



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado
Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y
Geográfica
Unidad de Posgrado

**Biorremediación de suelos arenosos contaminados con
petróleo crudo, utilizando consorcio bacteriano
(*Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y
Agrobacterium tumefaciens)**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Doctora en Ciencias
Ambientales

AUTOR

Jaqueline Heidy CHIRRE FLORES

ASESOR

Dr. Francisco Alejandro ALCÁNTARA BOZA

Lima, Perú

2025



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Chirre, J. (2025). *Biorremediación de suelos arenosos contaminados con petróleo crudo, utilizando consorcio bacteriano (*Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Agrobacterium tumefaciens*)*. [Tesis de doctorado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica, Unidad de Posgrado]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Jaqueline Heidy Chirre Flores
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	41954449
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-3104-3938
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Francisco Alejandro Alcántara Boza
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	27074721
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-9127-4450
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Jorge Leonardo Jave Nakayo
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	25454259
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Walter Javier Díaz Cartagena
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	25726173
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Carlos Francisco Cabrera Carranza
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	17402784
Datos de investigación	

Línea de investigación	2.08.02 -- Biorremediación, Biotecnologías de diagnóstico en la gestión ambiental
Grupo de investigación	No aplica.
Agencia de financiamiento	Proyecto de Investigación de Vicerrectorado de Investigación-Universidad Nacional de Ingeniería.
Ubicación geográfica de la investigación	País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Rímac Avenida: Túpac Amaru N° 210 Latitud: 12°01'11"S Longitud: 77°02'55"O
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2023-2024
URL de disciplinas OCDE	Biorremediación, Biotecnologías de diagnóstico en la gestión ambiental https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.08.02



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

SUSTENTACIÓN PÚBLICA

En la Universidad Nacional Mayor de San Marcos - Lima, a los diecinueve días del mes de agosto del año dos mil veinticinco, siendo las diez horas, se reúnen los suscritos Miembros del Jurado Examinador de Tesis, nombrado mediante Dictamen Nº 000222-2025-UPG-VDIP-FIGMMG/UNMSM del 15 de agosto del 2025, con la finalidad de evaluar la sustentación oral de la siguiente tesis:

TÍTULO

«BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS ARENOSOS CONTAMINADOS CON PETRÓLEO CRUDO, UTILIZANDO CONSORCIO BACTERIANO (*Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Agrobacterium tumefaciens*)»

Presentado por la Mg. **JAQUELINE HEIDY CHIRRE FLORES**, para optar el **GRADO ACADÉMICO DE DOCTORA** en **CIENCIAS AMBIENTALES**.

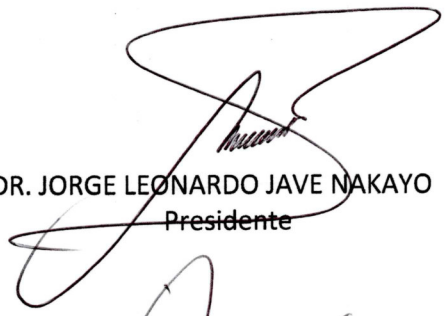
El Secretario del Jurado Examinador de la Tesis, analiza el expediente Nº UNMSM-20230096748, de fecha 21 de octubre del 2023, en el marco legal y Estatutario de la Ley Universitaria, acreditando que tiene todos los documentos y que cumplió con las etapas del trámite según el «Reglamento General de Estudios de Posgrado», aprobado con Resolución Rectoral Nº 04790-R-18 del 08 de agosto del 2018.

Luego de la Sustentación, se procede con la calificación de la Tesis, de acuerdo al procedimiento respectivo y se registra en el acta correspondiente de conformidad al Art. 72 del precitado Reglamento, correspondiéndole al graduando la siguiente calificación:

Muy Bueno (17)

Habiendo sido aprobada la sustentación de la Tesis, el Presidente recomienda a la Facultad se le otorgue el **GRADO ACADÉMICO DE DOCTORA** en **CIENCIAS AMBIENTALES** a la Mg. **JAQUELINE HEIDY CHIRRE FLORES**.

Siendo las 11:00 horas, se dio por concluido al acto académico.


DR. JORGE LEONARDO JAVE NAKAYO
Presidente


DR. WALTER JAVIER DÍAZ CARTAGENA
secretario


DR. CARLOS FRANCISCO CABRERA CARRANZA
Miembro


DR. FRANCISCO ALEJANDRO ALCÁNTARA BOZA
Asesor



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE

SAN MARCOS

Universidad del Perú, Decana de América

Anexo 1

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, DR. FRANCISCO ALEJANDRO ALCÁNTARA BOZA en mi condición de asesor acreditado con el Dictamen de la **UPG** o de la EP N° 000057-2024-UPG-VDIP-FIGMMG/UNMSM de la tesis/ monografía/ informe de investigación/trabajo académico, cuyo título es «**BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS ARENOSOS CONTAMINADOS CON PETRÓLEO CRUDO, UTILIZANDO CONSORCIO BACTERIANO (*Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Agrobacterium tumefaciens*)**», presentado por la bachiller/ **magíster**/ egresado/ licenciado/ estudiante JAQUELINE HEIDY CHIRRE FLORES, para optar el grado académico* de/ título*/ especialidad en DOCTORA EN CIENCIAS AMBIENTALES, **CERTIFICO** que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante la plataforma PIDS, el documento evaluado cuenta con el **18%** de similitud, nivel **PERMITIDO** para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional**.

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del grado académico*/ título*/ especialidad* DOCTORA EN CIENCIAS AMBIENTALES.

Lima, 20 de Junio de 2025

Firma del Asesor

Nombres y Apellidos del asesor: Francisco Alejandro Alcántara Boza

DNI: 27074721

* Según corresponda: bachiller, magíster, doctor; título profesional o título de segunda especialidad

La vigencia del presente certificado corresponde a un período de noventa (90) días desde la fecha de su emisión; siempre que no haya observaciones en el texto durante el proceso de revisión por el jurado informante o surja alguna contingencia.

DEDICATORIA

A mi padre Palermo Benigno Chirre Galarza y a mi madre Rosaura Flores Castro, que me impulsan y motivan a seguir cumpliendo mis objetivos y metas, a mis hermanos y amistades, por sus consejos y apoyo incondicional para el logro de mi tesis.

A mis profesores de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y a mis compañeros de la Universidad Nacional de Ingeniería por sus conocimientos valiosos, apoyo y asesoramiento de la tesis.

AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a Dios por darme vida y fortaleza para lograr mis objetivos, a mis padres y hermanos por su apoyo completo y constante.

A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por permitirme presentar esta tesis a favor del desarrollo del país.

A mi asesor de tesis, Dr. Francisco Alejandro Alcántara Boza, por sus importantes aportes, conocimientos y experiencia para el logro de la tesis.

Agradezco a los profesores Dr. Jorge Leonardo Jave Nakayo y Dr. Walter Javier Díaz Cartagena, al Dr. Carlos Cabrera Carranza, Dr. Oscar Rafael Tinoco Gómez, Dr. Elmer Benites Alfaro, de la Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica por sus enseñanzas y amplia experiencia para el término de la tesis.

Además, agradezco a todos mis amistades que colaboraron en la realización de esta tesis de doctorado.

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Situación Problemática	1
1.2 Formulación del Problema	2
1.3 Justificación Teórica	3
1.4 Justificación Práctica	4
1.5 Objetivos	6
1.5.1 Objetivo General	6
1.5.2 Objetivos Específicos	6
1.5.3 Delimitación de la Investigación: Espacial y Temporal	6
CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO	8
2.1 Marco Filosófico o Epistemológico de la Investigación	8
2.2. Antecedentes de Investigación	10
2.2.1. Antecedentes Internacionales	10
2.2.2 Antecedentes Nacionales	14
2.3. Bases Teóricas	19
2.3.1 Consorcio Bacteriano	19
2.3.2 Biorremediación de Suelos Contaminados con Petróleo Crudo	21
2.3.2.1 Técnicas de Biorremediación.	21
2.3.2.2 Proceso de Biorremediación de Lodos Contaminados con Hidrocarburos.	22
2.3.2.3 La Degradación de Algunos Hidrocarburos Típicos del Petróleo.	24
2.3.2.4 Degradación de Hidrocarburos.	25
2.3.2.5 Variables que Influyen en la Biorremediación.	26
2.4. Marco Conceptual	29
CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA	32
3.1. Metodología	32
3.1.1. Tipo y Diseño de Investigación	32
3.2. Unidad de Análisis	32
3.3. Población y muestra	33
3.3.1. Población	33
3.3.2. Tamaño de la Muestra	33
3.3.3. Selección de la Muestra	33

3.4. Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos	34
3.4.1. Materiales y Métodos	34
3.4.1.1 Material Biológico	34
3.4.1.2 Características del Consorcio Ultra-Archaea.	35
3.4.2. Métodos de investigación	36
3.4.2.1 Caracterización de los insumos del procedimiento experimental.	36
3.4.2.2. Identificación de las Bacterias del Consorcio Bacteriano.	39
3.4.2.3. Análisis de la Cinética Microbiana de los Microorganismos Evaluados en la Degradación de Hidrocarburos en Terrarios.	43
3.4.2.4 Metodología del Procedimiento Experimental para la Determinación de HTP.	44
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
4.1. Análisis, Interpretación y Discusión de Resultados	61
4.2. Pruebas de Hipótesis	67
4.2.1. Hipótesis General	67
4.2.2. Hipótesis específicas	67
4.3. Presentación de resultados	68
4.3.1. Comportamiento e Identificación Degradativa del <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> y <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	68
4.3.2. Características del Consorcio: <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> y <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	72
4.3.3. Condiciones de Operación del Consorcio Bacteriano	83
4.3.4. Eficiencia de Biodegradación de Hidrocarburos	84
CONCLUSIONES	123
RECOMENDACIONES	124
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	126
ANEXOS	135

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1.</i> Características del suelo contaminado con HTP de petróleo crudo ligero y biorremediado, aproximadamente en 90 días con bioaumentación-bioestimulación.	16
<i>Tabla 2.</i> Parámetros fisicoquímicos de las fracciones de hidrocarburos totales de petróleo (HTP).	18
<i>Tabla 3.</i> Estándares de calidad ambiental (ECA) para suelo.	31
<i>Tabla 4.</i> Propiedades principales del petróleo crudo.	38
<i>Tabla 5.</i> Composición de los cuatro terrarios para el proceso de biorremediación de petróleo utilizando consorcio bacteriano.	48
<i>Tabla 6.</i> Parámetros fisicoquímicos de las fracciones de hidrocarburos totales de petróleo (HTP).	64
<i>Tabla 7.</i> Fracciones de HTP para los terrarios 1, 2, 3 y 4 después de 60 y 142 días por método cromatógrafo de gase y Soxhlet.	66
<i>Tabla 8.</i> Actividad oleofílica del consorcio bacteriano.	70
<i>Tabla 9.</i> Metodología de ensayo de TPH: Fracción hidrocarburos F1 (C6 – C10), F2 (C10 – C28) y F3 (C28 – C40).	85
<i>Tabla 10.</i> Resultados de ensayo de TPH: Fracción hidrocarburos F1 (C6 – C10), F2 (C10 – C28) y F3 (C28 – C40).	86
<i>Tabla 11.</i> Fracciones de HTP para los terrarios 1, 2, 3 y 4 después de 60 y 142 días.	89
<i>Tabla 12.</i> Análisis de suelo arenoso costero – Ventanilla.	94
<i>Tabla 13.</i> Propiedades principales del petróleo crudo.	96
<i>Tabla 14.</i> Medición de CO ₂ (ppm), pH y T(°C).	98

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Eliminación de aceite en el suelo en la parcela de control y la parcela tratada con biopreparado (barras: desviación estándar).	13
<i>Figura 2.</i> Porcentaje de reducción de HTP en 180 días, en cada terrario de experimentación.	17
<i>Figura 3.</i> Consorcio bacteriano liofilizado - Ultra Archaea. Ultratech International Inc. y aspecto de degradación de hidrocarburos.	35
<i>Figura 4.</i> Muestras de Petróleo Crudo – 2023.	39
<i>Figura 5.</i> Colonias de bacterias presuntivas de <i>Pseudomonas</i> en agar cetrimide.	40
<i>Figura 6.</i> Resultado del crecimiento por triplicado de cepas en agar mineralizado, 1 % de crudo de petróleo después de 7 días.	42
<i>Figura 7.</i> A: Colonias degradando el tween 80 presente en el medio sólido con micelas alrededor de la colonia. B: Colonia en el mismo agar, pero sin actividad hidrolítica.	43
<i>Figura 8.</i> Diagrama de flujo del procedimiento experimental.	44
<i>Figura 9.</i> Medición de la masa y tamizado de suelo arenoso costero para obtener una muestra homogénea.	46
<i>Figura 10.</i> Terrario de acero inoxidable que contiene suelo arenoso, petróleo crudo, consorcio bacteriano y agua.	48
<i>Figura 11.</i> Muestras de terrarios para el laboratorio SAG Perú S. A. C., donde se realizó el análisis de fracciones de hidrocarburos.	49
<i>Figura 12.</i> Equipo cromatógrafo de gases (GC).	51
<i>Figura 13.</i> Equipo extractor Soxhlet, marca Eurolab, de extracción de hidrocarburos y sulfato de sodio anhidro.	53
<i>Figura 14.</i> Balanza analítica rango 0.0001-220 gramos, modelo HZYN-224/323, marca 3S Cientific, para medir las muestras del terrario.	55
<i>Figura 15.</i> Medición de CO ₂ y pH en los terrarios.	56
<i>Figura 16.</i> Desecador de vidrio con tapa	57
<i>Figura 17.</i> Equipo rotavapor, marca Daihan Scientific, modelo WEV-003S, para recuperación del solvente diclorometano y balón con el hidrocarburo de petróleo. ..	58

<i>Figura 18.</i> Estufa marca Binder, Modelo FD 56, para volatilizar los vapores de hidrocarburos de petróleo y desecador con balones secos para la medición del peso de los HTP.	59
<i>Figura 19.</i> Medidor de CO ₂ y temperatura, marca Meter, modelo GC-2028 para los terrarios, termómetro bimetálico de bolsillo en acero inoxidable 316 marca Tess y medidor de pH Panpeha.	60
<i>Figura 20.</i> A: Medio líquido de Bushnell Haas con 1 % (p/v) de petróleo; B y C: agar nutritivo con colonias de microorganismos con capacidad de degradación de hidrocarburos inducida.	71
<i>Figura 21.</i> Tinción de Gram de colonias, la mayoría bacilos Gram positivos (1000 aumentos. Microscopio Euromex).	72
<i>Figura 22.</i> Placa de agar hicrome con las cepas en conteo durante la cinética de degradación: las cepas <i>Bacillus subtilis</i> tienen coloración verdosa y las de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , colonias redondeadas con bordes irregulares amarillentas.	73
<i>Figura 23.</i> Placa de agar cetrimide con las cepas en conteo durante la cinética de degradación: <i>Pseudomonas</i> con colonias poco translucidas, elevadas con bordes irregulares y brillo tornasolado verdoso.	74
<i>Figura 24.</i> Tinción de Gram de dos colonias presuntivas para pseudomonales: bacilos cortos Gram negativos (1000 aumentos. Microscopio Euromex).	75
<i>Figura 25.</i> Muestras de terrario en tubos eppendorf y colocados en un cooler para llevar las muestras al laboratorio biológico Biotech S. A. C.	76
<i>Figura 26.</i> Curvas de desarrollo de los microorganismos evaluados – terrario 1.	77
<i>Figura 27.</i> Curvas de desarrollo de los microorganismos evaluados – terrario 2.	78
<i>Figura 28.</i> Curvas de desarrollo de los microorganismos evaluados – terrario 3.	79
<i>Figura 29.</i> Curvas de desarrollo de los microorganismos evaluados – terrario 4.	80
<i>Figura 30.</i> Comparación del conteo de UFC/mL de los promedios generales de los microorganismos del consorcio degradador por terrario.	81
<i>Figura 31.</i> Comparación del conteo de UFC/mL de los microorganismos heterótrofos viables por terrario.	82
<i>Figura 32.</i> UFC/mL vs. HTP (g).	83
<i>Figura 33.</i> Gráfica HTP (g) con el tiempo (días).	91

<i>Figura 34.</i> Tiempo (días) vs. CO ₂ (ppm) de cada terrario.	99
<i>Figura 35.</i> Correlación de las variables tiempo, masa y consorcio bacteriano con outliers.	121
<i>Figura 36.</i> Correlación de las variables tiempo, masa y consorcio bacteriano sin outliers.	122

Resumen

La biorremediación de suelos contaminados por petróleo crudo es un proceso de tratamiento biológico que se aplica microorganismos vivos para consumir los hidrocarburos totales de petróleo en el suelo. Este procedimiento recupera los suelos sin contaminantes y reduce las sustancias tóxicas a niveles mínimos.

En la presente investigación, se utilizó uno de los tratamientos amigables con el medio ambiente, como es la biorremediación de suelos contaminados con derrames de petróleo crudo, mediante el cual se realizó la biodegradación de hidrocarburos totales de petróleo (HTP), que es inversamente proporcional al incremento de la actividad del consorcio bacteriano. Las pruebas experimentales se realizaron en el Laboratorio de Normalización de Hidrocarburos de la Facultad de Petróleo, Gas Natural y Petroquímica de la Universidad Nacional de Ingeniería. Se utilizaron terrarios de 5000 mg de suelo contaminado con hidrocarburos diluidos en agua, a las condiciones de operación medioambientales, y se midieron los HTP en el equipo Soxhlet (Método EPA 3540) realizando dos muestreos semanales, así como el número de UFC/kg, pruebas biológicas y biomasa del comportamiento del consorcio bacteriano durante tres meses de tratamiento biológico, y la caracterización fisicoquímica y biológica del suelo y petróleo crudo.

El objetivo de la presente investigación es diseñar un proceso de biorremediación de petróleo crudo, utilizando un consorcio bacteriano conformado por *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Agrobacterium tumefaciens*.

Se han investigado varios métodos biológicos y fisicoquímicos para controlar la contaminación con petróleo. Los métodos biológicos se consideran tecnologías limpias para la eliminación de contaminantes y la biorremediación de lugares contaminados con petróleo (Patowary et al., 2016; Yuniati, 2018). Los métodos fisicoquímicos incluyen la extracción por solventes, la desorción térmica, la incineración, el horno de cemento y el vertido. Estos métodos son costosos y necesitan el traslado de grandes cantidades de materiales contaminados para su tratamiento *ex situ*.

Palabras Claves: Biorremediación, Biodegradación, Hidrocarburos, Impacto Medioambiental, Consorcio Microbiano.

Abstract

Bioremediation of oil-contaminated soils is a crude biological treatment process that applies living microorganisms to consume the total petroleum hydrocarbons in the soil. This procedure recovers soils without contaminants, eliminating toxic substances at minimum levels.

In the present study, one of the environmentally friendly treatments was ensured, such as the bioremediation of soils contaminated with crude oil spills, in which the biodegradation of total petroleum hydrocarbons (HTP) will be carried out, which is inversely proportional to the increase in the activity of the bacterial consortium, the experimental tests will be carried out in the Hydrocarbons Standardization Laboratory of the Faculty of Petroleum, Natural Gas and Petrochemistry of the National Engineering University, using terrariums of 5000 mg of soil contaminated with hydrocarbons diluted in water, to the environmental operating conditions, in which the PHT will be measured in the Soxhlet equipment (EPA 3540 Method) two weekly bursts, as well as the number of CFU/Kg, biological tests and biomass of the behavior of the bacterial consortium during three months of treatment, and the biological physicochemical, biological characterization of the soil and crude oil.

The objective of this research is to design a crude oil bioremediation process, using a bacterial consortium: *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Acinetobacter*.

Various biological and physicochemical methods have been investigated to control oil contamination. Biological methods are considered clean technologies for pollutant removal and bioremediation of oil-contaminated sites (Patowary et al., 2016; Yuniati, 2018). Physicochemical methods include solvent extraction, thermal desorption, incineration, cement kiln, and landfill. These methods are expensive and require the transport of large quantities of contaminated materials for *ex situ* treatment.

Keywords: Bioremediation, Biodegradation, Hydrocarbons, Environmental Impact, Microbial Consortium.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Situación Problemática

Desde la quinta década del siglo XX, en el ecosistema terrestre ocurren derrames que dañan el subsuelo, el agua subterránea y el ecosistema. Esto genera contaminación ambiental, la cual produce pérdidas económicas, sociales y medioambientales, que, a su vez, causan daños a los seres vivos y limitan el bienestar y desarrollo de la sociedad. De acuerdo con el Organismo de Evaluación y Fiscalización Ambiental (OEFA), del 2011 al 2018, en el Perú, se han reportado 178 derrames de petróleo crudo, y la región amazónica, donde se ha producido aproximadamente el 60 % de los derrames (Parra et al., 2019), ha sido la más dañada.

Asimismo, la catástrofe del derrame de 12 000 barriles de petróleo ocurrido el 12 de enero del 2022 en las playas del distrito de Ventanilla (provincia del Callao), que se extendió hasta el mar de la localidad de Chancay (provincia de Huaral, al norte de la provincia de Lima), produjo graves consecuencias en la salud de los encargados de la desinfección y limpieza de la zona, así como la muerte de diferentes especies marinas acuáticas y ornitológicas (Gonzales et al., 2022).

Los desechos petrolíferos de las industrias petroleras y las refinerías tienen cuatro fracciones principales definidas operativamente: los hidrocarburos alifáticos y aromáticos no polares, las resinas polares no hidrocarburíferas y los asfaltenos. Entre estos, los alcanos de cadena ramificada y los hidrocarburos poliaromáticos plantean un serio desafío para los investigadores debido a su inercia y resistencia a la degradación natural (Premnath et al., 2021). Los derrames y filtraciones de petróleo de las industrias petroleras pueden provocar daños agudos y crónicos al medio ambiente y a la salud humana, por lo que son motivo de gran preocupación (Ambade et al., 2021; Chiesa et al., 2019; Tian et al., 2018). La Agencia de Protección

Ambiental (EPA) consideró a los hidrocarburos de petróleo como contaminantes prioritarios (De Sousa & Spiess, 2018) debido a su heterogeneidad química y toxicidad asociada (Ambade & Sethi, 2021; Gaur et al., 2021).

Delgado (2011) documenta una serie de eventos relevantes donde se implementó la biorremediación como respuesta a derrames petroleros, entre los que destacan el incidente del Amoco Cádiz en Bretaña, Francia (1978); el caso del Ixtoc I en México (1979); el derrame del Exxon Valdez en Alaska (1989); el vertido durante el conflicto del Golfo Pérsico en Kuwait (1991); el siniestro del Prestige en España (2002); y el desastre del pozo Macondo en el Golfo de México (2010), considerado el más impactante a nivel global. La eficacia del tratamiento varió entre casos, influenciada por la composición del crudo liberado en cada situación. Los microorganismos del suelo se consideran los indicadores más sensibles debido a sus respuestas instantáneas a los cambios en las condiciones ambientales (Jiao et al., 2016), y muchos de estos poseen la capacidad de degradar el petróleo crudo; por su parte, los metabolitos de hidrocarburos de bajo peso molecular derivados de la degradación del petróleo crudo pueden servir como fuentes de carbono para el crecimiento de microbios (Patowary et al., 2017).

La investigación presenta un proceso de biorremediación de suelos contaminados con petróleo crudo, utilizando el proceso de bioaumentación mediante un consorcio bacteriano compuesto por *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Agrobacterium tumefaciens*, que expone un trabajo investigativo de tipo experimental apoyado por información de artículos científicos y estudios de investigación, entre otros, relacionados con la biodegradación de hidrocarburos como agente de biorremediación. El análisis que se realizará en la biorremediación resuelve el problema de la contaminación ambiental, formula el método mediante una estrategia en el procedimiento experimental y, finalmente, valida lo que se ha formulado para, posteriormente, disminuir el impacto ambiental, social, económico y cultural.

1.2 Formulación del Problema

En la presente investigación se abordaron los siguientes problema general y problemas específicos:

Problema general

¿Cuál es la eficiencia de biorremediación del consorcio bacteriano compuesto por *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Agrobacterium tumefaciens* en suelo arenoso contaminado con petróleo crudo?

Problemas específicos

1. ¿En qué medida influye el comportamiento degradativo del consorcio bacteriano *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Agrobacterium tumefaciens* para la biorremediación en suelo arenoso contaminado con petróleo crudo?
2. ¿Cómo determinar las características del consorcio bacteriano *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Agrobacterium tumefaciens* para la biorremediación en suelo arenoso contaminado con petróleo crudo?
3. ¿Cuáles son las condiciones de operación del consorcio bacteriano *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Agrobacterium tumefaciens* para la biorremediación en suelo arenoso contaminado con petróleo crudo?
4. ¿Cuál es el porcentaje de biodegradación del consorcio bacteriano *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Agrobacterium tumefaciens* en suelo arenoso contaminado con petróleo crudo?

1.3 Justificación Teórica

La técnica de biorremediación tiene como principal objetivo recuperar las condiciones iniciales del suelo contaminado. Para aplicar esta técnica de tratamiento, se consideran los siguientes criterios: a) la actividad microbiana de los microorganismos debe ser la necesaria para degradar los contaminantes a una velocidad adecuada; b) las condiciones ambientales deben facilitar la actividad degradativa y el costo del proceso debe ser menos costoso que otras tecnologías utilizadas para la eliminación de contaminantes.

Para la selección del tratamiento más eficiente y económico, se debe tener presente los siguientes factores: tipo de hidrocarburo a tratar, concentración del hidrocarburo a biorremediar, caracterización del lugar donde se realizará la biorremediación, conocimiento de las normativas medioambientales, evaluación de costos y tiempo disponible para el proceso de biorremediación.

La mayoría de las especies bacterianas poseen enzimas específicas que les permiten utilizar diferentes composiciones de petróleo crudo. La tasa de proliferación de microorganismos depende principalmente de su propiedad hidrocarbonoclástica, que ayuda a liberar enzimas extracelulares para la mineralización de compuestos complejos (Marchand et al., 2017). Sin embargo, las cepas bacterianas individuales no pueden degradar todos los componentes del petróleo crudo; por ello, se han empleado consorcios mixtos de especies bacterianas o fúngicas para eliminar simultáneamente la mayoría de los componentes del petróleo (Maqsood et al., 2023). En este estudio, la especie bacteriana con capacidad para degradar diferentes componentes del petróleo crudo se aisló del suelo contaminado con petróleo crudo y se la caracterizó. Además, se evaluó el potencial de las cepas bacterianas aisladas (individualmente y en consorcio) contra las fracciones alifáticas y aromáticas del petróleo crudo.

1.4 Justificación Práctica

Debido al incremento de la población en el mundo y de la demanda del uso de hidrocarburos en diversas áreas de la industria, es necesario desarrollar técnicas de tratamiento para eliminar contaminantes medioambientales resultantes de actividades humanas. Por tal razón, esta investigación plantea desarrollar un tipo de tratamiento novedoso como la biorremediación, utilizando un consorcio bacteriano compuesto por *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Agrobacterium tumefaciens*, eficiente para garantizar así el cuidado del medio ambiente.

La mayoría de los contaminantes en los derrames de petróleo son hidrocarburos, y su liberación incontrolada en el medio ambiente se considera una amenaza global (Eze & George, 2022). Estos contaminantes industriales acarrearán graves efectos en la salud humana, incluido su potencial mutagénico y cancerígeno (Benguenab & Chibani, 2021; Jiji & Prabakaran, 2020); también repercuten en los ecosistemas terrestres y acuáticos (Gidudu & Chirwa, 2020; Ventorino et al., 2019): por ejemplo, la contaminación petroquímica afecta la permeabilidad del suelo y procesos esenciales como la desfosforación y la nitrificación (Kim et al., 2019).

