocarburos naftaleno, antraceno, fenantreno y DBT al 0,05% p/v. Como resultado, se encontró que el 100% de las cepas estudiadas son capaces de degradar hidrocarburos naftaleno y antraceno, el 78,57% degrada fenantreno, el 71,42% dibenzotiofeno y el 50% cuatro hidrocarburos. Estos resultados muestran que las cepas aisladas tienen diferentes capacidades enzimáticas para degradar estos compuestos.

En el caso de Hernández et al (2017), en su trabajo titulado “Fitorremediación de un suelo contaminado con petróleo extra pesado con *Megathyrsus maximus*”, que estudió la capacidad de la hierba *Megathyrsus maximus* para la fitorremediación de suelos contaminados por petróleo extrapesado, procedente de cambios de 120 días en el contenido total de hidrocarburos del petróleo e indicadores de la actividad microbiológica del suelo (actividad enzimática deshidrogenasa, biomasa de carbono microbiana y respiración basal), que fueron evaluados en dos tratamientos, incluido uno en suelo contaminado donde fue trasplantado *Megathyrsus maximus* y el otro en terreno contaminado y sin plantas. Los resultados mostraron que, después de 120 días, el contenido de hidrocarburos se redujo en un 17,1%, al ser tratado *M. maximus* y 9,8% en el tratamiento sin plantas. Las fracciones de hidrocarburos que amenguaron fueron los aromáticos y saturados para su procesamiento *M. maximus* y aromáticos para el tratamiento sin plantas.

Otro caso particular fue el de Benavides et al (2006), con el trabajo titulado “Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo” cuyo objetivo fue el de analizar la biorremediación como una alternativa saludable frente al deterioro progresivo de la calidad del medio ambiente causado por el derramamiento de crudos, ya que esta problemática representa una amenaza real a la salud pública y la extinción de una gran cantidad de especies vegetales y animales. Las bacterias *Pseudomonas* son capaces de usar diferentes substratos, incluso los producidos por el petróleo. Las *Pseudomonas* son bacterias de la subclase gamma de Proteobacterias, gramnegativas y obicuas. La *Pseudomona putida* es un saprofito del suelo que es oportunista, viaja por todo el mundo y es metabólicamente versátil. Tiene una dioxigenasa inicial, una dioxigenasa de tolueno, aunque no presenta ningún compuesto. La dioxigenasa es una buena candidata para aplicaciones biotecnológicas, como la agricultura, la biocatálisis, la biorremediación, el biocontrol en protección de las plantas y la producción de bioplásticos, debido a su eficacia contra los PAHs. La *P. putida* puede colonizar la rizosfera de las plantas de cosecha y tiene una gran capacidad

metabólica, lo que ayuda a desarrollar biopesticidas y promotores de crecimiento de las plantas. La secuenciación del plasmido OCT que codifica una enzima dioxigenasa, que convierte los alcanos en aldehídos mediante la hidropoxidasa del n-alkil sin, se utilizó para investigar la degradación de alcanos de *Pseudomonas putida*. *Pseudomonas fluorescens* metaboliza naftaleno y fenantreno, lo que la distingue de otras *Pseudomonas* que solo metabolizan asfaltenos y naftaleno. Por tanto, recomienda el uso de estas dos bacterias *Pseudomonas*.

Otra investigación que se observó un gran resultado ante el uso de bacterias como biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos es Pérez (2018). Trabajo titulado “Evaluación de la biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos utilizando *Pseudomonas fluorescens*”. Este evaluó la capacidad de la bacteria *Pseudomonas fluorescens* mediante bioaumentación en suelo amazónico ecuatoriano contaminado con HAPs (hidrocarburos aromáticos policíclicos) y TPH (hidrocarburos totales de petróleo). El proyecto se llevó a cabo en dos fases: campo y laboratorio. Se aplicó un DBCA (diseño de bloques completos al azar) con cuatro tratamientos: T0 (Suelo + Hidrocarburo+ 150 ml de agua), T1 (Suelo + hidrocarburo + 150 ml de *Pseudomonas fluorescens* “104 UFC g⁻¹”), T2 (suelo + hidrocarburo + 150 ml de *Pseudomonas fluorescens* “106 UFC g⁻¹”) y T3 (suelo con hidrocarburo + 150 ml de *Pseudomonas fluorescens* “108 UFC g⁻¹”), con tres repeticiones. Resultando así, una remediación del 99.25% para HAPs y 97.5% para TPHs en el tratamiento 3, además de dar por sentado la tremenda capacidad de biorremediar de la bacteria *Pseudomonas fluorescens*.

Luego, Ugaz et al (2014) con el trabajo titulado “Biosurfactantes en la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos” con el objetivo de determinar el rendimiento de surfactantes producidos por *Pseudomonas spp.* degradadoras de hidrocarburos de petróleo. Cuando se utilizaba el petróleo como fuente de carbono y energía, se recolectaron muestras de suelo contaminado y se descubrió que *Pseudomonas spp.* era degradante. En un suelo con TPH de 22 900 mg g⁻¹, se encontraron 78 aislados de *Pseudomonas spp.*, de los cuales el 84,62% utilizaron el petróleo como fuente de carbono y energía entre 24 y 96 horas. Los halos de emulsión de petróleo crudo liviano, con diámetros de 10 a 30 mm, muestran que el 92,42% de estas bacterias produjo biosurfactante. Los surfactantes producidos por *Pseudomonas spp.* tuvieron una dosis de 1,0-1,5 ml L⁻¹, con un rendimiento de 35% (*Pseudomonas sp.* 2HI), 31% (*Pseudomonas sp.* 8JU) y 19% (*Pseudomonas sp.* 4CF). Se demostró que *Pseudomonas spp.* degradadoras de petróleo produce surfactantes y tiene la capacidad de limpiar suelos contaminados.

La tesis de Rojas & Rengifo (2021) en “Biodegradación de petróleo por *Pseudomonas aeruginosa* en aguas de derrame de la actividad petrolera Ucayali-2020” donde se investigó a escala de laboratorio el uso de *Pseudomonas aeruginosa* para la biodegradación del petróleo en aguas de derrame de la actividad petrolera de Ucayali. Se añadieron 250 ml de caldo preenriquecido a 7 botellas de 500 ml, 7,5 ml de petróleo y 14 ml de caldo nutritivo activo. Se agitaron constantemente durante 7 días a 37°C. Finalmente, los porcentajes de biodegradación de las cuatro muestras fueron de 82,65%, 81,41%, 80,33% y 81,16%, respectivamente. El crudo utilizado tenía un grado API de 0,91 gr cm⁻³ y las unidades formadoras de colonia en las muestras eran 38x10⁻⁸ UFC g⁻¹ y 257x10⁻⁹ UFC g⁻¹.

Otro trabajo fue el de Rodríguez (2022), con el título “Biorremediación mediante *Trichoderma spp.*, *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus subtilis* para reducir concentraciones de cadmio en espárrago” con el objetivo de poder evaluar la capacidad de microorganismos como *Trichoderma spp.*, *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus subtilis* para disminuir las dosis de Cd en el cultivo de espárragos. El experimento se realizó en Ica en 2019 en el fundo Santa Mónica de Floridablanca. Los tratamientos T1 y T2 (TRICOX 1 y 2 kg); T3 y T4 (BIODELTA 1 y 2 kg); T5 y T6 (BIO-SPLENT 1 y 2 kg) y T0 (Testigo) se utilizaron para realizar un DBCA. Terminado el ensayo, no se descubrieron diferencias significativas en el peso, el número de turiones, el calibre o el rendimiento parcial del espárrago.

Finalmente, Buendía (2012) investigó la “Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos mediante compost de aserrín y estiércoles” con el objetivo de que utilizando aserrín y estiércol se pueda recuperar un suelo contaminado con hidrocarburos, utilizando la planta indicadora *Zea mays L.* de la variedad Marginal T-28. El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Fertilidad de Suelos de la Universidad Nacional Agraria la Molina, utilizando el modelo estadístico de Diseño Experimental Completamente al Azar (DCA). Se realizaron tres repeticiones y doce tratamientos, totalizando 36 macetas experimentales. Se utilizó estiércol y aserrín como sustrato para la planta indicadora de "maíz" *Zea mays L.*, y se mantuvo bajo control durante dos meses. Se registró una disminución de 22.5% de TPH, 16.5% usando solo estiércol y 9.6% usando solo aserrín.

2.2 Bases teóricas

2.2.1 Suelo

Residuos rocosos de procesos de erosión, cambios físicos y químicos, y materia orgánica de la actividad biológica que sucede en la superficie, son los componentes de la pieza superior de la corteza terrestre denominado suelo.

Diverso y poliforme, donde se ocasiona los fenómenos de clima como el viento, la lluvia, etc. El escenario compila los procesos químicos, físicos, y un ecosistema subterráneo de minúsculos animales y bastantes microorganismos, de los cuales su presencia es fundamental para su fertilidad del mismo. Su formación se debe a la destrucción de rocas y diferentes materiales que se han ido aglomerando a lo largo de los siglos debido a demasiadas modificaciones físicas, químicas y biológicas dentro de un proceso que da lugar a capas bien diversificadas (Universidad Nacional de la Plata, n.d.)

2.2.1.1 Composición del suelo

El suelo se compone de tres elementos principales: sólidos, líquidos y gaseosos, que incluyen:

Sólidos. La parte sólida del suelo está formada principalmente por minerales como silicatos (micas, cuarzos, feldspatos), óxidos de hierro (limonita, goetita), óxidos de aluminio (gibbsita, boehmita), carbonatos (calcita, dolomita), sulfatos (aljez), cloruros, nitratos, y materia orgánica u orgánico-mineral, como diferentes tipos de humus (Universidad Nacional de la Plata, s.f.,p.4).

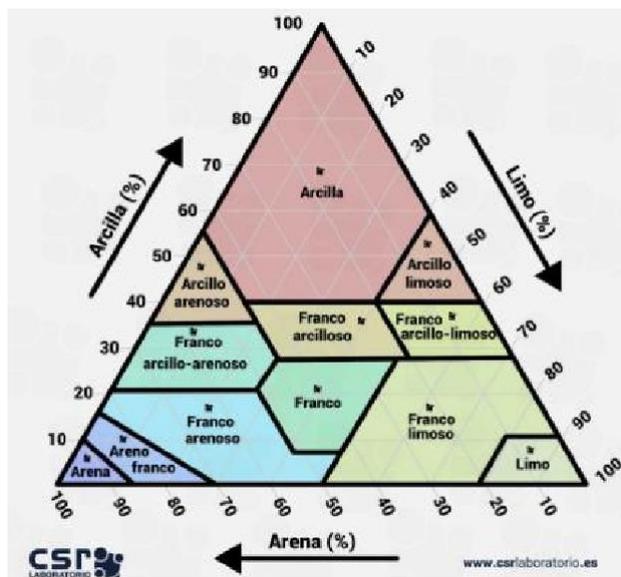
Líquidos. El agua es abundante en el suelo, pero no siempre se encuentra en su estado puro, ya que contiene iones, sales y diversas sustancias orgánicas. El agua en el suelo se desplaza por capilaridad, dependiendo de la permeabilidad del suelo, y transporta una variedad de sustancias de un nivel a otro (Universidad Nacional de la Plata, s.f., p.4).

Gaseosos. El suelo contiene varios gases atmosféricos, como oxígeno (O₂) y dióxido de carbono (CO₂). Además, dependiendo de la naturaleza del suelo, puede contener gases como metano (CH₄) y óxido nitroso (N₂O). Los tipos y la presencia de gases en el suelo son diversos y pueden variar significativamente (Universidad Nacional de la Plata, s.f.,p.4).

En la Figura 1, se observará a continuación el método de clasificación de suelos desde el punto de vista de clases texturales.

Figura 1

Triángulo textural (Clasificación USDA)



Nota. Tomado de (USDA, n.d.)

La textura del suelo se refiere al tamaño de las partículas que lo componen. Se expresa como la cantidad relativa entre la arena, el limo y la arcilla de una porción de suelo. La textura influye en cómo se ha de manejar el suelo, la cantidad de agua y aire que es capaz de retener. Por supuesto de la textura del suelo depende cómo penetra y se filtra el agua a través del suelo.

Como factor tan influyente en el manejo del suelo, uno está casi obligado a conocer la textura y las propiedades hídricas del suelo de su cultivo.

Existen cuatro grandes clases texturales para clasificar los suelos:

Suelos Arenosos: Compuestos principalmente por partículas de arena, que se pueden apreciar a simple vista. Las partículas se separan con facilidad, se saturan con poca agua y se seca rápidamente al aire. Poca adhesividad.

Suelos Limosos: Compuestos mayormente por partículas más grandes que la arcilla, pero 50 veces más pequeñas que las de arena. Su aspecto en seco es como polvo (talco) y cuando se humedece es suave. Cuando está humedecido es adhesivo, pero no retiene el agua por mucho tiempo.

Suelos Arcillosos: Están compuestos principalmente de arcilla, que son silicatos de aluminio y otros cationes. Son suelos que cuando se humedecen se vuelven muy plásticos, retienen mucha agua. Cuando se secan quedan muy cohesionados y es difícil de disgregar.

Suelos Francos: Nos referimos a tipos que son mezclas de varios tipos de materiales y que presentan propiedades mixtas con respecto a las mencionadas anteriormente.

2.2.1.2 Propiedades físicas del suelo

- La estructura, determina la proporción de partículas y minerales de distintos tamaños y formas del suelo.
- La textura, se refiere a la manera en que las partículas del suelo se presentan y se agrupan en agregados.
- La densidad, tiene un impacto en la distribución de la vegetación. Un suelo de mayor densidad es capaz de sostener una vegetación más abundante (Marin, 2016).
- La temperatura, también la distribución y altura uniforme de la vegetación.
- El color varía según la cantidad de humedad del suelo y sus componentes
- Capacidad de retención del agua

La definición la capacidad de retención del agua viene a ser la capacidad de un material (como el suelo, un sustrato o incluso un alimento) para retener agua contra la fuerza de la gravedad, es decir, cuánta agua puede retener el suelo después de haber sido saturado y drenado libremente. (Bhadha et al, 2017)

-Cálculo de la máxima capacidad de retención de agua.

Se utilizó el método presentado en (Bhadha et al, 2017), que describe el siguiente procedimiento:

En primer lugar, se pesó 50 tierra fina seca al aire. Seguidamente, se colocó un sistema de embudo de soporte y se cerró la base del embudo. Luego, se añadió 50 ml agua y se reposó por 30 minutos. Después, se pasó a dar una apertura a la base del embudo para drenar el agua y conectarla en un vaso precipitado. Para terminar, se cuantificó el agua que se drenó. Se realizó 3 veces tal procedimiento. Además, se realiza el mismo procedimiento una sola vez con papel filtro sin suelo para cuantificar el peso antes y después de agregar agua. Para concluir, se halló la capacidad de retención de agua (CRA) el mediante la ecuación siguiente:

$$CRA (\%) = \left[\frac{(50ml - ml \text{ de agua drenada} - 3.9ml + ml \text{ agua en el suelo})}{50g} \right] \times 100$$

2.2.1.3 Propiedades químicas del suelo

- **Potencial de hidrógeno (pH):** Se sabe que toda bacteria reacciona de manera diversa a cualquier valor de pH del ambiente. El pH altera directamente el crecimiento de bacterias, no obstante, con un pH de 3.2 hasta 8 experimentalmente se pueden desarrollar, aunque un rango más adecuado fluctúa entre 6.5 a 8. (Zak, 1973 p.43).
- **Conductividad eléctrica:** Se refiere a la capacidad del suelo para conducir electricidad debido a la presencia de sales disueltas y se mide en μScm^{-1} este valor es dependiente de la dosis y formación de las sales esparcidas en el suelo (Romero et al, 2009).
- **Temperatura (°C):** La temperatura juega un papel importante en la transformación de biodegradar los hidrocarburos y se debe a que induce el aumento de población de microorganismos y como resultado, la aceleración del metabolismo de hidrocarburos; el promedio es entre 10 °C a 45 °C. Según Ahumada y Gómez, (2009), a 25 °C es la temperatura óptima.
- **Capacidad de intercambio:** A esto se le llama intercambio arcilla-humus, que aporta nutrientes a las plantas mediante la regeneración de partículas minerales (Gonzales, 2018).
- **Fertilidad:** Dosis de nutrientes disponible para la vegetación.
- **pH:** Alcalinidad, acidez o neutralidad del suelo.

2.2.1.4 Propiedades biológicas

Tanto animales como bacterias y hongos son los que comprenden las propiedades biológicas del suelo. Además, los animales tienen sus tareas en la tierra en función de la nutrición, la actividad, el tamaño, etc.

2.2.1.5 Fuentes de contaminación de suelos

A nivel global, la contaminación del suelo se posiciona en tercer lugar en Europa y Euroasia, en cuarto lugar en el Norte de África, en quinto lugar en Asia, en séptimo lugar en el Noroeste del Pacífico, en octavo lugar en Norteamérica y en noveno lugar en el África Sub-Sahariana y Latinoamérica (Rodríguez et al, 2019).

Según Cerna (2018) las principales actividades que causan contaminación son:

- Aguas residuales in situ (nitratos, residuos de hidrocarburos y microorganismos fecales).

- Gasolineras y talleres de reparación de automóviles (benceno, hidrocarburos aromáticos).
- Eliminación de residuos sólidos, incluyendo amonio, salinidad y metales pesados.
- Sectores industriales, como la metalurgia, donde se manejan tetracloroetileno y otros hidrocarburos halogenados.
- Talleres de pintura y esmaltado, que emplean tetracloroetileno y álcali benceno.
- Industria maderera, involucrada en la utilización de pentaclorofenol y ciertos hidrocarburos aromáticos.
- Procesos de lavado en seco, que hacen uso de tricloroetileno y tetracloroetileno.
- Fabricación de pesticidas, que implica la presencia de plomo, zinc, fenoles, y compuestos hidrocarburos y halogenados.
- Plantas de curtido (fenoles e hidrocarburos halogenados, cromo y salinidad,).
- Aprovechamiento y recuperación de salinidad (hidrocarburos aromáticos).

2.2.2 Efectos de los hidrocarburos en el suelo

De acuerdo a Gavilánez (2013), la formación básica de petróleo crudo oscila entre el 80% y el 88%, mientras que el hidrógeno se encuentra en un rango del 10% al 15%. El nitrógeno varía de un 0% al 3%, el azufre se encuentra en un rango del 0.2% al 5%, y el oxígeno oscila entre el 0% y el 1%, estos datos varían por el yacimiento (Gavilánez, 2013). Menos de 5000 mgkg⁻¹ de presencia de hidrocarburos es lo que puede tolerar el suelo. Los efectos más importantes de los hidrocarburos en el suelo dependen de las propiedades físicas del suelo, del volumen de hidrocarburo, las composiciones químicas y microbiológicas y los factores ambientales (humedad, temperatura, factores climatológicos), que combinan todas las variables determinantes del tamaño. Cuando los contaminantes se esparcen por una determinada zona, los efectos más nocivos sobre el suelo son:

- Disminución de rendimiento de los cultivos agrícolas y deterioro de calidad de los productos obtenidos.
- Previene o retrasa que crezca las vegetaciones en cualquier área que este contaminada.
- Cambios de población microbiana del suelo
- Contaminar aguas superficiales a través de las escorrentías.
- Contaminar aguas subterráneas a través de lixiviados.
- Contaminar el aire por combustión, sublimación y evaporación.

- Veneno por medio de la cadena alimenticia.
- Acumular contaminantes supera cualquier capacidad de absorción del suelo, se produce una disminución o anulación de su poder autodepurante.
- Prohibir el intercambio de gases en la atmosfera al desencadenarse variedad de procesos físicos y químicos simultáneos (Gonzales, 2018).

Adicionalmente, pueden destruir la estructura terciaria de las proteínas, desnaturalizar enzimas y deshidratar células los elevados desniveles de salinidad presentes. (Hernandez y Ruiz, 2017)

2.2.3 Diésel

El Diésel, Gasoil o Gasóleo es un hidrocarburo obtenido a temperatura de ebullición de 175 a 400 °C y conformado por cadenas de quince a dieciocho carbonos. Compuesto por isoparafinas y cicloparafinas en un 75 % e hidrocarburos aromáticos, además de naftalenos y alcalobencenos en un 25%.

Las clases de diésel son: diésel A, diésel A+, biodiésel B100, diésel B, diésel B7, diésel B10, diésel B20, diésel R33, diésel C y diésel B5-S-50 (ultra).

El diésel B5 S-50, se compone de 95 % de diésel N° 2 S-50 y 5 % de biodiésel B100, poseyendo como máximo de 50 ppm de azufre.

En la Tabla 1 se detalla las densidades de los derivados del petróleo.

Tabla 1

Densidades de derivados de petróleo

Densidades	kg m ⁻³	g cm ⁻³
Gasolina	680	0.68
Diésel	850	0.85

Nota. La tabla muestra las distintas densidades de la gasolina y diésel. Tomado de (Simbaña, 2016)

En consecuencia, debido a la existencia de muchas sustancias químicas en petróleo crudo, no es práctico medir los componentes por separado. Por lo tanto, se mide la acumulación de hidrocarburos policíclicos (TPHs) en una ubicación específica (Estrella, 2012).

2.2.4 Biorremediación

Berkeley (2011), indica que la biorremediación es emplear todos los seres vivos para la restauración de ambientes de polución. La biorremediación, vocablo proveniente de inicios de los 80, es la ejecución de una estrategia físico-química con el fin de impedir la contaminación del suelo y el daño.

Para limpiar terrenos o aguas contaminadas es que se utiliza la biorremediación amenguando o eliminando los residuos potenciales perniciosos.

La biorremediación es particularmente adecuada para niveles de contaminación bajos o moderados, donde los contaminantes están presentes en concentraciones que no son tóxicas para los microorganismos responsables de su degradación. En este rango, los microorganismos pueden metabolizar eficientemente los contaminantes sin requerir modificaciones importantes del sitio. (Buendía, 2012)

Los suelos recomendados para un propicio proceso de biorremediación son los suelos arenosos y los suelos franco-arenosos, ya que la biorremediación aeróbica requiere un flujo adecuado de oxígeno para que los microorganismos puedan descomponer los contaminantes de manera eficiente. (Chang, 2019)

Los factores ambientales presentes en una determinada zona contaminada influyen en la degradación de los TPHs. Por tal razón, inspeccionar la actividad de los microorganismos degradadores es imprescindible para su eficiencia (Vallejo et al, 2010).

Dentro de los múltiples elementos ambientales y físicos que requieren evaluación, se encuentra la localización del derrame, la cual incide directamente en las características químicas y físicas del petróleo, por lo que a bajas temperaturas aumenta la viscosidad del petróleo, variando la solubilidad en agua y disminuyendo la volatilización; en cambio, cuando la temperatura es alta la toxicidad se incrementa, ya que cohibe así la carga microbiana y actividad. Para intensificar la actividad enzimática de los microorganismos, usar un rango apropiado de temperatura es lo adecuado. Esto ayuda a mejorar el proceso de biorremediación. La presencia de oxígeno molecular es otro aspecto relevante en esta fase de purificación es la posibilidad de llevar a cabo la oxidación de sustancias a través de las enzimas oxigenasas presentes en los microorganismos, junto con la rápida volatilización de compuestos perjudiciales. En consecuencia, una escasa dosis de oxígeno puede obstaculizar el proceso de descomposición (Vallejo et al, 2010).

De acuerdo a la investigación, se ha demostrado que en el rango de 35% a 90% de saturación de agua en el suelo y el potencial hídrico propicia óptimos tratamientos de descomposición. Cuando estos valores son más bajos, el proceso se ve afectado negativamente. Además, se ha comprobado que la mayoría de las bacterias heterótrofas prosperan en condiciones de pH cercanas a la neutralidad. En este sentido, valores de pH extremadamente ácidos o alcalinos pueden tener un efecto perjudicial en la comunidad microbiana, lo que a su vez reduce su capacidad para descomponer los hidrocarburos (Vallejo et al, 2010). Según algunos argumentos, el intervalo óptimo de pH se encuentra entre 5 y 7,8. Aparte de la temperatura y el pH, es crucial agregar sustancias nutritivas para estimular el crecimiento de microbios “Pardo, y otros, (2014)”. Por añadidura, tras los derrames se evidencia alto nivel de carbono, pero carencia de nitrógeno y fósforo, elementos esenciales para el funcionamiento metabólico de los microorganismos. Por consiguiente, la aplicación de estrategias de biorremediación resulta una excelente opción, como por ejemplo, la bioestimulación o la bioaugmentación (Vallejo et al, 2010).

Con los resultados de la caracterización permitirán caracterizar el suelo de acuerdo a lo indicado en la Tabla 2.

El pH, la capacidad de intercambio catiónico, la materia orgánica y los carbonatos son de los parámetros más importantes del suelo.