En la presente investigación se utilizará la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, en esta se realizará la biodegradación de hidrocarburos totales de petróleo (HTP), que disminuirán con el incremento de la actividad del consorcio bacteriano *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Agrobacterium tumefaciens*. Asimismo, se resolverá este problema utilizando uno de los tratamientos más amigables con el medio ambiente, como es la biorremediación de suelos contaminados con derrames de petróleo crudo. La biodegradación ha sido aceptada como alternativa económicamente eficaz e importante para la eliminación de contaminantes con un alto nivel tóxico para la flora y fauna del medio afectado en suelos o arena contaminados con petróleo crudo.

Los hallazgos de esta investigación representarán un aporte tanto social como ambiental. Desde el punto de vista social, el campo de la investigación se enriquecerá y se generará conocimiento respecto al diseño de sistemas de biodegradación a nivel industrial que harán posible eliminar los hidrocarburos del ecosistema. En cuanto al ambiente, los beneficios se relacionarán con que, al haber una menor cantidad de contaminantes en el suelo, se contribuirá a la preservación del medio ambiente.

En esta investigación se implementó la tecnología de biorremediación mediante la estrategia de bioaumentación, aplicada en terrarios a condiciones de operación ambientales, lo cual aportó a la reducción de las alteraciones que afectan los recursos naturales debido a las actividades de transporte y almacenamiento de hidrocarburos. Según este estudio, se pueden presentar técnicas parecidas para la remediación de los suelos contaminados, en suelos arenosos o en otros tipos de suelos con parecidas condiciones, y ello comprendería a las entidades o empresas que ofrecen propuestas de

remediaciones ambientales, lo que favorecería el avance y difusión de técnicas confiables, así como la existencia de empresas más competitivas y responsables socialmente.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo General

- Determinar la eficiencia de la biorremediación del consorcio bacteriano *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Agrobacterium tumefaciens* en suelo contaminado con petróleo crudo.

1.5.2 Objetivos Específicos

- Determinar la influencia del comportamiento degradativo del consorcio bacteriano usado (conformado por *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Agrobacterium tumefaciens*) para la biorremediación en suelo arenoso contaminado con petróleo crudo.
- Determinar las características del consorcio bacteriano utilizado (conformado por *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Agrobacterium tumefaciens*) para la biorremediación en suelo arenoso contaminado con petróleo crudo.
- Determinar las condiciones de operación del consorcio bacteriano usado (conformado por *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Agrobacterium tumefaciens*) para la biorremediación en suelo arenoso contaminado con petróleo crudo.
- Determinar el porcentaje de biodegradación del consorcio bacteriano *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Agrobacterium tumefaciens* en suelo arenoso contaminado con petróleo crudo.

1.5.3 Delimitación de la Investigación: Espacial y Temporal

El petróleo crudo proveniente de operaciones como el transporte, distribución, traslado, entre otros, a causa de derrames puede contaminar el medio ambiente, lo que es perjudicial para el ecosistema. La mencionada contaminación puede afectar muchas hectáreas de suelo y, debido a la alta peligrosidad del contaminante, puede dañar el desarrollo de los seres vivos que se encuentran alrededor de la zona afectada.

Para impedir tal contaminación ambiental, se realizará en el suelo un tratamiento biológico de biorremediación aeróbica con un consorcio bacteriano, determinándose la influencia de la concentración del consorcio y el rendimiento de biorremediación en el suelo contaminado con petróleo crudo.

Las pruebas experimentales se realizaron en los laboratorios de la Universidad Nacional de Ingeniería, los conocimientos obtenidos podrán ser aplicados por diversas empresas relacionadas con el sector petróleo y petroquímica, así como por los organismos de control y fiscalización del medio ambiente.

Se debe mencionar que existen otros métodos de tratamiento del suelo contaminado con petróleo crudo para reducir los contaminantes y que uno de los más adecuados es el método biológico. Entre las limitaciones más importantes en el desarrollo de la investigación están la falta de disponibilidad de algunos equipos para la recuperación de algunos compuestos del proceso —sin embargo, otros laboratorios de la Universidad Nacional de Ingeniería nos permitieron usar sus equipos para completar nuestro proceso—, así como el costo para llevar a cabo la investigación.

Las pruebas experimentales tuvieron una duración de unos cuatro (4) meses aproximadamente y se realizaron mediciones continuas bajo las condiciones de operación más adecuadas para lograr resultados satisfactorios.

CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO

2.1 Marco Filosófico o Epistemológico de la Investigación

La biotecnología tiene muchos años de antigüedad; sin embargo, se le dio este nombre, aproximadamente, en la segunda década del siglo XX (Fári & Kralovánszky, 2006). Según Renneberg (2019), en este campo se ha avanzado al punto que se puede modificar genéticamente las semillas para aumentar sus rendimientos y mejorar la calidad de los cultivos; además, se ha desarrollado la capacidad de fabricar agentes antibacterianos y otros fármacos que contribuyen a mejorar la salud humana.

Schramm y Kottow (2001) sostienen que la biotecnología puede ser considerada una aplicación de la tecnociencia, ya que combina ciencia y técnica, y genera conocimientos científicos que impulsan el desarrollo tecnológico. En este sentido, la biotecnología borra la línea entre la investigación pura y la aplicada, y elimina la distinción entre conocimiento y aplicación. Debido a su relevancia social, no se puede eludir la evaluación ética.

La epistemología ambiental establece el principio de la razón restrictiva, según el cual cualquier acción que contradiga la preservación del entorno ambiental debe ser limitada o descartada. En este marco, valores como la ética, la estética y la amabilidad son tan relevantes como los flujos de información, corrientes de energía y ciclos tangibles. Por tanto, el deterioro ambiental no se limita a la pérdida de recursos naturales, también implica la afectación de procesos emocionales, reflexivos y de acción humana que empobrecen la biodiversidad e interrumpen el equilibrio energético y material del planeta (Torres, 2015).

Según Passmore (1974), los problemas ambientales no deben abordarse únicamente

desde una perspectiva científica o ecológica. Advierte que, más allá de las soluciones técnicas que la ciencia pueda ofrecer, el deterioro ambiental constituye un desafío social de gran magnitud, comparable a fenómenos como los accidentes de tránsito, la violencia o el alcoholismo. En ese sentido, propone que las soluciones deben integrarse por medio de estrategias que reduzcan tanto la frecuencia como la severidad del impacto ambiental. Esto implica adoptar medidas concretas frente a la contaminación creciente, el almacenamiento de residuos peligrosos, y otros riesgos, a través de políticas innovadoras de carácter económico, político, administrativo y científico-tecnológicas.

Autores como Briones e Irigoien (2015) indican que el origen de los suelos se debe a procesos externos denominados “meteorización de rocas”, mediante los cuales, estas estuvieron expuestas a degradación química y a desintegración física; así, las masas de roca se transformaron en partes pequeñas.

La explotación de hidrocarburos ha tenido un impacto devastador en los suelos. Como señalan Romaniuk et al. (2012), la contaminación por hidrocarburos puede alterar significativamente las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo afectando su pH, conductividad eléctrica y capacidad de intercambio catiónico. Tales cambios no solo degradan la calidad del suelo, también perturban los delicados equilibrios ecológicos que sustentan la vida.

Ya Callicott 1987, planteaba la necesidad de considerar la Tierra no como una mercancía, sino como una comunidad de la cual formamos parte. A ello, Plumwood (2017) añade que nuestra identidad está intrínsecamente ligada al entorno natural, idea que desafía la de separación ser humano y naturaleza.

Por su parte, McKibben (2017) advierte las consecuencias a largo plazo de la contaminación. Su perspectiva subraya la interconexión de todos los seres vivos y la necesidad de considerar los impactos ecológicos de nuestras acciones. En esa línea, Peñas (2017), en la revista *Ethic*, realizó una reflexión profunda sobre la simplicidad y la autosuficiencia, ofreciendo una crítica al materialismo y al consumismo desenfrenado que a menudo impulsa la explotación de recursos naturales.

Como se observa, los autores mencionados cuestionan los paradigmas que han hecho posible la explotación desmedida de los recursos naturales y la consecuente contaminación que resulta de esta práctica. Además, nos comprometen a adoptar una ética ambiental que reconozca el valor intrínseco de la naturaleza y nuestra responsabilidad en su preservación.

La presencia de hidrocarburos en el suelo constituye no solo una dificultad de carácter técnico que exige respuestas desde la ingeniería, también implica un desafío ético que demanda una profunda reconsideración de nuestros valores y prácticas. Como sociedad, es necesario proponer y promover una relación más armoniosa y sostenible con nuestro entorno, pues tanto nuestra supervivencia como nuestro bienestar están sumamente ligados a la salud de los ecosistemas que habitamos.

Es posible generar un cambio significativo en nuestra conexión con el entorno si se asume un enfoque ecosistémico, un enfoque que resalte la interdependencia entre los elementos bióticos y abióticos. No es de sorprender, entonces, que en un planteamiento con enfoque ambientalista, conceptos como complejidad, diversidad y simbiosis adquieran gran relevancia. De ahí que, desde antes del presente siglo, la biología de la conservación y las estrategias de preservación hayan difundido las ideas de biosfera y biodiversidad (Primack et al., 2001).

Para la ecología profunda, el bienestar y el crecimiento de la vida del ser humano y no humano en la Tierra tienen importancia en sí mismos, por lo cual las personas no tienen derecho a disminuir abundancia y diversidad de los diferentes hábitats, excepto para retribuir necesidades vitales de manera sostenible. Esta idea está en armonía con la perspectiva epistemológica de la filosofía ambiental, que postula el establecimiento de variantes a nivel ideológico, político, económico y tecnológico (Bugallo, 2002).

2.2. Antecedentes de Investigación

2.2.1. Antecedentes Internacionales

Investigaciones internacionales

Pinto y Sánchez (2018) llevaron a cabo un estudio de biorremediación *ex situ* sobre suelos contaminados por hidrocarburos en los laboratorios de la Universidad Libre de Bogotá, con las condiciones fisicoquímicas de operación del suelo para respaldar una adecuada actividad biológica (pH: 6-8, temperatura: 15 °C – 45 °C, humedad: 25 %-70 %). Los autores concluyeron que la bacteria con elevado rendimiento degradativo de los hidrocarburos (diésel y gasolina) es la bacteria *Acinetobacter baumannii*, comprobando que la absorbancia medida con el espectrofotómetro en las franjas están en la zona de 3200 cm⁻¹ a 2700 cm⁻¹, lo que demuestra una diferencia en las categorías iniciales del suelo. Así, la bacteria con mayor porcentaje de biodegradación fue la *A. baumannii* con un 57.14 % de disminución de contaminantes.

Das y Mukherjee (2007) determinaron el rendimiento de *Bacillus subtilis* en la biodegradación de petróleo y dedujeron la existencia de una asociación directa entre la reducción y nivel de concentración de petróleo con la biomasa celular. Así, determinaron que el proceso de degradación está relacionado con la respiración celular, pues la cepa *B. subtilis* observó una disminución importante de los niveles de TPH en aproximadamente 50 % en el suelo tratado semejante a la del suelo de control al término de las pruebas experimentales (120 días).

Por su parte, Li et al. (2022) estudiaron la reducción eficaz de suelos contaminados con petróleo utilizando una asociación de oxidación previa con Fenton con hierro bioestimulado y biorremediación. El método utilizado tenía como objetivo investigar los procesos detrás de la ágil reproducción de bacterias degradantes de petróleo autóctonas (IPDB) y la biodegradación eficaz de los HTP. Si bien las concentraciones iniciales de HTP preoxidación con Fenton (3331–3775 mg/kg) fueron iguales independientemente de si se empleó hierro bioestimulado y no bioestimulados, la biodegradación de HTP luego de la oxidación previa con Fenton con hierro bioestimulado (5840 mg/kg) fue muy elevada respecto de la con hierro no bioestimulado (3034–4034 mg/kg). Por tal motivo, se propone que la oxidación

previa con Fenton con hierro bioestimulado sea aplicable a suelos demasiado contaminados con petróleo antes de la biorremediación.

Patowary et al. (2016) estudiaron las capacidades de biodegradación de consorcios bacterianos nativos en HTP con especial énfasis en hidrocarburos poliaromáticos. Su objetivo fue aislar cepas bacterianas degradantes de HTP de suelos contaminados con petróleo de Assam, India, y desarrollar un consorcio bacteriano adecuado para la biorremediación del petróleo crudo de esta tierra nativa. De 23 bacterias aisladas, se seleccionaron 5: KS2, PG1, PG5, R1 y R2; como bacterias degradadoras eficientes de petróleo crudo, las bacterias *Bacillus pumilus* KS2 y *Bacillus cereus* R2 tuvieron los mejores resultados. El consorcio mostró una degradación de hasta el 84.15 % de HTP después de 5 semanas de incubación, según los análisis realizados en el FTIR (transformada de infrarrojos de Fourier) y GCMS (cromatografía de gases-espectrómetro de masas), lo que demuestra que el consorcio eliminó hidrocarburos de petróleo, incluidos los alifáticos y los aromáticos.

Lázaro-Mass et al. (2023) estudiaron la biodegradación de hidrocarburos de suelos contaminados por consorcios microbianos. Se trató de un estudio de microcosmos de laboratorio en el que se caracterizaron las bacterias aisladas de un pozo petrolero de Tabasco, México. Para evaluar la degradación, se recolectaron muestras de suelo del pozo contaminado con hidrocarburos y se estudió la capacidad emulsionante del biosurfactante y la formación de biopelículas; los resultados indicaron que las cepas aisladas pertenecían al género de *Pseudomonas 16S rDNA*. Además, se obtuvieron porcentajes de emulsificación superior al 60 % y los consorcios microbianos degradaron el suelo contaminado con una eficiencia superior al 80 %; las emulsiones para aceite quemado y motor resultaron superiores al 50 %. Por último, se detectaron biosurfactantes aniónicos para las tres cepas que componían el consorcio y la formación de biopelículas *in vitro*. Considerando lo expuesto, los resultados indican que, aunque las cepas pertenezcan a la misma especie, los consorcios microbianos contribuyen al proceso de remediación de suelos contaminados con hidrocarburos.

Funtikova et al. (2023) investigaron la biorremediación de suelos contaminados con petróleo en la República de Kazajstán; para ello, utilizando un nuevo biopreparado que comprende cepas bacterianas *Rhodococcus. Qingshengii F2-1*, *Rhodococcus*

qingshengii F2-2 y *P. alopuntida* BS3701. El biopreparado en medio mineral con 15 % de petróleo crudo ha logrado una degradación de 48 % de los n-alcanos y 39 % de los PAH después de 50 días de tratamiento. Además, se demostró experimentalmente en el suelo contaminado con 10 % de petróleo crudo en K-Kurylys, República de Kazajstán, donde se obtuvo una degradación del 70 % del petróleo crudo.

En la Figura 1, se observa que después de seis semanas, al final del experimento de campo, el número de degradadores de petróleo era 10^7 UFC/g de suelo, lo que logró una degradación del 70 % de petróleo; y en el control, la degradación del petróleo fue del 23 %.

En el presente estudio se utilizará un consorcio bacteriano en el proceso de biorremediación de suelos contaminados con petróleo crudo a condiciones óptimas de operación.

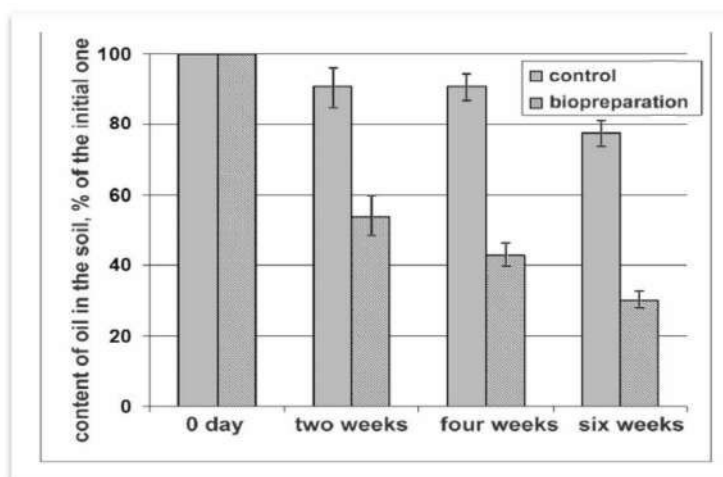


Figura 1. Eliminación de aceite en el suelo en la parcela de control y la parcela tratada con biopreparado (barras: desviación estándar). Fuente. Datos tomados de Funtikova et al. (2023).

Por su parte, Afkar et al. (2022) realizaron el estudio de la eliminación efectiva de alcanos e hidrocarburos aromáticos policíclicos por bacterias del suelo crónicamente

expuesto al petróleo crudo. Las bacterias estuvieron conformadas por AramcoS2 y AramcoS4, dos aislados bacterianos que habitan en el suelo del desierto oriental de Arabia Saudita. Dichas bacterias degradaron hidrocarburos del C₁₀ a C₂₀ en 77 %; además, redujeron los hidrocarburos policíclicos en 67 %, en 14 días, a las condiciones de operación de pH = 6,8 ± 0,2 y temperatura de 30 °C. Por ello y con base en los resultados obtenidos, se sugiere que los aislados AramcoS2 y AramcoS4 son actores claves para mediar o eliminar los derrames de petróleo, los hidrocarburos saturados y las fracciones de PAH.

Nedoroda et al. (2021) realizaron el análisis de la biodegradación del petróleo por un consorcio bacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens ssp.*, *Plantarumy*, *Bacillus subtilis*, y determinaron el nivel de destrucción de los hidrocarburos de petróleo en diferentes combinaciones de concentraciones de contaminantes y productos biológicos, así como en ausencia de contaminación por petróleo para garantizar la evaluación del impacto del producto biológico en el medio ambiente. La fitotoxicidad del suelo se evaluó mediante el método de bioensayo utilizando semillas de rábano de la variedad *sora*, mediante la relación entre la altura de las plántulas y la masa de materia orgánica obtenida.

Se encontró, cuando se expuso al suelo contaminado (4 % de aceite) con una solución en concentraciones de 2 % y 4 %, que el efecto fitotóxico en estos casos disminuyó de 96.04 % a 44.68 % y 21.86 % respectivamente. Por ello, es relevante el uso de biosurfactantes que contiene la suspensión de microorganismos que consume el petróleo utilizando métodos de biorremediación. El uso de la cepa *Bacillus amyloliquefaciens ssp.* en las áreas estudiadas de suelos contaminados con petróleo proporcionó una reducción del efecto fitotóxico al nivel de 51.36 %–74.18 %. El estudio se realizó durante 26 días.

2.2.2 Antecedentes Nacionales

Investigaciones nacionales

Patiño et al. (2021) realizaron un experimento enfocado en la capacidad de *Bacillus thuringiensis* para la biodegradación de petróleo como estrategia de restauración en suelos agrícolas contaminados, empleando tres concentraciones de petróleo: 1.5 %, 3.5 % y 5.5 %.

3 % y 4.5 % en un medio con bajo contenido salino. La DBO₅ se empleó como guía indirecta para la medición de la degradación de la materia orgánica y esta redujo de manera proporcional residuos de petróleo. Se midió la DBO₅, que disminuyó de 66.85 mg de O₂/L inicialmente hasta 5.86 mg de O₂/L después de 15 días, al término del tratamiento. Asimismo, se midió la biomasa celular que aumentó en promedio 24×10^6 UFC/mL. El estudio concluyó que *B. thuringiensis* presenta un potencial significativo para la degradación de tres concentraciones de 1.5 %, 3 % y 4.5 % de petróleo “Diesel II” en ambientes salinos mínimos en biorreactores de tanque, con aireación con agitación, y se encontró cierta relación entre la concentración de petróleo y biomasa celular.

Cabanillas y Pissani (2015) examinaron cómo la aplicación de bioaumentación y bioestimulación influye en la efectividad de la biorremediación en suelos afectados por hidrocarburos de petróleo. Para ello, trabajaron con suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo crudo liviano con HTP de 21 200 a 22 900 mg/kg, microorganismos totales ($4.6 \times 10^6 - 1.1 \times 10^7$ Número más probable o NMP/g), microorganismos hidrocarbonoclásticos ($1.5 \times 10^4 - 4,3 \times 10^4$ NMP/g). Los consorcios degradadores que se seleccionaron fueron los géneros *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter* y *Pseudomonas*. En la bioaumentación y bioestimulación se logró una eficiencia de biorremediación de 75 %; además, se comprobó que la introducción de microorganismos degradadores ejerce un mayor efecto en la biorremediación de suelos contaminados con petróleo crudo.

En la Tabla 1, se observa el tratamiento con la bioaumentación y con la bioestimulación durante 90 días: la toxicidad de los contaminantes del suelo disminuyó; asimismo, el HTP se redujo de 21200 mg/kg a 5300 mg/kg, lo que corresponde al 75 % de eficiencia de biorremediación del suelo contaminado con petróleo crudo liviano.

Tabla 1. Características del suelo contaminado con HTP de petróleo crudo ligero y biorremediado, aproximadamente en 90 días con bioaugmentación-bioestimulación.

Características	Días			
	0	30	30	90
Microorganismos				
totales (NMP/g ⁻¹)	1.1x10 ⁷	> 1.1x10 ⁷	>1.1x10 ⁷	1.1x10 ⁷
Microorganismos				
hidrocarbonoclasticas (NMP/g)	4.3x10 ⁴	1.1x10 ⁶	2.1x10 ⁵	1.1x10 ⁴
Índice de germinación (%)	46	65	69	87
Nivel de toxicidad	Severo	Moderado	Moderado	Bajo
HTP (mg/Kg.)	21 200	-	-	5300
Eficiencia (%)	-	-	-	75

Fuente. Datos tomados de Cabanillas y Pissani (2015).

Investigaciones locales

Pretell (2021) llevó a cabo un estudio para evaluar la capacidad biorremediadora de bacterias psicrotolerantes aisladas en la base peruana Machu Picchu de la Antártida; ahí también evaluó la producción de cepas que producen biosurfactantes tipo ramnolípidos (RL), que tienen actividad degradativa y emulsificante en el crudo de petróleo. Se utilizaron las siguientes cepas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Aeromonas sp. (39Bfb)*, *Stenotrophomonas rhizophila (116B)* y *Paenibacillus lautus*, de naturaleza psicrotolerante, degradadores de petróleo crudo y eficientes para la biorremediación de suelos en ambientes fríos como la Antártida.

Los resultados revelaron una cinética de crecimiento favorable para las cepas incubadas a 5 °C, evaluadas a lo largo de un periodo de 240 horas (equivalente a 10 días), mediante la medición de la densidad óptica (DO) a 620 nm. Durante este lapso, las bacterias mostraron un desarrollo óptimo bajo condiciones de baja temperatura.

Bocángel (2016) estudió la capacidad de biodegradación de un consorcio bacteriano aislado de la base científica peruana Machu Picchu de la Antártida, aplicado a suelos contaminados con petróleo crudo. El consorcio incluía *Pseudomonas putida (63Bb)*,

9Ab, 60Bf, 39Bfa), *Pseudomonas* sp. 9Aa, *Pseudomonas aeruginosa* 63Ba, *Aeromonas* sp. 39Bf, *Stenotrophomonas rhizophila* 116B y *Paenibacillus lautus* (95Fa y 95Fb). Se trabajó con tres terrarios, cada uno con 1.3 kg de suelo contaminado con un 5 % (p/p) de petróleo. El proceso de biorremediación se extendió por 180 días a temperaturas de entre 4 °C-5 °C, cuantificando los HTP por el método 3540 EPA-SOXHLET y saturación de fluidos API RP40-RETORTA, además del conteo microbiano y medición de parámetros fisicoquímicos cada 30 días. Se observó que el crecimiento bacteriano aerobio fue exponencial hasta el día 120, con 2.18×10^5 UFC/g; además, entre las bacterias están 4.3×10^4 NMP/g de bacterias psicotolerantes hidrocarbonoclásticas con una tasa de biodegradación de 57.88 %, y al término de los 180 días, de 58.41 %. En la Figura 2, se muestra el porcentaje de reducción de HTP, después de 180 días: en el terrario psicotolerante, la reducción de contaminantes fue de 58.41 %; en el terrario control, de 37.30 %; y en el de control abiótico, de 11.96 %.

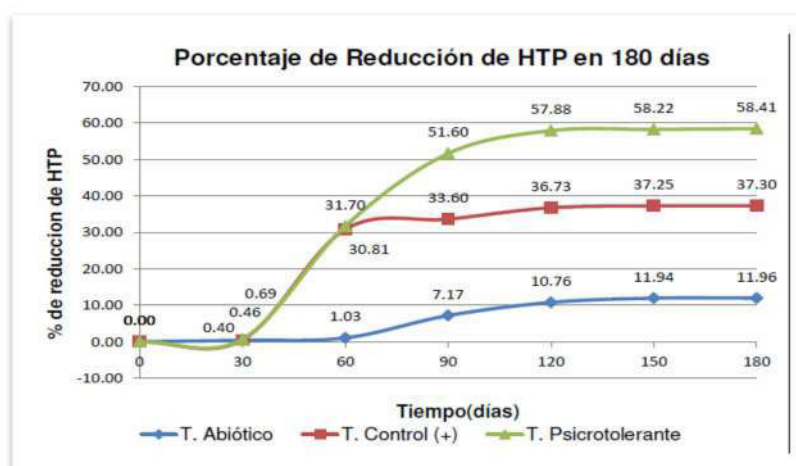


Figura 2. *Porcentaje de reducción de HTP en 180 días, en cada terrario de experimentación. Fuente. Datos tomados de Bocángel (2016).*

Yang et al. (2023) investigaron la biodegradación de hidrocarburos por *Purpureocillium lilacinum* y *Penicillium chrysogenum*, de lodos de petróleo pesado, y su potencial para la biorremediación de suelos contaminados. Se aislaron dos hongos degradadores de hidrocarburos denominados HF y HQ, de lodos de petróleo

pesado recolectados en el yacimiento petrolífero de Tahe, Xinjiang, noroeste de China. Sobre la base del análisis morfológico y la secuenciación genética, HF y HQ se identificaron como *Purpureocillium lilacinum* y *Penicillium chrysogenum* respectivamente. Después del tratamiento con hongos durante 30 días, las abundancias relativas de varios componentes de hidrocarburos cambiaron en patrones distintos basados en la cromatografía de gases-espectrometría de masas. La tasa de degradación media de HF para cicloalcanos, n-alcanos, aromáticos e isoalcanos fue del 100,0 %, 21.2 %, 15.1 % y 14.5 % respectivamente. El HQ mostró efectos contrastantes en la composición de hidrocarburos, como lo indica la disminución de n-alcanos (1.3 %) y el aumento de cicloalcanos, aromáticos e isoalcanos (82.6 %, 10.2 % y 11.9 % respectivamente). Aproximadamente, el 15.3 % y el 7.6 % del total de hidrocarburos de petróleo en lodos de aceite modificado fueron eliminados por el HF y el HQ respectivamente.

Quevedo (2022), en su tesis *Impactos socioeconómicos inmediatos percibidos por el derrame de petróleo en la comunidad pesquera de Ventanilla*, recopiló información cuatro meses después del incidente ocurrido el 15 de enero del 2022. Las muestras analizadas correspondieron a sedimentos intermareales de las playas Bahía Blanca, Costa Azul y Cavero, ubicadas en esa localidad. Las concentraciones promedio de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) registradas fueron de 180 mg/kg, 219 mg/kg y 275 mg/kg respectivamente, valores que se mantienen dentro de los límites permitidos en los estándares de calidad del suelo según el Decreto Supremo (D. S.) 011-2017-MINAM. Los parámetros fisicoquímicos de las fracciones de HTP se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Parámetros fisicoquímicos de las fracciones de hidrocarburos totales de petróleo (HTP).

Fracción de hidrocarburos	LCM	Bahía Blanca	Costa Azul	Cavero
Fracción 1 (C ₅ -C ₁₀)	0.25	<0.25	<0.25	<0.25
Fracción 2 (C ₁₀ -C ₂₈)	16	52	80	64
Fracción 3 (C ₂₈ -C ₄₀)	16	128	195	155

Hidrocarburos totales de petróleo	16	180	275	219
--------------------------------------	----	-----	-----	-----

Nota. L.C.M.: Límite de cuantificación del método, "<"= Menor que el L.C.M. Las cantidades están medidas en mg/kg.

Fuente: Datos tomados de Quevedo (2022).

Los análisis correspondientes a las muestras fueron realizados en el laboratorio Pacific Control S. A. C., entidad que cuenta con la acreditación oficial del Instituto Nacional de Calidad (Inacal).

Fajardo y Caballero (2022) elaboraron un informe dirigido al responsable de Evaluación Ambiental del OEFA. En este, detallaron los resultados de una inspección realizada mediante un sistema de aeronaves no tripuladas (RPAS) a lo largo de un tramo costero de 60 km, comprendido entre la playa Ventanilla (en el distrito de Ventanilla, provincia constitucional del Callao) y playa Punta Salinas (distrito de Huacho, provincia de Huaura, Lima). Dicha evaluación se efectuó entre el 17 y el 26 de enero del 2022, y se complementó con el análisis de imágenes satelitales captadas por los sensores SENTINEL 2A y WORLDVIEW-2 durante los días 18 y 19 de ese mismo mes. El informe determinó que un total de 11,060.31 hectáreas de superficie marina a lo largo de la costa resultaron impactadas por el derrame de hidrocarburos, lo que afectó considerablemente el equilibrio del ecosistema marino. En cuanto al análisis de arena en zonas intermareales, se examinó un total de 37 ubicaciones, de las cuales, en 35 se detectaron niveles significativos de hidrocarburos de petróleo en las fracciones F₁, F₂ o F₃ superando los umbrales mínimos de detección establecidos por el método analítico empleado. Los rangos de concentración oscilaron entre 2 mg/kg a 9 mg/kg para la fracción F₁; 6 mg/kg a 49006 mg/kg para la F₂ y de 10 mg/kg a 71921 mg/kg para la F₃.

2.3. Bases Teóricas

2.3.1 Consorcio *Bacteriano*

Se trata de una agrupación bacteriana que metaboliza el petróleo como fuente principal tanto de carbono como de energía. Para conformar el consorcio mixto destinado a la degradación de hidrocarburos, se seleccionaron las cinco bacterias con mayor capacidad emulsificante, evaluadas en unidades de actividad emulsificante (UAE mL⁻¹), según lo descrito por Madigan et al. (2003).

Identificación del consorcio bacteriano

La determinación del género de las bacterias se llevó a cabo mediante la observación de sus características morfológicas y fisiológicas, siguiendo los protocolos establecidos en los textos de Bergey: *Bacteriología Determinativa* y *Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática* (Holt et al., 1999).

Mohn et al. (2001) utilizaron consorcios microbianos en concentraciones apropiadas y los inocularon directamente a suelos afectados con hidrocarburos durante un año. Los resultados revelaron una disminución en la cantidad total de hidrocarburos del petróleo, pasando de 196 mg a menos de 10 mg/kg en un caso y de 2.109 mg a 195 mg/kg en otra área. Ello pone en evidencia que los consorcios microbianos aumentan significativamente la eliminación de hidrocarburos a nivel polar, confirmando la viabilidad de llevar a cabo la biorremediación *in situ* en suelos contaminados con combustibles en regiones de mínimas temperaturas.

Los combustibles, en particular el petróleo crudo, considerados como sustancias peligrosas han generado desafíos ambientales a nivel global porque contaminan suelos, aire y agua. Entre las contaminaciones más graves se encuentran aquellas derivadas de la extracción y manipulación del petróleo crudo en todas las naciones productoras de hidrocarburos, y este es un problema que persiste (Benavides et al., 2006).

Tipos de consorcio bacteriano

Se sabe que diversas cepas bacterianas tienen la capacidad de descomponer los HTP y diversas investigaciones han destacado que la mayoría de las bacterias con esta capacidad pertenecen al *phylum Proteobacteria*, específicamente a las clases *alfa* y *gamma-Proteobacteria*, que incluyen géneros como *Pseudomonas*,

Stenotrophomonas, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Pantoea*, *Psychrobacter* (Bowman et al., 1997; Viñas, 2005; Aislabie et al., 2006; Molina et al., 2009).

Según Dasgupta et al. (2013), además, las bacterias, en una cierta concentración, fueron consideradas durante mucho tiempo como uno de los principales agentes de degradación de hidrocarburos existentes en el medio ambiente, y son de vida libre y ubicuas.

2.3.2 Biorremediación de Suelos Contaminados con Petróleo Crudo

Biorremediación implica proporcionar soluciones utilizando métodos biológicos. Para Simarro (2012), una definición más precisa de biorremediación sería la aplicación de técnicas que comprenden la aplicación de microorganismos (como bacterias, algas unicelulares, hongos, plantas) o enzimas derivadas de ellos, para tratar ambientes contaminados.

Entre las diversas estrategias adoptadas para rehabilitar sitios contaminados con petróleo crudo, la remediación microbiana se considera como una de las tecnologías eficientes y rentables según Bento et al. (2005).

2.3.2.1 Técnicas de Biorremediación.

Su finalidad principal es maximizar la eficiencia del proceso de biodegradación. Por ello, diversas investigaciones se han centrado en perfeccionar sus mecanismos a través del desarrollo de técnicas que potencien sus resultados. Entre las estrategias más estudiadas se encuentran la bioestimulación y el bioaumento, las cuales buscan mejorar la capacidad del suelo para degradar compuestos contaminantes.

a) Bioestimulación

La bioestimulación implica ajustar las variables fisicoquímicas claves del lugar a tratarse para fomentar el aumento de la microflora oriunda degradadora. Por lo general, se busca corregir la existencia de macronutrientes, siendo la relación C/N/P de 100:10:1 considerada perfecta para el metabolismo microbiano en términos generales, según la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA, 1996a). Aunque niveles recomendados de C/N/P son esenciales para mejorar la

biodegradación, se ha prestado poca atención a los resultados de la concentración de macronutrientes sobre la rapidez de degradación de hidrocarburos.

Diversos estudios han confirmado que la incorporación de macro- y micronutrientes en suelos contaminados favorece tanto el incremento de las poblaciones microbianas como la mejora de las tasas de degradación de hidrocarburos (Braddock et al., 1997; Chaîneau et al., 2003; Nikolopoulou & Kalogerakis, 2008).

b) Bioaumentación

El bioaumentación es una estrategia orientada a potenciar la degradación biológica de zonas contaminadas mediante la incorporación de microorganismos con rutas catabólicas especializadas. Esta técnica representa un recurso de gran efectividad para optimizar los procesos de biorremediación (Hosokawa et al., 2009). El procedimiento consiste en inocular la matriz que se va a tratar con microorganismos que aporten capacidades metabólicas, orientadas a acelerar la descomposición de los compuestos tóxicos presentes (Madueño et al., 2011).

Generalmente, se emplean microorganismos con capacidad degradativa, aunque se han documentado casos en los que se inoculan bacterias que producen tensioactivos para mejorar la biodisponibilidad de los contaminantes, como se señala en Dean (2001). Varias investigaciones han indicado que factores ambientales, tanto bióticos como abióticos, influyen en el rendimiento del bioaumentación (Mrozik & Piotrowska-Seget, 2010). Por ello, resulta crucial emplear microorganismos autóctonos del área contaminada para realizar el proceso de bioaumentación (Hosokawa et al., 2009; Coppotelli et al., 2006).

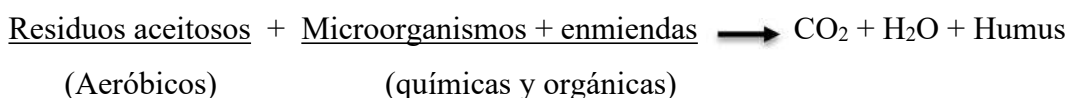
2.3.2.2 Proceso de Biorremediación de Lodos Contaminados con Hidrocarburos.

El fundamento de la biorremediación consiste en aprovechar y potenciar la capacidad natural de los ecosistemas para descomponer compuestos hidrocarburos presentes en suelos contaminados. Este objetivo se puede alcanzar mediante la mezcla del residuo con la capa superficial del suelo, rica en materia orgánica (como el humus), junto con fertilizantes orgánicos que contienen microorganismos facultativos adaptados para consumir y degradar los hidrocarburos. Cabe destacar que durante este tratamiento también ocurren reacciones fisicoquímicas inducidas por factores ambientales como la radiación solar, humedad y el flujo de aire, variables que cambian según la

ubicación geográfica (Fonseca & Vargas, 2006; Lugo & Mesa, 2001; Chirinos & Pereira, 1999).

HC saturados > aromáticos ligeros > aromáticos de alto peso molecular > asfaltenos, resinas.

Durante el proceso de biorremediación, los microorganismos como bacterias y hongos transforman los compuestos orgánicos derivados del hidrocarburo en dióxido de carbono (CO₂), agua (H₂O) y humus. Este proceso puede representarse así:



Se generan subproductos como metales y otros compuestos inorgánicos, los cuales quedan inmovilizados en el entorno aeróbico (rico en oxígeno) debido a los procesos naturales de intercambio iónico que tienen lugar en el suelo. Esto resulta en una unión química y física con las partículas del suelo, lo que evita la contaminación del agua. El residuo resultante se conoce como Total Petroleum Hydrocarbon (TPH; en español hidrocarburos totales de petróleo) (Ercoli et al., 2001; Dibble & Bartha, 1979).

El entorno ambiental desempeña un papel clave en la eficiencia del proceso de biorremediación, ya que variables como la temperatura, el oxígeno y los nutrientes afectan directamente la biodegradación. Para alcanzar una degradación efectiva, la temperatura debe mantenerse dentro de un intervalo de 5 °C–35 °C, ya que la degradación se relaciona directamente con la temperatura. A temperaturas más bajas, la degradación es menor, hay menos volatilidad y mayor viscosidad, por lo que se recomiendan temperaturas moderadas a elevadas para favorecer el proceso.

En cuanto al oxígeno, es crucial que esté disponible en cantidades adecuadas, pues la mayoría de los procesos de biodegradación funcionan de manera más eficiente en condiciones aerobias. En suelos arenosos, donde el aire circula con mayor facilidad, se incrementa la disponibilidad de oxígeno, lo que favorece tanto la volatilización como la degradación (Holliger & Zehnder, 1996).

2.3.2.3 La Degradación de Algunos Hidrocarburos Típicos del Petróleo.

Para abordar este tema, se requiere examinar la ruta de degradación de los hidrocarburos en el suelo.

Debido a que numerosos hidrocarburos aromáticos experimentan una degradación hacia benzoato, se observa un aumento significativo en la expresión génica relacionada con la degradación de benzoato. Así, se seleccionaron hidrocarburos comunes del petróleo para investigar sus rutas de degradación. Los alcanos fueron sometidos a oxidación mediante el alcano 1-monooxigenasa, lo que generó un 1-alcohol que fue posteriormente reducido a aldehído por el alcohol deshidrogenasa. Este aldehído experimentó una oxidación adicional a ácidos grasos a través del aldehído deshidrogenasa. Además, parte de los ácidos grasos se convirtieron en ácido graso ω -hidroxi debido a la acción del alcano 1-monooxigenasa, mientras que el resto se oxidó a α -hidroxi ácido graso mediante la nadph-citocromo P450 reductasa. Esto culminó en su transformación a acetil-CoA en una serie de pasos a la que siguió su conversión a butanoato. El metabolismo continuó a través de la vía del glioxilato y dicarboxilato, así como del ciclo del citrato.

Se identificaron diversos hidrocarburos policíclicos aromáticos (HAP) representativos para examinar sus rutas de degradación. Fluoreno, fenantreno y antraceno se transformaron en ftalato mediante una serie de reacciones redox, para luego ingresar en la vía de degradación de benzoato. Pyrene, por su parte, experimentó una apertura del anillo inicial a través de una acción redox, formando 3,4-dihidroxifenantreno. Los pasos subsiguientes fueron análogos a los de la degradación de fenantreno y concluyeron finalmente en la vía de degradación de benzoato (Liu et al., 2022).

El metabolismo catabólico bacteriano para la degradación de hidrocarburos puede ser aeróbico o anaeróbico. La concentración de oxígeno afecta las tasas de degradación; de hecho, la biodegradación es más rápida y eficiente porque el oxígeno es el electrón final aceptador. En condiciones aeróbicas, los hidrocarburos se canalizan hacia vías degradativas que convergen en el ciclo del ácido tricarboxílico (ciclo TCA o ciclo de Krebs) y conducen a la completa oxidación del sustrato con formación de CO₂ y NADH. Este último transfiere electrones a la cadena de transporte, que tiene

al O₂ como aceptor final y cuyo alto nivel redox potencial permite un alto rendimiento energético.

La primera etapa de la degradación aeróbica de los hidrocarburos consiste en la introducción de oxígeno en el sustrato, lo que produce que la molécula sea más soluble en agua y aumenta su reactividad. El oxígeno se introduce en forma de un grupo hidroxilo (-OH) y deriva del oxígeno molecular (O₂). La reacción de oxigenación es catalizada por enzimas llamadas oxigenasas. Las reacciones solamente pueden ocurrir dentro de una célula bacteriana, porque estas coenzimas se degradan rápidamente en el ambiente extracelular. Esto significa que las oxigenasas únicamente pueden actuar dentro de células bacterias y que un hidrocarburo sufre reacciones de oxidación solo después de haber sido transportado dentro de una celda. Las monooxigenasas pueden actuar tanto sobre hidrocarburos aromáticos como alifáticos, mientras que las dioxigenasas actúan principalmente sobre los hidrocarburos aromáticos (Barbieri et al., 2012).

2.3.2.4 Degradación de Hidrocarburos.

Las estrategias de biodegradación que ocurren espontáneamente en el entorno se denominan atenuación natural. Este proceso transforma los contaminantes en sustancias menos perjudiciales a través de mecanismos físicos (como la evaporación, dispersión o dilución), químicos (como la oxidación y reducción) y biológicos (por medio de la degradación), lo que reduce tanto su concentración como su movilidad y masa total (Gideon & Paschal, 2008). Entre las condiciones que contribuyen al rendimiento y a la factibilidad de la degradación, según Maroto y Rogel (2001), están las siguientes:

- ✓ Cualidades geológicas y geoquímicas apropiadas del suelo.
- ✓ Confirmación de la presencia y abundancia de comunidades microbianas con capacidad degradativa.
- ✓ Elaboración y preservación en el medio de productos secundarios de carácter constante o más peligrosos que los iniciales, en el proceso y finalmente.
- ✓ Ausencia de sustancia libre en flotación por encima del nivel freático.
- ✓ Niveles adecuados de oxígeno disuelto en el entorno.

- ✓ Disponibilidad de aceptores de electrones en ambientes anaerobios, como nitrógeno, fósforo o sulfatos, entre otros.
- ✓ Existencia de un resultado de retardo beneficioso para que se obtengan los acontecimientos de sorción con alta eficacia.
- ✓ Obtención de una disolución óptima para que la concentración disminuya.

Tal como se ha señalado, los hidrocarburos poseen la capacidad de degradarse tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. Sin embargo, la eficiencia de la degradación aeróbica está influenciada por la complejidad de la molécula afectada y la disponibilidad de aceptores de electrones. Los hidrocarburos que presentan estructuras moleculares voluminosas, con ramificaciones o múltiples anillos aromáticos, tienden a ofrecer mayor resistencia al proceso biológico de descomposición. Esta baja degradabilidad se debe en parte a su escasa solubilidad en agua, lo que dificulta la interacción con los microorganismos; además, su compleja configuración química impide que las enzimas microbianas puedan actuar eficazmente desde el inicio.

Por lo general, el proceso de degradación comienza con la incorporación de oxígeno a la molécula, una etapa que requiere tanto energía como oxígeno elemental. El hidrocarburo se oxida utilizando dos electrones, permite que los productos resultantes sean más accesibles para los microorganismos. Estos compuestos oxigenados, a su vez, pueden ser fácilmente transformados mediante reacciones adicionales como la deshidrogenación y la hidroxilación, lo que también mejora su solubilidad en medios acuosos (Maroto & Rogel, 2001).

2.3.2.5 Variables que Influyen en la Biorremediación.

Entre los principales desafíos para la biodegradación de contaminantes en suelos se encuentran la presencia de concentraciones elevadas de contaminantes en el suelo, las cuales pueden afectar negativamente a las poblaciones microbianas encargadas del proceso. Asimismo, la escasez de nutrientes esenciales puede limitar la eficiencia de la biorremediación. No obstante, incluso con niveles mínimos de nitrógeno y fósforo, es posible llevar a cabo la degradación, aunque a un ritmo más lento. Factores ambientales como la temperatura, el pH, la humedad, la disponibilidad de nutrientes (especialmente nitrógeno y fósforo), la presencia de aceptores de electrones como oxígeno, nitratos y sulfatos, así como la diversidad y abundancia de microorganismos,

desempeñan un papel crucial en la eficacia del proceso de biorremediación (Iturbe et al., 2002).

- **Temperatura**

Representa uno de los factores ambientales claves, ya que influye directamente en la biodegradación al afectar las propiedades físicas y químicas del petróleo y sus compuestos derivados (Pardo et al., 2004). A temperaturas bajas, la viscosidad de los hidrocarburos tiende a incrementarse, la volatilización de los alcanos de cadena corta disminuye y se reduce la disolución del O₂ en agua, lo que influye en la biodegradación. En cambio, al aumentar la temperatura, los niveles de degradación suelen incrementarse de forma proporcional.

Generalmente, las especies bacterianas prosperan en temperaturas comprendidas entre 18 °C y 30 °C. (condiciones mesófilas). No obstante, cuando la temperatura supera los 40 °C, la actividad microbiana se reduce significativamente, lo cual puede provocar una sustitución de especies por cepas más termotolerantes. Asimismo, en estas condiciones extremas, es posible que disminuya la eficacia del proceso de biorremediación debido a la desnaturalización de enzimas y proteínas de las bacterias (Ríos, 2005).

- **pH**

Representa un factor químico esencial en la rehabilitación de suelos afectados por hidrocarburos, ya que influye de manera directa en la capacidad de las partículas del suelo para adsorber iones, lo que repercute en la solubilidad, movilidad y configuración química de los contaminantes presentes (Volke & Velasco, 2002).

Este parámetro también regula la biodisponibilidad de fuentes de carbono y energía, esenciales para la actividad microbiana. Cuando el pH es muy ácido o excesivamente alcalino, el ritmo de biodegradación se ralentiza, pues estas condiciones afectan negativamente el crecimiento y la eficiencia metabólica de los microorganismos. En la mayoría de los casos, los suelos afectados por contaminación presentan una tendencia hacia la acidez, lo que limita su capacidad degradativa. Se considera que un rango óptimo para la biodegradación está entre 6 y 8, siendo ideal un pH neutro de entre 7.4 y 7.8, con la menor variabilidad posible. Además, el pH influye en la disponibilidad de nutrientes: por ejemplo, el fósforo es más soluble a pH 6.5,

mientras que el plomo presenta baja solubilidad entre 7 y 8. Para minimizar la movilidad de metales pesados, se recomienda mantener un pH superior a 6 (Ríos, 2005).

- **Humedad**

Representa un factor crucial en la biorremediación porque actúa como vehículo para transportar oxígeno y nutrientes hacia las células microbianas, además de formar parte del protoplasma bacteriano, lo cual es esencial para su metabolismo y desarrollo. Se recomienda mantener la humedad del suelo dentro de un rango del 20 % al 75 % de su capacidad de campo, entendida esta como la cantidad de agua que puede retener antes de saturarse (Gómez et al., 2008). Si la humedad es excesiva, se reduce la disponibilidad de oxígeno, lo que inhibe la proliferación bacteriana. Por el contrario, niveles muy bajos o ausencia de humedad impiden la difusión gaseosa, lo que genera zonas con condiciones anaerobias. Por ello, el balance hídrico del suelo puede afectar de forma crítica la efectividad del proceso de biodegradación (Torres & Zuluaga, 2009).

- **Aceptor de electrones**

Desempeñan un papel esencial al estimular la actividad de las comunidades microbianas nativas o introducidas en entornos contaminados (Hamdi et al., 2007). En la biorremediación, un proceso clave es la transferencia de electrones, pues permite que los microorganismos generen la energía que necesitan para crecer. Esta energía se produce cuando se oxidan compuestos reducidos, y las enzimas microbianas aceleran este proceso al facilitar el paso de electrones. Las bacterias comúnmente utilizan el oxígeno o los nitratos como aceptores. En ambientes aerobios, el oxígeno actúa como aceptor, lo cual permite a los microorganismos transformar los contaminantes en dióxido de carbono, agua y masa celular mediante la acción de enzimas llamadas oxigenasas. Pero si en lugar de oxígeno se usan sulfatos o dióxido de carbono, el proceso ocurre sin oxígeno (en forma anaerobia) y los contaminantes se degradan mediante rutas metabólicas diferentes (Gómez et al., 2008).

- **Microorganismos**

La descomposición biológica de hidrocarburos en ambientes como el suelo y el agua requiere de la intervención de microorganismos (principalmente bacterias, hongos y algas) cuya actividad bioquímica permite la oxidación de los hidrocarburos. Las proporciones de bacterias y hongos en el suelo varían considerablemente, abarcando desde un 0.13 % hasta un 50 % en el caso de bacterias, y entre un 6 % a 82 % para hongos, en relación con la comunidad heterótrofa total presente. La proporción entre estos grupos microbianos está condicionada por factores específicos del entorno. En suelos considerados representativos, la densidad total de microorganismos heterótrofos oscila entre 10^7 y 10^9 UFC/g. En suelos no contaminados, el número de microorganismos con capacidad potencial de degradación se sitúa entre 10^5 y 10^6 UFC/g, mientras que en suelos contaminados este rango aumenta a entre 10^6 y 10^8 UFC/g (Ríos, 2005).

2.4. Marco Conceptual

- ❖ **Crecimiento.** Incremento de células microbianas en un determinado tiempo, en este influyen los factores fisicoquímicos del ecosistema natural.
- ❖ **Bioaumentación.** Este proceso se basa en la incorporación intencional de cepas microbianas externas con alta capacidad para degradar contaminantes, con el objetivo de potenciar la biorremediación de suelos impactados por petróleo crudo.
- ❖ **Biodisponibilidad.** Es la adsorción por la parte sólida, que depende del tamaño del poro y la disolución en la fase líquida, para que los microorganismos tengan acceso a la materia orgánica contenida en el petróleo crudo.
- ❖ **Microencapsulación de microorganismos.** Es una técnica mediante la cual los microorganismos degradadores se recubren para mejorar su supervivencia en el suelo contaminado con petróleo crudo.

- ❖ **Biotensioactivos.** Son producidos por microorganismos que solubilizan los hidrocarburos del petróleo crudo, y mejoran así la eficiencia de degradación bacteriana.

- ❖ **Normativa de comparación:** se cuenta con los estándares de calidad ambiental (ECA) para suelo (Tabla 3).

Tabla 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 EPA8270
Benzo(a)pireno	0.1	0.7	0.7	EPA8270
Hidrocarburos de petróleo				
Fracción de hidrocarburos F1 ⁽¹¹⁾ (C ₆ -C ₁₀)	200	200	500	EPA8015
Fracción de hidrocarburos F2 ⁽¹²⁾ (>C ₁₀ -C ₂₈)	1200	1200	5000	EPA8015
Fracción de hidrocarburos F3 ⁽¹³⁾ (>C ₂₈ -C ₄₀)	3000	3000	6000	EPA8015
Compuestos organoclorados				
Bifenilos policlorados-PCB ⁽¹⁴⁾	0.5	1.3	33	EPA8082 EPA8270
Tetracloroetileno	0.1	0.2	0.5	EPA8260
Tricloroetileno	0.01	0.01	0.01	EPA8260
Inorgánicos				
Arsénico	50	50	140	EPA3050 EPA3051
Bario Total ⁽¹⁵⁾	750	500	2000	EPA3050 EPA3051
Cadmio	1.4	10	22	EPA3050 EPA3051
Cromo Total	**	400	1000	EPA3050 EPA3051
				EPA 3060/EPA

Cromo VI	0.4	0.4	1.4	7199 ó DIN EN 15192 ⁽¹⁶⁾
Mercurio	6.6	6.6	24	EPA 7471 EPA 6020 ó 200.8
Plomo	70	140	800	EPA3050 EPA3051
Cianuro Libre	0.9	0.9	8	EPA 9013 SEMWW-AWWA- WEF 4500 CN F o ISSO 17690:2015

Fuente. Datos tomados del D. S. 011-2017-MINAM.

De acuerdo con los resultados de las fracciones de hidrocarburos obtenidos, se realizó la comparación de los resultados obtenidos con los ECA para suelo agrícola según el D. S. 011-2017-MINAM, y se obtuvo que estaban por encima de los límites establecidos.

CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA

3.1. Metodología

3.1.1. Tipo y Diseño de Investigación

Esta investigación se clasifica como aplicada, con un enfoque cuantitativo y un diseño de tipo experimental. Considera el desarrollo de competencias fundamentales, tanto transversales como específicas, incluyendo habilidades duras y blandas, alineadas con las exigencias de la sociedad actual basada en el conocimiento y la información (Lozada, 2016).

Para el análisis estadístico, se aplicó un modelo matemático factorial con asignación aleatoria total. La variable principal considerada fue la concentración de hidrocarburos totales. La obtención de los datos experimentales se llevó a cabo mediante un diseño factorial completo, en el cual no se incorporaron puntos centrales ni réplicas.

3.2. Unidad de Análisis

La unidad de análisis de la investigación es un suelo de la playa de Ventanilla, en el departamento de Lima en Perú, proveniente de la zona costera del norte de Perú, que está contaminada con petróleo crudo mediano, con una densidad de 20 °API a 30 °API. Se utilizó una muestra de 20 kg de suelo costero arenoso al cual se le agregó de 25 % a 50 % de petróleo crudo liviano, para medir la eficiencia de biorremediación del suelo contaminado utilizando un consorcio bacteriano.

3.3. Población y muestra

3.3.1. Población

La población de la investigación son los suelos arenosos de las playas del distrito de Ventanilla (Lima), zona central del litoral costero del norte de Perú, a 71 m s. n. m., y coordenadas 11°51'20" S, 77°4'25".

El suelo fue preparado con la finalidad de medir la eficiencia del consorcio bacteriano en la biodegradación de petróleo crudo, para evitar que contenga elementos que no fueran hidrocarburos. Para no crear otros metales en la medición neta de los microorganismos que actúan frente a los hidrocarburos, se decidió que el suelo de la investigación fuera un suelo sintético.

El muestreo se realizó mediante la “Guía para muestreo de Suelos” establecida por el D. S. 002-2013-MINAM, estándares de calidad ambiental (ECA) para el suelo (2014).

3.3.2. Tamaño de la Muestra

El tamaño de la muestra de la investigación es un metro cúbico de suelo de las playas del distrito de Ventanilla (Lima). El muestreo se realizó en el distrito de Ventanilla. Se recolectaron tres muestras de 20 kg de suelo arenoso, procedente de la zona costera del norte de Lima. Estas fueron trasladadas al Laboratorio de Normalización de Petróleo y Derivados de la Universidad Nacional de Ingeniería, en bolsas de polietileno etiquetadas.