Tabla 2

Calificación de ciertos parámetros de caracterización

Parámetro	Unidad	Valor	Clasificación	Referencia
pH (1:1)	-	<5.5	Fuertemente ácido	
		5,6 -6,0	Moderadamente ácido	United States
		6,1 -6,5	Ligeramente ácido	Department
		6,6-7,3	Neutro	of
		7,4-7,8	Ligeramente alcalino	Agriculture,
		7,9-8,4	Moderadamente alcalino	2017
		>8,5		

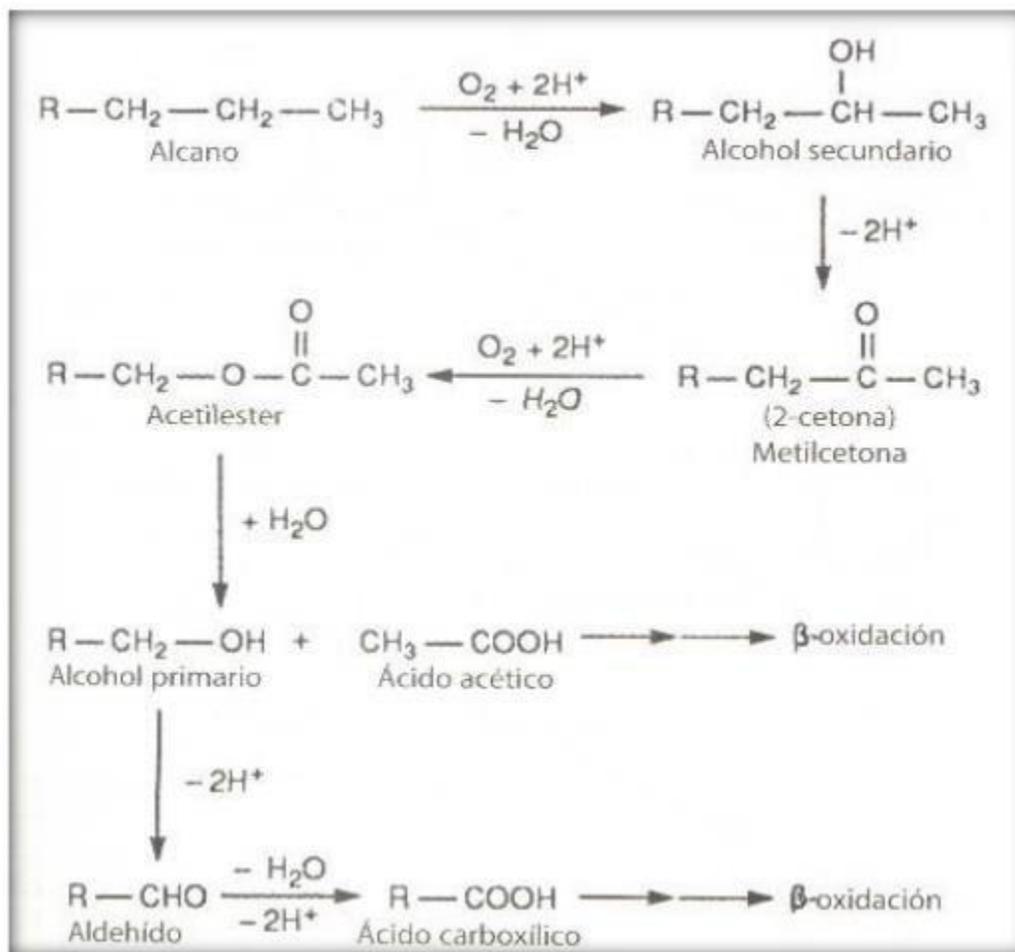
			Fuertemente alcalino	
Capacidad de intercambio catiónico	cmol kg ⁻¹	<5	Muy bajo	Cornell
		5-15	Bajo	University
		15-25	Medio	Copperative
		25-40	Alto	Extension,
		>40	Muy alto	2007
Materia orgánica	% peso	0,0 -0,5	Extremadamente bajo	Wood and
		0,5-1	Bajo	Research
		1,0-2,5	Moderadamente	Laboratory,
		2,5-6,0	bajo	1997
		>6,0	Moderado Alto	
Carbonatos	% peso	0	No calcáreo	
		>0-2	Ligeramente calcáreo	Food an
		>2-10	Moderadamente calcáreo	Agriculture
		>10-25	Fuertemente calcáreo	Organization
		>25	Extremadamente calcáreo	of the Unites Nations, 2006

Nota. pH: Medida del grado de acidez o alcalinidad de una solución Tomado de (Obispo y Ramos, 2019)

En la Figura 2 se detalla la ruta de degradación de n-alcanos e hidroxilación.

Figura 2

Ruta de degradación de n-alcanos e hidroxilación



Nota. Tomado de (Pérez, 2018)

En la Figura 2, las rutas de degradación de n-alcenos e hidroxilación, son catalizadas por el mismo grupo de enzimas. En las bacterias las enzimas participantes son monooxigenasas, alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenas.

2.2.5 Pasos y pautas para optar la técnica apropiada y como aplicarla

En cuanto a la contaminación del suelo, que es un problema global, se ha descubierto que la biotecnología ayuda a resolverlo (Moosavi y Seghatoleslami, 2013). De esta manera, se cuentan con métodos de conservación, extracción o segregación, y eliminación:

En la Tabla 3 se muestra la clasificación de métodos de remediación según su efecto sobre los contaminantes.

Tabla 3

Clasificación de métodos de remediación según el impacto respecto a los componentes infectantes.

Método	Concepto
Retención	Confinamiento intracelular, barrera impermeable, inmovilización.
Extracción	Filtración con carbón activado, lavado de tensioactivos, extracción de producto libre, extracción con vapor.
Destrucción	Biorremediación, fitorremediación e incineración.

Nota. Tomado de (Saval, 1999)

Para Saval (1999) “Una categorización más general de toda el área contaminada según riesgo y condiciones sanitarias debería basarse en las características biológicas, fisicoquímicas y térmicas del suelo”

En la Tabla 4 se muestra la clasificación de técnicas restauradoras según su principio funcional.

Tabla 4

Clasificación de técnicas restauradoras según su principio funcional

Técnica Restauradora	Principio funcional
Biológicas	Biorremediación, fitorremediación
Físico-químicas	Solidificación, estabilización, extracción de vapores.
Térmicas	Desorción por inyección de vapor, incineración.

Nota. Tomado de (Saval, 1999)

Las dos categorizaciones (Tabla 3 y 4) son validadas y complementarias, porque normalmente requiere combinarlas (Saval, 1999). Los expertos en remediación de suelos también utilizan el término atenuación natural. De acuerdo con Saval (1999) "La capacidad intrínseca de la naturaleza para reducir la presencia de contaminantes a través de los ciclos biogeoquímicos llevados a cabo por los microorganismos que existen en el suelo sin la intervención humana se denomina atenuación" (p.17). Esta noción se denomina también como biorremediación intrínseca. No obstante, el tiempo que se requiere para la recuperación de suelos pueden ser desde unos pocos días hasta más de diez años.(Chan et al, 2014)

Métodos biológicos utilizados para limpiar los suelos que están contaminados con hidrocarburos. Existen múltiples enfoques; sin embargo, los tratamientos biológicos se fundamentan en procesos microbiológicos que ocurren de manera inherente en el suelo y tienen como resultado la descomposición de los contaminantes (Sims, 1993; Fernández-Linares et al.,

2006: 179). El principal objetivo es lograr mineralización de contaminantes, es decir, convertir los compuestos químicos nocivos en compuestos inofensivos como el dióxido de carbono, agua o materia celular.

La Tabla 5 nos enseña las diferentes biotecnologías para la remediación de suelos contaminados.

Tabla 5

Tecnologías para la biorremediación de suelos infectados

Tecnología	Concepto de la tecnología
Bioestimulación	Implica agregar oxígeno y/o nutrientes al suelo contaminado para estimular la actividad de los microorganismos nativos, promoviendo así la biodegradación de los contaminantes.
Bioaumentación	Consiste en añadir microorganismos vivos que tienen la capacidad de degradar el contaminante en cuestión y así promover su biodegradación o biotransformación.
Biolabranza	Consiste en airear montones de suelo contaminado y añadir agua y fertilizantes; los microorganismos que se encuentran en este suelo se han adaptado a él recibiendo cantidades precisas de oxígeno del aire, el agua y los fertilizantes, y en el ambiente y las temperaturas adecuadas degradan los hidrocarburos.
Bioventeo	Consiste en fomentar la descomposición aerobia de una sustancia contaminante al proporcionar aire en el área afectada, ya sea mediante pozos de inyección o extracción ubicados en la región no saturada afectada por el vertido. Además, en caso necesario, se introducen nutrientes.
Biorreactores	Esta tecnología se destaca como la más apropiada, ya que optimiza la actividad de los microorganismos. Facilita la combinación controlada y eficiente de procesos químicos, físicos y biológicos, lo cual mejora y acelera el proceso de biodegradación. Un reactor ampliamente empleado para la biorremediación de suelos es el biorreactor de lodos. En este dispositivo, el suelo contaminado se mezcla de forma constante con un líquido, y la degradación se lleva a cabo en la fase acuosa mediante microorganismos que se encuentran en suspensión o inmovilizados en la fase sólida.

Biodegradación en fase sólida	<p>Normalmente, este tipo de tecnología se implementa fuera del lugar afectado y abarca prácticas como el compostaje, las pilas estáticas y las pilas alargadas. En otras palabras, el material contaminado se mezcla con abonos orgánicos como paja, aserrín, estiércoles y desechos agrícolas, ya que sus propiedades contribuyen a restablecer el equilibrio de nutrientes, aseguran una mejor aireación y facilitan la generación de calor durante el proceso. Las pilas estáticas, también conocidas como biopilas, representan una variante de compostaje que incorpora agua y nutrientes al sistema. Estas se ubican en áreas designadas para el tratamiento, que incluyen algún método de aireación y sistemas para recolectar lixiviados. Es común recubrir las pilas de suelo con plástico para controlar los lixiviados, prevenir la evaporación y reducir la volatilización de contaminantes, al tiempo que favorece el calentamiento del proceso.</p>
Fitorremediación	<p>Se trata de una tecnología in situ, no destructiva y de bajo costo utilizada para la descontaminación de suelos afectados por petróleo. Esta metodología se basa en la capacidad del suelo de ciertas plantas para acumular metales pesados y reducir las dosis de hidrocarburos. La técnica impulsa la actividad microbiana en la rizosfera, la región cercana a las raíces de las plantas, con el objetivo de degradar los contaminantes presentes en el suelo. Esto logra la eliminación, transferencia, estabilización y neutralización de compuestos orgánicos e inorgánicos perjudiciales.</p>

Nota. El gráfico muestra las biotecnologías utilizadas en la remediación de suelos contaminados.

Tomado de (Velasco y Volke, 2003)

Hay dos enfoques de la biorremediación: cuando usas el aditamento externo de microorganismos degradadores corresponde a la bioaumentación y la bioestimulación constituye la adición de nutrientes para favorecer el desarrollo de microorganismos y así acelerar la recuperación.

Por consiguiente, se ejecutará un procedimiento de aumentación al utilizar el hongo y un procedimiento de estimulación al agregarle nutrientes a éste para el adecuado crecimiento del hongo.

La bioestimulación es un factor determinante en la recuperación del suelo, tal y como confirman los resultados para este estudio. El crecimiento microbiano aumenta cuando se optimiza la relación C: N se optimiza ésta puede ser la razón del porqué, ya que los suelos altamente contaminados poseen demasía de carbono, es decir, la relación C: N es muy elevada, lo cual perjudica la degradación (Rodríguez et al, 2012).

La bioaumentación resultó gracias a la añadidura de inóculo con una remoción del 41%. Sin embargo, este porcentaje no permaneció constante. Pueden ocurrir permutaciones en microcosmos que cambian la proporción C: N y el metabolismo debido a cambios en la humedad y las fuentes de carbono y nutrientes. Esta transformación favorece el desarrollo de otras especies bacterianas y con ello la reducción de la eliminación de hidrocarburos. Esto podría ser confirmado por el inventario de microorganismos realizado durante la prueba, donde el número de bacterias de clastos de hidrocarburos disminuyó con el tiempo. Los inóculos utilizados no pudieron competir con las bacterias del suelo en los experimentos, lo que justifica la falta de potencia del inóculo microbiano. Esto se debe a que las comunidades bacterianas se caracterizan por cambios rápidos en respuesta a diversos factores ambientales; sin embargo, la progenie cultivada no puede aclimatarse tan rápido como ellos. (Rodríguez et al, 2012). Es decir, básicamente las bacterias poseen más facilidades de adaptarles a cambios drásticos de temperatura entre otras condiciones; al contrario, de los hongos. Es por eso que, esto afecta la bioaumentación.

2.2.6 Acción de las bacterias en los hidrocarburos

Las villas de bacterias de los suelos utilizan hidrocarburos originados de petróleo en situaciones aeróbicas o anaeróbicas como recurso de carbono que permite su eliminación. Algunas de estas bacterias son:

- *Pseudomonas*
- *Arthrobacter*
- *Alcaligenes*
- *Coiynebacterium*
- *Flavobacterium*
- *Achromobacter*
- *Micrococcus*

Los microorganismos presentes en el suelo no eliminan todos los componentes del petróleo a la misma velocidad. Se pueden hacer generalizaciones sobre la biorremediación inducida por hidrocarburos: los compuestos alifáticos de cadena lineal (parafínicos) son más propensos a ser

eliminados eficientemente que los aromáticos, los hidrocarburos saturados más que los insaturados, y los hidrocarburos de cadena sencilla más que los ramificados. La adición de ramificaciones y enlaces dobles o triples entre átomos de carbono complica el proceso de purificación. Las cadenas largas de hidrocarburos alifáticos se descomponen más fácilmente que las cortas. Los hidrocarburos con una longitud de cadena inferior a 9 átomos de carbono son difíciles de descomponer debido a su toxicidad para los microorganismos. En el caso de los compuestos aromáticos simples, se descomponen a través de diversas aperturas en el anillo aromático. La presencia de halógenos ralentiza la biorremediación al estabilizar el ciclo aromático. Según USEPA (2003), los componentes del petróleo incluyen dicloetileno, tetracloroetileno, tricloetano, dicloroetano, clorofenol, triclorofenol, diclorofenol, triclorobenceno, diclorobenceno, dicloropropano, dicloropropeno, diclorobenceno, dioxano, acenafteno, acetona, antraceno y benceno.

La estructura molecular de los hidrocarburos del petróleo puede ser modificada en diferentes niveles gracias a la actividad biológica de los microorganismos. La biotransformación ocurre cuando la descomposición de un compuesto orgánico conduce a la formación de un intermediario tóxico, pero a un nivel inferior. La mineralización se logra descomponiendo los hidrocarburos en dióxido de carbono, agua y compuestos celulares. Estas dos reacciones ocurren durante el proceso de biodegradación.

Las bacterias no son los exclusivos con capacidad de biorremediación. Últimamente, se han registrado hongos que superan la destreza de las bacterias.(Nasrawi, 2012)

En la Tabla 6 se observa los distintos géneros de bacterias capaces de degradar hidrocarburos.

Tabla 6

Géneros de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos

Género	Especie	Hidrocarburo
<i>Achromobacter</i>	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	Fenantreno, Pireno (HAPs).
<i>Acidoborax</i>	<i>Acidoborax sp</i>	Fenantreno (HAPs).
	<i>Acinetobacter sp.</i>	Fluoranteno, TPH, Fenol, Fluoranteno
<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	TPH
	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	HAPs

	<i>Acinetobacter genomosp</i>	HAPs
	<i>Acinetobacter venetianus</i>	Alcanos, TPH
<i>Actinobacillus</i>	<i>Actinobacillus sp.</i>	Fenol
<i>Aeribacillus</i>	<i>Aeribacillus pallidus</i>	Fluoranteno, Alifáticos
<i>Aeromona</i>	<i>Aeromona sp.</i>	Alifáticos, alcanos
<i>Alcaligenes</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	Alifáticos, alcanos
	<i>Alcaligenes sp.</i>	Naftaleno y tolueno
<i>Arthrobacter</i>	<i>Arthrobacter mysorens</i>	TPH
	<i>Arthrobacter sp.</i>	HAPs, 4-nitrofenol
<i>Agrococcus</i>	<i>Agrococcus sp.</i>	HAPs
<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus sp</i>	TPH, Asfaltenos, Hidrocarburos alifáticos, aromáticos, HAPS
	<i>Bacillus aerius</i>	HAPs
	<i>Bacillus cereus</i>	HAPs
	<i>Bacillus licheniformis</i>	HAPs
	<i>Bacillus mojavensis</i>	HAPs
	<i>Bacillus smithii</i>	Hidrocarburos aromáticos
	<i>Bacillus sphaericus</i>	HC
	<i>Bacillus subtilis</i>	HAPs
	<i>Bacillus toyonensis</i>	HAPs
<i>Brevibacterium</i>	<i>Brevibacterium sp.</i>	Naftaleno, tolueno
<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia sp</i>	HC
<i>Cellulosimicrobium</i>	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>	HAPs
	<i>Cellulosimicrobium funkei</i>	HC
<i>Chromobacterium</i>	<i>Chromobacterium sp.</i>	Hidrocarburos alifáticos
<i>Cyanobacterium</i>	<i>Cyanobacterium sp.</i>	TPH
<i>Citrobacter</i>	<i>Citrobacter sp.</i>	Asfaltenos
<i>Desulfobacter</i>	<i>Desulfobacter sp.</i>	TPH
<i>Desulfomicrobium</i>	<i>Desulfomicrobium sp.</i>	TPH
<i>Desulforococcus</i>	<i>Desulforococcus sp.</i>	TPH
<i>Desulfovibrium</i>	<i>Desulfovibrium sp.</i>	TPH

<i>Dietzia</i>	<i>Dietzia sp.</i>	Fenantreno (HAPs)
<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	HAPs
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	HC
	<i>Enterobacter sp.</i>	Asfaltenos, HC, Hidrocarburos alifáticos (n-alcanos)
<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>	HC
<i>Exiguobacterium</i>	<i>Exiguobacterium profundum</i>	TPH
<i>Flavimonas</i>	<i>Flavimonas sp.</i>	Hidrocarburos alifáticos (n-alcanos)
<i>Flavobacterium</i>	<i>Flavobacterium sp.</i>	TPH
<i>Geoalkalibacter</i>	<i>Geoalkalibacter sp.</i>	TPH
<i>Geobacillus</i>	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	Hidrocarburos alifáticos
<i>Gordonia</i>	<i>Gordonia amicalis</i>	Fenantreno (HAPs)
	<i>Gordonia sihwensis</i>	Alcanos
<i>Hydrogenophaga</i>	<i>Hydrogenophaga sp.</i>	Fenantreno (HAPs)
<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Benceno, fenantreno, fluoranteno y pireno
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	HC
	<i>Klebsiella sp.</i>	Hidrocarburos alifáticos (n-alcanos)
<i>Marmoricola</i>	<i>Marmoricola sp.</i>	Fenantreno (HAPs)
<i>Methanosphaera</i>	<i>Methanosphaera sp.</i>	TPH
<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacterium sp.</i>	Fenantreno (HAPs)
<i>Micrococcus</i>	<i>Micrococcus sp.</i>	Hidrocarburos aromáticos y alifáticos
<i>Nocardioides</i>	<i>Nocardioides sp.</i>	Fenantreno (HAPs)
<i>Novosphingobium</i>	<i>Novosphingobium sp.</i>	Fenantreno (HAPs)
<i>Pasteurella</i>	<i>Pasteurella sp.</i>	TPH
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Hidrocarburos aromáticos
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Fenol, hidrocarburos aromáticos y alifáticos
	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	HC
	<i>Pseudomonas panipatensis</i>	Naftaleno, azufre y kerosene
	<i>Pseudomonas putida</i>	Alcanos, TPH, Fenantreno (HAPs), Tolueno

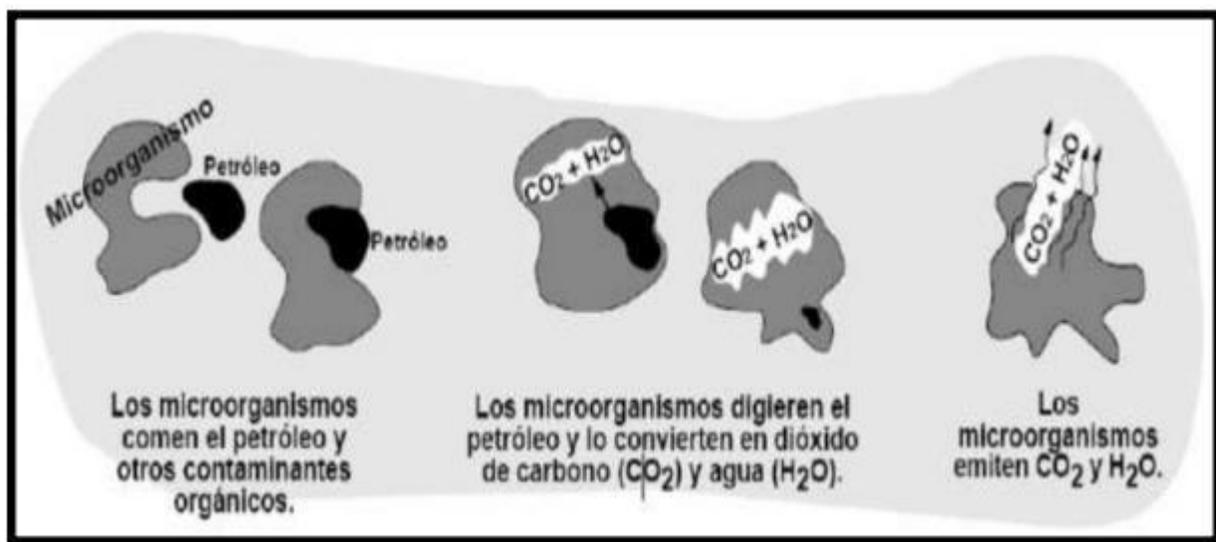
	<i>Pseudomonas koreensis</i>	Naftaleno, azufre y kerosene
	<i>Pseudomonas kunmingensis</i>	Naftaleno, azufre y kerosene
	<i>Pseudomonas sp.</i>	Hidrocarburos alifáticos (n-alcanos), HC, TPH
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Hidrocarburos aromáticos
	<i>Pseudomonas veronii</i>	Naftalenos, azufre y kerosene
<i>Raoultella</i>	<i>Raoultella terrigena</i>	HC
<i>Rhodococcus</i>	<i>Rhodococcus sp.</i>	Hidrocarburos del petróleo
<i>Serratia</i>	<i>Serratia rubidae</i>	Hidrocarburos alifáticos y aromáticos
<i>Spirillum</i>	<i>Spirillum sp</i>	Hidrocarburos alifáticos y aromáticos
<i>Sphingobium</i>	<i>Sphingobium sp.</i>	Fenantreno (HAPs)
<i>Sphingopyxis</i>	<i>Sphingopyxis sp.</i>	Fenantreno (HAPs)
<i>Sphingomonas</i>	<i>Sphingomonas sp.</i>	HAPs, Alcanos
<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Hidrocarburos aromáticos
	<i>Staphylococcus epidermis</i>	Hidrocarburos aromáticos
	<i>Staphylococcus sp.</i>	Asfaltenos
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>	Fenol
<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio fluvialis</i>	TPH, Fenantreno
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Fenantreno
	<i>Vibrio splendidus</i>	Naftaleno y fenantreno
<i>Xanthomonas</i>	<i>Xanthomonas sp.</i>	Hidrocarburos alifáticos y aromáticos
<i>Lysinibacillus</i>	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	HAPs
	<i>Lysinibacillus sp.</i>	Asfaltenos
	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	HAPs

Nota. Se ven todos los géneros de bacterias q degradan hidrocarburos indicando qué tipo de hidrocarburos específicamente degrada.

En la Figura 3 como actúan los microorganismos frente al hidrocarburo presente en el suelo.

Figura 3

Biodegradación mediante microorganismos en el suelo.



Nota. Tomado de (Campian, 2018)

En cuanto a la significancia de la materia orgánica, sus ventajas son:

El rol de los microorganismos del suelo tiene como objetivo mejorar las propiedades físicas y biológicas y erradicación de dolencias. Por tanto, se puede mencionar sus siguientes efectos:

- Según lo indicado por Buendía (2012), se observan efectos positivos en las condiciones físicas del suelo, como la mejora de la estructura y la aglomeración de partículas, la reducción de la compactación, el aumento de los espacios porosos y una mejor capacidad de infiltración del agua (p.23).
- De acuerdo con Buendía (2012), se señala que se logra el control de poblaciones de microorganismos patógenos en el suelo mediante la competencia (p.23).
- Conforme a las observaciones de Buendía (2012), se produce un incremento en la biodiversidad microbiana y se crean las condiciones necesarias para el desarrollo de microorganismos beneficiosos de forma natural (p.23).
- La relación C/N se expresa en términos de unidades de carbono por unidad de nitrógeno en el material. Una proporción adecuada de estos dos nutrientes favorece un óptimo crecimiento y reproducción. La relación C/N ideal para iniciar el proceso de degradación se encuentra en el rango de 25-35/1, esta relación disminuye gradualmente hasta llegar a 10-15/1, momento en el cual el material se encuentra listo para su uso (Buendía, 2012, p.23).