3.3.3. Selección de la Muestra

Se colocó una muestra de 20 kg en cada terrario, la cual fue deliberadamente contaminada con petróleo crudo liviano. De cada terrario, se retiraron muestras de aproximadamente 1 kg. En el tiempo inicial y después de unos dos días, durante noventa días, se extrajeron muestras para medir los HTP, humedad, pH, número de

colonias de microorganismos, temperatura y tiempo.

3.4. Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos

-Técnicas: Observación científica

Las pruebas experimentales se realizaron utilizando la observación científica, midiendo los parámetros o variables del proceso de biorremediación de suelos contaminados con petróleo crudo y para observar el comportamiento de los microorganismos dentro del proceso de biorremediación de suelos contaminados con petróleo crudo.

-Instrumento: Fichas o Formatos de recolección de datos debidamente validados

Las fichas de recolección de datos son las siguientes:

- Ficha 1: Degradación de *Bacillus subtilis*
- Ficha 2: Degradación de *Bacillus amyloliquefaciens*
- Ficha 3: Degradación de *Agrobacterium tumefaciens*
- Ficha 4: Conteo del consorcio bacteriano
- Ficha 5: Forma, Aspecto, Propiedades (Anexo 7)
- Ficha 6: pH, T, CO₂
- Ficha 7: Porcentaje de concentración de degradación (Anexo 7)
- Ficha 8: Dosis de la concentración del consorcio bacteriano
- Ficha 9: Medición de pH, conductividad eléctrica, salinidad, permeabilidad, densidad (Anexo 2)

3.4.1. Materiales y Métodos

3.4.1.1 Material Biológico.

Durante el desarrollo de esta investigación se emplearon los siguientes microorganismos de la patente Ultra-Archaea, que son los siguientes: *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, heterótrofos viables, como se muestra en la foto de la Figura 3.



Figura 3. Consorcio bacteriano liofilizado – Ultra Archaea. Ultratech International Inc. Y aspecto de degradación de hidrocarburos.

3.4.1.2 Características del Consorcio Ultra-Archaea.

Ultra-Archaea son los organismos vivos más antiguos del planeta y de los microorganismos, junto con las bacterias y eucariotas. Pueden sobrevivir en una amplia gama de formas de condiciones, incluidos ambientes extremos.

Ultra-Archaea es una colección basada en arqueas de más de cien especies diferentes de microbios que se cultivan desde entornos accidentados, como respiraderos submarinos o sitios donde hay actividad volcánica. Luego, son cultivados con el petróleo crudo como única fuente de alimento; por ello, crecen en miles de compuestos orgánicos del benceno a hidrocarburos aromáticos policíclicos. Las Ultra-Archaea se envían inactivas en una arcilla de bentonita o portador a base de azúcar, y cuando el portador se disuelve en agua, las arqueas se activan y el agua puede volverse temporalmente turbia debido a la infusión de la arcilla.

Ultra-Archaea digiere hidrocarburos y otros compuestos orgánicos como moléculas y los descompone en subproductos inofensivos de carbono, dióxido de carbono y lípidos (un compuesto natural soluble, material graso que es alimento para peces y plantas). Cuanto más complejo el hidrocarburo, más tiempo puede tomar este proceso; por ejemplo, el queroseno y el diésel se consumirán más rápido que el aceite de motor.

Se infunde de 5000 a 90,000 millones de arqueas por gramo en un derrame de petróleo en un recipiente grasiento, un separador de aceite/agua, etcétera, y en cuestión de horas, estas arqueas se han reproducido desde miles de millones por gramo hasta billones. Con agua, oxígeno y una fuente de alimento orgánico (como aceite, desechos humanos y animales, compost, etcétera), estos microbios formarán vastas colonias y digerirán y remediarán el suelo y agua, así como trampas de grasa, fosas sépticas, drenajes pluviales y casi cualquier otra área donde haya contaminantes presentes.

Estos microorganismos son usados para limpiar derrames de petróleo, remediar el suelo, residuos agrícolas, controlar algas; y limpiar aguas residuales (grasas, aceites y grasas), tanques sépticos y aguas negras para vehículos recreativos.

3.4.2. Métodos de investigación

3.4.2.1 Caracterización de los insumos del procedimiento experimental.

- **Caracterización del suelo costero – Ventanilla (Lima, Perú)**

En la Tabla 4, se muestran las metodologías de los análisis de salinidad de suelo arenoso costero de Ventanilla, que se realizaron en el Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas, Aguas y Fertilizantes de la Universidad Nacional Agraria La Molina (Anexo 2, que son los siguientes:

- **pH.** En el potenciómetro, suspensión suelo:agua 1:1 o en suspensión suelo:KCl N, relación 1:2.5.
- **Conductividad eléctrica (CE)** (del extracto acuoso en suelo:agua 1:1 o en el extracto de la pasta de saturación).

- **Fósforo disponible** (método del Olsen modificado, extracción con $\text{NaHCO}_3=0.5\text{M}$, pH 8.5), potasio disponible (extracción con acetato de amonio $(\text{CH}_3\text{-COONH}_3)\text{N}$, pH 7.0).
- **Calcáreo total CaCO_3** o acidez cambiabile (método gas-volumétrico utilizando un calcímetro).
- **Porcentaje de materia orgánica** (método de Walkley y Black, oxidación del carbono orgánico con dicromato de potasio, $\% \text{M.O.} = \% \text{C} \times 1.724$).
- **Textura:** según el sistema de clasificación por textura desarrollado por el U. S. Department of Agricultura (USDA), el tamaño de las partículas se clasifica así:
 - Tamaño de la arena: 2.0 a 0.05 mm en diámetro
 - Tamaño del limo: 0.05 a 0.002 mm en diámetro
 - Tamaño de la arcilla: menor que 0.002 mm en diámetro
- **CIC** (capacidad de intercambio catiónico) (saturación con acetato de amonio $(\text{CH}_3\text{-COOCH}_4)\text{N}$, pH 7.0)
- **Cationes cambiables:** reemplazo con acetato de amonio $(\text{CH}_3\text{-COONH}_4)\text{N}$, pH 7.0, cuantificación por fotometría de llama y/o absorción atómica
- **Color del suelo gris oscuro** (sistema de Munsell)

- **Caracterización del petróleo crudo**

El petróleo crudo está compuesto por una mezcla tan diversa de sustancias que resulta poco común encontrar dos muestras idénticas. Su clasificación y valoración económica se determinan a través de estándares internacionales, como los propuestos por el American Petroleum Institute (API). En términos generales, una mayor cantidad de grados API está asociada a una mejor calidad del petróleo.

Los petróleos más valorados se agrupan en categorías como “liviano”, “suave” o “dulce”. En esta clasificación, se considera liviano aquel petróleo que supera los 26 °API; los intermedios se sitúan entre los 20 °API y 25 °API, y los pesados presentan valores inferiores a 20 °API. En la Tabla 4, se muestra que el crudo tiene 28.57 °API, lo cual indica un crudo liviano o ligero (Vargas et al., 2004).

Tabla 4. Propiedades principales del petróleo crudo.

Propiedad	Norma
Densidad a 15 °C	ASTM D-1298
P. Específico	Calculado
15.6/15.6 °C	
Densidad API	Calculado
Azufre	ASTM D-4294
Nº de Neutralización	ASTM D-664
Presión de Vapor REID	ASTM D-6377
Punto de Vertido	ASTM D-97
Viscosidad 20 °C	ASTM D-445
Viscosidad 40 °C	ASTM D-445
Sulfhídrico disuelto	ARAMCO H-3
Sulfhídrico evol. A	REPSOL
340°C	
Residuo de Carbón	ASTM D-4530
Asfaltenos	CALCULADO
Nitrógeno	ASTM D-4629
Cadmio	-
Calcio	Abs. Atómica
Cobre	Abs. Atómica
Fósforo	Abs. Atómica
Hierro	Abs. Atómica
Níquel	Abs. Atómica
Plomo	-
Silicio	Abs. Atómica
Sodio	Abs. Atómica
Vanadio	Abs. Atómica
Cloro Total	ASTM D-7536
Cloro fase inorgánica	ASTM D-7536
Cloro fase orgánica	ASTM D-7536
Agua por destilación	ASTM D-4006
Aromaticidad disponible	REPSOL
40 °C	
Aromaticidad requerida	REPSOL
40 °C	
Valor P 40 °C	REPSOL

Composición en LPG

Composición en C ₂	Cromat. Gases
Composición en C ₃	Cromat. Gases
Composición en iC ₄	Cromat. Gases
Composición en nC ₄	Cromat. Gases
Composición en iC ₅	Cromat. Gases
Composición en nC ₅	Cromat. Gases

Fuente. Información entregada por Repsol en 2023 en comunicación personal.

La Tabla 4 también muestra mayor composición en butano, pentano y los isómeros de cada hidrocarburo, medidos mediante cromatógrafo de gases.

En la Figura 4, se ven las muestras de petróleo crudo ligero.

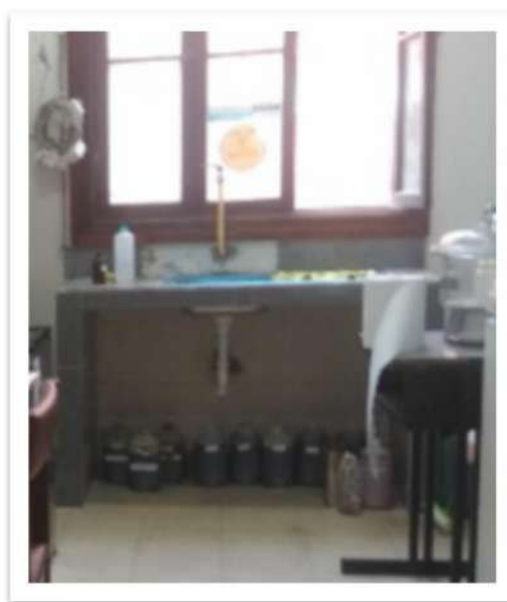


Figura 4. Muestras de petróleo crudo – 2023.

3.4.2.2. Identificación de las Bacterias del Consorcio Bacteriano.

Las pruebas biológicas de la presente investigación fueron realizadas por la empresa Innova Biotech Agro S. A. C.

Procedimiento experimental para la identificación y conteo bacteriano

- **Selectividad para *Pseudomonas* y aislamiento en agar cetrimide**

Para el aislamiento y selección de las especies de pseudomonales asociadas al producto, se pesaron 5 g del consorcio latente en base de arcilla, en condiciones de esterilidad en una cabina de flujo laminar. Esta muestra fue suspendida en 100 mL de medio líquido de Bushnell Haas: HB (Bushnell Haas, 1941, composición (g/L): 0.2 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.02 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 KH_2PO_4 , 1 K_2HPO_4 , 1 NH_4NO_3 , 0.05 FeCl_3) con 1 % (p/v) de petróleo como única fuente de carbono para favorecer la multiplicación de microorganismos degradantes de hidrocarburos.

La mezcla fue incubada a temperatura ambiente, bajo agitación constante a 180 rpm durante siete días. Posteriormente, se realizó una dilución con medio HB al (5 %, v/v) con crudo (1 % w/v) generando tres réplicas. Cada una fue sembrada en placas de agar selectivo para *Pseudomonas* suplementado con cetrimide (C: 10 g) (Figura 5). Este medio, por su selectividad, favorece el desarrollo exclusivo de este género. Las colonias obtenidas fueron nuevamente cultivadas en el mismo agar para su purificación, permitiendo observar tanto variantes pigmentadas como no pigmentadas. La incubación final se realizó a 30 °C durante 48 horas. Además, las colonias fueron subcultivadas en placas de agar nutritivo (Merck), con el propósito de observar las características fenotípicas.



Figura 5. Colonias de bacterias presuntivas de Pseudomonas en agar cetrimide.

- **Aislamiento de otras cepas potenciales utilizando agar nutritivo más fluconazol**

Para aislar las especies bacterianas asociadas al producto, se tomaron 5 g en condiciones de esterilidad. Esta muestra fue suspendida en 100 mL de medio líquido de Bushnell Haas (HB): HB (Bushnell Haas, 1941, composición) (g/L): 0.2 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.02 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 KH_2PO_4 , 1 K_2HPO_4 , 1 NH_4NO_3 , 0.05 FeCl_3) con 1 % (p/v) de petróleo como única fuente de carbono para favorecer la multiplicación de microorganismos hidrocarburos degradantes.

La muestra se incubó a 30 °C en un agitador orbital a 180 rpm durante 7 días. Luego, se la diluyó en medio líquido HB (5 %, v/v) con crudo (1 % w/v) para obtener tres réplicas: cada una fue sembrada en placas de agar nutritivo más antimicótico fluconazol. Las colonias aisladas se sembraron nuevamente en el mismo agar para su purificación. La incubación se efectuó a 30 °C durante 48 horas.

- **Selección de cepas competitivas en la degradación de petróleo (selección horizontal)**

Para la selección horizontal de las cepas, estas fueron reactivadas en caldo nutritivo e incubadas a 35 °C durante 24 horas. Posteriormente, se realizaron siembras masivas en agar mineralizado 1 % de crudo de petróleo a 30 °C durante 7 días, verificando el crecimiento más rápido por cada cepa (por triplicado), como se muestra en la Figura 6.

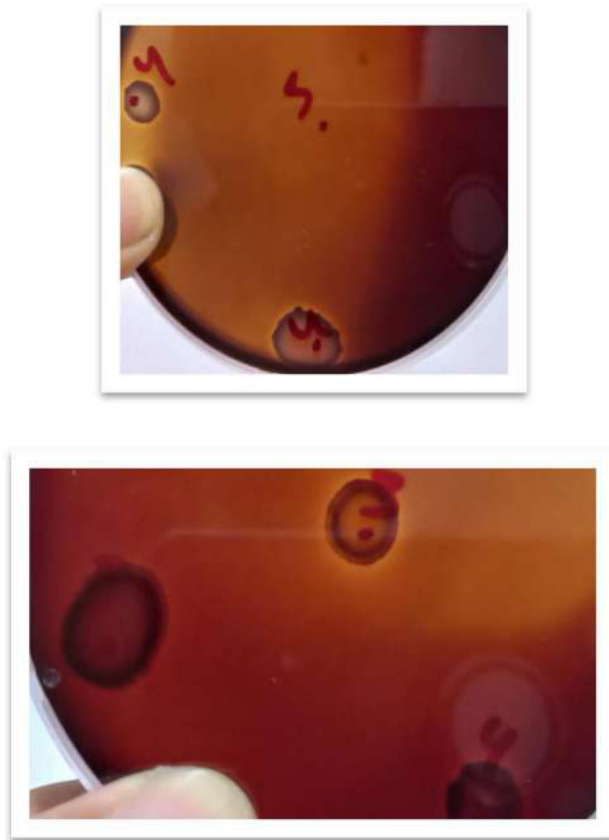


Figura 6. Resultado del crecimiento por triplicado de cepas en agar mineralizado, 1 % de crudo de petróleo después de 7 días.

Finalmente, como se muestra en la Figura 7, se sembraron las mejores cepas en agar tween 80 (medio mineralizado aditivado con tween 80 al 1 % p/v), incubándolas durante 4 días a temperatura de 30 °C y, posteriormente, guardándolas en frío (4 °C) durante 48 horas. Se evaluó la degradación del aceite (formación de micelas alrededor de las colonias) de cada cepa evaluada.

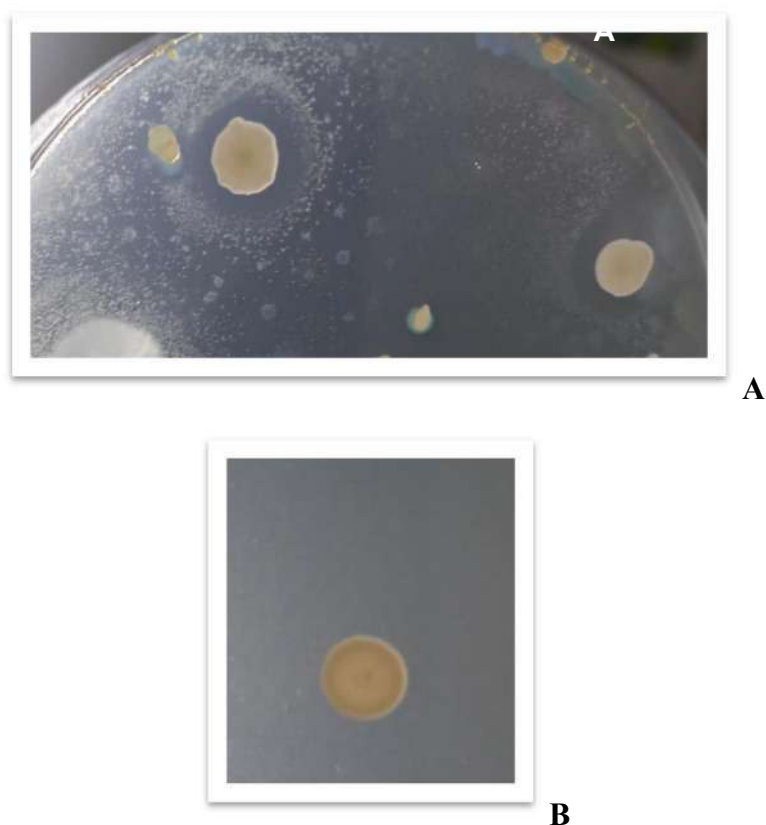


Figura 7. A: Colonias degradando el tween 80 presente en el medio sólido con micelas alrededor de la colonia. B: Colonia en el mismo agar, pero sin actividad hidrolítica.

3.4.2.3. Análisis de la Cinética Microbiana de los Microorganismos Evaluados en la Degradación de Hidrocarburos en Terrarios.

Se evaluó el desarrollo de la concentración celular mediante la siguiente metodología:

- **Conteo del consorcio bacteriano: unidades formadoras de colonia (UFC/g)**

Se extrajo una muestra y luego se pesó 1.0 g de material de terrario; el cual se adicionó a un tubo con 9 mL de solución salina estéril (NaCl 0.85 % p/v). Después, se utilizó un vórtex para homogenizar y se diluyó hasta 10^{-6} y 10^{-7} , sembrando por diseminación las dos últimas diluciones en agar: nutritivo, hicrome bacillus y cetrimide aditivado con fluconazol (0.05 g/L), todos por triplicado.

Se incubó a 30 °C entre 12 y 18 horas, y se evaluaron las características culturales de las cepas, tanto las del inoculo del consorcio como la de los heterótrofos viables. Se repitió el mismo procedimiento para cada toma de muestra.

3.4.2.4 Metodología del Procedimiento Experimental para la Determinación de HTP.

En la Figura 8, se muestra el diagrama de flujo del procedimiento experimental de las pruebas experimentales y cómo se obtuvo el % Rendimiento de HTP del proceso de biorremediación de suelo contaminado con petróleo crudo.

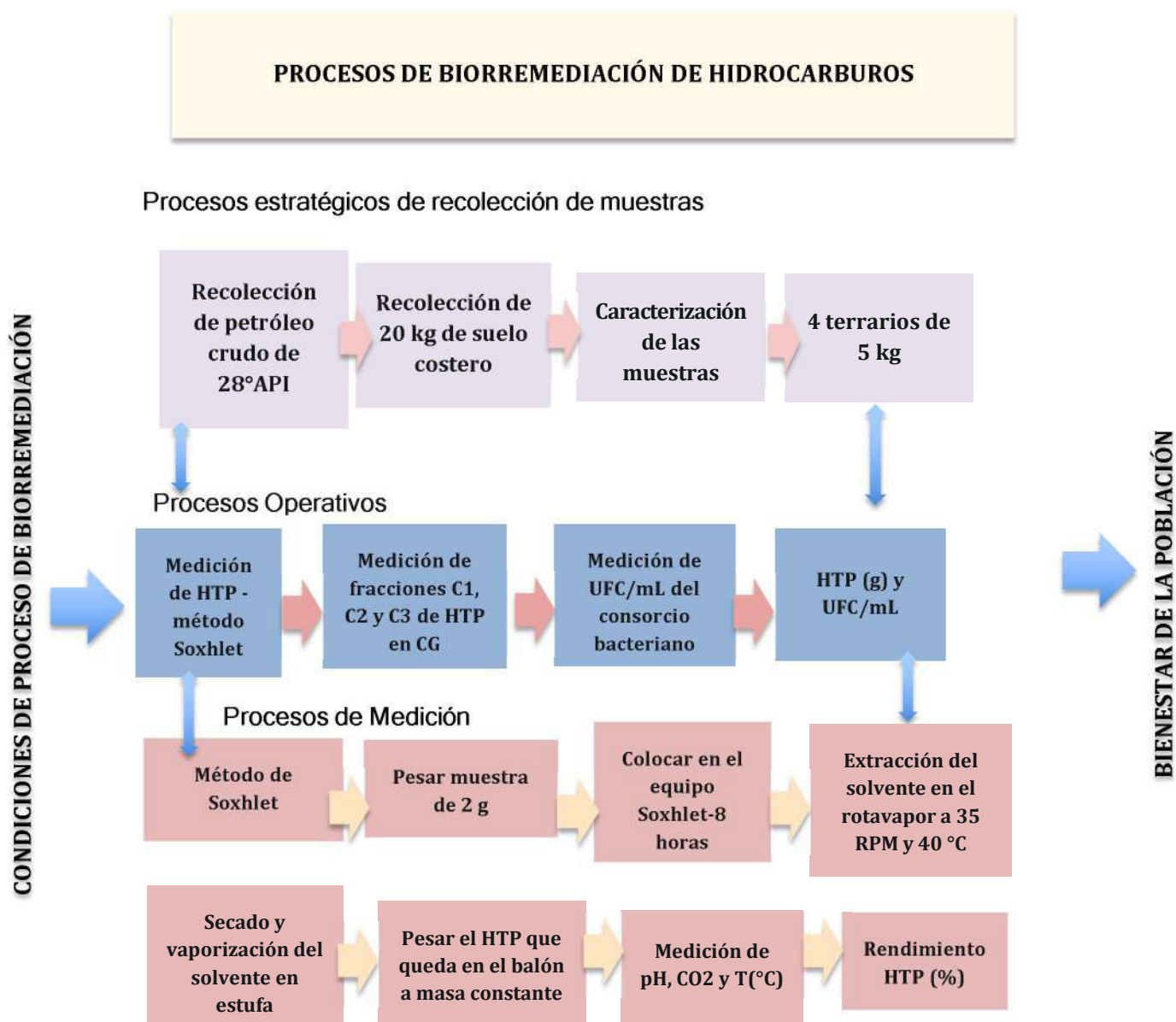


Figura 8. Diagrama de flujo del procedimiento experimental.

El procedimiento experimental comprendió las siguientes etapas:

❖ **Ubicación del laboratorio donde se realizaron las pruebas experimentales**

Las pruebas experimentales se realizaron en el Laboratorio de Nanotecnología en el pabellón D1, de la Facultad de Petróleo, Gas Natural y Petroquímica de la Universidad Nacional de Ingeniería.

❖ **Preparación de la muestra en los terrarios**

Una vez que la muestra llega al laboratorio, se procede de la siguiente manera: si se detecta un nivel de humedad superior al 30 %, esta se deja secar al aire libre durante un período de dos días. Esta etapa busca optimizar el proceso de extracción de hidrocarburos, debido a la inmiscibilidad del diclorometano (disolvente utilizado para la extracción del hidrocarburo) con el agua.

La muestra que se obtuvo del campo se envía al laboratorio. Dicha muestra es de 5 kg aproximadamente y es colocada en el terrario; para ello, primero se realiza un tamizado con el fin de eliminar las partículas de mayor tamaño que hubiera en la muestra. Como se observa en la Figura 9, se realizó el tamizado de partículas gruesas en el suelo arenoso con el objetivo de obtener una muestra homogénea, luego se realizó el pesaje (5 kg cada muestra) para, finalmente, mezclarla con los insumos en los terrarios.



Figura 9. Medición de la masa y tamizado de suelo arenoso costero para obtener una muestra homogénea.

❖ Preparación de los terrarios

- Previamente, se realizó la medición y caracterización fisicoquímicas de los hidrocarburos presentes en el petróleo crudo y el suelo arenoso, así como los análisis de conteo biológico del consorcio bacteriano y heterótrofos viables de los cuatro terrarios a condiciones ambientales.
- Se prepararon cuatro terrarios de acero inoxidable recubierto con pintura epóxica, y se colocó 5 kg de suelo arenoso costero: 25 % a 50 % de petróleo crudo. Esta adición del petróleo crudo se realizó manualmente; luego, se añadieron microorganismos

adaptados a hidrocarburos en 10 % a 15 % de consorcio bacteriano y 5 % de agua potable. Posteriormente, se mezcló todo el suelo hasta alcanzar la homogeneidad en la mezcla. Los microorganismos fueron incorporados con un suelo contaminado anteriormente con petróleo crudo; para la técnica de bioaumentación, se les agregó agua y se realizó un volteo manual (oxígeno) para beneficiar el desarrollo y crecimiento de los microorganismos degradadores. La distribución de los componentes en los terrarios se muestra en la Tabla 5.

- **Terrario 1.** En este terrario, se introdujo suelo arenoso con 25 % de petróleo crudo (1250 mL). Posteriormente, se procedió a la inoculación en el suelo el consorcio bacteriano exógeno seleccionado (10 %) (500 mL de cultivo y 333.33 mL de agua destilada).
- **Terrario 2.** En este terrario, se introdujo suelo arenoso con 50 % de petróleo crudo (2500 mL). Al igual que en el terrario anterior, se aplicó una inoculación en el suelo el consorcio bacteriano exógeno seleccionado (10 %) (500 mL de cultivo y 333.33 mL de agua destilada).
- **Terrario 3 (Control).** En este terrario, se introdujo suelo arenoso con 50 % de petróleo crudo (2500 mL). Denominado control abiótico, este terrario fue evaluado a condiciones normales con el propósito de evaluar únicamente la acción de los microorganismos autóctonos y la influencia de factores ambientales sobre la degradación de hidrocarburos (833.33 mL de agua destilada).
- **Terrario 4.** En este terrario, se introdujo suelo arenoso con 25 % de petróleo crudo (1250 mL). Posteriormente, se inoculó en el suelo el consorcio bacteriano exógeno previamente seleccionado (5 %) (250 mL de cultivo y 333.33 mL de agua destilada).

Tabla 5. Composición de los cuatro terrarios para el proceso de biorremediación de petróleo utilizando consorcio bacteriano.

Terrarios	Suelo arenoso (kg)	% Petróleo crudo	% Consorcio bacteriano	Agua (mL)
1	5	25	10	333.33
2	5	50	10	333.33
3	5	50	0	833.33
4	5	25	5	333.33

❖ **Preparación del consorcio bacteriano**

El inóculo estuvo conformado por una solución nutritiva de las tres bacterias biodegradadoras de hidrocarburos de petróleo, y se utilizó un biorreactor biológico. Como se muestra en la Figura 10, se agregó el inóculo a cada terrario, a condiciones ambientales de temperatura de 25 ± 5 °C y pH de 5 a 6.5.



Figura 10. Terrario de acero inoxidable que contiene suelo arenoso, petróleo crudo, consorcio bacteriano y agua.

❖ **Acondicionamiento de los terrarios**

El manejo de los terrarios incluyó una remoción manual por semana, de acuerdo con lo indicado por Townsend et al. (2000). Además, se aplicó riego tres veces por semana para conservar niveles adecuados de humedad, condición esencial para facilitar la actividad metabólica de los microorganismos, los que requieren agua disponible para acceder con mayor facilidad a los compuestos contaminantes. También se realizó un volteo manual adicional tres veces por semana con el objetivo de favorecer la aireación del suelo y aumentar la disponibilidad de oxígeno, lo cual contribuye a optimizar la eficiencia del proceso de biodegradación.