2.2. 7 *Pseudomonas putida*

TAXONOMÍA Y CLASIFICACIÓN:

REINO: *Bacterias*

FILO: *Proteobacteria*

CLASE: *Gammaproteobacteria*

ORDEN: *Pseudomonadales*

FAMILIA: *Pseudomonadaceae*

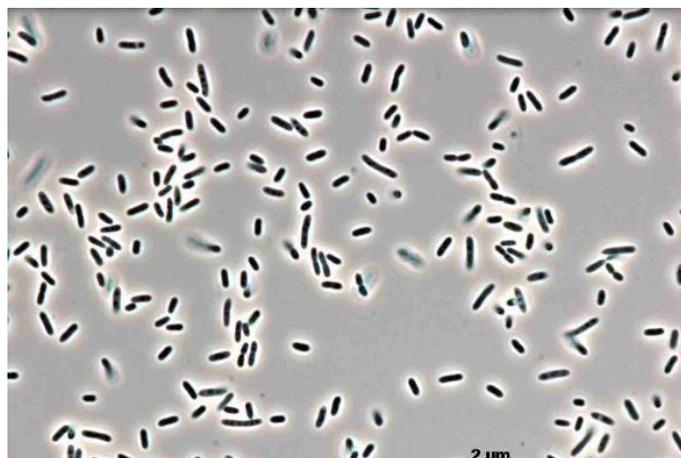
GÉNERO: *Pseudomonas*

ESPECIE: *Pseudomonas putida* (Volke et al, 2020)

En la Figura 4 se observa a nivel microscópico la bacteria *Pseudomonas putida*.

Figura 4

Pseudomonas putida



Nota. Tomado de (Europeana, n.d.)

Pseudomonas putida es una bacteria saprofita ubicua que coloniza la rizosfera del suelo y pertenece al género *Pseudomonas fluorescens*. La cepa KT2440 de *Pseudomonas putida* es el miembro mejor caracterizado de este grupo, emergiendo como una especie de laboratorio modelo que ha atraído una amplia atención como huésped celular para la biología sintética y la ingeniería metabólica debido a sus notables y versátiles capacidades metabólicas. Esta cepa ha evolucionado para resistir duras condiciones ambientales y tensiones fisicoquímicas. La especie también conserva la capacidad de sobrevivir y prosperar en su entorno natural del suelo. *Pseudomonas putida* mt-2 y otros aislados han sido reconocidos y utilizados como agentes de biorremediación debido a su capacidad para crecer en matrices complejas que incluyen compuestos aromáticos como tolueno y xileno. La ausencia de determinantes de patogenicidad es otra característica clave

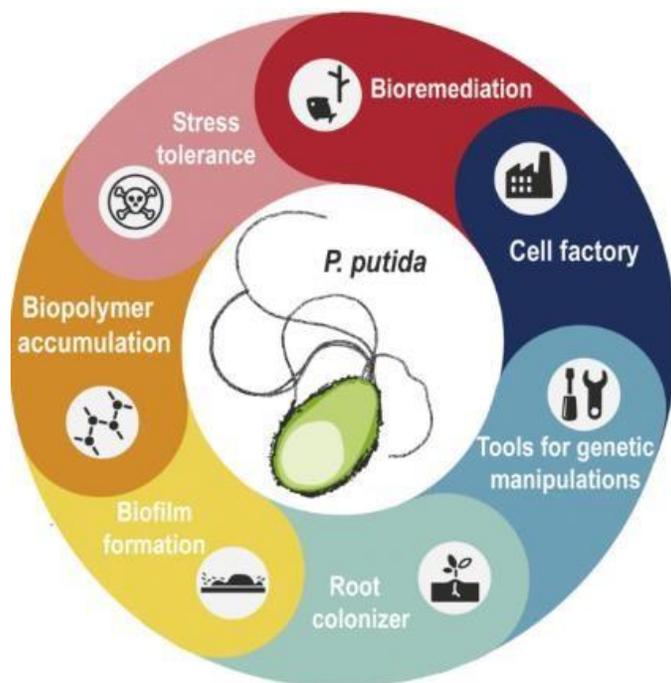
de la cepa KT2440, que facilita su uso en la investigación básica y aplicada en microbiología. (Volke et al, 2020)

Pseudomonas putida se encuentra en suelos que contienen componentes que descomponen los hidrocarburos, lo que convierte a esta bacteria en una candidata para aplicaciones biotecnológicas como biorremediación, biocontrol, agricultura y biocatálisis. Bacilos aerobios Gram negativos, incapaces de formar esporas, de 1,5 a 5 µm de largo y de 0,5 a 1,0 µm de diámetro. La temperatura óptima de crecimiento es de 30 a 35°C y el rango de pH es de 6 a 8 unidades. *Pseudomonas putida* puede degradar los hidrocarburos totales. (Bastidas y Cedeño, 2016)

En la Figura 5 se muestra la utilidad de la *Pseudomonas putida* en las diferentes industrias.

Figura 5

Desde 1960 la Pseudomonas putida abarca diversas industrias



Nota. El gráfico muestra los distintos campos que ha abarcado la *Pseudomonas putida*. Tomado de (Volke et al, 2020)

La robustez fisiológica, la diversidad metabólica y la alta tolerancia al estrés son características clave de esta especie. En la naturaleza, esta bacteria de la rizosfera coloniza el suelo y las raíces (a menudo formando biopelículas; en condiciones de laboratorio, se pueden explotar estilos de vida tanto planctónicos como ligados); El valor de esta especie como fábrica de células (por ejemplo, para la producción de biopolímeros o para la biodegradación) ha estimulado el desarrollo de una variedad de herramientas para todo tipo de manipulaciones genéticas. (Volke et al, 2020)

2.2.8 *Pseudomonas fluorescens*

TAXONOMÍA Y CLASIFICACIÓN:

REINO: *Bacterias*

FILO: *Proteobacteria*

CLASE: *Gammaproteobacteria*

ORDEN: *Pseudomonadales*

FAMILIA: *Pseudomonadaceae*

GÉNERO: *Pseudomonas*

ESPECIE: *Pseudomonas fluorescens* (Peñalver et al, 1994)

Descripción: Bacterias baciliformes, gramnegativas, móviles y con flagelos polares. Sin esporas, estrictamente aeróbico y quimioorganoheterotrófico. Los pigmentos fluorescentes se producen en medios apropiados y pectinasa. Pertenece al Grupo V LOPAT. Se han descrito cinco variantes biológicas de esta especie. (Peñalver et al, 1994)

Transmisión: Viento y lluvia. (Peñalver et al, 1994)

Distribución geográfica: A nivel mundial, zonas templadas de Europa y América. En España es esporádico (Peñalver et al, 1994).

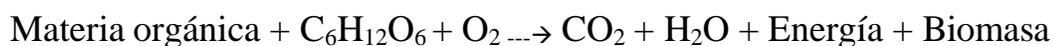
La bacteria *Pseudomonas fluorescens* es un bacilo Gram negativo, con un tamaño que oscila entre 0.5 a 1 μm de ancho y 1.5 a 5.0 μm de largo. Su temperatura óptima de crecimiento se sitúa entre 25 y 30°C, aunque puede desarrollarse en un rango de 5 a 42°C. Estas bacterias no proliferan en un pH inferior a 4.5, ya que prefieren condiciones de pH neutro. Tienen un metabolismo muy activo y suelen encontrarse en el agua y el suelo (León & Velásquez, 2022).

2.2.15 Respiración basal

Todos los seres vivos respiran, lo que significa que utilizan el carbono de los alimentos o sustratos para oxidarlo, generalmente de forma aeróbica, usando el O_2 como receptor de electrones. Este proceso genera energía, biomasa, CO_2 y agua. Lo mismo ocurre con todos los organismos que habitan en el suelo, como raíces, insectos, lombrices y microorganismos, por lo que se dice que el suelo también respira. Así como se muestra en la Figura 6 a continuación.

Figura 6

Reacción química de la respiración del suelo



Nota. Tomado de (Martinez y Ortega, 2022)

La respiración está estrechamente vinculada con la descomposición de la materia orgánica, tanto en ambientes aeróbicos como anaeróbicos, donde el aceptor de electrones disponible varía. En ambientes aeróbicos, el aceptor de electrones es el oxígeno molecular (O_2), mientras que, en condiciones anaeróbicas, sin O_2 , los aceptores de electrones pueden ser compuestos que contienen

oxígeno, como NO^{-3} , SO_4^{-2} , o H_2O . En este caso, se produce la liberación de CO_2 , CH_4 , H_2S y otros gases, junto con la formación de nuevos tejidos microbianos.

La respiración del suelo se utiliza como un método para medir los cambios en la producción de CO_2 en un volumen específico de suelo durante un cierto período de tiempo. Esto la convierte en una medida directa de la actividad biológica y la descomposición de la materia orgánica. Se expresa como la cantidad de carbono en forma de CO_2 producido por unidad de volumen en un tiempo determinado ($\text{C-CO}_2 \text{ kg ha}^{-1} \text{ d}^{-1}$).

-Métodos de medición.

La respiración del suelo puede medirse utilizando métodos simples o avanzados, ya sea en campo o en laboratorio.

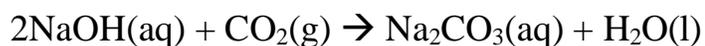
- Cromatografía de gases.
- Analizador de gases con infrarrojo (IRGA- Infrared gas analyzer).
- Sensores de CO_2 .
- Métodos de titulación.

Los métodos de titulación que emplean hidróxido de potasio (KOH) o hidróxido de sodio (NaOH) son sencillos y no requieren de un cromatógrafo, aunque sí requieren algunos recursos de laboratorio y espacio. Sin embargo, en ocasiones pueden subestimar la cantidad de CO_2 producido.

En este contexto, el CO_2 reacciona con la base, generando carbonato de sodio (o potasio) y agua como muestra la Figura 7.

Figura 7

Reacción química entre el NaOH y CO_2



Nota. Tomado de (Martinez y Ortega, 2022)

Después de la reacción base de la Figura 7, se añadió el BaCl_2 , con lo cual ocurre una reacción de precipitación. El procedimiento en sí, consiste en titular la base remanente con HCl diluido y fenolftaleína como indicador. Cuanto mayor sea la cantidad de base presente (lo que se

refleja en un mayor volumen de ácido utilizado), menor será la producción de CO₂, y viceversa. (Martinez y Ortega, 2022)

Formula de respiración basal (RB) (García et al, 2019):

$$RB = \frac{((10 - (\text{Gasto HCl} \times \text{Normalidad HCl})) \times 3 \times 22)}{(\text{Peso maceta} \times \text{Días de incubación})}$$

RB= Respiración Basal

Gasto HCl = Gasto de HCl al realizar la titulación.

Normalidad de HCl= Esta normalidad fue de 0.5N.

Peso maceta= Hubo macetas con peso de 2 kg y 1 kg

Días de incubación= Días que se dejó el NaOH encerrado en la maceta para la absorción de CO₂.

3= El número 3 en la formula representa la relación de la cantidad de NaOH puesta en la maceta para la absorción de CO₂ (30 g) y la alícuota de NaOH tomada para la titulación (10 g).

22= El número 22 en la formula representa el peso molecular del CO₂ (22 mg CO₂).

2.2.8 Significancia de microorganismos durante la descomposición de materia orgánica.

En el entorno que nos rodea, ya sea en el aire, en el suelo, en nuestros intestinos, en los alimentos que ingerimos o en el agua que consumimos, coexisten diversos microorganismos. Específicamente, los nutrientes y/o aditivos presentes en la materia orgánica, como el estiércol y los aserrines, desempeñan un papel fundamental en la restauración del equilibrio microbiológico del suelo. Este proceso contribuye a mejorar las condiciones físico-químicas del suelo, resultando en una reducción significativa de la contaminación del suelo y promoviendo un aumento en la producción de cultivos, así como en su protección. (Buendía, 2012, p.24).

Adicionalmente, la presencia de estos los nutrientes y/o aditivos favorece la velocidad y el porcentaje de germinación de las semillas. Este efecto beneficioso se atribuye a su influencia hormonal, la cual se asemeja a la del ácido giberélico. En conjunto, la actividad microbiana en el suelo juega un papel crucial en la mejora global de la salud y la productividad del suelo, así como en el respaldo a procesos agrícolas sostenibles. (Buendía, 2012, p.24).

Conforme a Buendía (2012), las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas spp* se caracterizan por ser microorganismos autónomos e independientes (p.24).

Según lo mencionado por Buendía (2012), las *Pseudomonas spp.* son microorganismos beneficiosos de origen natural. Estas bacterias tienen la capacidad de producir sustancias beneficiosas a partir de las secreciones radiculares, materia orgánica y gases perjudiciales, como el sulfuro de hidrógeno, utilizando la luz solar y el calor del suelo como fuentes de energía (p.24).

En breve, se muestran varios de los microorganismos involucrados en la desintegración, según la Tabla 7:

Tabla 7

Organismos involucrados durante el procedimiento de desintegración

Organismos	Componente desintegrador
<i>Pseudomonoma púdica</i>	n-C6 n-C10
<i>Pseudomonoma aeruginosa</i>	n-C6 n-C17
<i>Acinetobacter sp</i>	C10 -C20
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	C14
<i>Pseudomona sol 20</i>	nC2-C12
<i>Sacharomyces cerevisiae SAT</i>	n-C1-C22 Trimethylmethan 2-2 Dhymetilpropan 2-Methybutan 2-3 Methybutan
<i>Pseudomona sp/52</i>	Naphtalin
<i>Escherichia coli</i>	Ben(a) pyrene
<i>Mycobacterium sp</i>	Piren
<i>Pseudomona butanovora</i>	n-butan
<i>Morasella species</i>	Benzol
<i>Pseudomona especies</i>	Benzol
<i>Pseudomona paucimobilis</i>	Phenantheren
<i>Pseudomona vesicularis</i>	Fluoren
<i>Pseudomona putida</i>	Benzol
<i>Pseudomona putida</i>	Toluol

Nota. nC6 = cadenas de 6 carbonos y así consecutivamente. Obtenido de Kimura, 2005

Evaluación del impacto del producto 'ENZYMPLUS' (un activador biológico) en el proceso de compostaje utilizando dos tipos de estiércol, bovino y ovino.

2.2.10 Normas legales del Perú

El artículo 2, numeral 22, perteneciente a la Constitución Política del Perú dicta tener un ambiente adecuado para la vida y el desarrollo es un derecho de toda persona. El artículo 3 de la Ley General del Ambiente N° 28611 desarrolla e implementa las normas necesarias para asegurar el efectivo ejercicio de los derechos y el cumplimiento de las obligaciones. El apartado 31.1 del artículo 31 de la Ley que establece que los criterios de calidad ambiental (ACE) son medidas que especifican la dosis o extensión de elementos, sustancias o parámetros físicos, químicos y biológicos en el aire, agua o suelo. Estas medidas están diseñadas de manera que no resulten perjudiciales para la salud humana ni presenten circunstancias en las cuales el medio ambiente represente un riesgo significativo.

El artículo 7 del Decreto Legislativo N° 1013 aprobó la ley de creación, organización y funciones del Ministerio del Medio Ambiente. Aprobado el ECA de Tierras mediante Decreto Supremo N° 002-2013-MINAM de 25 de marzo de 2013, y normas adicionales para su aplicación mediante Decreto Ejecutivo N° 002-2014-MINAM de 24 de marzo de 2014. Mediante Resolución Ministerial N° 085-2014-MINAM se emitieron tres lineamientos técnicos (uno del muestreo de suelos y otro para la creación de planes de descontaminación) que complementan el marco legal.

El Decreto Supremo N° 013-2015-MINAM establece las normas para presentar y evaluar los informes de identificación de áreas contaminadas. La Resolución Ministerial N° 182-2017-MINAM obliga al Ministerio del Ambiente la prepublicación del proyecto de decreto supremo que aprueba las áreas de control de vertidos al suelo. El ECA de suelos fue aprobado mediante Decreto Supremo N° 011-2017-MINAM (Ministerio de Ambiente, 2017) del 2 de diciembre de 2017, el cual es una referencia obligatoria a parámetros relevantes en el diseño e implementación de herramientas de gestión ambiental aplicables a parámetros relevantes de producción, extracción y actividades de servicio.

El Decreto Supremo N° 011-2017-MINAM pronuncia los Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para suelo en relación a hidrocarburos de petróleo Fracción 2 o Fracción media para suelo agrícola, comercial y extractivo es 5000 mgkg^{-1} .

La ECA y sus requisitos consideran tres áreas de uso. En la fase de Definición se realiza la investigación de antecedentes, el análisis técnico del sitio y la definición del modelo. Si se encuentran signos de contaminación, es decir, se confirma que se ha pasado la zona de control de emisiones y la "norma de fondo", la zona se marca en una segunda etapa para conocer el alcance y profundidad de la contaminación. El informe también incluye recomendaciones para acciones

correctivas. En el proceso de fase de actualización, se revisa la muestra de aprobación final. El OEFA monitorea y gestiona el proceso y la DIGESA estará obligada a aprobar la Evaluación de Riesgos Ambientales y Sanitarios (ERSA).

2.3. Marco Conceptual o Glosario

Se pueden encontrar los siguientes conceptos en esta tesis:

- **Biorremediar:** Debido a que utiliza mismos microorganismos en el suelo, es un método muy práctico para limpiar suelos contaminados (Iturbe, 2010).
- **Bioaumentar:** La bioaumentación implica el uso de organismos, ya sean naturales o modificados genéticamente, para eliminar de manera eficiente compuestos no deseados de biorreactores o lugares de desechos peligrosos contaminados (Boon et al, 2000).
- **Contaminante:** Cualquier sustancia química que no se encuentre naturalmente en el suelo o cuya dosis sea superior al nivel base y que tenga el potencial de tener un impacto negativo en la salud humana o ambiental (OEFA, 2015).
- **Estándar de Calidad Ambiental (ECA):** La medida que muestra el nivel de dosis, sustancias o parámetros físicos, químicos y biológicos presentes en el aire, agua o suelo en su condición de cuerpo receptor, que no representa un riesgo grave. para la salud de la población o el medio ambiente. Una dosis o grado se puede expresar como máximo, mínimo o rango dependiendo del parámetro específico al que se refiere (MINAM, 2010).
- **Suelo:** Material no consolidado que se extiende desde la superficie hasta diversas profundidades que están formadas por una mezcla de elementos que incluye partículas inorgánicas, materia orgánica, agua, aire y organismos vivos (MINAM, 2014).
- **Suelo Agrícola:** Tierra utilizada para cultivar cultivos, forrajes y pastos para el ganado. Además, es un suelo propicio para el desarrollo tanto de la agricultura como de la ganadería. Esto incluye tierras calificadas para la agricultura que preservan hábitats para especies residentes y migratorias, así como para fauna local y la flora, como en el caso de las áreas naturales protegidas (MINAM, 2017).
- **Hidrocarburos:** Incluye todos los compuestos orgánicos, ya sean sólidos, líquidos o gaseosos, que están formados principalmente por carbono e hidrógeno (Congreso de la Republica del Perú, 2019).

CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el taller de Conservación de Agricultura Sostenible (CONSAS) de la Facultad de Agronomía (UNALM).

3.1 Tipo, alcance y diseño de la investigación

Tipo: aplicada.

Alcance: explicativo.

Diseño: experimental.

3.2 Muestra

La muestra estuvo constituida por el suelo del taller de Conservación de Agricultura Sostenible (CONSAS) de la Facultad de Agronomía (UNALM), el cual fue contaminado por diésel B5 S-50.

3.3 Materiales

3.3.1 Fase de campo

3.3.1.1 Instrumentos

- Balanza digital

3.3.1.2 Materiales

-Diésel B5 S-50

-Bacniphos (*Pseudomonas putida* cepa AMCB38 y *Pseudomonas fluorescens* cepa AMCB54) distribuidor Novalty

-Melaza

-48 Recipientes de 4 kg y 12 de 1 kg

-2 Palas pequeñas

-Agua de riego

-2 baldes y una botella de 3 L

-Probetas de 5, 25 y 100 ml

-Vaso precipitado de 250 ml

- 122 etiquetas
- Bolsas plásticas de polietileno y bolsas ziplock
- Guantes de látex
- Plumón indeleble delgado y grueso
- Cinta scotch y cinta masking tape
- Tijeras
- Regla de 20 cm
- Lapiceros y lápices
- Cuaderno de campo

3.3.2 Fase de laboratorio

3.3.2.1 Reactivos

- NaOH 1N, Marca Merck
- BaCl₂ dihidratado 1N, Marca CDH
- HCl 0.5N, Marca J.T.Baker
- Fenolftaleína

3.3.2.2 Equipos

- Campana de extracción

3.3.2.3 Instrumentos

- Matraces
- Bureta
- Pipetas
- Beakers
- Bombillas de bola de succión

3.3.2.4 Materiales

- 62 recipientes de plástico con tapa
- 62 palos bajalenguas

-62 esponjas de 2 cm de grosor aproximadamente

-2 fiolas

-Bandeja de plástico

-Guantes de nitrilo

-62 etiquetas

3.4 Ámbito espacial y temporal

El ámbito espacial de la investigación fueron los suelos del distrito La Molina en la UNALM.

3.5 Identificación de variables.

3.5.1 Variables independientes

-Dosis de cepas de las bacterias *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens* (UFC/ml)

-Dosis de diésel B5 S-50 en suelo (g kg^{-1})

3.5.2 Variable dependiente

-Capacidad de biorremediación (% Remoción TPH (mg kg^{-1})) y Respiración Basal ($\text{mgCO}_2 \text{ kg suelo}^{-1} \text{ día}^{-1}$)

3.5.3 Parámetros

-Tipo de bacteria: *Pseudomonas putida* cepa AMCB38 y *Pseudomonas fluorescens* cepa AMCB54.

-Dosis de suelo: 2 kg y 1 kg.

-Hidrocarburo: Diésel B5 S-50

-Tiempo: 10 semanas y 3 días.

-Temperatura: ambiente.

-pH: 5-7

3.6. Operacionalización de variables

En la Tabla 8 se muestra la operacionalización de variables de la investigación.

Tabla 8*Operacionalización de variables*

Variables	Definición Conceptual	Definición Operacional	Dimensiones	Indicadores	Unidades
Variable independiente: 1.Dosis de bacterias <i>Pseudomonas putida</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i> .	<p><i>Pseudomonas putida</i>.</p> <p>Pertenece al reino de las bacterias, filo proteobacteria, clase gammaproteobacteria, orden pseudomonadales, familia pseudomonadaceae, género pseudomonas y especie <i>Pseudomonas putida</i>.(Volke et al, 2020)</p> <p><i>Pseudomonas putida</i> se encuentra en suelos que contienen componentes que descomponen los hidrocarburos, lo que convierte a esta bacteria en una candidata para aplicaciones biotecnológicas como biorremediación, biocontrol, agricultura y biocatálisis. Bacilos aerobios Gram negativos, incapaces de formar esporas, de 1,5 a 5 µm de largo y de 0,5 a 1,0 µm de diámetro. La temperatura óptima de crecimiento es de 30 a 35°C y el rango de pH es de 6 a 8 unidades. <i>Pseudomonas putida</i> puede degradar los hidrocarburos totales (Bastidas y Cedeño, 2016)</p>	<p>Cantidad de bacterias <i>Pseudomonas putida</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i> que se añadió al suelo contaminado con diésel.</p>	-	Cantidad de bacterias	UFC/kg

Pseudomonas fluorescens.

Pertenece al reino de las bacterias, filo proteobacteria, clase gammaproteobacteria, orden pseudomonadales, familia pseudomonadaceae, género pseudomonas y especie *Pseudomonas fluorescens*. (Peñalver et al, 1994)

Bacterias baciliformes, gramnegativas, móviles y con flagelos polares. Sin esporas, estrictamente aeróbico y quimioorganoheterotrófico. Los pigmentos fluorescentes se producen en medios apropiados y pectinasa. Pertenece al Grupo V LOPAT. Se han descrito cinco variantes biológicas de esta especie. (Peñalver et al, 1994)

Variable independiente:	Diésel	Cantidad de diésel que se añadió a una parcela de la Facultad de Agronomía de la UNALM.	Cantidad de mg diésel
2.Dosis de diésel	El Diésel, Gasoil o Gasóleo es un hidrocarburo obtenido a temperatura de ebullición de 175 a 400 °C y conformado por cadenas de quince a dieciocho carbonos.	1.1%Remoción TPH	1.1Cantidad de hidrocarburos totales de
Variable dependiente:	Biorremediación	Capacidad de remoción de diésel por	1.1mg kg ⁻¹

1.Capacidad de biorremediación	Berkeley (2011), indica que emplear todos los seres vivos para la restauración de ambientes de polución. biorremediación es para la restauración de	tratamiento mediante las bacterias	petróleo eliminados.
		<i>Pseudomonas putida</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i> .	1.2Cantidad de CO ₂ capturado del suelo 1.2 mg CO ₂ kg suelo ⁻¹ día ⁻¹

3.7 Métodos

3.7.1 Fase de campo

3.7.1.1 Recolección de la muestra

En el taller de Conservación de Agricultura Sostenible CONSAS de la Facultad de Agronomía (UNALM), se tomaron muestras aleatorias con un total de 108 kg de suelo utilizando una pala plana en dos sacos mediante la técnica de muestreo para muestras superficiales (MINAM, 2014). Luego, el suelo se extendió sobre un plástico para su secado durante un día para un adecuado procedimiento (Figura 8).

Figura 8

Secado de suelo al aire libre en el CONSAS



Nota. a. Suelo recolectado del CONSAS y dejado a secar al aire libre b. Instalaciones del taller de Conservación de Agricultura Sostenible (CONSAS) de la Facultad de Agronomía (UNALM).

3.7.1.2 Caracterización fisicoquímica del suelo y agua de riego

Estos análisis facilitaron la optimización de las condiciones para el tratamiento, lo que a su vez ayudó a prevenir complicaciones que podrían hacer que la tesis sea más costosa y prolongada.

-Caracterización fisicoquímica del suelo

La caracterización fisicoquímica del suelo se realizó de la siguiente manera:

La caracterización de la muestra consistió en las determinaciones que se indican en la Tabla 9. Los métodos utilizados en el Laboratorio de Suelos, Aguas, Plantas y Fertilizantes (LASPAF) de la Facultad de Agronomía de la UNALM se muestran en la Tabla 9.