❖ **Muestras para el análisis de HTP en cromatógrafo de gases**

Se recolectaron muestras de 250 g obtenidas de los terrarios en frascos estériles con tapa, debidamente rotulados, y cada muestra, con sus respectivas cadenas de custodia, proporcionada por el laboratorio especializado de análisis de hidrocarburos (Anexo 4), para la medición de fracciones de (HTP o TPH, sigla en inglés). En la Figura 11, se observan las muestras en sus frascos.



Figura 11. Muestras de terrarios para el laboratorio SAG Perú S. A. C., donde se realizó el análisis de fracciones de hidrocarburos.

❖ **Procedimiento de medición de fracciones de HTP realizados por el laboratorio especializado SAG Perú S. A. C.**

Medición de las cadenas hidrocarbonadas en el cromatógrafo de gases (CG) utilizando una técnica normalizada, al inicio y final de las pruebas experimentales para cada uno de los terrarios.

HTP: Fracción hidrocarburos F₁ (C₆ – C₁₀)

Metodología de ensayo: EPA 8015 C. Nonhalogenated Organics by Gas Chromatography. Rev 3 / February 2007

Una vez recibida la muestra en laboratorio, se separaron los residuos que pudo haber tenido y se realizó su homogenización. Según las características que presentaba, la muestra tenía una alta concentración de contaminación, por lo cual se pesaron 5 g a los que se le añadieron 10 mL de solución de metanol y, mediante una agitación continua, se le dejó sedimentar. Se tomó una alícuota del extracto, se le añadió 10 mL de solución salina y se realizó la lectura con un equipo cromatógrafo de gases, marca Thermo Scientific, debidamente calibrado.

HTP: Fracción hidrocarburos F₂ (C₁₀ – C₂₈) y F₃ (C₂₈ – C₄₀)

Metodología de ensayo: EPA 8015 C, Rev 3. Nonhalogenated Organics by Gas Chromatography. 2007

Una vez recibida la muestra en laboratorio, se separaron los residuos que pudiera tener para lograr su homogenización. Luego, se le adicionó estándares de recuperación y diclorometano para extraer los hidrocarburos, y después se la secó con Na₂SO₄ y se extrajo por tres veces. Se concentró el extracto a determinado volumen para, posteriormente, realizar la lectura con un equipo cromatógrafo de gases, marca Shimatzu, debidamente calibrado (Figura 12).



Figura 12. Equipo cromatógrafo de gases (GC).

❖ **Muestreo para análisis y extracción de HTP por Método Soxhlet (3540EPA)**

Para extraer los HTP presentes en suelos contaminados con hidrocarburos, se utilizó el método con reflujo Soxhlet tomando como referencia el **Método 3540C EPA**. Se realizó, mediante extracción por reflujo Soxhlet, empleando hexano como disolvente: en esta investigación, se utilizó diclorometano (Anexo 12). Este procedimiento garantiza un contacto constante entre la matriz de la muestra con el disolvente, lo que favorece una óptima extracción de los compuestos. Para maximizar la extracción, el suelo fue previamente secado y triturado hasta obtener partículas pequeñas; y con el fin de asegurar un mejor contacto, se evaporó el solvente al final de la prueba y el extracto se cuantificó gravimétricamente (EPA 3540C, 1996b).

El proceso aseguró un contacto íntimo de la matriz de la muestra con el solvente de extracción. El montaje del sistema de extracción con Soxhlet consta de los siguientes elementos:

Equipos y materiales

- Balanza analítica
- Hornilla eléctrica
- Rotavapor
- Estufa eléctrica
- Termómetro digital
- Equipo Soxhlet de 70 mL
- Mangueras de polietileno
- Desecador
- Vasos precipitados 100 mL, 250 mL y 500 mL
- Balones de base redonda de 250 mL
- Probeta 100 mL
- Cuchara espátula
- Virutas de ebullición (pedazos chicos de vidrio)
- Soporte universal
- Pinzas de tres dedos
- Cristalizador de 500 mL

Reactivos

- Diclorometano CH_2Cl_2 Merck
- Sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) Sigma Aldrich

Procedimiento experimental

- Se introdujeron 2 g de la muestra de suelo contaminado con 2 g de sulfato de sodio anhidro en el cartucho de extracción (papel de filtro cerrado), que, a su vez, se introdujo en el Soxhlet sujetado en un soporte universal metálico con pinzas, y se instalaron las mangueras del refrigerante al equipo Soxhlet.
- Los balones de extracción fueron ubicados dentro de un cristalizador adaptado como baño María, el cual fue calentado mediante una cocinilla eléctrica. En el sifón se añadió diclorometano, disolvente encargado de extraer los compuestos orgánicos de la muestra, en un volumen aproximado de 70 mL, equivalente a un poco más de una vez y media el volumen del sifón. Dentro de cada balón, se colocó vidrio molido para evitar la ebullición brusca del solvente. La cocinilla situada bajo el cristalizador generó el calor necesario para iniciar la evaporación

del disolvente, manteniendo una temperatura constante entre 60 °C y 70 °C, controlada mediante termómetros digitales. El montaje se conectó a la red eléctrica y al suministro de agua, y operó de forma continua durante un lapso estimado entre 6 y 8 horas. Todo el sistema se observa en la Figura 13.

- Durante este intervalo de tiempo, los vapores del disolvente ascendieron hasta la zona de refrigeración, donde se condensaron y gotearon hacia los cartuchos que contenían las muestras de suelo contaminado, y arrastraron los compuestos que nos interesan al balón. Este ciclo de evaporación, condensación y extracción se repitió constantemente, enriqueciendo progresivamente la solución en el balón con los compuestos hidrocarbonados de la muestra.
- Una vez transcurrido el tiempo de operación (8 horas), se desconectó el sistema de la fuente eléctrica y se dejó enfriar de manera natural a temperatura ambiente.



Figura 13. Equipo extractor Soxhlet, marca Eurolab, de extracción de hidrocarburos y sulfato de sodio anhidro.

- Cuando los balones utilizados en la extracción se enfriaron por completo, se procedió a desarmar el sistema Soxhlet. Los cartuchos que contenían las muestras se colocaron en vasos de precipitados y se trasladaron a un desecador para su secado y para permitir así la eliminación residual del diclorometano.
- El extracto contenido en los balones se redujo hasta alcanzar un volumen específico, y el solvente fue recuperado mediante el uso de un rotavapor. En este equipo, el balón gira constantemente a 40 rpm mientras se encuentra parcialmente sumergido en un baño de agua caliente, regulado a 38 °C, temperatura correspondiente al punto de evaporación del diclorometano. Simultáneamente, se aplicó un vacío suave y se conectó un sistema de refrigeración con agua a 10 °C mediante un chiller (Figura 17). Gracias al vacío y al calor, el disolvente se evapora en el rotavapor, pero se recupera en otro balón. A medida que se evapora, llega a una zona donde hay un refrigerante que provoca que el disolvente se condense y caiga en otro balón; en este, se va acumulando el disolvente supuestamente limpio y en el balón original se va reduciendo el volumen del disolvente hasta llegar a un volumen final solo del HTP.
- En el balón, únicamente quedó el HTP, que, posteriormente, se colocó en una estufa a 60 °C durante 2 horas. Después, el balón se envolvió en papel aluminio y se colocó en el desecador a temperatura ambiente.
- Luego, el balón con el extracto concentrado se pesó en la balanza analítica tres veces; por diferencia de pesos, se obtuvo, por gravimetría, la cantidad en gramos de HTP extraídos de la muestra de suelo contaminada con petróleo.

$$\text{HTP} = m(\text{hidrocarburos inicial}) - m(\text{hidrocarburo final}) \text{ (g)}$$

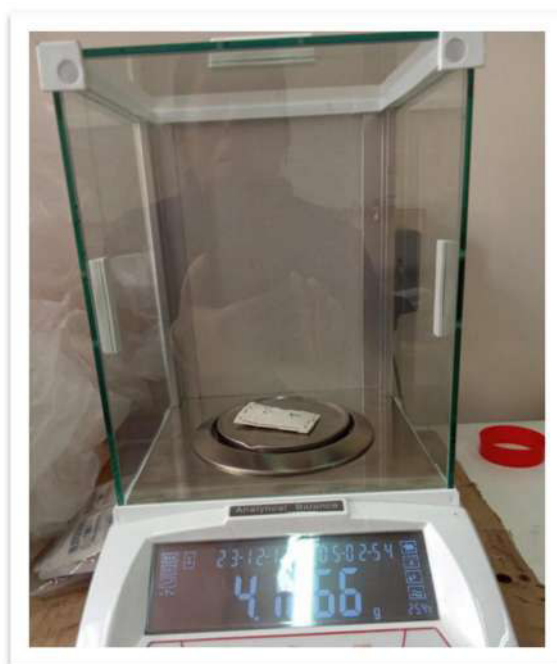


Figura 14. Balanza analítica rango 0.0001-220 gramos, modelo HZYN-224/323, marca 3S Cientific, para medir las muestras del terrario.

Cada dos a tres días, se realizó el muestreo de 2 g de muestra del terrario en una balanza analítica como la de la Figura 14, y que se detalla en el Anexo 9. Se adicionó la misma masa de sulfato de sodio anhidro (Anexo 16), se homogenizó y se colocó dentro de un papel de filtro formando un cartucho para las mediciones de la extracción de los HTP, utilizando el equipo Soxhlet bajo la norma 3540.

❖ **Mediciones complementarias de pH, temperatura (°C) y CO₂ (ppm)**

Para su seguimiento y control, se realizaron mediciones durante los experimentos: de temperatura, pH y CO₂, una vez por semana; HTP, dos veces a la semana; porcentaje de fracciones de HTP, tres veces; y conteo de microorganismos degradadores de hidrocarburos, dos veces por semana y por triplicado. El tiempo total fue de 142 días. Asimismo, se realizaron las mediciones de conteo de las UFC/kg, biomasa del consorcio bacteriano, pH y CO₂ (Figura 15) durante 142 días.

Temperatura: se usó un termómetro de suelos para la medición de la temperatura del suelo contaminado en el terrario.

pH: Para medir el pH del suelo, se preparó una suspensión mezclando 30 mL de suelo en estado de pasta saturada con 60 mL de agua destilada. La mezcla se agitó continuamente durante un periodo de una hora para asegurar una homogenización adecuada.

CO₂: se utilizó un equipo de medición de CO₂ y temperatura digital en unidades ppm y °C.



Figura 15. Medición de CO₂ y pH en los terrarios.

Al terminar la extracción de los HTP en el balón utilizado en el equipo Soxhlet, se lo colocó en un vaso y, posteriormente, en un desecador para recuperar el solvente utilizado en el proceso de extracción de los HTP, como se muestra en la Figura 16.



Figura 16. Desecador de vidrio con tapa.

Luego, la solución con hidrocarburo y solvente del vaso se colocó en un balón especial para adaptarse al equipo rotavapor y realizar la recuperación del solvente diclorometano, utilizando el equipo rotavapor con chiller (Figura 17), a una temperatura de 29 °C y una velocidad de rotación de 35 rpm, llevando el balón con el hidrocarburo a sequedad del solvente. Al finalizar las mediciones, se realizó la limpieza del equipo rotavapor utilizando alcohol etílico para eliminar las trazas de solventes que quedaron en el equipo mencionado.



Figura 17. Equipo rotavapor, marca Daihan Scientific, modelo WEV-003S, para recuperación del solvente diclorometano y balón con el hidrocarburo de petróleo.

Posteriormente, el balón que se muestra en la Figura 21, se llevó a una estufa a 60 °C y luego se lo colocó en el desecador para secar los vapores de hidrocarburos restantes (Figura 18), y, después, para ser pesado en una balanza analítica de 4 decimales (Anexo 9) para mayor precisión y exactitud. La masa irá variando hasta que sea constante: en ese instante, se anota la masa del HTP de dicha muestra.

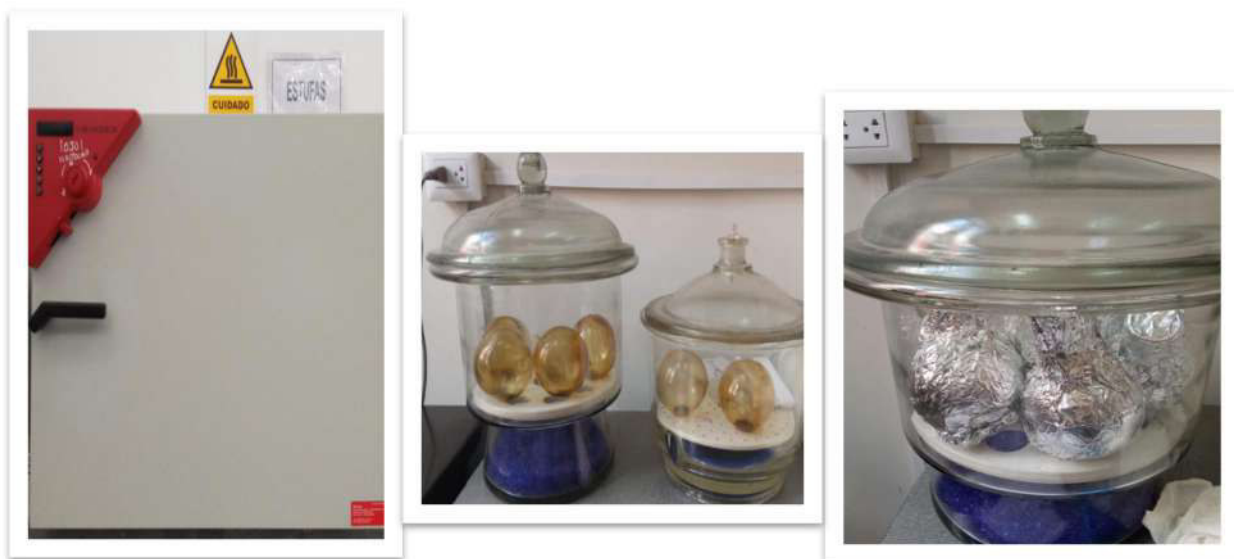


Figura 18. Estufa marca Binder, Modelo FD 56, para volatilizar los vapores de hidrocarburos de petróleo y desecador con balones secos para la medición del peso de los HTP.

❖ **Procedimiento experimental para la medición de pH y CO₂**

Se efectuó la medición de CO₂ presente en la muestra de suelo tratado con los microorganismos, utilizando un medidor de CO₂, durante 1 minuto hasta que se estabilizó la medición; posteriormente, se realizó un análisis estadístico del proceso de biodegradación de suelos contaminados con derrames de petróleo (Figura 19).

Luego, se estudió la cinética química de crecimiento de las bacterias del proceso de biodegradación y el porcentaje de rendimiento de biodegradación de petróleo crudo en el suelo.





Figura 19. Medidor de CO₂ y temperatura, marca Meter, modelo GC-2028 para los terrarios, termómetro bimetálico de bolsillo en acero inoxidable 316 marca Tess y medidor de pH Panpeha.

❖ **Muestreo para análisis biológico**

Cada dos a tres días, se realizaron muestreos de suelo contaminado de cada terrario, en un tubo ependorf con tapa, para llevarlo al laboratorio especializado biológico.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis, Interpretación y Discusión de Resultados

Entre los resultados obtenidos está la reducción de los contaminantes del suelo, que son los hidrocarburos del petróleo crudo, mediante la degradación con el consorcio bacteriano. Esto logrará que el rendimiento de biodegradación sea máximo debido a la cuantificación gravimétrica de los HTP. Asimismo, se incentivará a que esta investigación continúe ampliándose, utilizando diferentes condiciones de operación y otros consorcios bacterianos que complementen los resultados experimentales.

Según el recuento de bacterias heterotróficas viables (por terrarios), en general, se presentó un crecimiento en la concentración celular a partir de los 20 a 25 días posteriores al inicio de los tratamientos; la tendencia de este crecimiento se presentó en todas las curvas de los terrarios, observándose una disminución en la duración del trabajo a partir de los 60 días.

La población de bacterias oleofílicas del consorcio fue mayor al comienzo de los tratamientos (base 10^8 UFC/gr); sin embargo, fue disminuyendo progresivamente, pero de una manera muy lenta. Hasta los 140 días aún se registró un crecimiento de los microorganismos, lo que significa que aún encuentran fuente hidrocarbonada dentro de los terrarios.

La concentración de los hidrocarburos se debe correlacionar con la presencia de los microorganismos del consorcio. Por los resultados, se observa que la degradación está en el rango de 60 % a 75 %, lo cual indica una degradación considerable de los hidrocarburos de petróleo crudo debido a la actividad de los microorganismos en el tratamiento.

Discusiones de la investigación

- Se procedió con el análisis de las muestras del suelo y su comparación con los resultados obtenidos del laboratorio, y se determinó que no existían diferencias significativas $p < 0.05$.
- Las bacterias que degradan el petróleo pueden gradualmente adaptarse al entorno del suelo y hacer un mejor uso de los hidrocarburos del petróleo como fuente de carbono para la supervivencia y el crecimiento que aceleran la tasa de degradación del petróleo en el suelo (Nwankwegu et al., 2022). Bodor et al. (2021) estudiaron que la concentración inicial de HTP en el suelo disminuyó de 52.500 mg/kg a 29.800 mg kg⁻¹, lo que representa el 57 % de degradación de cadenas de hidrocarburos, con la inoculación de *R. qingshengii* KAGC y *R. erythropolis* PR4 después de 60 días. La tasa de HTP fue dos veces más rápida que la atenuación natural y la remediación de suelos contaminados no solo sirvió para eliminar el petróleo, sino también para reducir la toxicidad de la materia orgánica y la viscosidad.

En la presente investigación, se muestra que el porcentaje de degradación es de 73.4 % después de 140 días, en suelo contaminado con petróleo crudo en la relación de 1:2 (petróleo crudo:suelo costero), utilizando la medición de HTP mediante el método Soxhlet 3540 EPA. Dicha diferencia de resultados se debe a los distintos microorganismos utilizados y a las diversas condiciones de operación tratadas en cada una de las dos metodologías de investigación.

- Nedoroda et al. (2021) realizaron el análisis de la biodegradación del petróleo por un consorcio bacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. y *Plantarum*, *Bacillus subtilis*, en el que se utilizó biosurfactantes que contienen la suspensión de microorganismos que consume el petróleo. El uso de las cepas en las áreas estudiadas de suelos contaminados con petróleo proporcionó una reducción del efecto fitotóxico al nivel de 51.36 %– 74.18 %. Asimismo, del estudio, que se llevó a cabo durante 26 días, se obtuvo que el mayor efecto ocurrió cuando se expuso el suelo contaminado (4 % de aceite) a una solución en concentraciones de

2% y 4 %; en cuanto al efecto fitotóxico en estos casos disminuyó de 96,04 % a 44,68 % y 21,86 % respectivamente.

En comparación con la presente investigación en la cual, a concentraciones de 25 % y 50 %, el porcentaje de biodegradación supera el 73 % durante aproximadamente 120 días de tratamiento de biorremediación de suelos contaminados con petróleo crudo ligero, los resultados son casi próximos, porque se utilizaron bacterias del mismo género en la investigación. La diferencia es el porcentaje de hidrocarburo y las condiciones de operación de la investigación.

- En su investigación titulada *Impactos socioeconómicos inmediatos percibidos por el derrame de petróleo en la comunidad pesquera de Ventanilla*, Quevedo (2022) recolectó información cuatro meses después del derrame ocurrido el 15 de enero del 2022. Se tomaron muestras de sedimentos en zonas intermareales de las playas Bahía Blanca, Costa Azul y Caveró. Las concentraciones promedio de HTP registradas en promedio en estas áreas fueron de 180 mg/kg, 219 mg/kg y 275 mg/kg, respectivamente, valores que se encuentran dentro de los límites establecidos por la normativa del D. S. 011-2017-MINAM sobre calidad de suelo. Los detalles de los parámetros fisicoquímicos de las fracciones analizadas se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Parámetros fisicoquímicos de las fracciones de hidrocarburos totales de petróleo (HTP).

Fracción de hidrocarburos	LCM	Bahía Blanca	Costa azul	Cavero
F1 (C ₅ -C ₁₀)	0.25	<0.25	<0.25	<0.25
F2 (C ₁₀ -C ₂₈)	16	52	80	64
F3 (C ₂₈ -C ₄₀)	16	128	195	155
Hidrocarburos totales de petróleo	16	180	275	219

Nota. LCM: límite de cuantificación del método, “<”= Menor que el L.C.M. Las cantidades están medidas en mg/kg.

Fuente. Datos tomados de Quevedo (2022).

Las muestras se analizaron en el laboratorio Pacific Control S. A. C., acreditado por el Inacal. En la presente investigación, los HTP obtenidos de todas las fracciones es de 73 193.15 mg/kg, en comparación con los 180 a 275 mg/kg de HTP, dichas diferencias se deben a que los porcentajes de hidrocarburos utilizados es mucho mayor al medido durante el derrame de petróleo crudo en Ventanilla.

- Bocángel (2016) llevó a cabo una investigación sobre el potencial de un consorcio bacteriano, aislado en la base peruana “Machu Picchu” ubicada en la Antártida, para degradar petróleo crudo en suelos contaminados. El consorcio estuvo conformado por varias cepas: *Pseudomonas putida* (63Bb, 9Ab, 60Bf y 39Bfa), *Pseudomonas sp.* 9Aa, *Pseudomonas aeruginosa* 63Ba, *Aeromonas sp.* 39Bf, *Stenotrophomonas rhizophila* 116B y *Paenibacillus lautus* (95Fa y 95Fb). Se evaluaron tres terrarios con 1.3 kg de suelo contaminado con 5 % (p/p) de petróleo. El proceso de biorremediación fue de 180 días a 4 °C-5 °C, se cuantificaron los HTP mediante el método 3540 EPA-SOXHLET y saturación de fluidos (API RP40-RETORTA), Además, se efectuaron conteos de microorganismos y se monitorearon parámetros fisicoquímicos cada 30 días. La autora demostró que el crecimiento bacteriano aerobio fue exponencial hasta los 120 días, con 2.18×10^5 UFC/g, entre las cuales están 4.3×10^4 NMP/g de bacterias psicotolerantes hidrocarbonoclasticas, con una tasa de biodegradación de 57.88 %, y al término de los 180 días, de 58.41 %. El

terrario psicotolerante presentó una reducción de contaminantes de 58.41 %; el terrario control, una de 37.30 %; y el de control abiótico, una de 11.96 después de 180 días.

En comparación, en la presente investigación, la tasa de biodegradación resultó 73.4 % al término de 142 días utilizando otros microorganismos degradadores de petróleo crudo y diferentes condiciones de operación.

- La Tabla 7 muestra el porcentaje de reducción de HTP, por los dos métodos de análisis. Se puede observar que no coinciden, pero el terrario 1 es el que presenta mayor porcentaje de degradación de HTP en masa.

Tabla 7. Fracciones de HTP para los terrarios 1, 2, 3 y 4 después de 60 y 142 días por método cromatógrafo de gases y Soxhlet.

Fracciones de Hidrocarburos (mg/kg)	Inicio	Después de 60 días				Después de 142 días			
		T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4
F ₁	27 508.09	504.50	1451	1147.40	1623.20	32.05	28.18	30.33	149.70
F ₂	155265.30	66104.40	203504.10	196588.60	39805	36810.90	97169.10	53482.70	25903.60
F ₃	88 842.60	48169.30	125425.30	129121.50	31116	36350.20	90159	50359.80	27457.50
HTP (CG)	271615.99	114778.20	330380.40	326857.50	72544.20	73193.15 (63.76%)	187356.28 (56.71%)	103872.83 (31.78%)	53510.80 (73.76%)
HTP (Soxhlet)						(73.40%)	(29.50%)	(44.49%)	(59.29%)

Nota. T1, T2, T3, T4: terrarios.

4.2. Pruebas de Hipótesis

4.2.1. Hipótesis General

Ha. La eficiencia de biorremediación del consorcio bacteriano *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Agrobacterium tumefaciens* logrará un rendimiento de biodegradación de 60 % en suelo arenoso contaminado con petróleo crudo.

Ho. La eficiencia de biorremediación del consorcio bacteriano *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Agrobacterium tumefaciens* no logrará un rendimiento de biodegradación de 60 % en suelo arenoso contaminado con petróleo crudo.

4.2.2. Hipótesis específicas

Ha. La influencia del comportamiento degradativo del consorcio bacteriano *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Agrobacterium tumefaciens* permitirá una adecuada eficiencia para la biorremediación en suelo arenoso contaminado con petróleo crudo.

- La característica del consorcio bacteriano *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Agrobacterium tumefaciens* permitirá una adecuada eficiencia para la biorremediación en suelo arenoso contaminado con petróleo crudo.
- Las condiciones de operación del consorcio bacteriano *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Agrobacterium tumefaciens* permitirán una adecuada eficiencia para la biorremediación en suelo arenoso contaminado con petróleo crudo.
- El porcentaje de biodegradación utilizando el consorcio bacteriano *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Agrobacterium tumefaciens* permitirá una adecuada eficiencia para la biorremediación en suelo arenoso contaminado con petróleo crudo.

Ho. La influencia del comportamiento degradativo del consorcio bacteriano *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Agrobacterium tumefaciens* no permitirá una

adecuada eficiencia para la biorremediación en suelo arenoso contaminado con petróleo crudo.

- La característica del consorcio bacteriano *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Agrobacterium tumefaciens* no permitirá una adecuada eficiencia para la biorremediación en suelo arenoso contaminado con petróleo crudo.
- Las condiciones de operación del consorcio bacteriano *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Agrobacterium tumefaciens* no permitirán una adecuada eficiencia para la biorremediación en suelo arenoso contaminado con petróleo crudo.
- El porcentaje de biodegradación utilizando el consorcio bacteriano *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Agrobacterium tumefaciens* no permitirá una adecuada eficiencia para la biorremediación en suelo arenoso contaminado con petróleo crudo.

4.3. Presentación de resultados

4.3.1. Comportamiento e Identificación Degradativa del *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Agrobacterium tumefaciens*

De acuerdo con la Tabla 8 para identificar y conformar el consorcio bacteriano, en la investigación, se procedió a identificar cada una de las bacterias que tuvieran mayor comportamiento de degradación de hidrocarburos: de 12 cepas diferentes de bacterias, quedaron para la constitución del consorcio tres cepas bacterianas con comportamiento de degradación oleofílica.

En la Tabla 8, se muestran los resultados de las tres cepas bacterianas con mayor capacidad de degradación. De las 12 cepas, las de mayor eficiencia de degradación en agar mineralizado al 1 % de petróleo crudo y en agar twen 80 son la CEPA-3, la CEPA-4 y la CEPA-6: respectivamente, *Bacillus amyloliquefaciens* con 70 % de degradación, *Bacillus subtilis* con 70 % de degradación y *Agrobacterium*

tumefaciens con 83 % de degradación. Estas conformaron el consorcio de la investigación.

Tabla 8. Actividad oleofílica del consorcio bacteriano.