Dependiendo de su textura y materia orgánica, el suelo tiene una capacidad de retención de agua diferente. Además, la textura es importante para la aireación y permeabilidad. Razón por la

cual, es recomendable realizar análisis de suelo previo al tratamiento de biorremediación. (León & Velásquez, 2022)

La porosidad es un indicador fundamental en la calidad del suelo porque tiene la capacidad para almacenar el agua y permite el intercambio biológico y fisicoquímico en el suelo (González et al., 2011). Asimismo, la porosidad total representa el porcentaje de volumen del suelo que no posee sólidos y que está compuesto del 50 % de materiales sólidos y 50 % de espacios porosos; donde circulan los nutrientes, agua, aire y gases (Martinez Reina et al., 2018)

Tabla 9

Indicadores y metodología empleada en la caracterización fisicoquímica del suelo

Indicadores	Método empleado agregar normativa
Textura	Método del hidrómetro
Salinidad	Medida de la CE en un extracto acuoso de relación suelo: agua 1:1 en volumen
Ph	Medida potenciométrica en la suspensión suelo: agua de relación 1:1 en volumen
Calcáreo total (CaCO ₃)	Método gaso – volumétrico utilizando un calcímetro
Materia orgánica	Método de Walkley y Black. Oxidación del carbono orgánico con dicromato de potasio en medio sulfúrico y determinación del dicromato residual por titulación con sulfato ferroso.
Fosforo disponible	Método de Olsen modificado. Extracción con NaHCO ₃ 0.5M pH 8.5 y determinación del P en el extracto por colorimetría.
Potasio disponible	Extracción con acetato de amonio 1N pH 7 y determinación de K en el extracto por espectrometría de emisión atómica en llama.
Capacidad de intercambio catiónico (CIC)	Saturación con acetato de amonio 1N pH 7 y determinación del amonio adsorbido por desplazamiento con KCl, reacción con formaldehído y titulación ácido-base.
K ⁺ y Na ⁺ cambiables	Extracción con acetato de amonio 1N pH 7 y cuantificación por espectrometría de emisión atómica en llama.
Ca ²⁺ y Mg ²⁺ cambiables	Extracción con acetato de amonio 1N pH 7 y cuantificación por espectrometría de absorción atómica en llama.
Acidez Cambiable	Extracción con KCl 1N y cuantificación por titulación ácido-base.

Nota. CE: Conductividad eléctrica. pH: Medida del grado de acidez o alcalinidad de una solución. NaHCO_3 : Bicarbonato de Sodio. P: Fosforo. K: Potasio Na: Sodio KCl: Cloruro de potasio. N: Normalidad. M: Molaridad. (Apéndice 4)

La caracterización fisicoquímica del suelo se mandó a realizar en el Laboratorio de Suelos, Aguas, Plantas y Fertilizantes (LASPAF) de la Facultad de Agronomía de la UNALM.

-Caracterización fisicoquímica del agua de riego

En la Tabla 10 se tiene las características físicas y químicas que se analizó. De igual manera, las metodologías utilizadas corresponden a las del Laboratorio de Suelos, Aguas, Plantas y Fertilizantes (LASPAF) Facultad de Agronomía de la UNALM. La caracterización fisicoquímica del suelo se mandó a realizar en el Laboratorio de Suelos, Aguas, Plantas y Fertilizantes (LASPAF) de la Facultad de Agronomía de la UNALM.

El presente análisis de agua de riego ayudó a saber la composición química del agua de riego para identificar sales, minerales o contaminantes presentes que puedan afectar la biodegradación. Por otra parte, conocer la disponibilidad de oxígeno en el agua es fundamental al tratarse de un proceso aeróbico, para así saber la cantidad de oxígeno disuelto.

Según Andriulo y Irizar (2017, p. 45), La humedad se refiere a la cantidad de agua que el suelo puede retener, lo que se mide como la masa de agua en comparación con la masa de tierra seca. La humedad es crucial para facilitar el intercambio de gases entre las muestras de suelo y las bacterias que se están evaluando.

Tabla 10

Caracterización fisicoquímica del agua de riego

Características	Unidades
pH	
CE	dS m^{-1}
Calcio	mEq l^{-1}
Magnesio	mEq l^{-1}
Potasio	mEq l^{-1}
Sodio	mEq l^{-1}
Suma de cationes	mEq l^{-1}
Nitratos	mEq l^{-1}
Carbonatos	mEq l^{-1}

El análisis preliminar del suelo y el agua de riego proporciona la información necesaria para adaptar el enfoque de biorremediación y maximizar la eficiencia del tratamiento mientras se minimizan los riesgos ambientales y los costos operativos.

3.7.1.3 Preparación de suelo

Una vez que el suelo secó al aire, éste se tamizó con un tamiz de 2 mm. El proceso es exhaustivo pero necesario, así se obtuvo las partículas menores o iguales a 2 mm que componen el suelo (Figura 9).

Se procedió a distribuir los 108 kg de suelo tamizado en tratamientos de macetas de 2 kg y 1 kg mediante una balanza digital. Esta distribución constó de 48 macetas con contenido de 2 kg y 12 macetas con contenido de 1 kg porque fueron 20 pruebas experimentales con 3 repeticiones respectivas. Siendo 60 pruebas experimentales en total.

Figura 9

Proceso de preparación de suelo



Nota. a. Proceso de tamizado b. Tamiz de 2 mm c. Vista microscópica del tamiz d. Suelo recolectado para tamizar y suelo ya tamizado.

3.7.1.4 Acondicionamiento de diésel

El suelo ya distribuido en pesos de 2 kg y 1 kg, se acondicionó con el diésel B5 S-50. Se realizó el proceso usando guantes de látex y teniendo mucho cuidado con el manejo de diésel sobre todo para evitar derrames innecesarios. Se compró galón y medio de diésel B5 S-50, y se hizo uso de una probeta de 100 ml para verter 21.25 g kg⁻¹, 42.5 g kg⁻¹ y 85 g kg⁻¹ de diésel para las pruebas

experimentales del 5 al 16 y sus 3 repeticiones por tratamiento. Todo este procedimiento se continuó en el taller de Conservación de Agricultura Sostenible (CONSAS) (Tabla 13).

Se instalaron 48 recipientes de 4 kg (con contenido de 2kg) y 12 macetas de 1 kg en 3 mesa. Se traspasaron los suelos pesados a cada maceta puesta al aire libre. Además, el etiquetado se acondicionó en cada tratamiento como muestra la Figura 10

Figura 10

Acondicionamiento de diésel



Nota. a. Acondicionamiento de diésel por bloques b. Puesto de las macetas en las mesas correspondientes por repeticiones c. Traspaso de los suelos contaminados a macetas, listos para inoculación.

En la Tabla 11 se muestran las diferentes equivalencias de la dosis de diésel para un mejor entendimiento de la cantidad en muestra.

Tabla 11

Dosis de diésel en distintas unidades

Dosis de diésel				Dosis de diésel por macetas con 2 kg de suelo	
% (v/v)	g kg ⁻¹	g kg ⁻¹ *	% (p p ⁻¹)	g maceta ⁻¹	g maceta ⁻¹
0	0	0	0	0	0
2.5	25	21.25	2.125	50	42.5
5	50	42.5	4.25	100	85
10	100	85	8.5	200	170

Nota: * densidad del diésel = 0.85 g cm⁻³

3.7.1.5 Caracterización de TPH inicial del suelo contaminado

El contenido de TPH inicial del suelo se realizó mediante cromatografía de gases, con el fin de verificar las dosis de diésel B5 S-50.

Al momento de acondicionar el suelo con diésel, se recolectó 200 g en bolsa ziplock de una muestra con 21.25 g kg⁻¹ de diésel, 200 g en bolsa ziplock de una muestra con 42.5 g kg⁻¹ de diésel y otra muestra de 200 g en bolsa ziplock de una muestra con 85 g kg⁻¹ de diésel. Se analizó el TPH inicial de las tres muestras mencionadas en el laboratorio Slab Perú.

En la Tabla 12 se tiene los métodos utilizados en el análisis de TPH Fracción 2 (>C10-C28).

Tabla 12

Método utilizado en el análisis de TPH inicial

Ensayo	Método
Hidrocarburo Totales de Petróleo (TPH) Fracción 2 (>C10-C28)	EPA METHOD 8015C Rev. 03 2007 Nonhalogenated Organics by Gas Chromatography (Anexo 4)

Nota. Slab Laboratorio de Ensayo e Investigación.

En la Figura 11 se observan las dos muestras llevadas a análisis de TPH inicial.

Figura 11

Muestra 1 y 2 iniciales para llevar a laboratorio



Nota. a. Foto de la muestra en el laboratorio. b. Foto de la muestra 2 llevada a laboratorio.

3.7.1.6 Preparación del suelo para la inoculación de las bacterias *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida*.

Para propiciar el crecimiento de las bacterias y dar inicio a la biorremediación, se acondicionó el suelo con agua azucarada. Esta agua azucarada es una mezcla de agua de riego con la melaza. Se mezcló 2 baldes de 15 L de agua con 75 g de melaza para macetas de 2 kg. También, se mezcló 3 L de agua con 15 g de melaza para macetas de 1 kg. (Figura 12)

La solución de bacteria es de 100g para macetas de 2 kg y 50 g para macetas de 1 kg, donde el agua azucarada varía de 60 a 100g (los tratamientos son especificados en la Tabla 16).

De igual manera, para macetas de 1kg son 50 g de solución de bacteria, donde el agua azucarada se encuentra desde 30g hasta 50g (los tratamientos son especificados en la Tabla 16).

Figura 12

*Preparación del suelo para la inoculación de las bacterias *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida**



Nota. a. Se pesó 75 g de melaza que se puso al balde de 15 L de agua de riego. b. Se pesó 15 g de melaza que se puso a la botella de 3 L de agua de riego. c. Balde de 15 L de agua de riego junto a la melaza de 75 g. d. Todas las macetas con las bolsas abiertas, listas para la puesta de agua

azucarada (agua de riego + melaza) e. Iniciando a verter agua azucarada. f. Terminado a verter la solución de agua azucarada (agua de riego + melaza) de forma circular acaparando todo el suelo contaminado.

3.7.1.7 Inoculación con las bacterias *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida*

Se muestra a continuación en la Tabla 13, las 20 pruebas experimentales y los 100 g de solución de bacteria. La solución bacteriana se formó de Bacniphos y agua azucarada.

Tabla 13

Distribución de la solución bacteriana (Bacniphos + solución de agua azucarada) por tratamiento

N° Tratamiento	Solución		
	Bacteriana total ¹ (ml)	Bacniphos ² (ml)	Solución agua con melaza ³ (ml)
T1	100	0	100
T2	100	10	90
T3	100	20	80
T4	100	40	60
T5	100	0	100
T6	100	10	90
T7	100	20	80
T8	100	40	60
T9	100	0	100
T10	100	10	90
T11	100	20	80
T12	100	40	60
T13	100	0	100
T14	100	10	90
T15	100	20	80
T16	100	40	60
T17	50	0	50
T18	50	5	45
T19	50	10	40
T20	50	20	30

Nota: ¹Solución bacteriana total (g) = 2 + 3. Densidad de Bacniphos= 1g/ml

Tabla 14*Equivalencias de concentración de bacteria*

Equivalencias de concentración de bacteria para cantidades de 2kg				
Concentración de bacteria (g kg ⁻¹)	0 g kg ⁻¹	5 g kg ⁻¹	10 g kg ⁻¹	20 g kg ⁻¹
En ese sentido, cuando trabajamos con contenido de suelo igual a 2kg, la concentración de bacteria es:	0 g 2 kg ⁻¹	10 g 2 kg ⁻¹	20g 2 kg ⁻¹	40 g 2 kg ⁻¹
Concentración de bacteria (ml kg ⁻¹)	0 ml 2 kg ⁻¹	10ml 2 kg ⁻¹	20ml 2 kg ⁻¹	40ml 2 kg ⁻¹
Solución bacteriana correspondiente a cada concentración de bacteria (Tabla 13)	100ml	100ml	100ml	100ml
Proporción entre la dosis de bacteria y la solución bacteriana	0ml/100ml=0	10ml/100ml=0.1	20ml/100ml=0.2	40ml/100ml=0.4
De acuerdo a la ficha técnica de la bacteria:	1 ml de bacteria = 10 ⁸ UFC	1ml de bacteria = 10 ⁸ UFC	1ml de bacteria = 10 ⁸ UFC	1ml de bacteria = 10 ⁸ UFC
Suelo	2 kg	2 kg	2 kg	2 kg
Concentración de bacteria*	0*10 ⁸ UFC/ 2kg	0.1*10 ⁸ UFC/ 2kg	0.2*10 ⁸ UFC/ 2kg	0.4*10 ⁸ UFC/ 2kg
Concentración de bacteria final*	0*10 ⁸ UFC/ kg	0.05*10 ⁸ UFC/ kg	0.1*10 ⁸ UFC/ kg	0.2*10 ⁸ UFC/ kg

Nota. *En 1ml de Bacniphos existe 10⁸ UFC de *Pseudomonas fluorescens* y 10⁸ UFC de *Pseudomonas putida* (Anexo 1). Para tratamientos (T17, T18, T19 y T20) con dosis de UFC/kg son las bacterias 0, 5, 10 y 20 ml y solución bacteriana 50 ml, las concentraciones de bacteria en mismas, ya que la proporción de dosis de bacteria/ solución bacteriana es la misma. (Tabla 13)

Para añadir la solución bacteriana total, se necesitó humedecer previamente el suelo con la solución azucarada hasta que el suelo estuviera cerca de su capacidad de campo (contenido de humedad óptimo del suelo para la actividad biológica). Aproximadamente, la solución

bacteriana total se aplicó 3 h después de haber regado el suelo. Se recomienda no cerrar al 100% las bolsas.

Después, se acondicionó el suelo con las bacterias *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida*. El producto se llama Bacniphos (Anexo 1 y Anexo 2), es un biofertilizante en consorcio microbiano para coadyuvar los programas de fertilización y nutrición radicular. Los implementos fueron probetas de 5, 25 y 100 ml y un vaso precipitado de 250 ml. Para nuestra protección usamos de igual manera guantes de látex. Se recomienda lavado de manos antes y después de la actividad. El producto es poco tóxico. Su presentación es de 1kg y se necesitó 945 ml en total. Las dosis para las pruebas experimentales fueron $0 \cdot 10^8$, $0.05 \cdot 10^8$, $0.1 \cdot 10^8$ y $0.2 \cdot 10^8$ UFC/kg.

En la Tabla 15 se señalan las pruebas experimentales y su composición.

Tabla 15

Lista de las pruebas experimentales (contenido de 2kg)

N° pruebas experimentales	Suelo	Dosis de diésel	Dosis de bacteria
1	2kg	0	$0 \cdot 10^8$ UFC/kg
2	2kg	0	$0.05 \cdot 10^8$ UFC/kg
3	2kg	0	$0.1 \cdot 10^8$ UFC/kg
4	2kg	0	$0.2 \cdot 10^8$ UFC/kg
5	2kg	21.25 g kg ⁻¹	$0 \cdot 10^8$ UFC/kg
6	2kg	21.25 g kg ⁻¹	$0.05 \cdot 10^8$ UFC/kg
7	2kg	21.25 g kg ⁻¹	$0.1 \cdot 10^8$ UFC/kg
8	2kg	21.25 g kg ⁻¹	$0.2 \cdot 10^8$ UFC/kg
9	2kg	42.5 g kg ⁻¹	$0 \cdot 10^8$ UFC/kg
10	2kg	42.5 g kg ⁻¹	$0.05 \cdot 10^8$ UFC/kg
11	2kg	42.5 g kg ⁻¹	$0.1 \cdot 10^8$ UFC/kg
12	2kg	42.5 g kg ⁻¹	$0.2 \cdot 10^8$ UFC/kg
13	2kg	85 g kg ⁻¹	$0 \cdot 10^8$ UFC/kg
14	2kg	85 g kg ⁻¹	$0.05 \cdot 10^8$ UFC/kg
15	2kg	85 g kg ⁻¹	$0.1 \cdot 10^8$ UFC/kg
16	2kg	85 g kg ⁻¹	$0.2 \cdot 10^8$ UFC/kg

Se tomó la cantidad de 2kg de suelo ya que es una cantidad manejable y por bibliografía es recomendada. Más cantidad de suelo, se necesitaría más sustrato y no sería conveniente por temas económicos. Menos cantidad de suelo, no se podría percibir el proceso de biorremediación del suelo con diésel.

En la Tabla 16, se detalla las pruebas experimentales con contenido de 1kg.

Tabla 16*Lista de las pruebas experimentales (contenido de 1kg)*

N° pruebas experimentales	Suelo	Dosis de diésel	Dosis de bacteria
1	1kg	0	0*10 ⁸ UFC/kg
2	1kg	0	0.05*10 ⁸ UFC/kg
3	1kg	0	0.1*10 ⁸ UFC/kg
4	1kg	0	0.2*10 ⁸ UFC/kg

En la Tabla 17 se indica las variables y niveles del diseño experimental usado.

Tabla 17*Variables y niveles del diseño experimental 3²*

Variables	Niveles			Niveles		
D	+	0	-	21.25 g kg ⁻¹	42.5 g kg ⁻¹	85 g kg ⁻¹
B	+	0	-	0*10 ⁸ UFC/kg	0.1*10 ⁸ UFC/kg	0.2*10 ⁸ UFC/kg

Nota. D= dosis de diésel B= dosis de bacteria

Se muestra a continuación el diseño experimental utilizado en la Tabla 18.

Tabla 18*Diseño experimental 3²*

Tratamientos	D	B	D	B
1	-1	-1	21.25 g kg ⁻¹	0*10 ⁸ UFC/kg
2	-1	0	21.25 g kg ⁻¹	0.1*10 ⁸ UFC/kg
3	-1	1	21.25 g kg ⁻¹	0.2*10 ⁸ UFC/kg
4	0	-1	42.5 g kg ⁻¹	0*10 ⁸ UFC/kg
5	0	0	42.5 g kg ⁻¹	0.1*10 ⁸ UFC/kg
6	0	1	42.5 g kg ⁻¹	0.2*10 ⁸ UFC/kg
7	1	-1	85 g kg ⁻¹	0*10 ⁸ UFC/kg
8	1	0	85 g kg ⁻¹	0.1*10 ⁸ UFC/kg
9	1	1	85 g kg ⁻¹	0.2*10 ⁸ UFC/kg

La Figura 13 muestra las fotos tomadas durante el proceso de la inoculación de las bacterias *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida*.

Figura 13

Inoculación con las bacterias Pseudomonas fluorescens y Pseudomonas putida



Nota. a. Las macetas listas y abiertas para recibieren la inoculación de la bacteria b. Bacniphos (producto comercial compuesto por *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida*) c. Inoculación del producto haciendo uso de una probeta d. Término de la inoculación y se procede al cierre parcial de las bolsas.

3.7.1.8 Capacidad de retención del agua (CRA)

Se hizo uso de la ecuación para hallar el CRA (Bhadha et al, 2017) para determinar la capacidad de retención de agua del sustrato.

Por tanto, en el suelo se determinó la capacidad de retención de agua del sustrato utilizado y el riego se mantuvo al 80% de la capacidad.

3.7.1.9 Biorremediación del suelo

El proceso de biorremediación consistió en tratar 2 kg y 1 kg de suelo contaminado con 21.25 g kg⁻¹, 42.5 g kg⁻¹ y 85 g kg⁻¹ de diésel B5 S-50 al cual se le adicionó 0*10⁸ UFC/kg, 0.05*10⁸ UFC/kg, 0.1*10⁸ UFC/kg y 0.2*10⁸ UFC/kg de Bacniphos. El proceso tuvo una duración de 10 semanas y 3 días (desde el 7 de mayo hasta el 19 de julio del 2024).

Se inició añadiendo 200 g de agua de riego a las macetas de 2 kg y 100 g a las macetas de 1 kg.

Se continuó con un monitoreo continuo de la humedad de las macetas. Cada dos días, se revisó, pesó, removió y se regó las macetas con agua en el caso tuviera menos de su peso base. Siendo este peso base 2563 g en las macetas de 2 kg y 1231 g en las macetas de 1 kg.

En la Tabla 19, se observa el plan experimental.

Tabla 19

Plan experimental

Tratamiento	Suelo (g)	Diésel (g kg⁻¹)	Bacterias (UFC/kg)	TPH inicial	TPH final
1	2000	21.25 g kg ⁻¹	0*10 ⁸ UFC/kg	-	-
2	2000	21.25 g kg ⁻¹	0.1*10 ⁸ UFC/kg		
3	2000	21.25 g kg ⁻¹	0.2*10 ⁸ UFC/kg		
4	2000	42.5 g kg ⁻¹	0*10 ⁸ UFC/kg		
5	2000	42.5 g kg ⁻¹	0.1*10 ⁸ UFC/kg		
6	2000	42.5 g kg ⁻¹	0.2*10 ⁸ UFC/kg		
7	2000	85 g kg ⁻¹	0*10 ⁸ UFC/kg		
8	2000	85 g kg ⁻¹	0.1*10 ⁸ UFC/kg		
9	2000	85 g kg ⁻¹	0.2*10 ⁸ UFC/kg		

3.7.1.10 Caracterización de TPH final del suelo contaminado

Para el análisis del TPH final de suelo contaminado, se tomó 9 muestras representativas y se enviaron al laboratorio Slab Perú (Tabla 20).

Se tomaron las 9 muestras indicadas específicamente, ya que ellas mostraron óptimos resultados en la respiración basal.

Tabla 20*Resultados finales TPH*

Código de laboratorio	Descripción de muestras	Unidad	TPH final
M1: T5R2	2 kg de suelo + 21.25 g kg ⁻¹ diésel	mg kg ⁻¹	-
M2: T3R1	2 kg de suelo + 21.25 g kg ⁻¹ diésel + 0.1*10 ⁸ UFC/kg bacteria	mg kg ⁻¹	-
M3: T8R2	2 kg de suelo + 21.25 g kg ⁻¹ diésel + 0.2*10 ⁸ UFC/kg bacteria	mg kg ⁻¹	-
M4: T9R1	2 kg de suelo + 42.5 g kg ⁻¹ diésel	mg kg ⁻¹	-
M5: T11R1	2 kg de suelo + 42.5 g kg ⁻¹ diésel + 0.1*10 ⁸ UFC/kg bacteria	mg kg ⁻¹	-
M6: T12R2	2 kg de suelo + 42.5 g kg ⁻¹ diésel + 0.2*10 ⁸ UFC/kg bacteria	mg kg ⁻¹	-
M7: T13R2	2 kg de suelo + 85 g kg ⁻¹ diésel	mg kg ⁻¹	-
M8: T15R3	2 kg de suelo + 85 g kg ⁻¹ diésel + 0.1*10 ⁸ UFC/kg bacteria	mg kg ⁻¹	-
M9: T16R2	2 kg de suelo + 85 g kg ⁻¹ diésel + 0.2*10 ⁸ UFC/kg bacteria	mg kg ⁻¹	-

Nota. Slab Laboratorio de Ensayo e Investigación.

El cálculo de % de TPHe se realizará con la ecuación:

$$\text{TPHe} = \frac{(\text{TPH inicial} - \text{TPH final}) \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) \times 100\%}{\text{TPH inicial}}$$

Se analizaron los diferentes datos recolectados de los experimentos, asimismo se determinó el efecto de las variables independientes sobre la variable dependiente y mediante el Análisis de Varianza (ANOVA) se determinó la significancia de las variables. Se utilizó el software Statgraphics 18 con licencia trial para el desarrollo del análisis estadístico.

3.7.2 Fase de laboratorio

Para determinar la respiración basal de los suelos tratados se usó el método de Anderson y Domsch desarrollado en 1978 (Höper, 2006) adaptado Sady et al. (2019).

3.7.2.1 Preparación de incubación.

-Preparación de hidróxido de sodio (NaOH) 1N.

1. Se usó una balanza digital. Se colocó el beaker de 200 g y se taró.
2. Se pesó 80 g de NaOH (sosa cáustica en perlas) en el beaker.
3. En un beaker de 1000 g se echó los 80 g de NaOH, enjuagando el beaker de 200 g con agua desionizada. Se adicionó más agua desionizada al beaker para su disolución, un aproximado de la mitad de la capacidad del beaker.
4. Se usó un agitador magnético (Stirrer) a 250 rpm para disolver el NaOH con agua desionizada. Se esperó hasta que la mezcla tornó a transparente.
5. Se pasó la solución a la fiola de 2 L, completando con agua desionizada hasta el ras.

En la Figura 14 se observan las fotos del proceso de la preparación de hidróxido de sodio (NaOH) 1N.

Figura 14

Preparación de hidróxido de sodio (NaOH) 1N



Nota. a. El reactivo NaOH b. Se pesó 80 g de NaOH c. Disolución de NaOH en agua desionizada en el agitador magnético. d. Fiola de 2 L usada para poner la solución de NaOH.

e. Todos los instrumentos de laboratorio y reactivos utilizados (fiola, beaker, agitador magnético, balanza digital, NaOH y agua desionizada).

-Preparación de implementos de la incubación.

1. Se alistó 62 esponjas de 2 cm aproximadamente y 62 envases de plástico. Estos últimos debidamente etiquetados. Cabe resaltar que, fueron 60 pruebas experimentales y 2 blancos (macetas sin suelo).