Código	Características macroscópicas (en agar)	Características microscópicas (coloración Gram)	Crecimiento en agar mineralizado 1 % de crudo de petróleo*	Crecimiento en agar tween 80*	Reconocimiento genético
CEPA-1	Colonias blanquecinas, bordes irregulares y planos.	Bacilos largos Gram positivos formadores de esporas.	+++	+++	N.R.
CEPA-2	Colonias blanquecinas, bordes irregulares y planos.	Bacilos largos Gram positivos formadores de esporas.	+++	++	N.R.
CEPA-3	Colonias blanquecinas, bordes irregulares y planos.	Bacilos cortos Gram positivos formadores de esporas.	++++++	+++++	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
CEPA-4	Colonias blanquecinas, bordes irregulares y planos.	Bacilos largos Gram positivos formadores de esporas.	++++++	+++++	<i>Bacillus subtilis</i>
CEPA-5	Colonias blanquecinas, bordes irregulares y planos.	Bacilos largos Gram positivos formadores de esporas.	+++	+++	N.R.
CEPA-6	Colonias pigmentadas de verde, elevadas y redondeadas.	Bacilos cortos pleomórficos Gram negativos	+++++++	+++++++	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
CEPA-7	Colonias pigmentadas de verde, elevadas y redondeadas.	Bacilos cortos Gram negativos	++	+++	N.R.
CEPA-8	Colonias pigmentadas de verde, elevadas y redondeadas.	Bacilos cortos Gram negativos	+++	+++	N.R.
CEPA-9	Colonias elevadas y redondeadas.	Cocobacilos Gram positivos	++	+++	N.R.
CEPA-10	Colonias elevadas y redondeadas.	Cocos Gram positivos	++++	+++	N.R.
CEPA-11	Colonias elevadas y redondeadas.	Cocos Gram positivos	++	++	N.R.
CEPA-12	Colonias elevadas y redondeadas.	Cocos Gram positivos	+++	+++	N.R.

N. R.: NO REALIZADO. *: Tamaño del halo de degradación.

En la Figura 20, se muestran los subcultivos de las colonias en placas de agar nutritivo (Merck) para la observación de las características fenotípicas (tinción de Gram y reconocimiento cultural en placa).

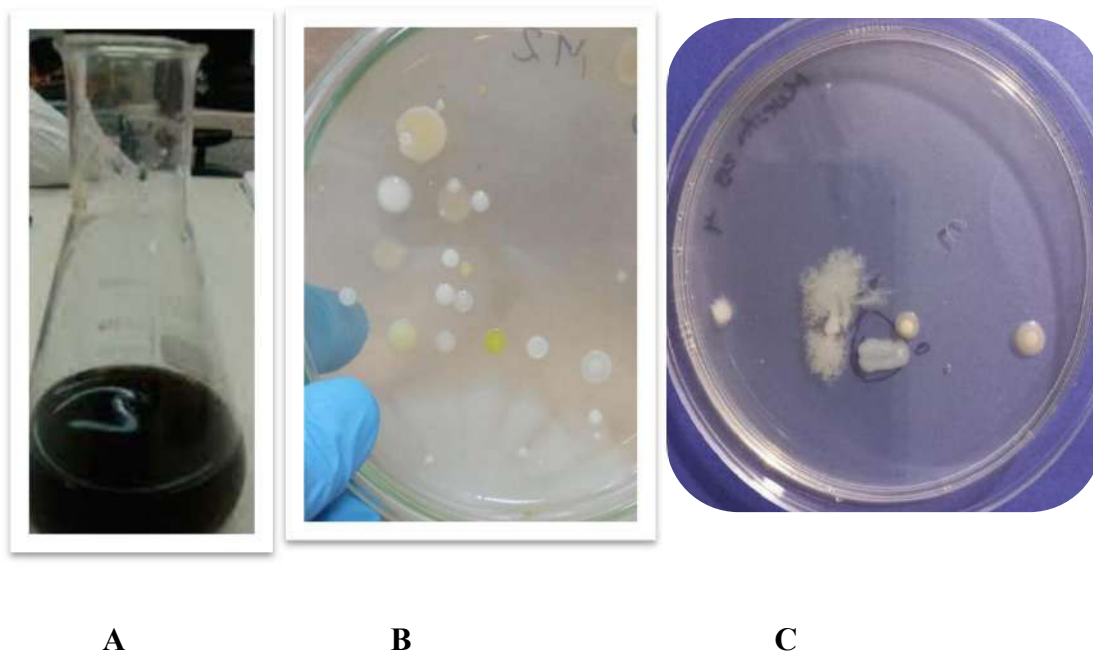


Figura 20. A: Medio líquido de Bushnell Haas con 1 % (p/v) de petróleo; B y C: agar nutritivo con colonias de microorganismos con capacidad de degradación de hidrocarburos inducida.

En la Figura 21, se muestra la tinción de Gram de las colonias bacilos Gram positivos.

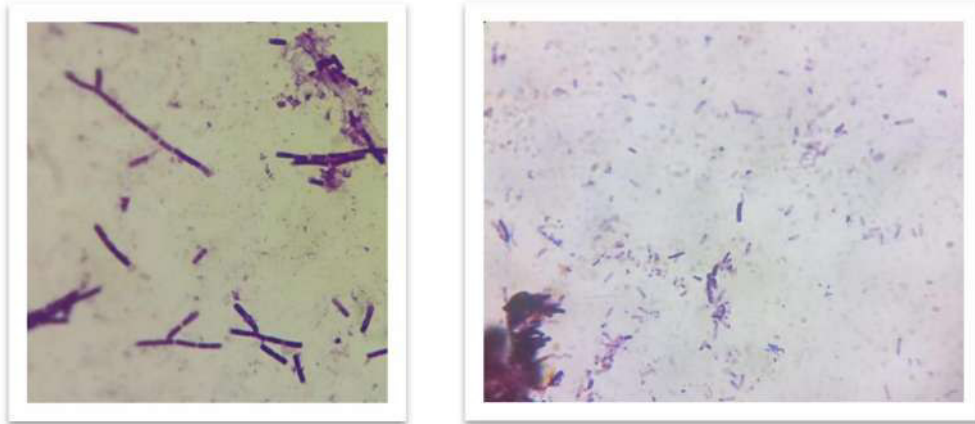


Figura 21. Tinción de Gram de colonias, la mayoría bacilos Gram positivos (1000 aumentos. Microscopio Euromex).

4.3.2. Características del Consorcio: *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Agrobacterium tumefaciens*

En la Figura 22, se muestran las características macroscópicas (en agar) del *Bacillus amyloliquefaciens*, que son colonias blanquecinas de bordes irregulares y planos; y las características microscópicas (tinción de Gram), que son bacilos cortos Gram positivos formadores de esporas. Su tamaño oscila entre 0.7-0.9 micrómetro (μm) de ancho a 1.8-3.0 μm de largo.



Figura 22. Placa de agar hicrome con las cepas en conteo durante la cinética de degradación: las cepas *Bacillus subtilis* tienen coloración verdosa y las de *Bacillus amyloliquefaciens*, colonias redondeadas con bordes irregulares amarillentas.

En la Figura 22, se observan también las características macroscópicas (en agar) del *Bacillus subtilis*: son colonias blanquecinas de bordes irregulares y planos, y las características microscópicas (coloración Gram): son bacilos largos Gram positivos formadores de esporas. El tamaño del *Bacillus subtilis* es variable, pudiendo medir entre 0.5 μm y 10 μm de largo.

Guevara-Luna et al. (2018) indicaron que el género *Bacillus* tiene la disposición de degradar diferentes compuestos como el benzo(a)pireno (BaP); estas sustancias son conocidas por ser hidrocarburos altamente cancerígenos y 63 mutagénicos.

En la Figura 23, se muestran las características macroscópicas (en agar) del *Agrobacterium tumefaciens*: son colonias pigmentadas de color verde, elevadas y redondeadas; en cuanto a sus características microscópicas (tinción de Gram): son bacilos cortos pleomórficos Gram negativos. *Agrobacterium tumefaciens* forma esporas Gram negativas y su movilidad es porque poseen de 1 a 6 flagelos peritricos; su tamaño varía de 0,6 μm –1,0 μm de ancho a 1.5 μm a 3.0 μm de largo, y pueden presentarse solas o en parejas.

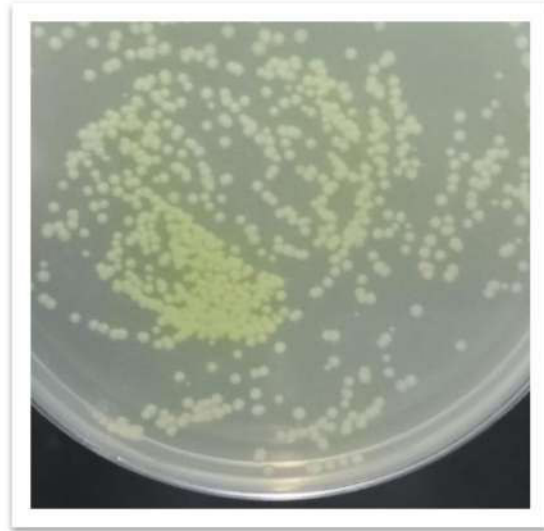


Figura 23. Placa de agar cetrimide con las cepas en conteo durante la cinética de degradación: *Pseudomonas* con colonias poco translucidas, elevadas con bordes irregulares y brillo tornasolado verdoso.

La tinción de Gram se utilizó para confirmar que las colonias eran Gram negativas, grupo al que pertenecen las especies del género *Pseudomonas*. También se realizaron pruebas para detectar la actividad de la enzima catalasa, añadiendo peróxido de hidrógeno (3 %) sobre cultivos puros (catalasa +), y se aplicó la prueba de citocromo oxidasa, que permite diferenciar la *Pseudomonas spp.* (oxidasa +) de otras especies del mismo género y de otros bacilos Gram negativos (oxidasa -) (Figura 24).

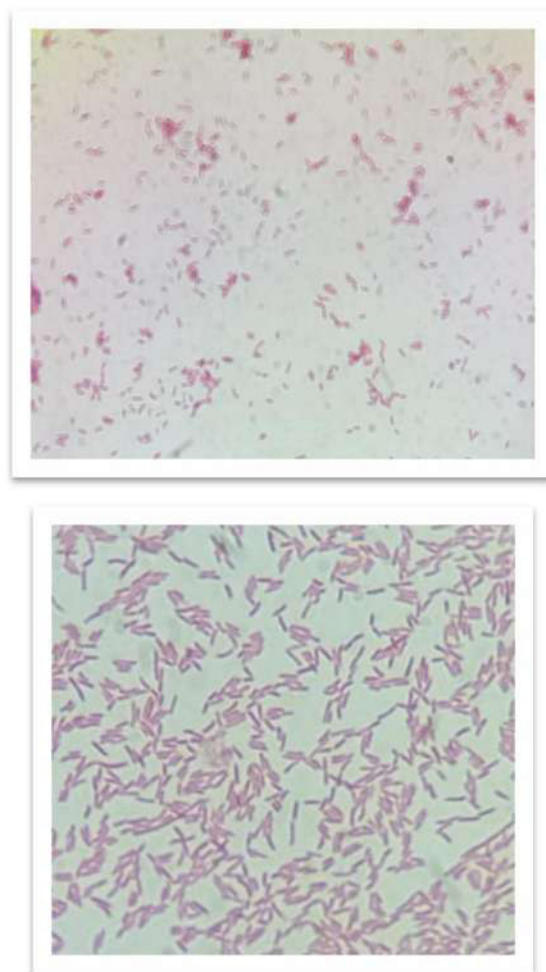


Figura 24. Tinción de Gram de dos colonias presuntivas para Pseudomonales: bacilos cortos Gram negativos (1000 aumentos. Microscopio Euromex).

Resultados biológicos del conteo de bacterias oleofilicas

Se recolectaron las muestras de los terrarios para los análisis biológicos, 2 g de cada terrario en tubos ependorf de 10 mL con tapa y se las conservó en un frigobar. Posteriormente, para su traslado al laboratorio biológico especializado, se las colocó en un *cooler* para que lleguen en buen estado para su análisis respectivo (Figura 25).



Figura 25. Muestras de terrario en tubos eppendorf y colocados en un cooler para llevar las muestras al laboratorio biológico Biotech S. A. C.

En los mencionados terrarios, la población de las bacterias hidrocarbocíclicas tuvo como característica un crecimiento permanente en su población en la mayor cantidad del tiempo de estudio. Estos terrarios presentaron proyecciones muy semejantes en las poblaciones de bacterias en el tiempo; relacionando esta característica con los datos anteriores, se determinó que estos comenzaron con una alta población de bacterias, lo que indica que el suelo presentaba bacterias adaptadas a hidrocarburos que no fueron contaminadas por esta mezcla (Ríos, 2005).

En la Figura 26, se muestra el conteo de las bacterias oleofílicas y del promedio de ellas, cuyos resultados están medidos en unidades formadoras de colonia UFC/mL del terrario 1: *Agrobacterium tumefaciens* (1.37×10^8 a 1.14×10^6), *Bacillus subtilis* (2.72×10^8 a 2.82×10^6), *Bacillus amyloliquefaciens* (1.30×10^8 a 6.73×10^6), heterótrofos viables (6.28×10^6 a 1.32×10^5) y promedio de bacterias oleofílicas (1.80×10^8 a 3.56×10^6), durante 142 días de tratamiento de biorremediación de suelos contaminados con petróleo.

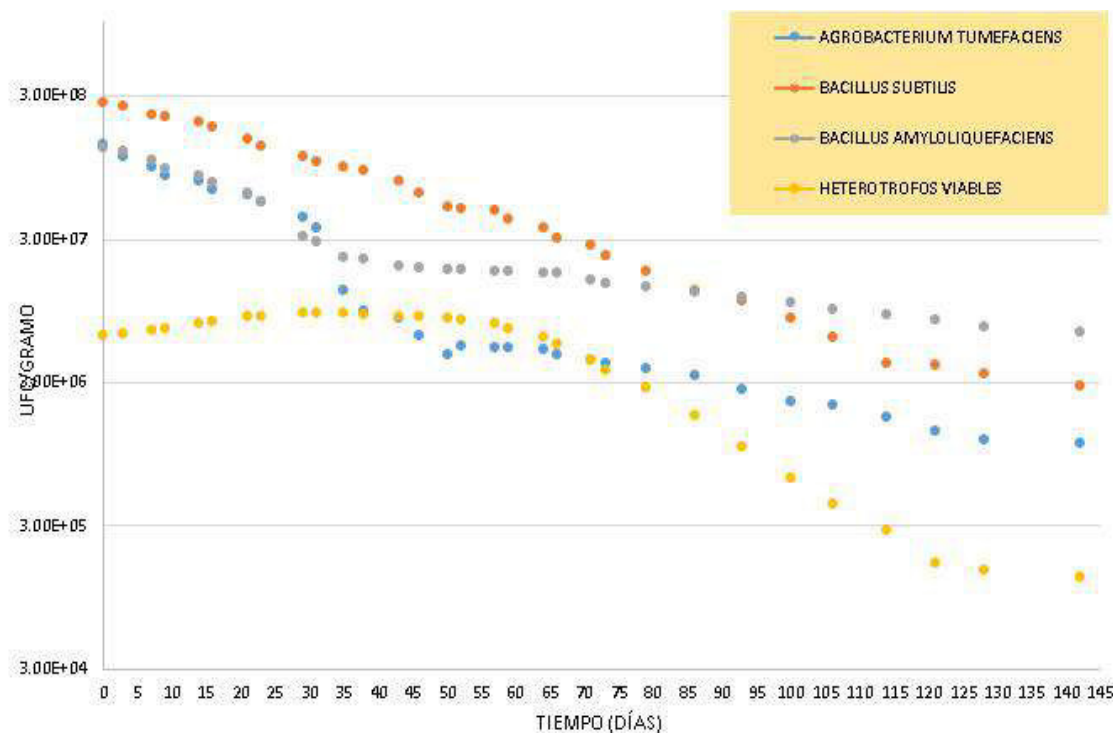


Figura 26. Curvas de desarrollo de los microorganismos evaluados – terrario 1.

En la Figura 27, se muestra el conteo de las bacterias oleofílicas y el promedio de ellas: los resultados están medidos en unidades formadoras de colonia UFC/mL del terrario 2: *Agrobacterium tumefaciens* (2.10×10^8 a 1.25×10^6), *Bacillus subtilis* (3.83×10^8 a 6.54×10^5), *Bacillus amyloliquefaciens* (2.30×10^8 a 6.10×10^6), heterótrofos viables (3.53×10^6 a 1.56×10^5) y promedio de bacterias oleofílicas (2.74×10^8 a 2.67×10^6), durante 142 días de tratamiento de biorremediación de suelos contaminados con petróleo.

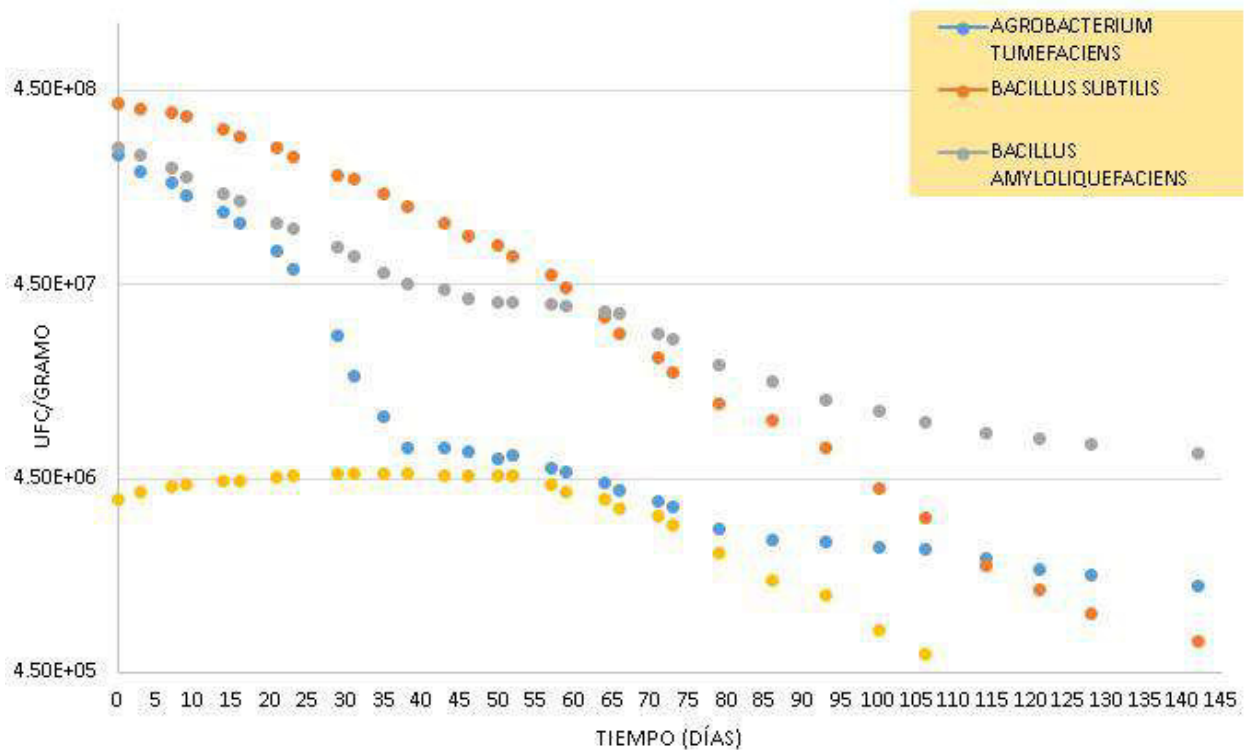


Figura 27. Curvas de desarrollo de los microorganismos evaluados – terrario 2.

En la Figura 28, se muestran los promedios de conteos de las unidades formadoras de colonia UFC/mL del **terrario 3**, que es el terrario control, donde solo están presentes bacterias **heterótrofos viables** (2.47×10^6 a 4.12×10^5), durante 142 días de tratamiento de biorremediación de suelos contaminados con petróleo.

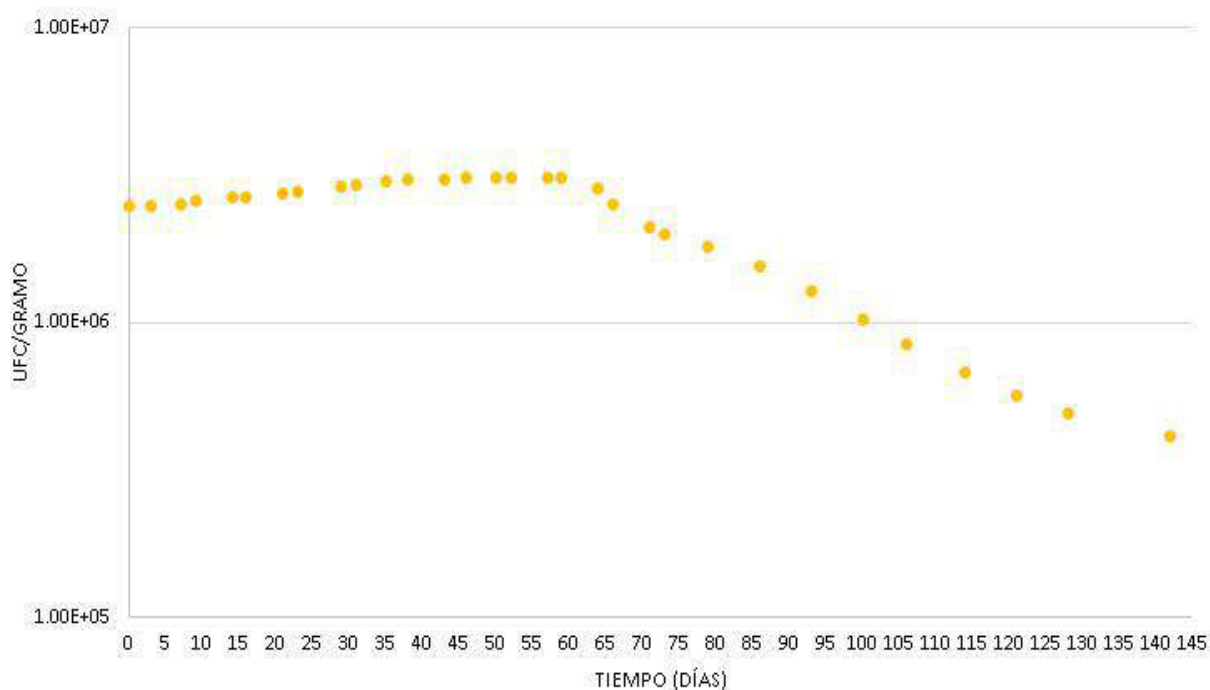


Figura 28. Curvas de desarrollo de los microorganismos evaluados – terrario 3.

En la Figura 29, se muestra el conteo de las bacterias oleofílicas y del promedio de ellas: sus resultados están medidos en unidades formadoras de colonia UFC/mL del terrario 4: *Agrobacterium tumefaciens* (2.10×10^8 a 1.07×10^6), *Bacillus subtilis* (3.34×10^8 a 3.31×10^6), *Bacillus amyloliquefaciens* (1.97×10^8 a 5.71×10^6), heterótrofos viables (2.54×10^6 a 2.26×10^5) y promedio de bacterias oleofílicas (2.47×10^8 a 3.36×10^6), durante 142 días de tratamiento de biorremediación de suelos contaminados con petróleo.

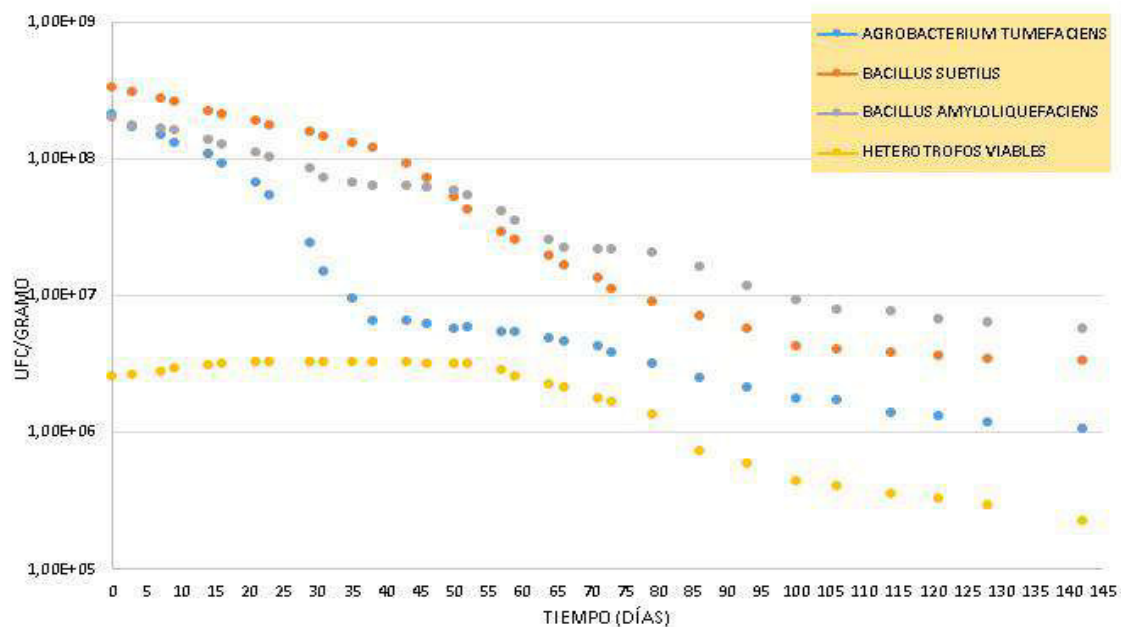


Figura 29. Curvas de desarrollo de los microorganismos evaluados – terrario 4.

Los promedios de conteos de las unidades formadoras de colonia UFC/mL de las bacterias *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, en el **terrario 1** (1.80×10^8 a 3.56×10^6), **terrario 2** (2.74×10^8 a 2.67×10^6) y **terrario 4** (2.47×10^8 a 3.36×10^6) durante 142 días de tratamiento de biorremediación de suelos contaminados con petróleo se ven en la Figura 30.

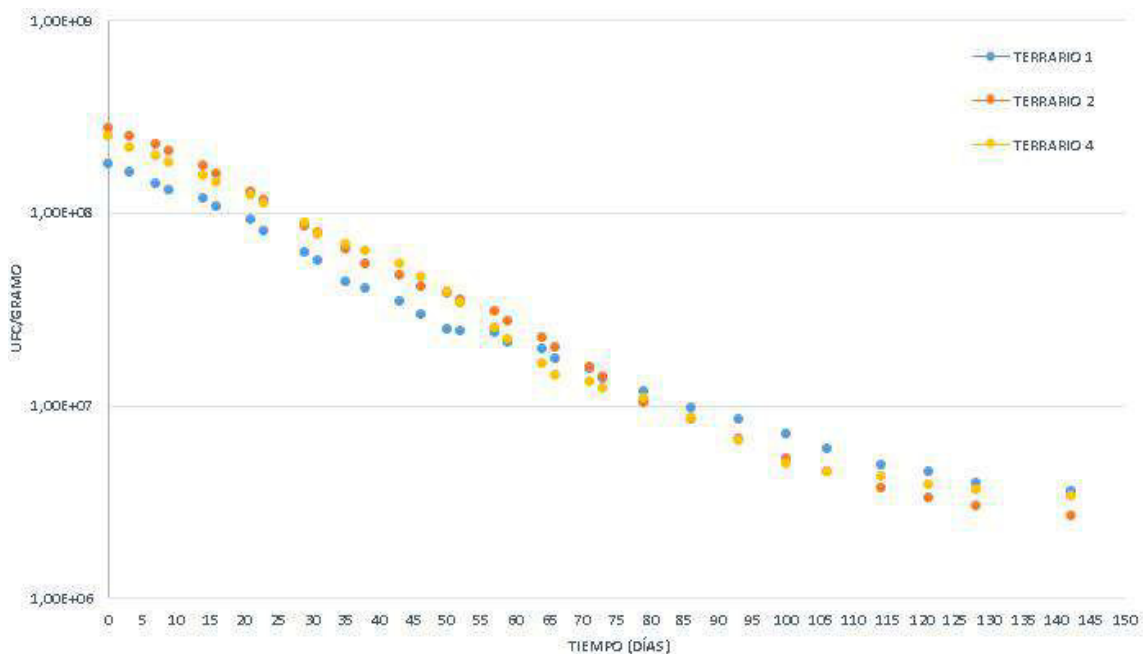


Figura 30. Comparación del conteo de UFC/mL de los promedios generales de los microorganismos del consorcio degradador por terrario.