2. Se puso una esponja en cada envase de plástico.

3. Se echó 30 g de NaOH a cada envase de plástico y se procedió a tapan el envase.

En la Figura 15 se observa las esponjas que se usaron en la incubación y el NaOH antes de echar a los envases de plástico.

Figura 15

Preparación de implementos de la incubación



Nota. a. Las 62 esponjas listas para poner a los envases de plásticos. b. NaOH a verter en cada envase de plástico.

3.7.2.2 Incubación.

1. Se llevó los 62 envases a campo.

2. En campo, se extendieron las bolsas de cada maceta y se formó la silueta de un globo aerostático.

3. Antes de cerrar la bolsa, se introdujo los envases con NaOH 1N abiertos en cada bolsa. Después, se cerró las bolsas con un nudo y alambres plastificados.

4. Se tomó hora de cierre de cada maceta para contar las 24 h exactas para el inicio de la lectura de respiración basal.

5. También se realizó 2 pruebas en blanco, es decir, macetas sin suelo contaminado con un envase abierto con 30 g de NaOH 1N.

En la Figura 16 se aprecia las fotos del proceso de incubación de la respiración basal.

Figura 16

Incubación de la respiración basal



Nota. a. Cada envase de plástico ya en su respectiva maceta con su misma etiqueta b. Las bolsas ya cerradas en forma de globo aerostático.

-Preparación de cloruro de bario 1N.

1. Se usó una balanza digital. Se colocó el beaker de 200 g y se taró.

2. Se pesó 244.28 g de cloruro de bario dihidratado en el beaker.

3. En un beaker de 1000 g se echó los 244.28 g de cloruro de bario, enjuagando el beaker de 200 g con agua desionizada. Se adicionó más agua desionizada al beaker para su disolución, un aproximado de la mitad de la capacidad del beaker. Esto último no necesita tener una exactitud, solo ser menos de la cantidad que entrará en la fiola de 2 L.

4. Se usó un agitador magnético (Stirrer) a 250 rpm para disolver el cloruro de bario con agua desionizada. Se esperó hasta que la mezcla tornó a transparente sin ningún polvillo aparente.

5. Se pasó la solución a la fiola de 2 L, completando con agua desionizada hasta el ras. Se procedió a tapar y agitar.

En la Figura 17 se observan las fotos del proceso de preparación de cloruro de bario 1N.

Figura 17

Preparación de cloruro de bario 1N



Nota. a. Cloruro de Bario dihidratado b. 244.28 g de BaCl_2 c. Disolución de BaCl_2 d. Fiola de 2 L con la solución de BaCl_2 e. Envase de vidrio para el traslado del BaCl_2 f. Vertiendo agua desionizada a la fiola.

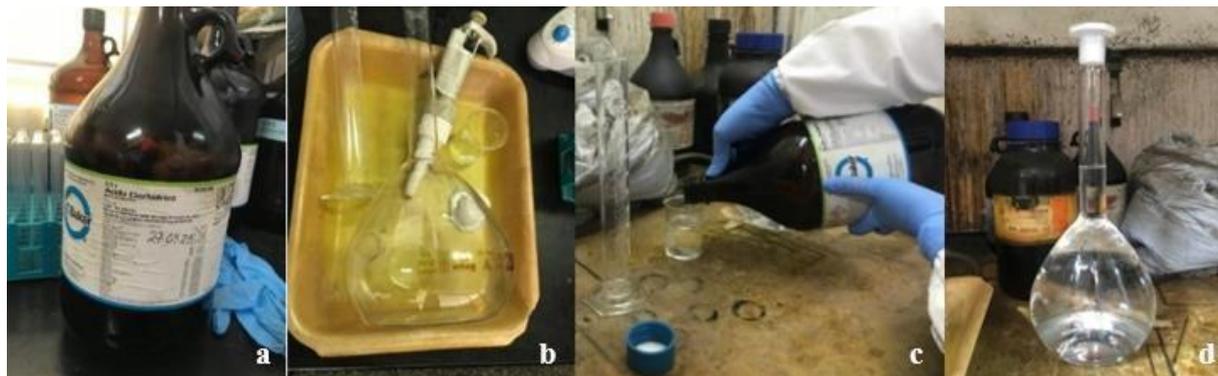
-Preparación de ácido clorhídrico (HCl) 0.5N.

1. Se echó agua desionizada indistintamente a la fiola de 2 L.
2. Se fue a la campana de extracción de gases para retirar HCl. Se usó una micropipeta para echar 82.12 g de HCl a un beaker de 100 g.
3. Se echó el HCl a la fiola.
4. Se echó agua desionizada a la fiola hasta el ras.

En la Figura 18 se muestran las fotos de la preparación de ácido clorhídrico (HCl) 0.5N.

Figura 18

Preparación de ácido clorhídrico (HCl) 0.5N



Nota. a. Envase de HCl b. Todos los instrumentos de laboratorio usados en la preparación de HCl (micropipeta, fiola, probeta, beaker, agua desionizada y HCl) c. Se vertió HCl al beaker. d. La solución de HCl y agua desionizada lista para usar.

-Preparación para la lectura de respiración basal (titulación)

1. Se acondicionó una bureta con la solución de HCl 0.5N.
2. Se lavó pipetas, matraces con agua desionizada para su uso.
3. Una vez pasadas las 24 h de incubación, se colocó a la mano los envases de plástico con un contenido de 40g.
4. Se tuvo a la mano un cuaderno de apuntes para anotar las lecturas tomadas y/o observaciones.

3.7.2.4 Lectura de respiración basal (titulación)

1. Se sacó una alícuota de 10 g de NaOH mediante la pipeta. Esta alícuota se colocó en un matraz.
2. Se precipitó con 10 g de BaCl₂ tornándose a blanco lechoso.
3. Se agregó 2 a 3 gotas de Fenolftaleína tornándose rosella.

4. Se tituló con HCl hasta que tornó blanco lechoso nuevamente.
5. Se anotó la lectura de la titulación en el cuaderno de apuntes.
6. Así, se realizaron 60 titulaciones, además de 2 blancos.

-Recomendaciones para buenas prácticas de laboratorio (BPL).

-Siempre enjuagar los instrumentos de laboratorio antes y después de su uso.

-Ante todo, priorizar la seguridad.

-Hacer uso de guantes y guardapolvo en todo momento, sobre todo en la manipulación de reactivos.

Se analizaron los diferentes datos recolectados de los experimentos, asimismo se determinó el efecto de las variables independientes sobre la variable dependiente y mediante el Análisis de Varianza (ANOVA) se determinó la significancia de las variables. Se utilizó el software Statgraphics 18 con licencia trial.

3.7.3 Correlación entre la respiración basal y la dosis de diésel inicial

Se analizó la correlación entre la variable respuesta respiración basal y la dosis inicial de diésel en el suelo.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Características fisicoquímicas de suelo y el agua de riego

De acuerdo a la Tabla 21, se muestra que se obtuvo un suelo con pH ligeramente alcalino, fuertemente salino, con una materia orgánica baja, con fósforo disponible bajo, potasio disponible alto y finalmente una capacidad de intercambio iónico baja. Un suelo franco arenoso con poca fertilidad.

Tabla 21

Análisis fisicoquímico del suelo del CONSAS

	Característica fisicoquímica	Valor
	pH (1:1)	7.29
	C.E. (1:1) dSm ⁻¹	9.33
	CaCO ₃ %	3.67
	M.O. %	1.22
	P ppm	3.2
	K ppm	287
Análisis mecánico	Arena %	60
	Limo %	26
	Arcilla %	14
	Clase textural	Fr.A ¹
	CIC	7.2
Cationes cambiables	Ca ⁺² meq100g ⁻¹	4.3
	Mg ⁺² meq100g ⁻¹	1.65
	K ⁺¹ meq100g ⁻¹	0.66
	Na ⁺¹ meq100g ⁻¹	0.19
	Al ⁺³ + H ⁺	0.00
	Suma de cationes	6.80
	Suma de bases	6.80
	% Sat. de bases	100

Nota. ¹Fr. A: Franco arenoso, dS m⁻¹ (decisiemens metro⁻¹), Meq/100 = miliequivalentes por 100 g de suelo.

En la Tabla 22, se observa los resultados de las características fisicoquímicas del agua con la que se aportó humedad al suelo contaminado está clasificada ligeramente alcalino y muy ligeramente salino.

Tabla 22

Características químicas del agua

Características	Unidades	Valores
pH		7.72
CE	dS m ⁻¹	0.80
Calcio	mEq l ⁻¹	4.80
Magnesio	mEq l ⁻¹	0.99
Potasio	mEq l ⁻¹	0.08
Sodio	mEq l ⁻¹	2.48
Suma de cationes	mEq l ⁻¹	8.35
Nitratos	mEq l ⁻¹	0.38
Carbonatos	mEq l ⁻¹	0.00
Bicarbonatos	mEq l ⁻¹	3.77
Sulfatos	mEq l ⁻¹	1.17
Cloruros	mEq l ⁻¹	2.75
Suma de aniones	mEq l ⁻¹	8.07
Sodio	%	29.71
RAS		1.46
Boro	mgkg ⁻¹	0.37
Clasificación		C3-S1

Nota. CE: conductividad eléctrica, RAS: relación de adsorción de sodio.

4.2 Proceso de biorremediación en función del TPH

Los resultados del análisis de TPH inicial en las muestras se tienen en la Tabla 23.

Tabla 23*Resultados iniciales TPH*

Código de laboratorio	Descripción de muestras	Unidad	TPH inicial
S-1884	2 kg de suelo + 21.25 g kg ⁻¹ diésel +0.2*10 ⁸ UFC/kg bacteria	mg kg ⁻¹	16947.84
S-1885	2 kg de suelo + 42.5 g kg ⁻¹ diésel +0.2*10 ⁸ UFC/kg bacteria	mg kg ⁻¹	38116.71
S-1886	2 kg de suelo + 85 g kg ⁻¹ diésel +0.2*10 ⁸ UFC/kg bacteria	mg kg ⁻¹	59285.57

Nota. TPH = Hidrocarburos totales de petróleo

Como se apreció en la Tabla 23, para suelos con dosis de diésel de 21.25 g kg⁻¹, 42.5 g kg⁻¹ y 85 g kg⁻¹ se observa un alto nivel de TPH inicial. Todos sobrepasando los 5000 mg kg⁻¹ indicado en MINAM (2017) (Anexo 3).

En la Tabla 24 se indican los resultados de TPH finales después de 73 días de biorremediación.

Tabla 24*Resultados TPH finales*

Código de laboratorio	Descripción de muestras	Unidad	TPH final
M1: T5R2	2 kg de suelo + 21.25 g kg ⁻¹ diésel	mg kg ⁻¹	1245.07
M2: T3R1	2 kg de suelo + 21.25 g kg ⁻¹ diésel + 0.1*10 ⁸ UFC/kg bacteria	mg kg ⁻¹	1100.00
M3: T8R2	2 kg de suelo + 21.25 g kg ⁻¹ diésel + 0.2*10 ⁸ UFC/kg bacteria	mg kg ⁻¹	1012.29
M4: T9R1	2 kg de suelo + 42.5 g kg ⁻¹ diésel	mg kg ⁻¹	6252.31
M5: T11R1	2 kg de suelo + 42.5 g kg ⁻¹ diésel + 0.1*10 ⁸ UFC/kg bacteria	mg kg ⁻¹	5242.00
M6: T12R2	2 kg de suelo + 42.5 g kg ⁻¹ diésel + 0.2*10 ⁸ UFC/kg bacteria	mg kg ⁻¹	2815.15
M7: T13R2	2 kg de suelo + 85 g kg ⁻¹ diésel	mg kg ⁻¹	17866.18
M8: T15R3	2 kg de suelo + 85 g kg ⁻¹ diésel + 0.1*10 ⁸ UFC/kg bacteria	mg kg ⁻¹	17279.10
M9: T16R2	2 kg de suelo + 85 g kg ⁻¹ diésel + 0.2*10 ⁸ UFC/kg bacteria	mg kg ⁻¹	15943.48

Nota. TPH = Hidrocarburos totales de petróleo

Tres resultados de TPH finales (M1, M2, M3 y M6) son menores de 5000 mg kg⁻¹ como se indica en MINAM (2017) (Anexo 3). Dentro de una misma dosis de diésel, se observa la acción de la bacteria disminuyendo el TPH final.

En la Tabla 25 se nota el porcentaje de TPH eliminado (TPHe%) en cada muestra.

Tabla 25

TPHe % en cada muestra

D (g kg ⁻¹)	B (10 ⁸ UFC/kg)	TPHe (%)
21.25	0	92.65
21.25	0.1	93.51
21.25	0.2	94.03
42.5	0	83.60
42.5	0.1	86.25
42.5	0.2	92.61
85	0	69.86
85	0.1	70.85
85	0.2	73.11

Nota. TPHe: hidrocarburos totales de petróleo eliminados D= dosis de diésel B= dosis de bacteria

Como se puede apreciar, aquellos suelos que fueron adicionados sintéticamente con 21.25 g kg⁻¹ de diésel (menor dosis) obtuvieron los TPHe más bajos. Considerando que la TPH inicial fue 16947.84 mg kg⁻¹.

Los suelos que tuvieron el aporte mayor de diésel (85 g kg⁻¹) comprendieron el mayor índice de TPH no eliminado al final del experimento.

Los suelos contaminados con diésel que fueron inoculados con bacteria tienden a poseer menores contenidos de TPH en relación de aquellos que no recibieron al microorganismo.

Los tratamientos contaminados con 42.5 g kg⁻¹ y 85 g kg⁻¹ de diésel mostraron una tendencia que a mayor dosis de inóculo se obtiene menor contenido de TPH.

Es también importante observar que la presencia de inóculo ha tendido a disminuir los TPH finales. Si analizamos los tratamientos que no tienen presencia de bacteria, hubo mayor remediación en los tratamientos con menos dosis de diésel. Después, los tratamientos con 0.1*10⁸ UFC/kg de bacteria, tuvieron mejor remediación a menos dosis de diésel igualmente.

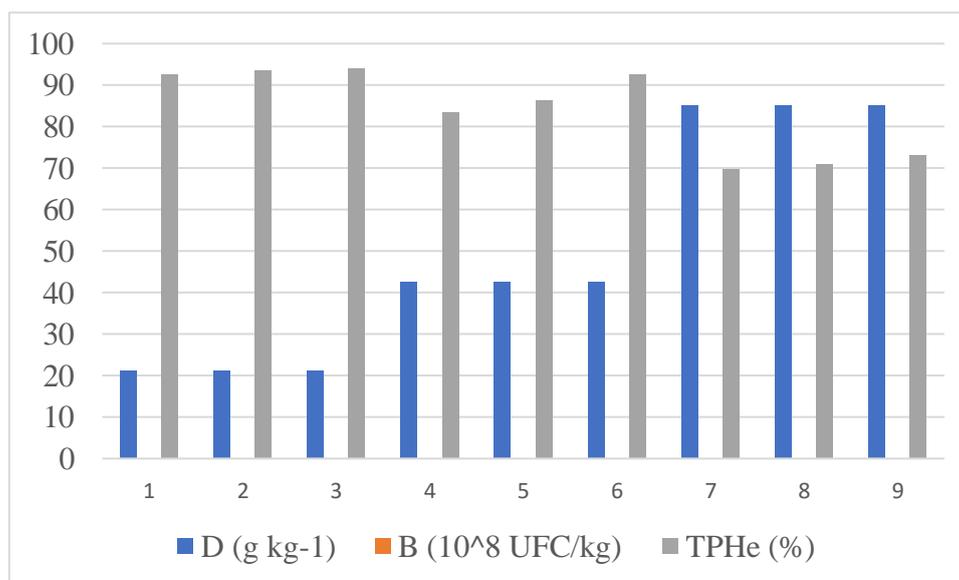
Finalmente, los tratamientos con $0.2 \cdot 10^8$ UFC/kg de bacteria, tuvieron mejor remediación a menos dosis de diésel también, e incluso el rango de remediación entre ellos fue mínimo. Por tanto, se puede decir que las bacterias nativas fueron las responsables directas de la biorremediación más que las inoculadas. Además, que una dosis menor de diésel respecto al diésel, podría dar mejores resultados.

De acuerdo al D.S. N° 011-2017 MINAM que establece que los ECA de suelo comercial es de 5000 mg kg^{-1} en fracción de hidrocarburos F2 ($>C_{10}-C_{28}$), valores que sobrepasaron en el caso de los suelos contaminados con 42.5 g kg^{-1} a más de diésel, lo que permite deducir que el inóculo no logró reducir adecuadamente el contenido de TPH finales.

Para una mejor visualización, en la Figura 19 se muestra el gráfico de barras de los % TPHe indicado en la Tabla 24.

Figura 19

Grafico de barras de TPHe(%) en cada muestra



Nota. D= dosis de diésel B= dosis de bacteria. TPHe (%) = porcentaje de hidrocarburos totales de petróleo eliminados.

La mayor disminución de TPH se percibió en 21.25 g kg^{-1} de diésel con $0.2 \cdot 10^8$ UFC/kg de bacterias *Pseudomonas* con un porcentaje de remoción de 94.03. Seguido de 93.51%, 92.65% y 92.61 % en 21.25 g kg^{-1} diésel y $0.1 \cdot 10^8$ UFC/kg bacteria, 21.25 g kg^{-1} de diésel y $0 \cdot 10^8$ UFC/kg bacteria y 42.5 g kg^{-1} de diésel y $0.2 \cdot 10^8$ UFC/kg de bacteria respectivamente. Hecho que podría indicar usar una menor dosis de diésel como 21.25 g kg^{-1} .

Se observan los valores más bajos de TPHe en las dosis de 85 g kg⁻¹ de diésel. Además, se aprecia una relación directamente proporcional de mayor inóculo, mayor TPHe.

De igual manera que León & Velásquez (2022), se obtuvo una biorremediación alta de 82.38%. Esto corroboró que el uso de *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida* es capaz de biorremediar el suelo contaminado.

El menor porcentaje de disminución de TPH se obtuvo en 85 g kg⁻¹ de diésel sin inoculación de bacterias, con un 69.86%. Al observar que no solo el menor porcentaje de remoción se encuentra en una dosis de 85 g kg⁻¹ de diésel, sino que las tres muestras analizadas con 85 g kg⁻¹ de diésel son las menores; se deduce no usar una muestra con gran cantidad de diésel o usar una cantidad muy superior de bacteria a lo usado en la tesis.

-Análisis estadístico de TPH

Las hipótesis H₀ y H₁ son:

H₀: Las dos variables (dosis de diésel y dosis de bacteria) en el proceso de biorremediación de suelos contaminados con diésel no son significativas.

H₁: Las dos variables (dosis de diésel y dosis de bacteria) en el proceso de biorremediación de suelos contaminados con diésel son significativas.

Figura 20

Datos de entrada Statgraphics 18 con licencia trial

BLOQUE	D	B	%TPHe
	g kg ⁻¹	10 ⁸ UFC / kg	%
Entero	Número	Número	Número
1	42.50	0.0	83.6
1	42.50	0.1	86.25
1	85.00	0.2	73.11
1	85.00	0.0	69.86
1	85.00	0.1	70.85
1	21.25	0.1	93.51
1	21.25	0.2	94.03
1	42.50	0.2	92.61
1	21.25	0.0	92.65

La Figura 20 se muestra los datos de entrada aleatorios en el software Statgraphics 18 con licencia trial.

Nota. D= dosis de diésel B= dosis de bacteria %TPHe= porcentaje de hidrocarburos totales de petróleo eliminados.

La Tabla 26 indica el estimado del efecto de cada variable independiente (dosis de diésel y dosis de bacteria) sobre el porcentaje de TPH eliminado.

Tabla 26
Efectos estimados para %TPHe (%)

Variable o interacción	Efecto estimado	Desviación estándar
Promedio	83.47	+/- 6.23
D	-22.12	+/- 6.22
B	4.57	+/- 6.27
DD	-3.30	+/- 12.33
BB	0.18	+/- 7.48
DB	1.55	+/- 10.77

Nota. D=dosis de diésel, B= dosis de bacteria. DD= interacción entre variable dosis de diésel BB= interacción entre variable dosis de bacteria

Cuando la dosis de diésel cambia de menor a mayor (0 a 85 g kg⁻¹), en promedio el porcentaje de TPH eliminado disminuye en 22.1233 %.

Cuando la dosis de bacteria cambia de menor a mayor (0*10⁸ a 0.2*10⁸ UFC/kg), en promedio el porcentaje de TPH eliminado aumenta en 4.56 %.

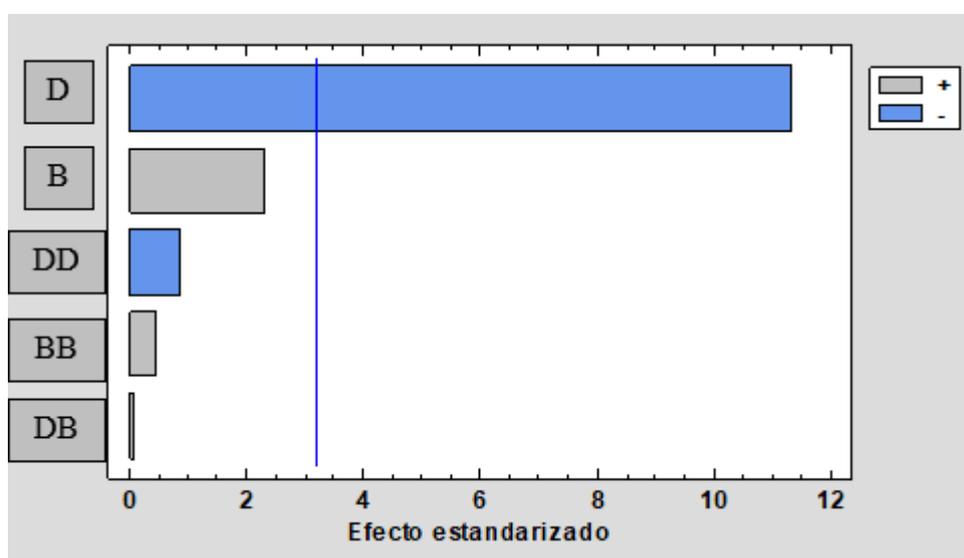
En el caso del aumento de dosis del biodiésel y de las bacterias en forma conjunta, el porcentaje de TPH eliminado se incrementa en 1.55 %

Estas variaciones se aprecian de mejor manera en el diagrama de Pareto (Figura 21), donde resalta que la variable de mayor efecto en el porcentaje de remoción de TPH es la dosis de diésel.

La Figura 21 nos muestra los efectos estimados en orden decreciente de importancia.

Figura 21

Diagrama de Pareto estandarizada para %TPHe



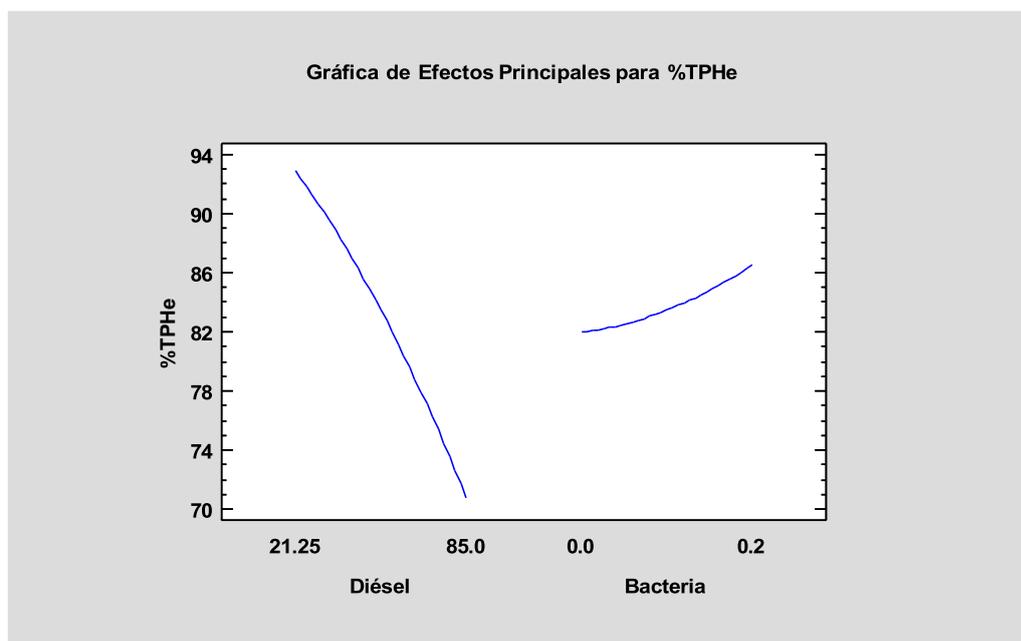
Nota. D=dosis de diésel, B= dosis de bacteria. DD= interacción entre variable dosis de diésel BB= interacción entre variable dosis de bacteria DB= interacción de dosis de diésel y dosis de bacteria. TPHe (%) = porcentaje de hidrocarburos totales de petróleo eliminados.

A pesar de que la dosis de diésel tenga la mayor reducción de porcentaje de TPHe de 22.12, esta variable representa el mayor efecto en la eliminación de TPH.

Por otro lado, en la Figura 22 se muestra gráficamente los efectos de las variables en estudio sobre el porcentaje de TPH eliminados.

Figura 22

Gráfica de efectos principales para %TPHe



Nota. D= dosis de diésel B= dosis de bacteria %TPHe= porcentaje de hidrocarburos totales de petróleo eliminados.

Al observar la Figura 22 de efectos principales para %TPHe, podemos inferir que, a más dosis de diésel, menos %TPHe. Sin embargo, a más dosis de bacteria inoculada, aumenta el %TPHe poco a poco. Por tanto, no incrementando la dosis de diésel, pero si añadiendo más dosis de bacteria, tendremos mejores resultados de biorremediación.

Coincide con la tendencia en la Tabla 25 de los porcentajes de remoción de TPH, disminuye el TPHe cuando disminuye la dosis de diésel. Igualmente, aumenta el TPHe cuando aumenta la dosis de bacteria.

En la Tabla 27 se muestra el análisis de varianza para el porcentaje de TPHe.

Tabla 27

Análisis de varianza para %TPHe

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
D	734.16	1	734.16	128.31	0.0015
B	30.74	1	30.74	5.37	0.1033
DD	4.17	1	4.14	0.72	0.4577
BB	0.04	1	0.04	0.01	0.9424
DB	1.196	1	1.20	0.21	0.6786

Error total	17.17	3	5.72
Total (corr.)	836.65	8	

Nota. D= dosis de diésel, B= dosis de bacteria. DD= interacción entre variable dosis de diésel BB= interacción entre variable dosis de bacteria DB= interacción de dosis de diésel y dosis de bacteria. TPHe (%) = porcentaje de hidrocarburos totales de petróleo eliminados.

Del estudio, respecto a la dosis de diésel, se puede decir que como el P valor es menor a 0.05 entonces resultó ser significativa con un nivel de confianza del 95.0%. En cambio, respecto a la variable dosis de bacteria y las interacciones, los valores P fueron mayores a 0.05 lo cual se consideran no significativas.

Por lo expuesto, respecto a las hipótesis H_0 y H_1 planteadas, se demuestra que tan solo una variable (dosis de diésel) es significativa.

El modelo matemático que representa a las 9 pruebas experimentales más dos replicas, con un coeficiente de determinación (R^2) de 97.95% es:

$$\begin{aligned} \%TPHe = & 95.97 - 0.0754952 \times D + 2.91667 \times B - 0.000292889 \times D^2 \\ & + 0.00614286 \times D \times B + 19.3333 \times B^2 \end{aligned}$$

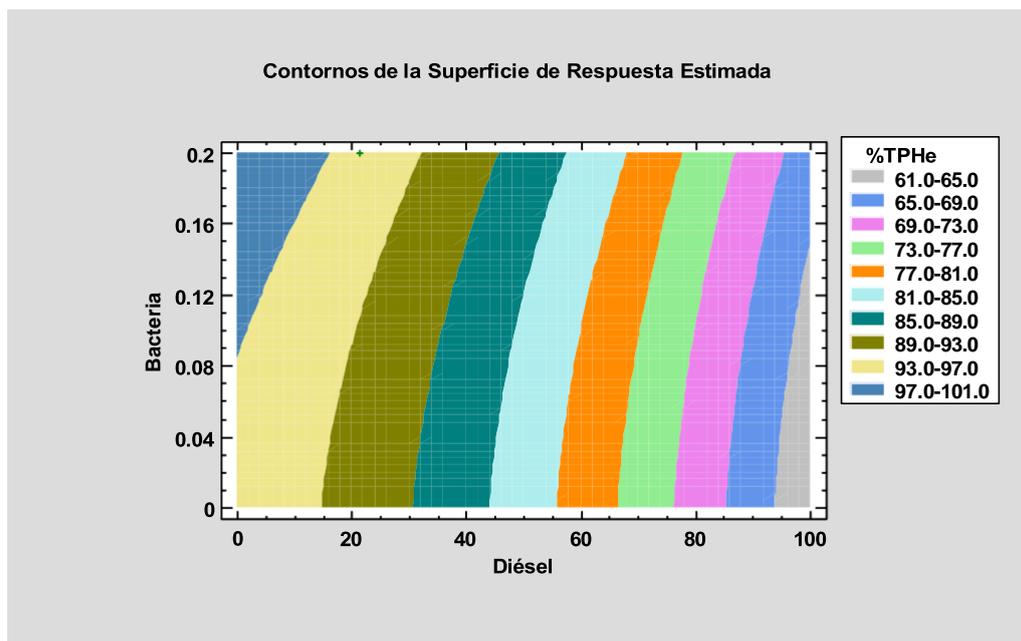
En resumen, el modelo matemático es:

$$\%TPHe = 95.97 - 0.0754952 \times D + 2.91667 \times B$$

La Figura 23 muestra gráficamente el modelo matemático, donde se resalta los contornos de la superficie de respuesta estimada

Figura 23

Contornos de la superficie de respuesta estimada



Nota. D=dosis de diésel, B= dosis de bacteria. TPHe (%) = porcentaje de hidrocarburos totales de petróleo eliminados Statgraphics 18.

En la Figura 23, el mayor porcentaje %TPHe estimado ocurre en el área de color azul oscuro y el menor porcentaje %TPHe estimado en el color gris.

Asimismo, se observa que en dosis de diésel de 10 a 20 g kg⁻¹ se tiene un %TPHe de 96% a 99%. En cambio, en dosis de diésel de 78.63 a 85 g kg⁻¹ se tiene un %TPHe de 69% a 72%.

De acuerdo a los resultados, se puede observar una tendencia que los parámetros adecuados para una buena biorremediación según la remoción de TPH es a 21.25 g kg⁻¹ diésel y 0.2*10⁸ UFC/kg de bacteria. Ya que estos dieron un 94.03% de remoción de TPH (Tabla 23). Aunque, a 42.5 g kg⁻¹ de diésel y 0.2*10⁸ UFC/kg de bacteria también se obtuvo una alta remoción de 92.61%. De acuerdo a los resultados de estadística, siempre hubo una notoria significancia del efecto de la dosis de diésel.

4.3 Proceso de biorremediación en función del RB

Para complementar los resultados de biorremediación, se realizaron análisis de respiración basal. Cabe resaltar que, de las 4 lecturas realizadas, solo se usaron las dos últimas dos lecturas con resultados óptimos.

Se observa en la Tabla 28 la respiración basal promedio en cada dosis de bacteria, incluyendo el testigo. En el promedio de respiración basal en cada dosis de bacteria en maceta

de 2 kg se observa que a más dosis de bacteria se obtuvo menos respiración basal. Es decir, menos CO₂ presente en la maceta y sin un efecto relevante proveniente de la bacteria. Aunque Pérez (2018), indica que existe una potencial acción de biorremediación sobre todo en cuatro HAPs (Acenaftaleno, benzo a antraceno, fenantreno, naftaleno) proveniente de la *Pseudomona fluorescens*.

Se usó contenidos de 2 kg para 16 macetas (con sus 3 repeticiones) y de 1kg para 4 macetas (con sus repeticiones).

Tabla 28

Promedio de respiración basal en cada dosis de bacteria en maceta de contenido de 2kg

	Macetas de contenido de 2kg			
Dosis de bacteria (10⁸ UFC/kg)	0	0.05	0.1	0.2
Prom RB (mg CO₂ kg suelo⁻¹ día⁻¹)	61.67	49.93	58.27	54.77

Nota. Prom RB= promedio de la respiración basal

En la Tabla 29 se detalla los promedios de respiración basal en cada dosis de diésel en maceta de 2 kg y 1 kg. A más dosis de diésel, si hay mayor respiración en la maceta. Se deduce la presencia de mayor alimento gracias al diésel. Además de actividad microbiana, que vienen a ser los comensales principales. Estos resultados coinciden con Hernández (2020), quien encontró que, a mayor nivel de materia orgánica, mayor actividad metabólica.

Tabla 29

Promedio de respiración basal en cada dosis de diésel en maceta de contenido de 2kg y 1kg

	Macetas de contenido de 2kg y 1kg			
Dosis de diésel (g kg⁻¹)	0	21.25	42.5	85
Prom RB (mg CO₂ kg suelo⁻¹ día⁻¹)	28.53	55.33	76.20	77.41

Nota. Prom RB= promedio de la respiración basal

La Tabla 30 muestra la respiración basal de macetas de 1kg en relación a la dosis de bacteria inoculada. Es evidente que, a más dosis de bacteria, fue menor la respiración basal. Cabe recalcar que, en estas macetas de 1kg no se agregó melaza. Misma tendencia que la Tabla 28 en macetas de 2 kg.

Estas pruebas experimentales adicionales fueron para corroborar la no esperada acción frente a la biorremediación de las bacterias en todos los análisis ya antes vistos.

Tabla 30

Promedio de respiración basal en cada dosis de bacteria en maceta de contenido de 1 kg

	Macetas de contenido de 1kg			
Dosis de bacteria (10⁸ UFC/kg)	0	0.05	0.1	0.2
Prom RB (mg CO₂ kg suelo⁻¹ día⁻¹)	65.40	37.81	38.5	44.87

Nota. Prom RB= promedio de la respiración basal

Se presenta la Tabla 31 con el promedio de respiración basal con y sin dosis de diésel en maceta de 2 kg y 1 kg. Se puede apreciar que existe mayor respiración basal en presencia de diésel y casi la mitad del valor de respiración basal en la ausencia de diésel.

Se concordó otra vez con Hernández (2020), al tener mayor respiración basal en presencia de materia orgánica.

Tabla 31

Promedio de respiración basal con y sin diésel en maceta de contenido de 2 kg y 1 kg

	Macetas de contenido de 2kg y 1kg	
	Con diésel	Sin diésel (testigo)
Prom RB (mg CO₂ kg suelo⁻¹ día⁻¹)	69.51697248	37.58619792

Nota. Prom RB= promedio de la respiración basal

Se presenta en la Tabla 32, las 4 lecturas realizadas en todo el proceso de biorremediación. Indicando su promedio de respiración basal en cada lectura, los días de incubación que se tomaron en cada determinada lectura y los días de biorremediación llevados al momento de tomar la respiración basal. Finalmente se puede examinar los promedios de respiración basal, días de incubación y días de biorremediación para las diferentes lecturas en la Tabla 32 Promedio de respiración basal de cada lectura, Días de incubación y días de biorremediación en macetas de 2 kg y 1 kg.

Respecto a las lecturas de las respiraciones basales, en la lectura 2 y 4 es donde se obtuvo en promedio respiraciones basales más altas. Sin embargo, los valores de las lecturas 1 y 2 tuvieron un rango muy amplio de variaciones. Con lo cual, para nuestra estadística se tomaron las lecturas con un rango de valores más pequeño, es decir, las lecturas 3 y 4. Los resultados de respiración basal son proporcionales a los días de incubación. Esto probablemente sea ya que hay una mayor reproducción de las bacterias a más días de incubación. Por último,

no se puede deducir una tendencia entre la respiración basal y los días de biorremediación, ya que los resultados fluctúan bastante.

Existe una tendencia de disminución de respiración basal a medida que disminuyan los hidrocarburos según Hernández et al (2017), y esto coincide de la lectura 1 a la lectura 2 pero ya no de la lectura 3 a la lectura 4 como lo muestra la Tabla 32.

Tabla 32

Promedio de respiración basal de cada lectura, días de incubación y días de biorremediación en macetas de contenido de 2 kg y 1 kg

	Macetas de contenido 2kg y 1kg			
	Prom L-1	Prom L-2	Prom L-3	Prom L-4
Prom RB (mg CO₂ kg suelo⁻¹ día⁻¹)	39.27	95.08	42.10	65.44
Días de incubación	1	3	1	2
Días de biorremediación	23	58	65	73

Nota. Prom RB= promedio de la respiración basal. Prom L-1= Promedio de la respiración basal en la lectura 1. Prom L-2= Promedio de la respiración basal en la lectura 2. Prom L-3= Promedio de la respiración basal en la lectura 3. Prom L-4= Promedio de la respiración basal en la lectura 4.

-Análisis estadístico de la respiración basal.

Se analizó los diferentes datos recolectados de los experimentos, asimismo se determinó el efecto de las variables independientes sobre la variable dependiente y mediante la herramienta estadística de análisis de varianza (ANOVA) se determinó la significancia de las variables. Se utilizó el software Statgraphics 18 con licencia trial para el desarrollo del análisis estadístico.

A. Data con diésel (16 tratamientos con melaza)

En la tabla 33 se muestra los promedios de respiración basal a los 65 y 73 días de tratamientos con diésel que vienen a ser 16 tratamientos.

Respecto al promedio de la respiración basal de 65 días, se observan valores desde 9 hasta 81 mgCO₂ kg suelo⁻¹ día⁻¹. En relación a la dosis de diésel, los valores de respiración fluctúan bastante. En dosis de 42.5 g kg⁻¹ de diésel, se ven mejores resultados de respiración. Por otro lado, la dosis de bacteria tiene una influencia mínima en la respiración basal.

A los 73 días, el promedio de la respiración basal va desde 14 hasta 104 mgCO₂ kgsuelo⁻¹ día⁻¹. En relación a la dosis de diésel, aquí los valores de respiración si van en aumento relativamente constante. En dosis de 85 g kg⁻¹ de diésel, se ven mejores resultados de respiración. Por otro lado, la dosis de bacteria tiene una influencia muy variable e imprecisa.

Se tomaron 16 tratamientos con 3 repeticiones cada uno, haciendo un total de 48 tratamientos con melaza. Los datos que se muestran en el promedio de respiración basal a 65 y 73 días (Prom RB 65 y Prom RB 73 respectivamente) son un promedio de las 3 repeticiones realizadas para cada tratamiento.

Tabla 33

Promedio respiración basal para día 65 y 73 de la biorremediación con sus respectivas desviaciones estándar y error estándar.

Diésel	Bacteria	PromRB 65	Es	Dst	PromRB 73	Es	Dst
0	0	12.65	± 0.4	3.4	14.0±	± 0.5	4.1
0	0.05	13.2	± 0.3	2.9	16.2±	± 0.1	1.0
0	0.1	13.15	± 0.8	7.2	14.9±	± 0.1	0.8
0	0.2	9.3	± 0.8	7.4	26.7±	± 2.8	24.8
21.25	0	45.65	± 1.5	13.4	59.1	± 1.8	16.0
21.25	0.05	53.35	± 2.2	19.9	53.4	± 1.2	11.1
21.25	0.1	33	± 3.1	27.6	59.4	± 1.9	17.1
21.25	0.2	39.05	± 0.9	7.8	60.5	± 1.2	11.2
42.5	0	68.75	± 1.2	10.6	69.6	± 2.4	22.0
42.5	0.05	23.65	± 1.5	13.7	70.1	± 2.7	23.9
42.5	0.1	81.4	± 2.5	22.4	99.3	± 3.0	27.1
42.5	0.2	62.15	± 1.8	16.5	84.2	± 2.9	25.8
85	0	64.35	± 2.7	24.4	104.8	± 1.4	13.0
85	0.05	76.45	± 2.2	19.9	103.4	± 3.1	27.6
85	0.1	47.85	± 0.2	1.7	94.3	± 2.3	20.4
85	0.2	31.9	± 2.1	19.1	90.2	± 1.5	13.9

Nota. Prom RB 65=Promedio respiración basal a los 65 días de biorremediación Prom RB 73

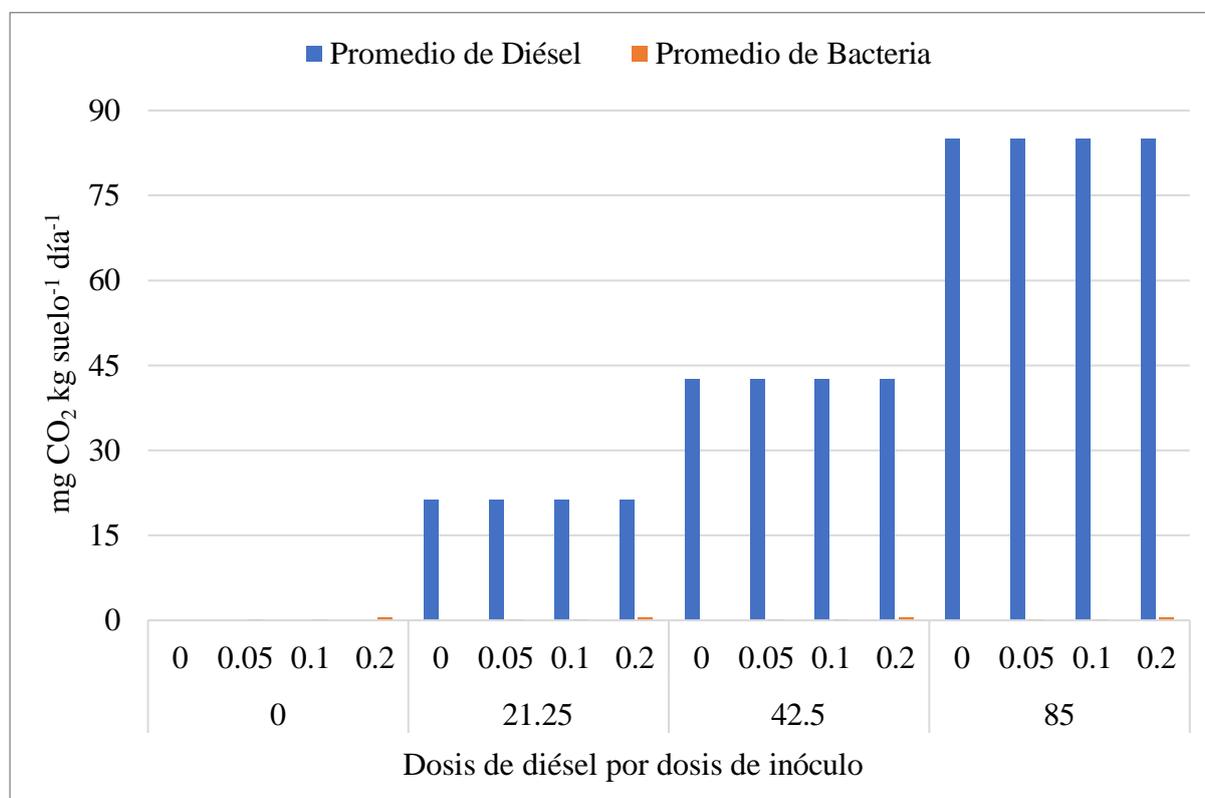
= Promedio respiración basal a los 73 días de biorremediación Dst= Desviación estándar.

Es=Error estándar. Dosis de bacteria en 10⁸ UFC/ml y dosis de diésel en g kg⁻¹.

En la Figura 24 se ve el gráfico de barras del promedio de respiraciones basales a los 65 y 73 días de biorremediación.

Figura 24

Gráfico dinámico de respiración basal para 65 y 73 días de la biorremediación



Nota. Las unidades de la dosis de diésel y dosis de inóculo son g kg⁻¹ y 10⁸ UFC/kg respectivamente. La percepción del inóculo en el gráfico puede ser mínima ya que se manejan valores minúsculos.

Se percibe en Tabla 34 la desviación estándar y el error estándar de los resultados de promedio de respiraciones basales en 65 y 73 días de biorremediación.

El error estándar mayor es de 3.1 en 21.25 g kg⁻¹ de diésel y 0.1*10⁸ UFC/kg de bacteria para 65 días de biorremediación. Por otro lado, a los 73 días de biorremediación, el mayor error estándar es 3.1 en el tratamiento que posee 85 g kg⁻¹ de diésel y 0.05*10⁸ UFC/kg de bacteria.

En la Tabla 34 se presenta la significancia de las variables diésel y bacteria dentro del estudio estadístico.

Tabla 34*Significancia respecto las variables y su interacción*

	Pr>F (RB65)	Pr>F (RB73)
Diésel	<0.0001	<0.0001
Bacteria	0.3018	0.8255
D * B	0.0019	0.6501
CV	37.20%	28.90%

Nota. D=dosis de diésel B= dosis de bacteria D*B= interacción entre variables. CV= coeficiente de varianza

Si tomamos el análisis estadístico de data con diésel (16 tratamientos con melaza) respecto a la respiración basal de 65 días (Lectura 3), se ve que la variable diésel tuvo un valor $Pr<F$ menor a 0.05, esto quiere decir que hubo significancia respecto a esta variable. Luego, la interacción de las variables diésel y bacteria de igual manera tuvo un valor $Pr<F$ menor a 0.05. Por tanto, hubo significancia. Al contrario, la bacteria por tener un valor mayor a 0.05, no tiene mayor significancia. Por ende, la bacteria no tuvo un efecto trascendente en la biorremediación a los 65 días.

Por otro lado, el análisis estadístico de data con diésel (16 tratamientos con melaza) respecto a la respiración basal de 73 días (lectura 4), la variable diésel tuvo un valor $Pr<F$ menor a 0.05 entonces se aprecia que hay significancia únicamente en ésta. Por el contrario, el valor $Pr<F$ de la bacteria y la interacción de las variables diésel y bacteria son mayores a 0.05. Por tanto, no tiene significancia. En consecuencia, el diésel solo tuvo un efecto eminente en la biorremediación a los 73 días.

Estos resultados coinciden con la estadística respecto al %TPHe, dando la presencia resaltante al diésel como variable relevante frente a la bacteria. Es más, se resalta una interacción sobresaliente a los 65 días.

Contrario a Benavides et al (2006), la variable diésel es la que prima en relevancia. No la bacteria como tal.

a. Estadística de la interacción a los 65 días.

En la Tabla 35 se aprecia la estadística se realizó en el software Statgraphics 18 con licencia trial de dónde se trabajaron los siguientes datos:

Tabla 35*Datos tukey de la interacción diésel bacteria a 65 días*

Diésel	Bacteria	RB 65	±	Es						
0	0	12.65	±	0.38	A	B	D0B10	a	D100B0	A
0	0.05	13.2	±	0.32	A	C	D0B20	a	D200B0	A
0	0.1	13.15	±	0.80	A	B	D0B0	a	D50B0	A B
0	0.2	9.3	±	0.83	A	B	D0B40	a	D0B0	B
21.25	0	45.65	±	1.49	A	AB	D50B10	a	D200B10	A
21.25	0.05	53.35	±	2.21	A	AB	D50B0	a	D50B10	A B
21.25	0.1	33	±	3.06	A	B	D50B40	a	D100B10	B C
21.25	0.2	39.05	±	0.87	A	AB	D50B20	a	D0B10	C
42.5	0	68.75	±	1.18	ab	A	D100B20	a	D100B20	A
42.5	0.05	23.65	±	1.53	B	BC	D100B0	a b	D200B20	A B
42.5	0.1	81.4	±	2.49	A	A	D100B40	a b	D50B20	B
42.5	0.2	62.15	±	1.84	ab	A	D100B10	b	D0B20	B
85	0	64.35	±	2.71	A	A	D200B10	a	D100B40	A
85	0.05	76.45	±	2.21	A	A	D200B0	a	D50B40	A B
85	0.1	47.85	±	0.18	A	AB	D200B20	a	D200B40	A B
85	0.2	31.9	±	2.12	A	AB	D200B40	a	D0B40	B

Nota. Es = Error estándar. Prom RB 65=Promedio respiración basal a los 65 días de biorremediación. La dosis de diésel y la dosis de bacteria es de g kg^{-1} y 10^8 UFC/kg respectivamente.

Los datos tukey vienen de comparar un nivel de dosis de diésel con todos los niveles de dosis de bacteria y viceversa, un nivel de dosis de bacteria con todos los niveles de dosis de diésel. De esta manera, se compararon todos los niveles de dosis de bacteria con todos los niveles de dosis de diésel.

Se percibió que, con poca comida, es decir, con poca dosis de diésel; la respiración fue similar entre ellos. Lo mismo pasó con mucha comida o con mayor dosis de diésel.

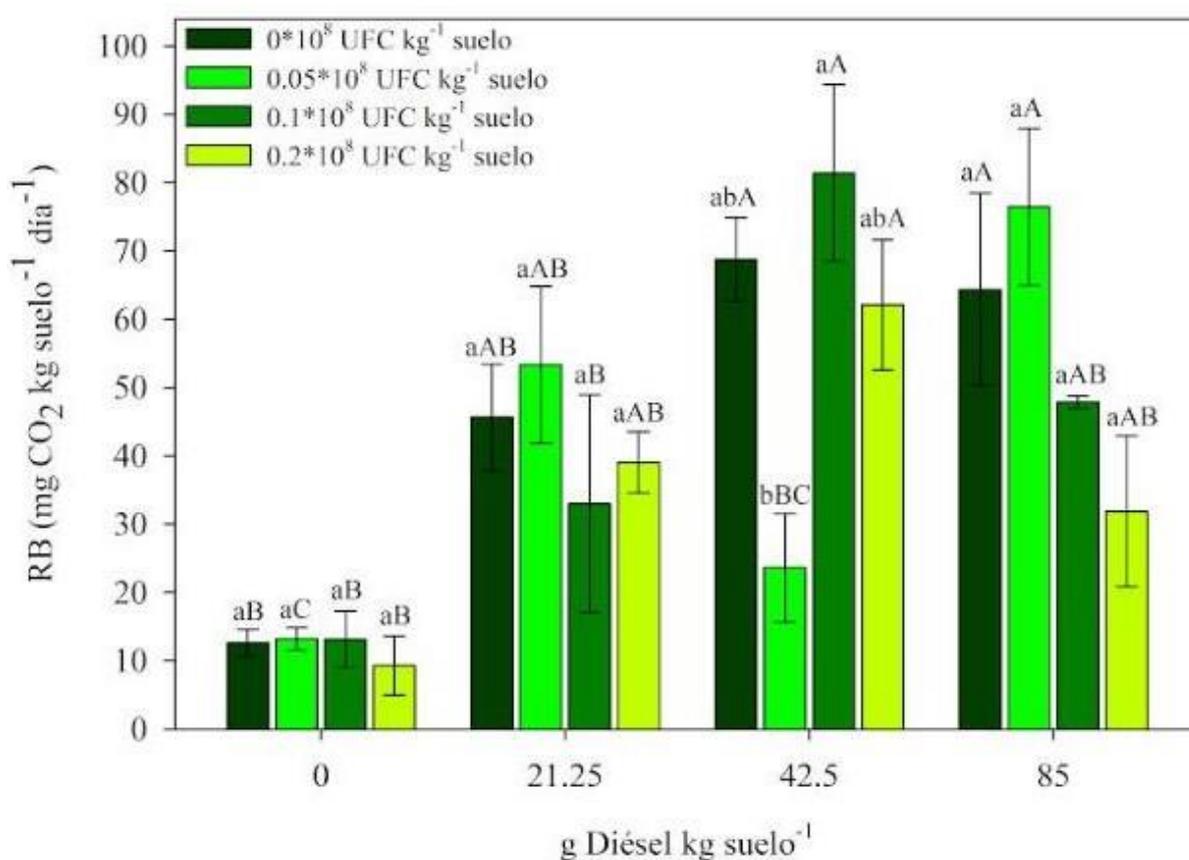
Sin embargo, la interacción más resaltante fue una dosis de 42.5 g kg^{-1} de diésel con $0.1 \cdot 10^8$ UFC/kg de bacteria.