De acuerdo con la Figura 30, los recuentos muestran que al inicio hay una rápida estimulación de los degradadores en comparación con los controles. Se ha determinado en diversas investigaciones de biodegradación de HTP que, al término del proceso de biodegradación, se presenta un almacenamiento de las fracciones más extensas y pesadas de hidrocarburos, las cuales son poco utilizables para los microorganismos, lo que obstaculiza su pronta degradación y causa una reducción importante en el recuento de degradadores (Coulon & Delille, 2003).

Los resultados obtenidos son similares a los de Das y Mukherjee (2007), que determinaron la eficiencia de *Bacillus subtilis* en la biodegradación de petróleo y concluyeron que existe una relación entre la disminución de concentración de petróleo en HTP en, aproximadamente, 50 % durante 120 días con respecto a la biomasa celular; asimismo, demostraron que el proceso degradativo está relacionado con la respiración celular.

Los promedios de conteos de las unidades formadoras de colonia UFC/mL de las bacterias heterótrofos viables: terrario 1 (6.28×10^6 a 1.32×10^5), terrario 2 (3.53×10^6 a 1.56×10^5), terrario 3 (2.47×10^6 a 4.12×10^5) y terrario 4 (4.19×10^6 a

6.15×10^5), durante 142 días de tratamiento de biorremediación de suelos contaminados con petróleo se pueden observar en la Figura 31.

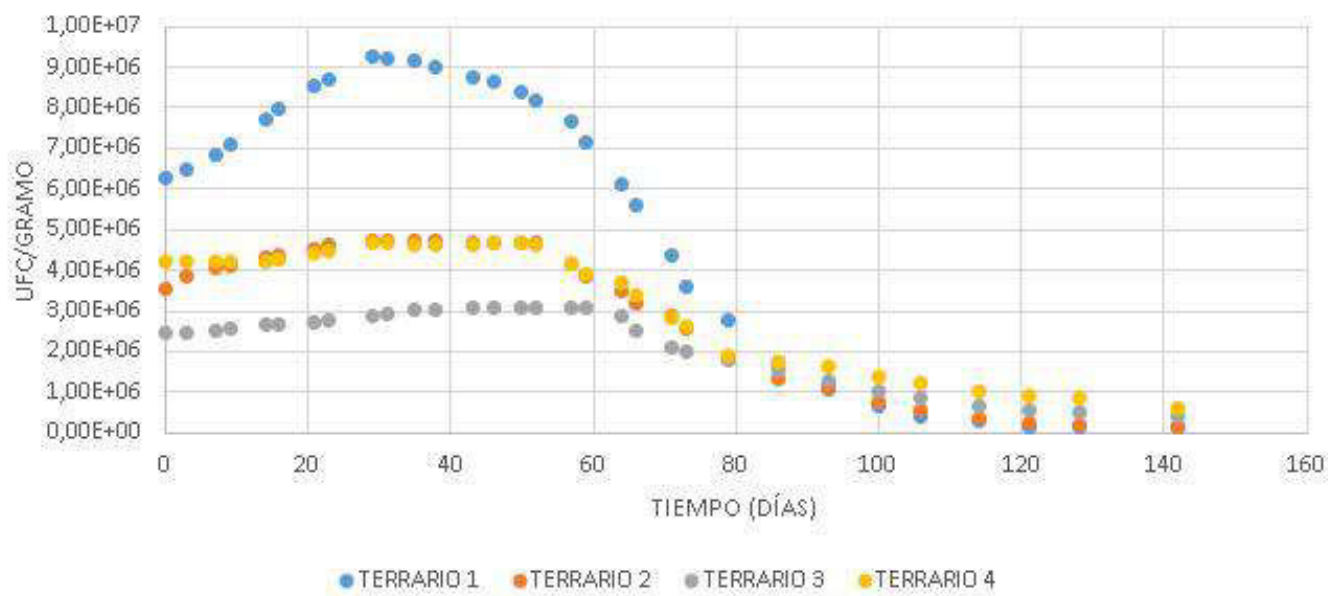


Figura 31. Comparación del conteo de UFC/mL de los microorganismos heterótrofos viables por terrario.

De acuerdo con la Figura 31, en el suelo contaminado, se obtuvo un recuento inicial de heterótrofos totales. Estos recuentos fueron considerados adecuadamente ya que para la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos se necesita una concentración mínima de heterótrofos totales $>10^5$ UFC/g (Silverio & Sordo, 1989; Coulon & Delille, 2003; Ercoli et al., 2001).

Las tres cepas con mejor efecto degradador fueron la *Bacillus amyloliquefaciens*, la *Bacillus subtilis* y la *Agrobacterium tumefaciens*, las cuales conformaron el consorcio degradador de hidrocarburos en los terrarios evaluados (Figura 32).

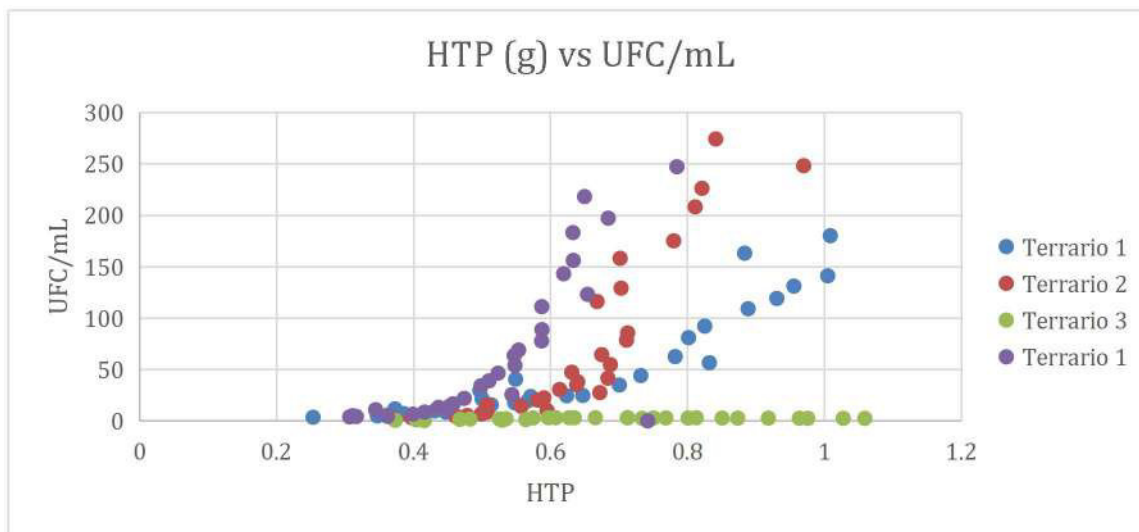


Figura 32. UFC/mL vs. HTP (g).

Los resultados de la población inicial de bacterias hidrocarbocíclicas expresaron cantidades típicas de suelos contaminados con microorganismos adaptados. Según Atlas y Unterman (1999), las poblaciones de bacterias degradadoras en suelos no contaminados cambia de 1×10^3 a 1×10^4 , y para los contaminados de 1×10^6 a 1×10^8 U.F.C/g. El conteo de bacterias hidrocarbocíclicas observadas en los terrarios está entre 1.80×10^8 a 2.57×10^6 U.F.C/g, correspondientes a poblaciones altas, que se podrían considerar como adaptadas, típicas de suelos con presencia de hidrocarburos. De acuerdo con las recomendaciones reportadas en la literatura, estos niveles corresponden a suelos con un alto potencial de biodegradación (Ríos, 2005).

4.3.3. Condiciones de Operación del Consorcio Bacteriano

Las características del consorcio bacteriano de la patente Ultra Archaea son las siguientes:

- Apariencia: polvo fino, estado físico: sólido, color: gris claro, olor: ligero olor a aceite, umbral de olor: no aplicable, pH: 8.5, punto de fusión: $> 842^\circ\text{F}$ ($> 450^\circ\text{C}$), Inflamabilidad (sólido, gas). Este producto no es inflamable. Densidad relativa: $2,6 \text{ g/cm}^3$, solubilidad (agua): $< 0.9 \text{ mg/l}$, temperatura de descomposición: $> 932^\circ\text{F}$ ($> 500^\circ\text{C}$). Otra información: densidad aparente entre $0.9 - 1.4 \text{ g/cm}^3$.

- Propiedades comburentes: ninguna, porcentaje volátil: 0 %, pH en solución acuosa: 8.5, gravedad específica: no aplicable, COV (% en peso): 0 %, almacenamiento de vida útil: 5 años, manteniéndolo seco, evitando la luz solar directa y estando alejado de todos los productos químicos o “biocidas” que puedan matar los microbios al contacto, temperatura recomendada: 32 °F-120 °F.

Las condiciones de operación del consorcio bacteriano de la patente Ultra Archaea son las siguientes: se prefieren temperaturas estables y se debe evitar grandes fluctuaciones de temperatura, cultivo: 100% natural y cultivado.

- Tolerancia al pH 5.0-10.0 (rango de trabajo ideal pH 5.5-8.5)
- Tolerancia de temperatura 32 °F-120 °F (rango de trabajo ideal 40 °F-110 °F)
- Tolerancia a la salinidad hasta saturación (depende de los minerales)
- Se mantiene un mínimo de oxígeno de 1 ppm (% de los microbios de la fórmula son anaerobios y anaerobios facultativos, pero el consorcio funciona mejor con O₂) Humedad >10 % mantenida; en suelo >1 % de humedad mantenida (Ultratech International, Inc. 2024).

Medios de cultivo: los medios de cultivos utilizados para este consorcio bacteriano son los siguientes:

- Medio de mantenimiento: agar nutritivo
- Medio de crecimiento: agar cetrimide, agar hicrome *Bacillus*, agar nutritivo.

4.3.4. Eficiencia de Biodegradación de Hidrocarburos

Resultados de las fracciones de HTP mediante GC

Se realizaron las mediciones de las fracciones de hidrocarburos en el cromatógrafo de gases (GC), en unidades de mg/kg de las cadenas de hidrocarburos, se muestra el método utilizado y el límite de cuantificación para cada análisis del GC que se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Metodología de ensayo de TPH: Fracción hidrocarburos F1 (C6 – C10), F2 (C10 – C28) y F3 (C28 – C40).

Ensayo	Método	L.C.	Unidades
Total Petroleum	EPA 8015C.		
Hydrocarbons (TPH): Fracción de Hidrocarburos F ₁ (C ₆ - C ₁₀)	Nonhalogenated Organics by Gas Chromatography. Rev. 3 / February 2007	0.60	mg/kg
Total Petroleum	EPA 8015C. Rev. 3		
Hydrocarbons (TPH): Fracción de Hidrocarburos F ₂ (C ₁₀ - C ₂₈)	Nonhalogenated Organics by Gas Chromatography. 2007	1.90	mg/kg
Total Petroleum	EPA 8015C. Rev. 3		mg/kg
Hydrocarbons (TPH): Fracción de Hidrocarburos F ₃ (C ₂₈ - C ₄₀)	Nonhalogenated Organics by Gas Chromatography. 2007	1.90	

L.C.: Límite de cuantificación.

En los resultados obtenidos de la Tabla 10, se observa una muestra de suelo contaminado con petróleo crudo; la fecha de muestreo es 18-07-2023, 15:00 horas, conservada a condiciones de laboratorio; el código de muestreo es SEH y el código de laboratorio es 23072767. Las cadenas de hidrocarburos se midieron en mg/kg.

. Muestra SEH01 (mg/kg): F₁: 27 508.091, F₂: 155 265.3 y F₃: 88 842.6

Tabla 10. Resultados de ensayo de TPH: Fracción hidrocarburos F1 (C6 – C10), F2 (C10 – C28) y F3 (C28 – C40).

Los resultados obtenidos fueron:

Producto declarado	Suelo
Matriz analizada	Suelo
Fecha de muestreo	2023-07-18
Hora de inicio de muestreo (h)	15:00
Condiciones de la muestra	Conservada
Código del Cliente	SEH-01
Código del Laboratorio	23072767

Ensayo Acreditado ante IAS-829		
Ensayo	Unidades	Resultados
SEH-01 (Crudo)		
Total Petroleum Hydrocarbons (TPH):		
Fracción de Hidrocarburos F ₁ (C ₆ -C ₁₀)	mg/kg	27508.09
Hidrocarburos totales de petróleo (TPH):		
Fracción de Hidrocarburos F ₂ (C ₁₀ -C ₂₈)	mg/kg	155265.30
Hidrocarburos totales de petróleo (TPH):		
Fracción de Hidrocarburos F ₃ (C ₂₈ -C ₄₀)	mg/kg	88842.60

Se realizó la comparación de los resultados obtenidos con el ECA para suelo agrícola y estos se encuentran por encima de los límites establecidos.

En los ensayos acreditados ante el Inacal – DA (Sede Lima 1), obtenidos de la segunda parte de la Tabla 10 (página siguiente), se observan cuatro muestras de suelo contaminado con petróleo crudo, con fecha de muestreo 19-09-2023, 15:28 horas, conservadas a condiciones de laboratorio, el código de muestreo es SEH-03, SEH-04, SEH-06, SEH-07 y el código de laboratorio es 23092667, 23092666, 23092664 y 23092665. Las cadenas de hidrocarburos se midieron en mg/kg.

. Muestra terrario 1 (SEH03) (mg/kg): F₁: 504.50, F₂: 66 104.40 y F₃: 48 169.30

. Muestra terrario 2 (SEH04) (mg/kg): F₁:1451, F₂: 203 504.10 y F₃: 125 425.30

. Muestra terrario 3 (SEH06) (mg/kg): F₁: 1147.40, F₂: 196 588.60 y F₃: 129 121.50

. Muestra terrario 4 (SEH07) (mg/kg): F₁: 1623.20, F₂: 39805 y F₃: 31116

Ensayo Acreditado ante IAS-829					
Ensayo	Unidades	Resultados			
		SEH-03	SEH04	SEH06	SEH07
		(Terrario 1)	(Terrario 2)	(Terrario 3)	(Terrario 4)
Total Petroleum Hydrocarbons (TPH):					
Fracción de Hidrocarburos F ₁ (C ₆ -C ₁₀)	mg/kg	504.50	1451	1147.40	1623.20
Hidrocarburos totales de petróleo (TPH):					
Fracción de Hidrocarburos F ₂ (C ₁₀ -C ₂₈)	mg/kg	66 104.40	20 3504.10	196 588.60	39805
Hidrocarburos totales de petróleo (TPH):					
Fracción de Hidrocarburos F ₃ (C ₂₈ -C ₄₀)	mg/kg	48 169.30	125 425.30	129 121.50	31116
Resultados de suelo reportados en base seca.					
Ensayo Acreditado ante IAS-829					
Ensayo	Unidades	Resultados			
		SEH-08	SEH09	SEH 11	SEH12
		(Terrario 1)	(Terrario 2)	(Terrario 3)	(Terrario 4)
Total Petroleum Hydrocarbons					
(TPH): Fracción de	mg/kg	32.05	28.18	30.33	149.70
Hidrocarburos F ₁ (C ₆ -C ₁₀)					
Hidrocarburos totales de petróleo					
(TPH): Fracción de	mg/kg	36 810.90	97 169.10	53 482.70	25903.60
Hidrocarburos F ₂ (C ₁₀ -C ₂₈)					
Hidrocarburos totales de petróleo	mg/kg	36 350.20	90 159	50 359.80	27457.50
(TPH): Fracción de					

Hidrocarburos F3 (C₂₈-C₄₀)

Resultados de suelo reportados en base seca.

Resultados de HTP en cromatógrafo de gases

En los ensayos acreditados ante Inacal-DA (Lima 1), obtenidos de la tercera parte de la Tabla 10 (página anterior), se observan cuatro muestras de suelo contaminado con petróleo crudo, la fecha de muestreo es 18-12-2023, 16:00 horas, conservada a condiciones de laboratorio, el código de muestreo es SEH08, SEH09, SEH11 y SEH12 y el código de laboratorio es 23121623, 23121624, 23121626 y 23121625.

Las fracciones de hidrocarburos que se midieron en mg/kg son las siguientes:

- . **Muestra terrario 1 (SEH08) (mg/kg):** F₁: 32.05, F₂: 36 810.90 y F₃: 36 350.20
- . **Muestra terrario 2 (SEH09) (mg/kg):** F₁: 28.18, F₂: 97 169.10 y F₃: 90 159
- . **Muestra terrario 3 (SEH11) (mg/kg):** F₁: 30.33, F₂: 53 482.70 y F₃: 50 359.80
- . **Muestra terrario 4 (SEH12) (mg/kg):** F₁: 149.70, F₂: 25 903.60 y F₃: 27 457.50

Tabla 11. Fracciones de HTP para los terrarios 1, 2, 3 y 4 después de 60 y 142 días.

Fracciones de Hidrocarburos (mg/kg)	Inicio	Después de 60 días				Después de 142 días			
		T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4
F₁	27 508.09	504.50	1451	1147.40	1623.20	32.05	28.18	30.33	149.70
F₂	155265.30	66104.40	203504.10	196588.60	39805	36810.90	97169.10	53482.70	25903.60
F₃	88 842.60	48169.30	125425.30	129121.50	31116	36350.20	90159	50359.80	27457.50
HTP	271615.99	114778.20	330380.40	326857.50	72544.20	73193.15 (63.76 %)	187356.28 (56.71 %)	103872.83 (31.78 %)	53510.8 (73.76 %)

Nota. T1, T2, T3, T4: terrarios.

En la Tabla 11, se muestran fracciones de HTP, de las cuales, en el terrario 1 se observa una reducción creciente en comparación con los demás terrarios, en los que la variación no se ve uniforme y creciente. Asimismo, se puede observar la rápida disminución en las concentraciones de HTP (meses iniciales) producidas por una alta disminución de hidrocarburos ligeros (menor peso molecular), mediante los procesos de volteo manual. Posteriormente, los productos de alto peso molecular, y que son más complejos de degradar por los microorganismos, van juntándose en la matriz del suelo haciendo menos rápida la concentración de biodegradación (Marguesin & Schinner, 1997; Ercoli et al., 2001).

Resultados de mediciones de HTP realizadas en el Soxhlet

La exposición a los hidrocarburos del petróleo reduce la diversidad de comunidades bacterianas y cambia los microorganismos dominantes (Okere & Semple, 2011). Este cambio en la composición de la comunidad bacteriana tiene un impacto importante en el ciclo de nutrientes, lo que causa una disminución de la productividad del suelo. La contaminación por hidrocarburos de petróleo también puede alterar las interacciones microbianas del suelo; por ejemplo, la presencia de hidrocarburos de petróleo puede estimular el crecimiento de bacterias degradantes de hidrocarburos y reducir la presencia de otros microorganismos (Ahmed et al., 2020).

A continuación, se presentan las gráficas de comportamiento de la concentración de HTP durante el tiempo de la investigación.

En la Figura 33, se muestran los resultados de la reducción de la masa de hidrocarburos durante 139 días, medidos con el método gravimétrico o diferencias de masas en gramos para los cuatro terrarios. De estos, el terrario 3 es el de control abiótico de la investigación. Se muestran los porcentajes de reducción de masa de hidrocarburos, que son los siguientes: **terrario 1: 73.40 %**, **terrario 2: 29.50 %**, **terrario 3: 44.49 %** y **terrario 4: 59.29 %**.

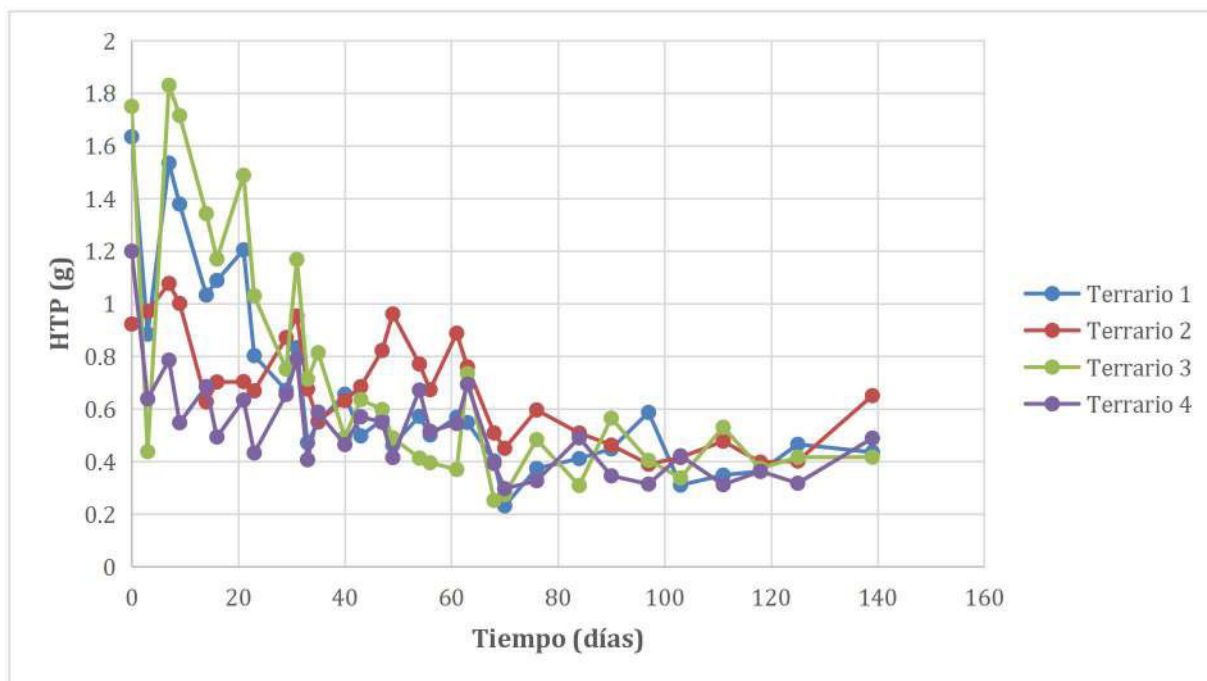


Figura 33. Gráfica HTP (g) con el tiempo (días).

De acuerdo con la Figura 33, uno de los indicadores fundamentales de la efectividad de un proceso de biorremediación es la disminución en las concentraciones de HTP (Douglas et al., 1994; Weisman, 1998; Zhu et al., 2001); por este motivo, es primordial realizar un seguimiento adecuado de la disminución de HTP mediante todo el proceso de biorremediación de suelos contaminados con petróleo crudo.

4.3.5 Características del Suelo – Descripción y Recolección del Suelo

- **Análisis preliminar y caracterización del suelo costero – Ventanilla (Lima, Perú)**

Para determinar algunas características fisicoquímicas y granulométricas del suelo arenoso, se realizó un análisis al suelo utilizado durante el estudio antes de la adición de los hidrocarburos. El suelo fue obtenido de una de las playas de Ventanilla afectada por el derrame de petróleo.

Para realizar la caracterización inicial del suelo, se tomaron muestras aleatorias de suelo, empleando espátulas metálicas. Las muestras fueron colocadas en bolsas en un balde de 20 litros aproximadamente.

En la Tabla 12, se muestran los resultados del análisis de salinidad de suelo arenoso costero de Ventanilla, realizado en el Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas, Aguas y Fertilizantes de la Universidad Nacional Agraria La Molina (Anexo 2), que son los siguientes:

- **pH:** 7.33 (ligeramente alcalino).

Se determinó que el suelo libre de contaminantes tenía un pH próximo al neutro, alrededor de 7.33.

- **Conductividad eléctrica (CE):** 11.92 dS/m (fuertemente salino).

- **Fósforo disponible:** 8.20 ppm (valor medio).

- **Calcáreo Total CaCO_3 :** 0.09 %.

- **% Materia orgánica:** 0.14 % (valor bajo).

- **Textura:** 99 % arena, 1 % limo y 0 % arcilla por el método del hidrómetro.

Como se observa en los resultados, el suelo tiene una textura arenosa, lo cual era de esperarse debido a que el tipo de suelo de mayor abundancia en esa playa se caracteriza por su alto contenido de arena.

- **CIC:** la muestra de suelo sin contaminar presentó 25.6 meq/kg de suelo, esto nos indica que los hidrocarburos en el suelo disminuyeron aproximadamente a la mitad de su capacidad para intercambiar iones.

- **Cationes cambiables:** 0.97 calcio, 0.84 magnesio, 0.30 sodio, 0.45 meq/100 g potasio.

- **Cationes solubles de suelo:** 341.92 meq/100g, aniones solubles de suelo es 356.20 meq/100 g.

- **Boro soluble de suelo:** 2.91 ppm.

- **Yeso soluble:** 0 %.

- **Porcentaje de sodio intercambiable:** 11.89 (Psi).

- **Microelementos disponibles:** 6.56 ppm de hierro; 0.23 ppm de cobre, zinc; 0.36 ppm manganeso y 2.19 ppm de boro.

- **Microelementos totales:** (12581.97 ppm de hierro; 8.39 ppm de cobre, zinc; 187.87 ppm de manganeso y 14.92 ppm de boro). 9.03 ppm de plomo, 0.3 ppm de cadmio, 7.08 ppm de cromo total y 0.03 ppm de cromo soluble.

- **Granulometría** (0 % de arcilla, 1 % de limo y fracciones de arena, 9 % arena media y 82 % de arena fina).

- **Densidad aparente:** 1.35 g/cc.

- **Densidad real:** 2.57 g/cc.
- **Porosidad:** 47.49 %.
- **Humedad gravimétrica:** 0.01%.
- **Sólidos solubles totales (SST):** 21491.20 ppm.
- **Color del suelo gris oscuro:** (sistema de Munsell): 5Y 4/1.
- **Relación de absorción de sodio:** 44.46.
- **Materia orgánica:** 0.14%, que se realizó con la medición de color por la tabla de Munsell.

Tabla 12. Análisis de suelo arenoso costero – Ventanilla.

Número de Muestra		C.E.	Análisis Mecánico					Cationes Cambiables										Suma	Sum	%
Lab.	Campo	dS/m	Arena	Limoso	Arcilloso	Textura	pH 1:1	CaCO ₃ %	M.O. %	P ppm	K ppm	Cl ⁻	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	Na ⁺	Al ³⁺ H ⁺	de Cationes	a de Bases	% Sat. De Bases
												meq/100g						s	s	Base s
1043		11.9	99	1	0	A.	7.3	0.09	0.14	8.2	176	2.56	0.97	0.84	0.4	0.3	0.0	2.56	2.56	100
4		2					3								5	0	0			

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

No. Mues t. Lab.	Saturación Pasta n %	pH Sat.	C.E. Ext. St. dS/m	Cationes Solubles (meq/L)					Aniones Solubles (meq/L)					Boro Soluble ppm	Yeso Soluble %	PSI	
				Ca ⁺²	Mg ⁺²	K ⁺	Na ⁺	SUMA	NO ₃ ⁻	CO ₃ ⁻²	HCO ₃ ⁻	SO ₄ ⁻²	Cl ⁻				SUMA
10434	30	7.01	33.58	24.50	46.67	5.54	265.22	341.92	0.18	0.00	4.12	1.90	350.00	356.20	2.91	0.00	11.89

Fuente. Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas, Aguas y Fertilizantes de la Universidad Nacional Agraria La Molina, 2023.