Además, que la presencia de diésel promueve a los organismos nativos del suelo a descomponerse. Pero este poder de descomponer no es tan grande como para diferenciarse significativamente del testigo. A mayor cantidad de hidrocarburos, mayor descomposición.

En la Figura 25 se presenta la relación entre dosis de diésel (g kg^{-1}) y respiración basal ($\text{mgCO}_2 \text{kg suelo}^{-1} \text{ día}^{-1}$) a los 65 días de biorremediación.

Figura 25

% Diésel por respiración basal a 65 días ($\text{mgCO}_2 \text{kg suelo}^{-1} \text{ día}^{-1}$)



Nota: Letras minúsculas compara dosis de bacteria dentro en una dosis de diésel. Letras mayúsculas compara dosis de diésel en una misma dosis de bacteria.

En la dosis de 0 g kg^{-1} diésel, la respiración es similar en cuanto a la variación de dosis de bacteria dentro de esta dosis de diésel. Sin embargo, hay un ligero mejor resultado en 0.05 $\times 10^8$ UFC/kg bacteria. Además de, una ligera disminución en 0.2 $\times 10^8$ UFC/kg bacteria.

En la dosis de 21.25 g kg⁻¹ diésel, la respiración marca diferencia en cuanto a la variación de dosis de bacteria dentro de esta dosis de diésel. Sin embargo, hay un ligero mejor resultado en 0.05*10⁸ UFC/ml bacteria y una ligera disminución en 0.1*10⁸ UFC/kg bacteria.

En la dosis de 42.5 g kg⁻¹ diésel, todas las respiraciones son altas a excepción de 0.05*10⁸ UFC/kg de bacteria.

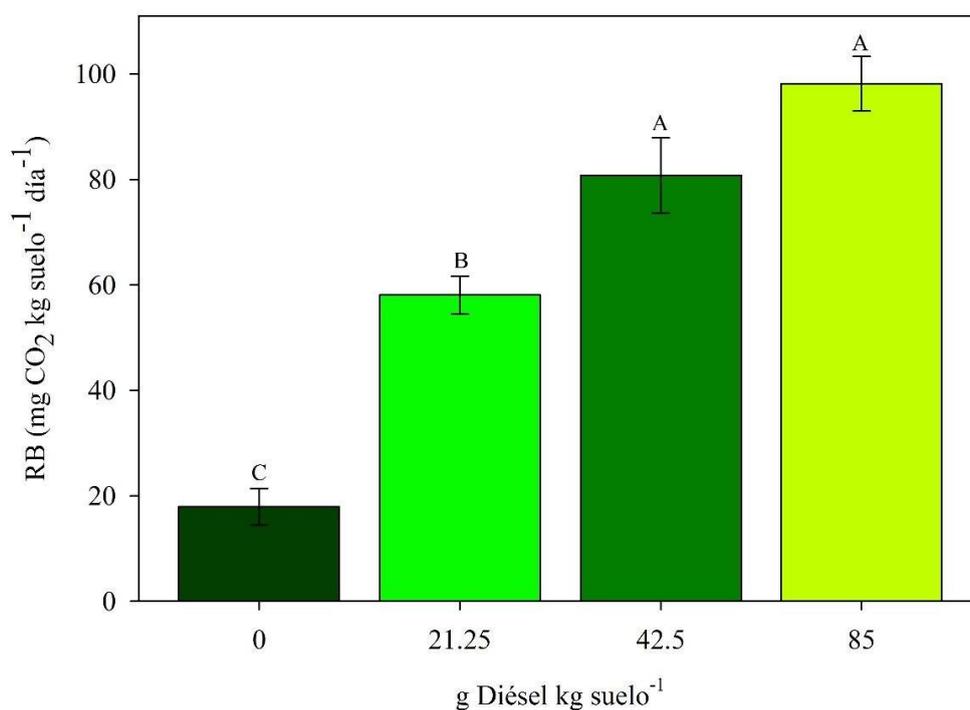
En la dosis de 85 g kg⁻¹ diésel, todas las respiraciones son altas y ninguna muy alejada de la otra.

b. Estadística de la interacción a los 73 días.

En la Figura 26 se presenta la relación entre dosis de diésel (g kg⁻¹) y respiración basal (mgCO₂ kgsuelo⁻¹ día⁻¹) a los 73 días de biorremediación.

Figura 26

% Diésel por respiración basal a 73 días (mgCO₂ kg suelo⁻¹día⁻¹)



Se observa en los resultados (Figura 26), que para suelos con 85 g kg⁻¹ de diésel el promedio de la respiración basal fue la mayor, próximo a 100 mgCO₂ kgsuelo⁻¹ día⁻¹. Por otro lado, para suelos con 0g kg⁻¹ de diésel el promedio de respiración fue el menor, menor a 20 mgCO₂ kgsuelo⁻¹ día⁻¹.

B. Data sin diésel (8 tratamientos:4 sin melaza y 4 con melaza)

El mayor promedio respiración basal para día 65 de la biorremediación se encuentra en 0 g kg⁻¹ diésel y 0.2*10⁸ UFC/kg de bacteria con 21.1 mgCO₂ kgsuelo⁻¹ día⁻¹. Por otra parte, es 9.3 el menor promedio respiración basal para día 65 de la biorremediación en el tratamiento 0 g kg⁻¹ de diésel y 0.2*10⁸ UFC/kg de bacteria, y con presencia de melaza.

El mayor promedio respiración basal para día 73 de la biorremediación se encuentra en 0 g kg⁻¹ diésel y 0*10⁸ UFC/kg de bacteria con 64.35 mgCO₂ kg suelo⁻¹ día⁻¹. Por otra parte, es 14.025 el menor promedio respiración basal para día 73 de la biorremediación en el tratamiento 0 g kg⁻¹ de diésel y 0*10⁸ UFC/kg de bacteria, pero con presencia de melaza

Es turno de analizar los resultados estadísticos para data sin diésel (8 tratamientos:4 sin melaza y 4 con melaza) en la Tabla 36.

Tabla 36

Promedio respiración basal para día 65 y 73 de la biorremediación

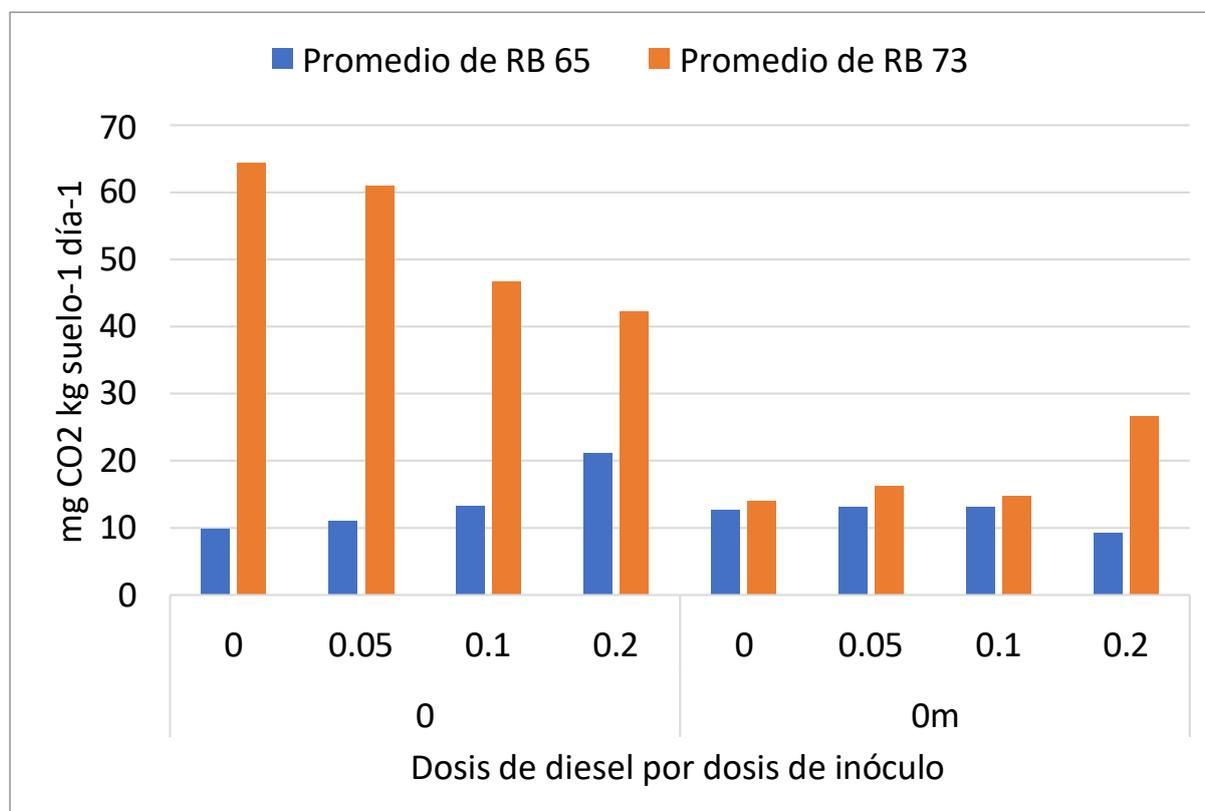
Diésel (g kg ⁻¹)	Bacteria (UFC/kg)	Prom RB 65	Prom RB 73
0	0	9.9	64.35
0	0.05	11.1	61.05
0	0.1	13.3	46.75
0	0.2	21.1	42.35
0m	0	12.65	14.025
0m	0.05	13.2	16.225
0m	0.1	13.15	14.85
0m	0.2	9.3	26.675

Nota. 0m= 0 g kg⁻¹ de diésel y presencia de melaza, 0= 0 g kg⁻¹ de diésel y sin presencia de melaza. Prom RB 65= Promedio de la respiración basal a los 65 días. Prom RB 73= Promedio de la respiración basal a los 73 días. Unidades RB= mgCO₂ kgsuelo⁻¹ día⁻¹

La Figura 27 muestra el gráfico en barras de la Tabla 36

Figura 27

Gráfico dinámico de los promedios de respiración basal para 65 y 73 días de la biorremediación



Nota. 0m= 0 g kg⁻¹ de diésel y presencia de melaza, 0= 0 g kg⁻¹ de diésel y sin presencia de melaza. La dosis de diésel y la dosis de bacteria es de g kg⁻¹ y 10⁸ UFC/kg respectivamente.

El error estándar mayor es de 1.46 en 0 g kg⁻¹ de diésel y 0.1*10⁸ UFC/kg de bacteria para 65 días de biorremediación sin presencia de melaza. Por otro lado, a los 73 días de biorremediación, el mayor error estándar es 2.752 en el tratamiento que posee 0 g kg⁻¹ de diésel y 0.2*10⁸ UFC/kg de bacteria, pero en presencia de melaza.

En la Tabla 37 se presenta la desviación estándar y error estándar de para las respiraciones basales en 65 y 73 días de biorremediación sin presencia de diésel.

Tabla 37

Desviación estándar y error estándar para respiraciones basales en 65 y 73 días de biorremediación para suelos sin presencia de diésel

Diésel	Bacteria	PromRB 65	Es	Dst	PromRB 73	Es	Dst
0	0	9.9	± 0.98	8.73	64.35	± 2.40	21.64
0	0.05	11.1	± 0.02	0.17	61.05	± 2.50	22.46
0	0.1	13.3	± 1.46	13.16	46.75	± 2.02	18.18
0	0.2	21.1	± 0.43	3.9	42.35	± 1.33	11.90
0m	0	12.65	± 0.38	3.44	14.025	± 0.46	4.13
0m	0.05	13.2	± 0.32	2.86	16.23	± 0.11	0.95
0m	0.1	13.15	± 0.81	7.23	14.85	± 0.09	0.83
0m	0.2	9.3	± 0.83	7.44	26.68	± 2.75	24.77

Nota. 0m= 0 g kg⁻¹ de diésel y presencia de melaza, 0= 0 g kg⁻¹ de diésel y sin presencia de melaza. Dst= Desviación estándar. Es= Error estándar. Prom RB65 = Promedio Respiración Basal a 65 días de biorremediación. Unidades RB= mgCO₂ kgsuelo⁻¹ día⁻¹. Prom RB73 = Promedio Respiración Basal a 73 días de biorremediación. La dosis de diésel y la dosis de bacteria es de g kg⁻¹ y 10⁸ UFC/kg respectivamente.

Para decir si hay significancia, Pr>F tiene que ser menor que 0.05. Caso contrario, no hay significancia.

Para respiración basal de 65 días, ni el diésel ni la bacteria ni la interacción entre estas variables fue significativa.

Aunque, la respiración basal de 73 días nos reveló que sí hubo significancia en la variable diésel para unidades experimentales sin diésel (8 tratamientos:4 sin melaza y 4 con melaza).

En oposición a León & Velásquez (2022), no teniendo mayor influencia de las bacterias *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens*.

En la Tabla 38 se presenta la significancia de las variables diésel y bacteria dentro del estudio estadístico.

Tabla 38

Significancia respecto las variables y su interacción

	Pr>F (RB65)	Pr>F (RB73)
Diésel	0.5434	<.0001
Bacteria	0.4988	0.0792
D * B	0.4301	1
CV	54.0176%	45.02333%

Nota. D=dosis de diésel B= dosis de bacteria D*B= interacción entre variables

CV= coeficiente de varianza

A pesar que no se observaron resultados constantes y ascendentes en su totalidad, se observó gran presencia de CO₂ en el análisis. Esto indicó la multiplicidad de las bacterias y que éstas se alimentaron del diésel. Por tanto, hay un comportamiento correcto y efectivo de las bacterias.

De acuerdo a los resultados, se puede observar una tendencia que los parámetros adecuados para una buena biorremediación según la remoción de TPH es a 21.25 g kg⁻¹ diésel y 0.2*10⁸ UFC/kg de bacteria. Ya que estos dieron un 94.03% de remoción de TPH (Tabla 24). Aunque, a 42.5 g kg⁻¹ de diésel y 0.2*10⁸ UFC/kg de bacteria también se obtuvo una alta remoción de 92.61%. De acuerdo a los resultados de estadística, siempre hubo una notoria significancia del efecto de la dosis de diésel.

De acuerdo a los resultados, se puede ver un comportamiento tal que los parámetros indicados para una biorremediación efectiva según la respiración basal son a 42.5 g kg⁻¹ de diésel y 0.1*10⁸ UFC/kg de bacteria (Tabla 35). A pesar de que se muestra a más dosis de diésel, mayor RB y en el caso de la bacteria; mayor dosis de bacteria, menor RB. La estadística revela significancia en la dosis de diésel y en la interacción. Y es en la interacción donde se obtiene la relación inicial mostrada.

En contrario a lo que indica Benavides et al (2006), las *Pseudomonas fluorescens* no degradaron naftalenos en gran medida ni la *Pseudomonas putida* tuvo un comportamiento oportunista. La *Pseudomonas putida* tampoco pudo degradar los hidrocarburos aromáticos presentes en el diésel en un 25% como indicaba Benavides et al (2006).

De igual manera, se contradice lo mencionado en Bracho et al (2004), sobre el efecto de las *Pseudomonas* de poder degradar naftaleno, antraceno, fenantreno y DBT.

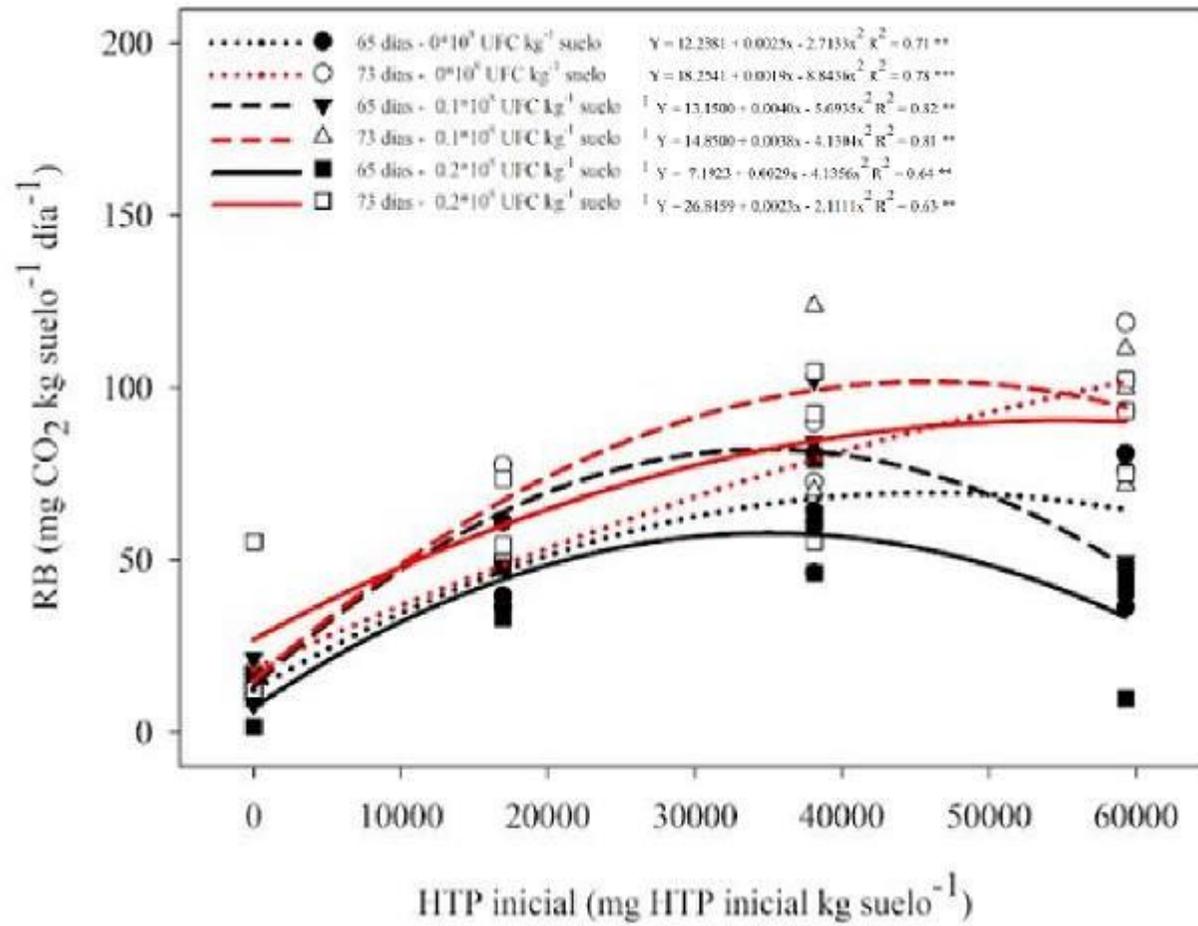
Como lo cita Conde et al (2021), la acción degradadora de las bacterias *Pseudomonas* se evidenció en gran escala cuando se usa un biorreactor. Tal vez éste sea el camino adecuado para resultados más eficientes.

4.4 Correlación entre respiración basal y dosis inicial de diésel

En la Figura 28, se observa la relación entre la respiración basal (a 65 y 73 días de biorremediación) y las dosis de diésel (0 g kg^{-1} , 21.25 g kg^{-1} , 42.5 g kg^{-1} y 85 g kg^{-1} expresados en mg kgsuelo^{-1}). Además, de considerar $0 \cdot 10^8 \text{ UFC/kg}$, $0.1 \cdot 10^8 \text{ UFC/kg}$ y $0.2 \cdot 10^8 \text{ UFC/kg}$ de bacteria (*Bacniphos*).

Figura 28

Correlación entre TPH inicial y respiración basal



Nota. ** = $P < 0.01$ = muy significativo, *** = $P < 0.001$ = altamente significativo

En la línea punteada de color negro (primera línea), que corresponde a los 65 días de respiración basal y sin presencia de bacteria, se observa que la respiración basal fue de 20-60 mgCO₂ kgsuelo⁻¹ día⁻¹ y después cayó hasta 55 mgCO₂ kgsuelo⁻¹ día⁻¹ aproximadamente, ajustándose a la ecuación cuadrática $Y = 12.2381 + 0.0025X - 2.7133X^2 R^2 = 0.71^{**}$, donde los tratamientos presentan una diferencia muy significativa ($P < 0.01$). Se muestra una correlación o grado de afinidad de $R = 0.87$.

En la línea punteada de color rojo (segunda línea), que corresponde a los 73 días de respiración basal y sin presencia de bacteria, se observa que la respiración basal fue de 30-95 mgCO₂ kgsuelo⁻¹ día⁻¹ y siendo de las pocas líneas que no mostró caída, ajustándose a la ecuación cuadrática $Y = 18.2541 + 0.0019X - 8.8436X^2 R^2 = 0.78^{***}$ donde los tratamientos presentan una diferencia altamente significativa ($P < 0.001$). Se muestra una correlación grado de afinidad de $R = 0.91$.

En la línea de rayas de color negro (tercera línea), que corresponde a los 65 días de respiración basal y con $0.1 \cdot 10^8$ UFC/kg de bacteria, se observa que la respiración basal fue de 20-70 mgCO₂ kgsuelo⁻¹ día⁻¹ y después cayó hasta 50 mgCO₂ kgsuelo⁻¹ día⁻¹ aproximadamente, ajustándose a la ecuación cuadrática $Y = 13.1500 + 0.0040X - 5.6935X^2 R^2 = 0.82^{**}$ donde los tratamientos presentan una diferencia muy significativa ($P < 0.01$). Se muestra una correlación grado de afinidad de $R = 0.93$.

En la línea de rayas de color rojo (cuarta línea), que corresponde a los 73 días de respiración basal y con $0.1 \cdot 10^8$ UFC/kg de bacteria, se observa que la respiración basal fue de 20-100 mgCO₂ kgsuelo⁻¹ día⁻¹ y después cayó hasta 90 mgCO₂ kgsuelo⁻¹ día⁻¹ aproximadamente, ajustándose a la ecuación cuadrática $Y = 14.8500 + 0.0038X - 4.1304X^2 R^2 = 0.81^{**}$ donde los tratamientos presentan una diferencia muy significativa ($P < 0.01$). Se muestra una correlación grado de afinidad de $R = 0.92$.

En la línea de color negro (quinta línea), que corresponde a los 65 días de respiración basal y con $0.2 \cdot 10^8$ UFC/kg de bacteria, se observa que la respiración basal fue de 10-60 mgCO₂ kgsuelo⁻¹ día⁻¹ y después cayó hasta 30 mgCO₂ kgsuelo⁻¹ día⁻¹ aproximadamente, ajustándose a la ecuación cuadrática $Y = 7.1923 + 0.0029X - 4.1356X^2 R^2 = 0.64^{**}$ donde los tratamientos presentan una diferencia muy significativa ($P < 0.01$). Se muestra una correlación grado de afinidad de $R = 0.84$.

En la línea de color rojo (sexta línea), que corresponde a los 73 días de respiración basal y con $0.2 \cdot 10^8$ UFC/kg de bacteria, se observa que la respiración basal fue de 30-80 mgCO₂ kgsuelo⁻¹ día⁻¹ y siendo de las pocas líneas que no mostró caída, ajustándose a la ecuación cuadrática $Y = 26.8459 + 0.0023X - 2.111X^2$ $R^2 = 0.63^{**}$ donde los tratamientos presentan una diferencia muy significativa ($P < 0.01$). Se muestra una correlación grado de afinidad de $R = 0.84$.

Por tanto, se puede concluir que existe correlación entre las variables dosis inicial de diésel y respiración basal del 89% en promedio: dicha correlación es positiva hasta el punto máximo de la curva y después negativa.

En términos generales se puede apreciar que mientras los valores de TPH ascienden, la respiración basal incrementa hasta un máximo y luego cae. Lo que los puntos se ajustan a un modelo cuadrático, tal como lo indica el R^2 .

A más días de incubación, la respiración basal tendió a ser mayor (en un rango de 20 a 80 mgCO₂ kgsuelo⁻¹ día⁻¹). De igual manera, se observa que, a más presencia de *Pseudomonas*, existe mayor respiración basal.

Por las curvas crecientes de las ecuaciones cuadráticas se tiene que, a mayor TPH dará un mayor RB. No obstante, esta tendencia llega a un punto máximo en la gran mayoría de curvas y decae, creando una curva decreciente. Esta nueva tendencia expresa que a mayor TPH menor RB desde el punto máximo alcanzado.

De acuerdo a la curva, las ratios de RB, con el tiempo deben incrementarse y luego caer a causa de los sustratos. Esta tendencia está muy bien explicada en *Microbiological methods for assessing soil quality* (2006).

CONCLUSIONES

1. Se demostró la capacidad de biorremediación mediante bioaugmentación de cepas de las bacterias *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida* en los suelos contaminados con diésel B5 S-50 en una parcela de la Facultad de Agronomía de la UNALM, dentro de las condiciones operativas y sus niveles (dosis de diésel de 0-85 g kg⁻¹ y la dosis de bacteria 0-0.2*10⁸ UFC/kg).
2. Las características fisicoquímicas del suelo de una parcela de la Facultad de Agronomía de la UNALM demuestran que es franco arenoso con poca fertilidad. Por otra parte, el agua de riego muestra es ligeramente alcalino y poco salino, siendo adecuado para el riego.
3. La degradación de diésel por *Pseudomona putida* y *Pseudomona fluorescens* (Bacniphos) evaluado por TPH tuvo una eficiencia en el rango de 70- 94.03%. Considerando la dosis de diésel de 0-85 g kg⁻¹ y la dosis de bacteria 0-0.2*10⁸ UFC/kg. Lo cual alcanzó disminuir la dosis de diésel en el suelo.
4. La degradación de diésel por *Pseudomona putida* y *Pseudomona fluorescens* (Bacniphos) evaluado por respiración basal llegó hasta valores de 104 mgCO₂ kgsuelo⁻¹ día⁻¹ en una escala de 0-200 mgCO₂ kgsuelo⁻¹ día⁻¹. Considerando la dosis de diésel de 0-85 g kg⁻¹ y la dosis de bacteria 0-0.2*10⁸ UFC/kg. Lo cual alcanzó disminuir la dosis de diésel en el suelo comprobándose así la presencia CO₂ en las macetas. Esto corroboró la actividad microbiana en ellas proveniente notoriamente más del ambiente natural que de la inoculación. Dando la adición de diésel, mayor alimento para las bacterias.
5. La correlación positiva entre las variables dosis inicial de diésel y respiración basal fue del 89% en promedio. Se observó que, a más cantidad de diésel menor cantidad de TPH removido pero mayor respiración basal. En 21.25 g diésel kg⁻¹ de diésel y 0.2*10⁸ UFC/kg de bacteria, el %TPHe fue eficiente, un 94.03%. Sin embargo, respecto a la respiración basal (RB), la mejor relación fue de 42.5 g diésel kg⁻¹ de diésel y 0.1*10⁸ UFC/kg de bacteria obteniendo 81.4 mg CO₂ kg suelo⁻¹ día⁻¹.
6. La dosis de diésel B5 S-50 ocupa un lugar significativo (P<0.05) en la biorremediación de suelos según los estudios estadísticos de los hidrocarburos totales de petróleo (TPH) y en respiración basal (RB).
7. El efecto de la dosis de las bacterias *Pseudomona putida* y *Pseudomona fluorescens* (Bacniphos) en las dosis de 0, 0.05, 0.1 y 0.2*10⁸ UFC/kg estadísticamente no son significativas en el proceso de biorremediación de suelos contaminados con diésel.

RECOMENDACIONES

1. Utilizar suelos contaminados y no necesariamente contaminarlos sintéticamente. Esto con fines ambientales e investigativos. La desventaja es que no es fácil conseguir los suelos contaminados de las empresas del rubro.
2. Seguidamente, realizar los análisis para saber que hidrocarburos posee el suelo contaminado. Este análisis tiene un alto precio, pero valioso para un buen punto de partida.
3. Utilizar otras bacterias y/o hongos para la biorremediación ya que también existen otras cepas con excelentes capacidades de biorremediación.
4. Probar con distintas dosis de bacterias. Se recomienda una alta dosis de bacteria para altas dosis de hidrocarburo presente.
5. Realizar más lecturas de respiración basal para una mejor investigación y resultados eficientes.
6. La biorremediación de suelos será más efectiva mientras más prolongado sea el tiempo de biorremediación.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alcántara y Llatas (2018). *Efecto del estiércol de Cavia Porcellus en el potencial de malezas para la remediación de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo.*
- Alvarez y Polti. (2014). *Bioremediation in Latin America.* Springer.
<https://link.springer.com/content/pdf/bfm:978-3-319-05738-5/1.pdf>
- Bastidas y Cedeño. (2016). Comparación de eficiencia entre *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas putida*, y su masificación para la remediación de hidrocarburos totales de petróleo en los pasivos ambientales de aq-lab en Puerto Francisco de Orellana. *Journal of Mathematical Sciences*, 139(3), 6520–6534.
<http://dspace.espace.edu.ec/handle/123456789/5660>
- Bhadha et al. (2017). Raising Soil Organic Matter Content to Improve Water Holding Capacity. *Edis*, 2017(5), 1–5. <https://doi.org/10.32473/edis-ss661-2017>
- Boon et al. (2000). Bioaugmentation of activated sludge by an indigenous 3-chloroaniline-degrading *Comamonas testosteroni* strain, I2gfp. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7), 2906–2913. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.7.2906-2913.2000>
- Buendía. (2012). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos mediante el compost de aserrín y estiércol. *Revista Del Instituto de Investigación de La Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalurgica y Geográfica*, 15(30), 123–130.
- Campian. (2018). Reducción de aceite dieléctrico en el suelo contaminado utilizando las cepas de *Penicillium Janthinellum* asociado con bagazo de la caña de azúcar en Shangrilla, Puente Piedra – 2018. *Universidad César Vallejo.*
<https://repositorio.ucv.edu.pe/handle/20.500.12692/21085>
- Cerna. (2018). *Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos usando el hongo Penicillium janthinellum en los servicios generales de la UNALM.* Universidad Cesar Vallejo.
- Chan et al. (2014). *Directrices para la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos.*
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=456144902006>
- Chang. (2019). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburo mediada por *Pseudomonas spp.* en biorreactores. *Universidad Nacional Agraria de La Selva*, 13–84.
<http://repositorio.unas.edu.pe/handle/UNAS/1566>

- Congreso de la Republica del Perú. (2019). Ley Orgánica de Hidrocarburos. *NASPA Journal*, 42(4), 1.
- Europeana. (n.d.). *Pseudomonas putida*. Pseudomonas Putida (Trevisan 1889) Migula 1895. Retrieved September 25, 2024, from <https://www.europeana.eu/es/item/11637/PROKARYAXDSMZGGERMANYXDSMX26234>
- García et al. (2019). *Microbiología y bioquímica del suelo - guía de prácticas*.
- Gavilánez. (2013). *Determinación de la biodiversidad bacteriana presente en suelos contaminados con hidrocarburos para uso potencial en biorremediación*. UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO.
- Gonzales. (2018). Estudio De La Contaminación De Suelos Por Residuos De Hidrocarburos Y Propuesta De Manejo Ambiental De Los Talleres De Mecanica Automotriz Del Distrito De San Jerónimo-Cusco. *Universidad San Agustin de Arequipa*, 1, 1–188. <http://bibliotecas.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/6544/CFMgobejf.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- González, J., Cervantes, G., Sánchez-Cohen, I., López-Santos, A., Valenzuela-Núñez, L. M., González-Barrios, J. L., González-Cervantes, G., Sánchez-Cohen, I., López-Santos, A., & Valenzuela-Núñez, L. M. (2011). Terra : organo oficial de divulgación de la Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A.C. *Terra Latinoamericana*, 29(4), 369–377. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-57792011000400369&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Hernandez y Ruiz. (2017). *Secuencia de enseñanza-aprendizaje relacionada con el proceso de biorremediación de suelos contaminados con mercurio para el desarrollo actitudinal con enfoque cts*.
- Iturbe. (2010). *¿Qué es la biorremediación?* (Issue 1).
- León & Velásquez. (2022). Eficiencia degradadora de hidrocarburos por Pseudomona putida y Pseudomona fluorescens en suelos contaminados por talleres mecánicos en Carabayllo, 2022. *Repositorio Institucional - UCV*. <https://repositorio.ucv.edu.pe/handle/20.500.12692/99457>
- Marin. (2016). Crecimiento de plantas de maíz (*Zea mays*) en un suelo contaminado con

- petróleo y remediado con extracto de cáscaras de naranja (*Citrus sinensis*). *Enfoque UTE*, 7(3), 1–13. <https://doi.org/10.29019/ENFOQUEUTE.V7N3.101>
- Martinez Reina, A. M., Salcedo, S., Tordecilla Zumaqué, L., Osorio Almanza, L., & Burbano Figueroa, O. (2018). Ventajas de incorporar nuevas variedades al cultivo del algodón en el Valle del Sinú. *Temas Agrarios*, 23(2), 188–199. <https://doi.org/10.21897/rta.v23i2.1302>
- Martinez y Ortega. (2022). *La respiración es un indicador sensible e integrador de la calidad de suelos. Qué factores inciden y cómo se mide - Mundoagro*. La Respiración Es Un Indicador Sensible e Integrador de La Calidad de Suelos. Qué Factores Inciden y Cómo Se Mide. <https://mundoagro.cl/la-respiracion-es-un-indicador-sensible-e-integrador-de-la-calidad-de-suelos-que-factores-inciden-y-como-se-mide/>
- Meneses. (2014). Biorremediación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en microcosmos de suelo a campo abierto. *Universidad Politécnica Salesiana, Cuenca, Ecuador*, 1–121. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/8974/1/UPS-CT005259.pdf>
- MINAM. (2010). *Calidad Ambiental*. 1–374. <http://www.ambiente.gob.ec/calidad-ambiental/>
- MINAM. (2014). Guía para muestreo de suelos. *D.S. N° 002-2013-Minam*, 38. http://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2014/04/GUIA-MUESTREO-SUELO_MINAM1.pdf
- Moosavi y Seghatoleslami. (2013). *Phytoremediation: A review*.
- Nasrawi, H. Al. (2012). Biodegradation of Crude Oil by Fungi Isolated from Gulf of Mexico. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 03(04). <https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000147>
- Obispo y Ramos. (2019). Biorremediación mediante el uso de *Auricularia* sp. en suelo agrícola contaminado por petróleo analizando la fracción 2 y 3 de hidrocarburo desarrollado en la Universidad Nacional del Callao. *Estrategia De Intervencion De Enfermeria En Estimulacion Temprana En Niños Menores De 3 Años Aplicado En La Familia, Andahuaylas - Apurimac*, 37. <http://hdl.handle.net/20.500.12952/5053>
- OEFA. (2015). Instrumentos basicos para la fiscalizacion ambiental. *Organismo de Evaluación Fiscalización Ambiental*, 29. https://www.oefa.gob.pe/?wpfb_dl=13978
- Peñalver et al. (1994). Characterisation and pathogenicity of bacteria from shoot tips of the

- globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Annals of Applied Biology*, 125(3), 501–513.
<https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1994.tb04987.x>
- Pérez. (2018). *Evaluación de la biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos utilizando pseudomonas fluorescens*.
- Rodríguez et al. (2019). La contaminación del suelo: una realidad oculta. In *Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura FAO*.
<http://www.fao.org/3/I9183ES/i9183es.pdf>
- Rodríguez et al. (2012). *Comparación entre bioestimulación y bioaumentación para la recuperación de suelos contaminados con diesel*.
- Romero et al. (2009). *Bioingeniería y suelo: abundancia microbológica, ph y conductividad eléctrica bajo tres estratos de erosión*.
- Saval. (1999). Exitos y fracasos de la remediación de suelos en sitios contaminados con hidrocarburos. *Siebe C. Conservación y Restauración, México*, 17.
https://www.academia.edu/1017281/Exitos_y_fracasos_de_la_remediación_de_suelos_en_sitios_contaminados_con_hidrocarburos
- Simbaña. (2016). *Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos de la parroquia Taracoa en Francisco de Orellana, mediante el hongo Pleurotus Ostreatus*. ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.
- Speight y Arjoon. (2012). *Bioremediation of Petroleum and Petroleum Products*.
- Universidad Nacional de la Plata. (n.d.). *El suelo: un universo invisible*.
- USDA. (n.d.). *Home / Natural Resources Conservation Service*. Retrieved November 18, 2024, from <https://www.nrcs.usda.gov/>
- Vallejo et al. (2010). *Aplicación de sales de Tetrazolio de nueva generación (xtt) para la estimación de la densidad de microorganismos degradadores de hidrocarburos empleando la técnica del número más probable*.
- Velasco y Volke. (2003). *El composteo: una alternativa tecnológica para la biorremediación de suelos en México*.
- Volke et al. (2020). *Pseudomonas putida*. *Trends in Microbiology*, 28(6), 512–513.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.02.015>

Xu y Obbard. (2004). Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Oil-Contaminated Beach Sediments Treated with Nutrient Amendments. *Journal of Environment Quality*, 33(3), 861. <https://doi.org/10.2134/jeq2004.0861>

ANEXOS

Anexo 1. Hoja de seguridad Consorcio Microbiano Bacniphos (parte 1)

BACNIPHOS

**BIOFERTILIZANTE EN CONSORCIO MICROBIANO
PARA COADYUVAR LOS PROGRAMAS
DE FERTILIZACIÓN Y NUTRICIÓN RADICULAR**

BACNIPHOS es un formulado biotecnológico obtenido mediante un proceso fermentativo FPB® (Fermentation Polyphasic Biotechnology) que contiene en su formulación la novedosa tecnología MAMPs Enhancer Technology®, elicidores moleculares metabólicos que actúan como moléculas de señal en la comunicación "planta-microorganismo".

BACNIPHOS es un biofertilizante promotor del crecimiento vegetal formulado a base de microorganismos y sus metabolitos naturales que incrementan la disponibilidad del fósforo, garantizando mejoras en el desarrollo radicular, vegetativo y en el rendimiento final del cultivo.

BACNIPHOS actúa como solubilizador de fósforo. Sus bacterias son capaces de crecer en medios con Fosfato tricálcico, apatita o materiales insolubles similares como única fuente de fosfato. Asimismo no sólo asimilan el elemento sino que solubilizan una gran proporción del mismo, liberándolo en cantidades superiores a sus demandas nutricionales.



COMPOSICIÓN

<i>Pseudomonas putida</i> cepa AMCB38	: $\geq 10^8$ ufc/ml
<i>Pseudomonas fluorescens</i> cepa AMCB54	: $\geq 10^8$ ufc/ml

BACNIPHOS está libre de agroquímicos que puedan afectar su calidad como producto orgánico y/o ecológico.



Certificado por:



Nota. Novalty S.A.C.

Anexo 2. Hoja de seguridad Consorcio Microbiano Bacniphos (parte 2)

PROPIEDADES FÍSICAS / QUÍMICAS

Estado	: Suspensión concentrada (SC)
Color	: Blanco
Olor	: Característico
Solubilidad	: 100 % soluble en agua
Estabilidad	: Estable bajo condiciones normales de temperatura, humedad y luminosidad.
Densidad	: 1.0 ± 0.05 g/ml
pH (0.1%)	: 7.0 ± 0.5

ALMACENAMIENTO Y SEGURIDAD

Se deben cumplir las buenas prácticas agrícolas exigidas por la autoridad nacional.

<https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2014/12GUIA-DE-BUENAS-PRACTICAS-AGRICOLAS.pdf>

COMPATIBILIDAD

BACNIPHOS es compatible con la mayoría de pesticidas y fertilizantes de uso agrícola, recomendando tener cuidado con aquellos productos de reacción alcalina.

Se sugiere realizar pruebas de compatibilidad en cantidades pequeñas.

GARANTÍA Y LÍMITES DE RESPONSABILIDAD

NOVALTY S.A.C. garantiza que este producto cumple con las características descritas en esta ficha técnica. Un almacenamiento inadecuado del producto, la omisión de las recomendaciones en esta ficha técnica o sin un anexo escrito que la acompañe escapan al control, responsabilidad y garantías.

Cualquier consulta con respecto a las características, análisis, certificados de uso equivalente para agricultura orgánica de algún producto y a fin de garantizar el adecuado uso del mismo, los usuarios interesados deben solicitar la información completa al correo:

opcomercial@novaltyperu.com y calidad@novaltyperu.com.

 Ningún tercero está autorizado a dar otras garantías adicionales.

Nota.NovaltyS.A.C.

Anexo 3. Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Suelo.

Parámetros en mg/kg PS ⁽²⁾	Usos del Suelo ⁽¹⁾			Métodos de ensayo ^{(7) y (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 ⁽⁹⁾ EPA 8021
Tolueno	0,37	0,37	0,37	EPA 8260 EPA 8021
Etilbenceno	0,082	0,082	0,082	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

Nota. D.S. N° 011-2017-MINAM

Anexo 4. Method 8015 C: método usado en el analisis de TPH en Slab Perú.

METHOD 8015C

NONHALOGENATED ORGANICS BY GAS CHROMATOGRAPHY

SW-846 is not intended to be an analytical training manual. Therefore, method procedures are written based on the assumption that they will be performed by analysts who are formally trained in at least the basic principles of chemical analysis and in the use of the subject technology.

In addition, SW-846 methods, with the exception of required method use for the analysis of method-defined parameters, are intended to be guidance methods which contain general information on how to perform an analytical procedure or technique which a laboratory can use as a basic starting point for generating its own detailed Standard Operating Procedure (SOP), either for its own general use or for a specific project application. The performance data included in this method are for guidance purposes only, and are not intended to be and must not be used as absolute QC acceptance criteria for purposes of laboratory accreditation.

1.0 SCOPE AND APPLICATION

1.1 This method may be used to determine the concentrations of various nonhalogenated volatile organic compounds and semivolatile organic compounds by gas chromatography. The following RCRA compounds were quantitatively determined by this method, using the preparative techniques indicated.

APENDICES***Apéndice 1. Resultados análisis TPH inicial.***

Código de Laboratorio	Parámetro	Unidad	LCM	Resultados
S-1884	Hidrocarburos Totales de Petróleo - Fracción 2 (>C10-C28)	mg/Kg	N.A.	16947.84
S-1885	Hidrocarburos Totales de Petróleo - Fracción 2 (>C10-C28)	mg/Kg	N.A.	59285.57

Nota. Slab Perú S.A.C.

Apéndice 2. Resultados análisis TPH final.

Código de Laboratorio	Parámetro	Unidad	LCM	Resultados
S-3339	Hidrocarburos Totales de Petróleo Fracción 2 (>C10-C28)	mg/Kg	N.A.	1245.07
S-3340	Hidrocarburos Totales de Petróleo Fracción 2 (>C10-C28)	mg/Kg	N.A.	1012.29
S-3341	Hidrocarburos Totales de Petróleo Fracción 2 (>C10-C28)	mg/Kg	N.A.	6252.31
S-3342	Hidrocarburos Totales de Petróleo Fracción 2 (>C10-C28)	mg/Kg	N.A.	5242.00
S-3343	Hidrocarburos Totales de Petróleo Fracción 2 (>C10-C28)	mg/Kg	N.A.	2815.15
S-3344	Hidrocarburos Totales de Petróleo Fracción 2 (>C10-C28)	mg/Kg	N.A.	17866.18
S-3345	Hidrocarburos Totales de Petróleo Fracción 2 (>C10-C28)	mg/Kg	N.A.	17279.10
S-3346	Hidrocarburos Totales de Petróleo Fracción 2 (>C10-C28)	mg/Kg	N.A.	15943.48

Nota. Slab Perú S.A.C.

Apéndice 3. Resultados análisis fisicoquímico del suelo- LASPAF



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
FACULTAD DE AGRONOMIA - DEPARTAMENTO DE SUELOS
LABORATORIO DE ANALISIS DE SUELOS, PLANTAS, AGUAS Y FERTILIZANTES



ANALISIS DE SUELOS : CARACTERIZACION

Solicitante : AURORA MILENA ALVAREZ BARRIGA

Departamento : LIMA
Distrito : LA MOLINA
Referencia : H.R. 83667-141C-24

Bolt.: 6846

Provincia : LIMA
Predio : CONSAS
Fecha : 12/09/2024

Número de Muestra Lab	Claves	pH (1:1)	C.E. (1:1) eS/m	CaCO ₃ %	M.O. %	P ppm	K ppm	Análisis Mecánico			Clase Textural	CIC	Cationes Cambiables					Suma de Cationes	Suma de Bases	% Sat. De Bases
								Arena %	Limo %	Arcilla %			Ca ⁺²	Mg ⁺²	K ⁺	Na ⁺	Al ⁺³ + H ⁺			
7581		7.29	10.78	3.67	1.22	3.2	287	60	26	14	Fr.A.	6.80	4.30	1.65	0.66	0.19	0.00	6.80	6.80	100

A = Arena ; A.Fr. = Arena Franca ; Fr.A. = Franco Arenoso ; Fr. = Franco ; Fr.L. = Franco Limoso ; L = Limoso ; Fr.Ar.A. = Franco Arcillo Arenoso ; Fr.Ar. = Franco Arcilloso ; Fr.Ar.L. = Franco Arcillo Limoso ; Ar.A. = Arcillo Arenoso ; Ar.L. = Arcillo Limoso ; Ar. = Arcilloso



Lily Tello Peramás
Dra. Lily Tello Peramás
Jefa del Laboratorio

Nota. Se realizó una corrección en los valores de C.E. y CIC presentados en los resultados a los valores de C.E.= 9.33 dS/m y CIC= 7.2 por parte del laboratorio de LASPAF-UNALM

Apéndice 4. Resultados análisis fisicoquímico del suelo- LASPAF (parte 2)

MÉTODOS SEGUIDOS EN EL ANÁLISIS DE SUELOS

1. Textura de suelo: % de arena, limo y arcilla; método del hidrómetro.
2. Salinidad: medida de la conductividad eléctrica (CE) del extracto acuoso en la relación suelo: agua 1:1 o en el extracto de la pasta de saturación(es).
3. PH: medida en el potenciómetro de la suspensión suelo: agua relación 1:1 o en suspensión suelo: KCl N, relación 1:2.5.
4. Calcario total (CaCO₃): método gaso-volumétrico utilizando un calcímetro.
5. Materia orgánica: método de Walkley y Black, oxidación del carbono orgánico con dicromato de potasio. %M.O.=Cx1.724.
6. Nitrogeno total: método del micro-Kjeldahl.
7. Fósforo disponible: método del Olsen modificado, extracción con NaHCO₃=0.5M, pH 8.5.
8. Potasio disponible: extracción con acetato de amonio (CH₃ - COONH₄)N, pH 7.0.
9. Capacidad de intercambio catiónico (CIC): saturación con acetato de amonio (CH₃ - COONH₄)N; pH 7.0.
10. Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺, K⁺ cambiables: reemplazamiento con acetato de amonio (CH₃ - COONH₄)N; pH 7.0 cuantificación por fotometría de llama y/o absorción atómica.
11. Al³⁺+ H⁺: método de Yuan, Extracción con KCl, N
12. Iones solubles:
 - a) Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺, Na⁺ solubles: fotometría de llama y/o absorción atómica.
 - b) Cl, Co₃, HCO₃⁻, NO₃ solubles: volumetría y colorimetría. SO₄ turbidimetría con cloruro de Bario.
 - c) Boro soluble: extracción con agua, cuantificación con curcumina.
 - d) Yeso soluble: solubilización con agua y precipitación con acetona.

Equivalencias:

- 1 ppm=1 mg/kilogramo
 1 millimho (mmho/cm) = 1 deciSiemens/metro
 1 miliequivalente / 100 g = 1 cmol(+)/kg
 Sales solubles totales (TDS) en ppm ó mg/kg = 640 x CEes
 CE (1 : 1) mmho/cm x 2 = CE(es) mmho/cm

TABLA DE INTERPRETACION

Salinidad		Materia Orgánica	Fósforo disponible	Potasio disponible	Relaciones Catiónicas			
Clasificación del Suelo	CE(es)	CLASIFICACIÓN	%	ppm P	ppm K	Clasificación	K/Mg	Ca/Mg
*muy ligeramente salino	<2	*bajo	<2.0	<7.0	<100	*Normal	0.2 - 0.3	5 - 9
*ligeramente salino	2 - 4	*medio	2 - 4	7.0 - 14.0	100 - 240	*defc. Mg	>0.5	
*moderadamente salino	4 - 8	*alto	>4.0	>14.0	>240	*defc. K	>0.2	
*fuertemente salino	>8					*defc. Mg		>10

Reacción o pH		CLASES TEXTURALES		Distribución de Cationes %		
Clasificación del Suelo	pH	A = arena	Fr.Ar.A = franco arcillo arenoso	Ca ²⁺	=	60 - 75
*fuertemente ácido	<5.5	A.Fr = arena franca	Fr.Ar = franco arcilloso	Mg ²⁺	=	15 - 20
*moderadamente ácido	5.6 - 6.0	Fr.A = franco arenoso	Fr.Ar.L = franco arcilloso limoso	K ⁺	=	3 - 7
*ligeramente ácido	6.1 - 6.5	Fr. = franco	Ar.A = arcilloso arenoso	Na ⁺	=	<15
*neutro	6.6 - 7.0	Fr.L = franco limoso	Ar.L = arcilloso limoso			
*ligeramente alcalino	7.1 - 7.8	L = limoso	Ar. = arcilloso			
*moderadamente alcalino	7.9 - 8.4					
*fuertemente alcalino	>8.5					