Número Muestra	Cu* 95	Mn* 95	Fe* 95enzo.	Zn* 95	B* 95enzo.
Lab. Claves	enzo. Ppm	enzo. Ppm	Ppm	enzo. Ppm	Ppm
10434	0.23	0.36	6.56	0.45	2.19

Número Muestra	Cu** total	Mn** total	Fe** total	Zn** total	B** total
Lab. Claves	ppm	ppm	ppm	ppm	Ppm
10434	8.39	187.87	12581.97	33.93	14.92

Número Muestra	Pb total	Cr total	Cd total	Pb sol.	Cr sol.	Cd sol.
Lab. Claves	ppm	ppm	ppm	Agua ppm	Agua ppm	Agua ppm
10434	9.03	7.08	0.30	0.07	0.03	0.01

Número Muestra	D.A.	D.R.	H.G.	Sólidos sol.	RAS	Porosidad
Lab. Claves	g/cc	g/cc	%	Totales ppm		%
10434	1.35	2.57	0.01	21491.20	44.46	47.49

* Micronutrientes disponibles: Solución extractante Agro Service International (ASI) o Hunter para suelo.

** Micronutrientes y metales pesados totales: Solución extractante HclO4-HNO3 (1:5) para suelo.

Número Muestra	% Arena muy Gruesa	% Arena Gruesa	% Arena Media	% Arena Fina	% Arena Muy Fina	% Limo	% Arcilla
Lab. Claves	2.00 – 1.00 mm	1.00 – 0.50 mm	0.50 – 0.25 mm	0.25-0.10 mm	0.10-0.05 mm		
10434	0.00	0.00	9.00	82.00	8.00	1.00	0.00

Número Muestra	Color*	Nombre del Color
Lab. Claves		
10434	5Y 4/1	Gris oscuro

* La determinación se realizó empleando las cartillas de color del suelo de Munsell.

- **Caracterización del petróleo crudo**

En la Tabla 13, se muestran los resultados de las propiedades fisicoquímicas del petróleo crudo liviano.

Tabla 13. Propiedades principales del petróleo crudo.

Propiedad	Unidad	Valor
Densidad a 15°C	g/mL	0.87
P. Específico	g/mL	0.88
15.6/15.6 °C		
Densidad API	°API	28.55
Azufre	%p/p	0.288
N° de Neutralización	mg KOH/g	0.18
Presión de Vapor REID	kPa	21.20
Punto de Vertido	°C	-17
Viscosidad 20 °C	cSt	43.21
Viscosidad 40 °C	cSt	16.57
Sulfhídrico disuelto	ppm v/v	1.50
Sulfhídrico evol. A	ppm p/p	8.50
340 °C		
Residuo de Carbón	%p/p	5
Asfaltenos	%p/p	2
Nitrógeno	ppm p/p	2890
Cadmio	ppb	0.95
Calcio	ppm p/p	0.70
Cobre	ppm p/p	0.65
Fósforo	ppm p/p	<5
Hierro	ppm p/p	1.15
Níquel	ppm p/p	6.85
Plomo	ppm	1.02
Silicio	ppm p/p	<10
Sodio	ppm p/p	3.45
Vanadio	ppm p/p	9.55
Cloro Total	ppm	98.20
Cloro fase inorgánica	ppm	87
Cloro fase orgánica	ppm	11.25
Agua por destilación	% vol	1.50
Aromaticidad disponible	-	0.55
40°C		
Aromaticidad requerida	-	0.0010

40 °C			
Valor P 40 °C		-	>3.90
Contenido en LPG			
C ₂	%p/p		0.01
C ₃	%p/p		0.14
iC ₄	%p/p		0.12
nC ₄	%p/p		0.44
iC ₅	%p/p		0.38
nC ₅	%p/p		0.71

Fuente. Información entregada por Repsol en 2023 en comunicación personal.

- **Resultados de las mediciones de CO₂ acumulado, pH y temperatura de cada terrario**

En la Tabla 14, se presenta la medición de CO₂ acumulado en ppm, que muestra un valor ascendente de hasta 30378 ppm. Asimismo, se midió el pH entre 5.5 a 6 y la temperatura (°C) varía entre 20 °C y 23.5 °C (Figura 34).

Tabla 14. Medición de CO₂ (ppm), pH y T(°C).

Muestra	Día	Hora (pm)	CO₂ (ppm)	pH	T (°C)
1	17-07-2023	12:00	502	5.50	23
	17-10-2023	12:00	27156	6	20
	05-12-2023	12:00	30378	6	22
2	17-07-2023	12:00	503	5	22
	17-10-2023	12:00	21179	5	20
	05-12-2023	12:00	24486	5.50	22
3	17-07-2023	12:00	506	5	23.5
	17-10-2023	12:00	23383	5.50	21
	05-12-2023	12:00	26635	5	22.5
4	17-07-2023	12:00	0	5.50	23
	17-10-2023	12:00	12690	6	21
	05-12-2023	12:00	16022	6	22.5

De acuerdo con la Tabla 13, el desarrollo y actividades de los microorganismos son influenciados por la cantidad de pH ácidos (<5.0); sin embargo, existen microorganismos que son capaces de realizar el proceso de biodegradación en condiciones extremas. El intervalo adecuado para realizar este proceso se presenta entre 5.0 y 8.8 (Dibble & Bartha, 1979; Leahy & Colwell, 1990; Levin & Gealt, 1997; Hamme et al., 2003).

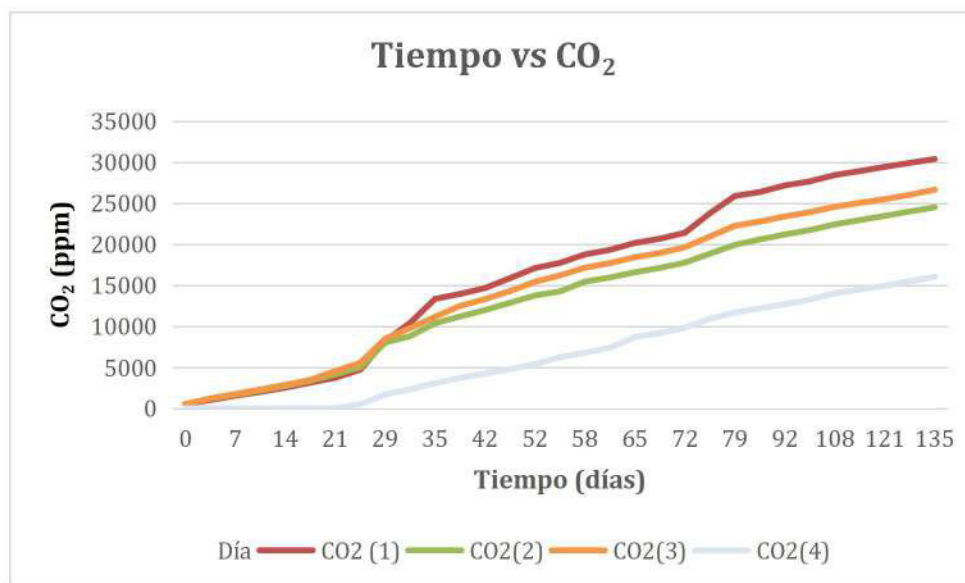


Figura 34. Tiempo (días) vs. CO₂ (ppm) de cada terrario.

La Figura 34 muestra la concentración de CO₂ acumulado en ppm, lo que indica un crecimiento ascendente del consorcio bacteriano en 142 días.

Las mediciones diarias de CO₂ generadas por el proceso de biorremediación permitieron el cálculo de la producción acumulada de CO₂ durante el período de tratamiento (mostrado en la Figura 24) y las tasas de respiración diarias promediadas periódicamente.

De acuerdo a la Figura 34, con estos parámetros, los sedimentos de cada mesocosmos presentaban óptimas características, la temperatura estaba dentro del intervalo óptimo 18 °C y 30 °C, que tolera la actividad enzimática e intercambio celular (Gómez et al., 2008).

En la Tabla 14, el pH se halló en el rango de 5.50 y 7.80 unidades (rango conveniente para el crecimiento de bacterias), intervalo óptimo entre 6 y 8 unidades (Ríos, 2005); la humedad estaba entre el orden del 10 % a 20 % de la capacidad del terrario, que es fundamental porque se comporta como medio de transporte de nutrientes y oxígeno a la célula (Gómez et al., 2008).

- **Resultados estadísticos de la investigación**

Para la evaluación del comportamiento en el tiempo y los datos de las diversas variables de interés, se utilizó el programa o lenguaje de programación con un enfoque al análisis estadístico **R**. Primero, se realizó un análisis para comparar la probabilidad de que la variable de concentración de HTP seguía una distribución homogénea.

Resultados estadísticos

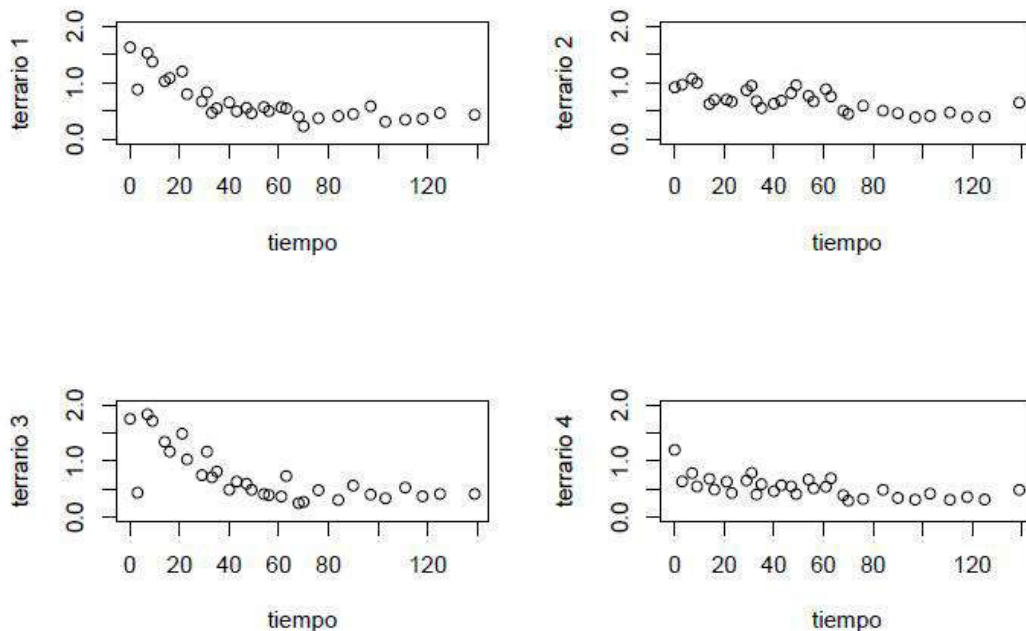
Se presentan cuatro muestras medidas en terrarios en un período de 142 días:

Análisis con Outliers

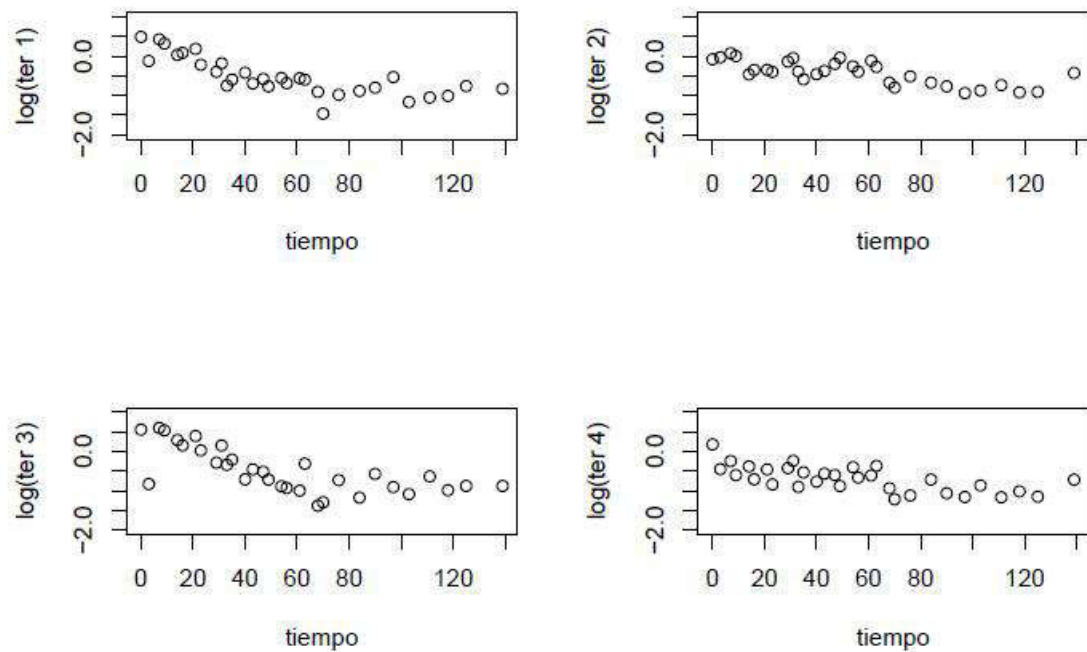
Tiempo (s) vs. terrario (g)

Análisis preliminar

Se dibujan unos gráficos de dispersión para examinar las relaciones de manera preliminar:



Donde aparentan un comportamiento del tipo exponencial; además se observan valores atípicos en los terrarios 1 y 3, en el dato 2, mientras que en los demás, en el último dato. Sacando el logaritmo, se observa un comportamiento lineal.



Modelamiento

Para el modelamiento, se consideran los datos atípicos. Se extrajo la matriz de correlación:

```
##          t          11          12          13          14
## t    1.0000000 -0.7727206 -0.7417455 -0.7053378 -0.6788210
## 11 -0.7727206  1.0000000  0.6702216  0.8626650  0.7355757
## 12 -0.7417455  0.6702216  1.0000000  0.5700833  0.7442030
## 13 -0.7053378  0.8626650  0.5700833  1.0000000  0.6323293
## 14 -0.6788210  0.7355757  0.7442030  0.6323293  1.0000000
```

Donde se observa que existe una marcada correlación lineal entre el tiempo y cada uno de los logaritmos medidos en cada terrario (valor mayor a 6.0).

Se propone así:

$$\log(ter_i) = \beta_0 + \beta_1 \times t + \varepsilon$$

Donde $i = 1, 2, 3, 4$ y ter_i indican la medida en el terrario i ; t es el tiempo mientras que ε es el error aleatorio. Ejecutando las regresiones, se tiene lo siguiente:

Tabla resumen de la regresión terrario vs. tiempo

	R ²	beta_0	beta_1	pv-beta_0	pv-beta_1	pv-global
Terrario 1	0.5971	0.0182	-0.0097	0.8554	0	0
Terrario 2	0.5502	-0.1008	-0.0059	0.1380	0	0
Terrario 3	0.4975	0.1017	-0.0106	0.4475	0	0
Terrario 4	0.4608	-0.3732	-0.0058	0.0001	0	0

Donde el valor de p valor 0 indica que este es muy pequeño, menos que 0.005. Se observa que la regresión es significativa en todos los casos; sin embargo, en algunos, el término independiente no es significativo; por ello, se vuelve a calcular las regresiones:

Tabla resumen de la regresión terrario vs. tiempo, con p valor significativos.

	R ²	beta_0	beta_1	pv-beta_0	pv-beta_1	pv-global
Terrario 1	0.8162	NA	-0.0095	NA	0	0
Terrario 2	0.8393	NA	-0.0071	NA	0	0
Terrario 3	0.7032	NA	-0.0093	NA	0	0
Terrario 4	0.4608	-0.3732	-0.0058	1e-04	0	0

Donde el valor de p valor 0 indica que este es muy pequeño, menor a 0.005. Se observa mejoras en R². Se analiza también si se verifica la normalidad a través de una prueba paramétrica (Shapiro-Willks) y una prueba no paramétrica (Lilliefors) en los residuos a través de su p-valor:

```
##
## 1 Terrario 1 Terrario 2 Terrario 3 Terrario 4
## 2      0.18      0.371      0.292      0.552
```

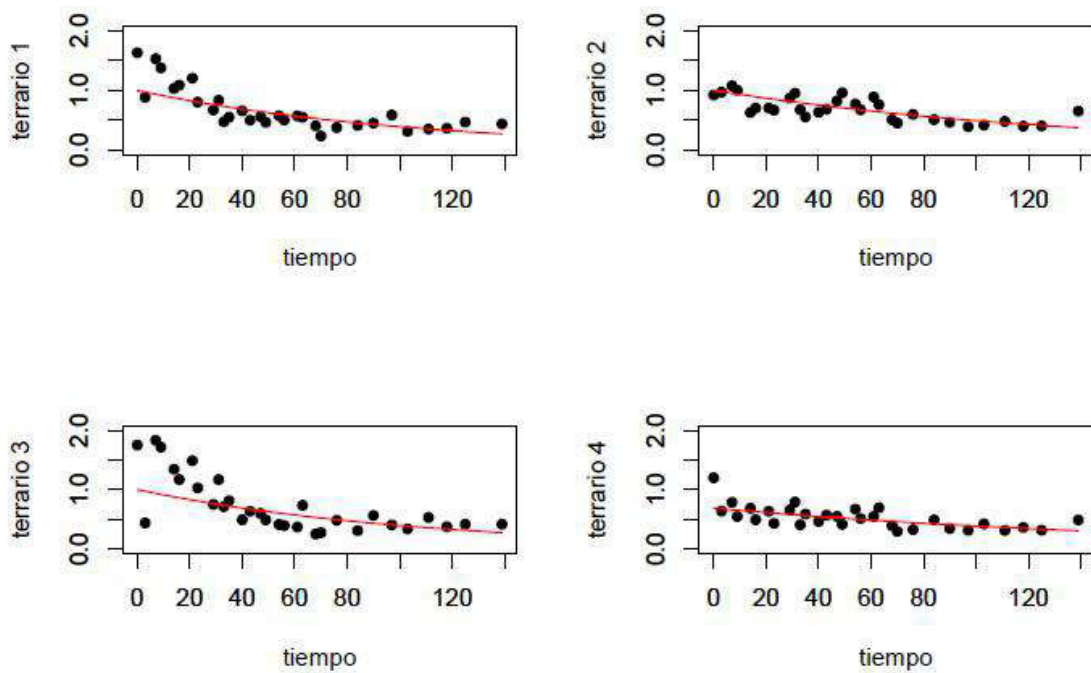
Donde se observa que todos los valores son mayores a 0.05, con lo que no se rechaza la hipótesis nula de normalidad, cumpliendo así este supuesto.

```
##
## 1 Terrario 1 Terrario 2 Terrario 3 Terrario 4
## 2      0.334      0.68      0.366      0.391
```

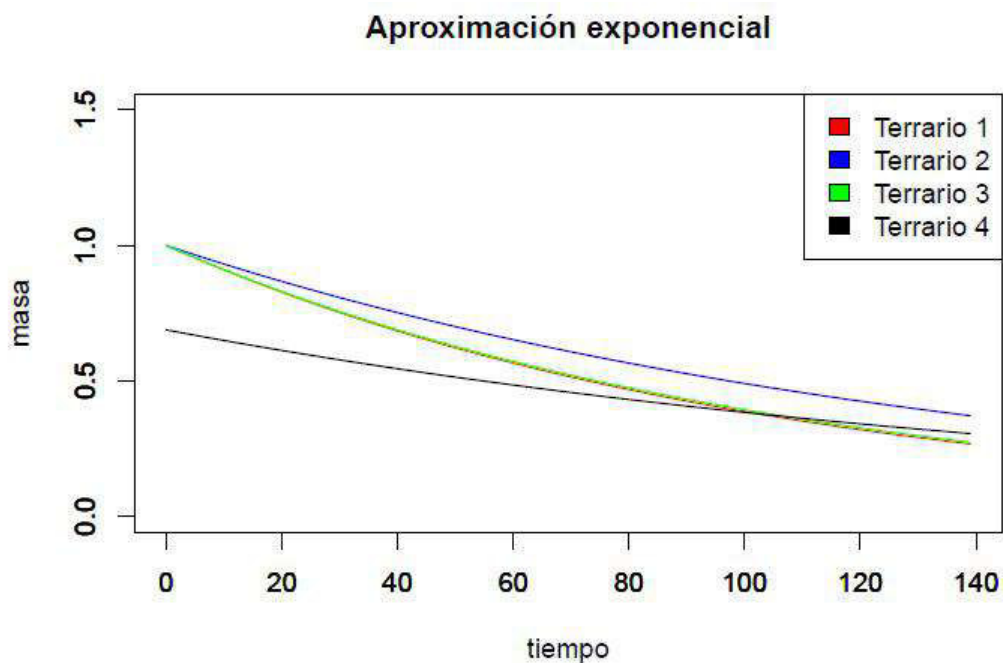
Donde se observa que todos los valores son mayores a 0.05, con lo que no se rechaza la hipótesis nula de normalidad cumpliendo así este supuesto.

Visualización de resultados

Se puede realizar el gráfico de la curva exponencial correspondiente en cada caso:



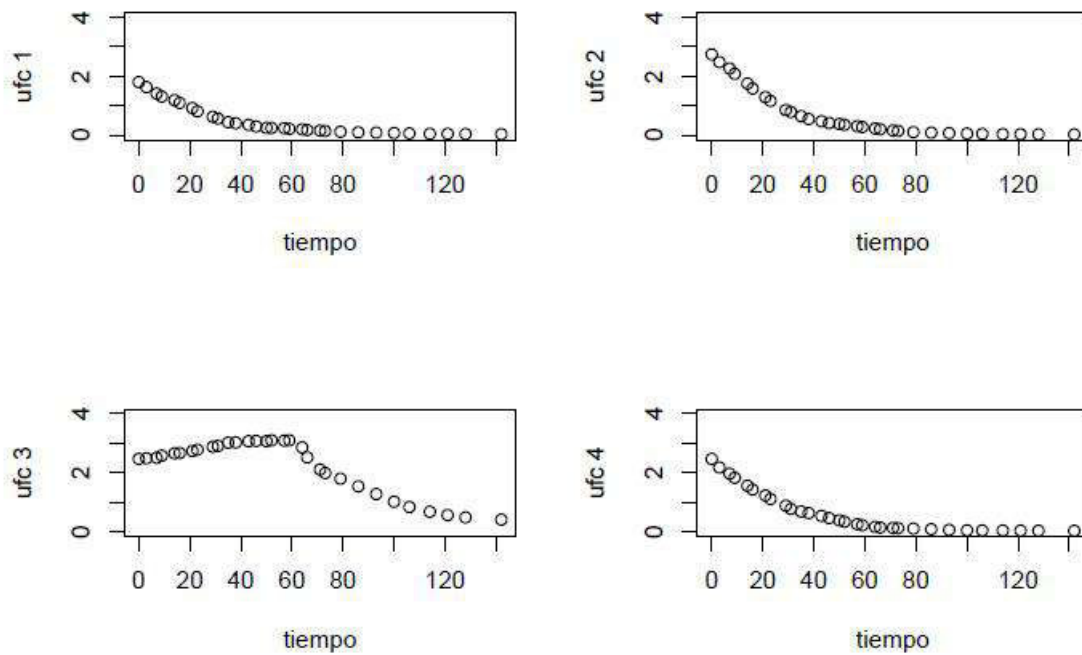
Asimismo, se puede observar las curvas exponenciales estimadas:



Tiempo vs. ufc

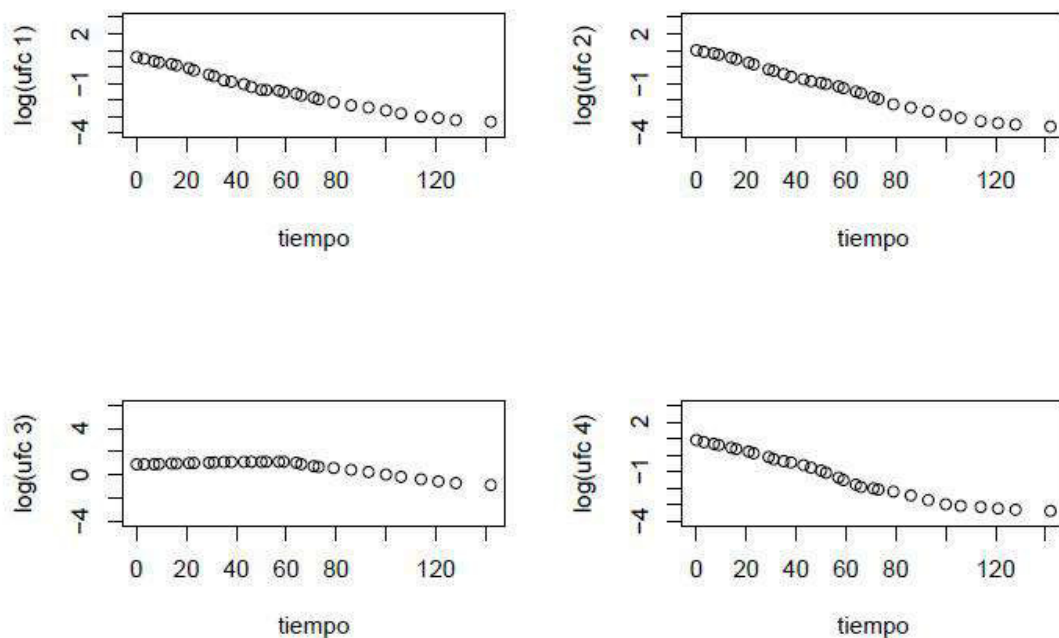
Análisis preliminar

Se hace una gráfica de dispersión para evaluar las relaciones preliminares:



Donde aparentan un comportamiento del tipo exponencial, sacando logaritmo.

```
par(mfrow=c(2,2))
plot(x=base_2$t,y=log(base_2$ufc_1),xlab="tiempo",ylab="log(ufc 1)",ylim=c(-4,3))
plot(x=base_2$t,y=log(base_2$ufc_2),xlab="tiempo",ylab="log(ufc 2)",ylim=c(-4,3))
plot(x=base_2$t,y=log(base_2$ufc_3),xlab="tiempo",ylab="log(ufc 3)",ylim=c(-4,6))
plot(x=base_2$t,y=log(base_2$ufc_4),xlab="tiempo",ylab="log(ufc 4)",ylim=c(-4,3))
```



Donde se observa un dato atípico en ufc 3 (dato 15). Se analizan las correlaciones:

```
##          t          11          12          13          14
## t  1.0000000 -0.9880266 -0.9919698 -0.8492208 -0.9842355
## 11 -0.9880266  1.0000000  0.9969834  0.7686893  0.9925222
## 12 -0.9919698  0.9969834  1.0000000  0.8001751  0.9956584
## 13 -0.8492208  0.7686893  0.8001751  1.0000000  0.7752686
## 14 -0.9842355  0.9925222  0.9956584  0.7752686  1.0000000
```

Donde se observa que existe una marcada correlación lineal entre el tiempo y cada uno de los logaritmos de los valores medidos en cada ufc (valor absoluto mayor a 0.6).

Modelamiento

Para el modelamiento, se consideran los datos atípicos. Se propone:

$$\log(ufc_i) = \beta_0 + \beta_1 \times t + \varepsilon$$

Donde $i = 1, 2, 3, 4$ y ufc_i indica la medida en el ufc_i, t es el tiempo, mientras que ε es el error aleatorio. Ejecutando las regresiones, se tiene:

Tabla resumen de la regresión ufc(UFC/mL) vs. tiempo(días).

	R ²	beta_0	beta_1	pv-beta_0	pv-beta_1	pv-global
Ufc 1	0.9762	0.3763	-0.0299	0	0	0
Ufc 2	0.9840	0.9064	-0.0366	0	0	0
Ufc 3	0.7212	1.4229	-0.0132	0	0	0
Ufc 4	0.9687	0.7889	-0.0351	0	0	0

Donde el valor de p valor 0 indica que este es muy pequeño, menor a 0.005; además el R² es elevado en todos los casos. Se observa que la regresión es significativa en todos los casos. Se analiza también si se verifica la normalidad a través de una prueba paramétrica (ShapiroWilk) y una prueba no paramétrica (Lilliefors) en los residuos a través de su p-valor:

```
##
## 1 ufc 1 ufc 2 ufc 3 ufc 4
## 2 0.018 0.004 0.052 0.006
```

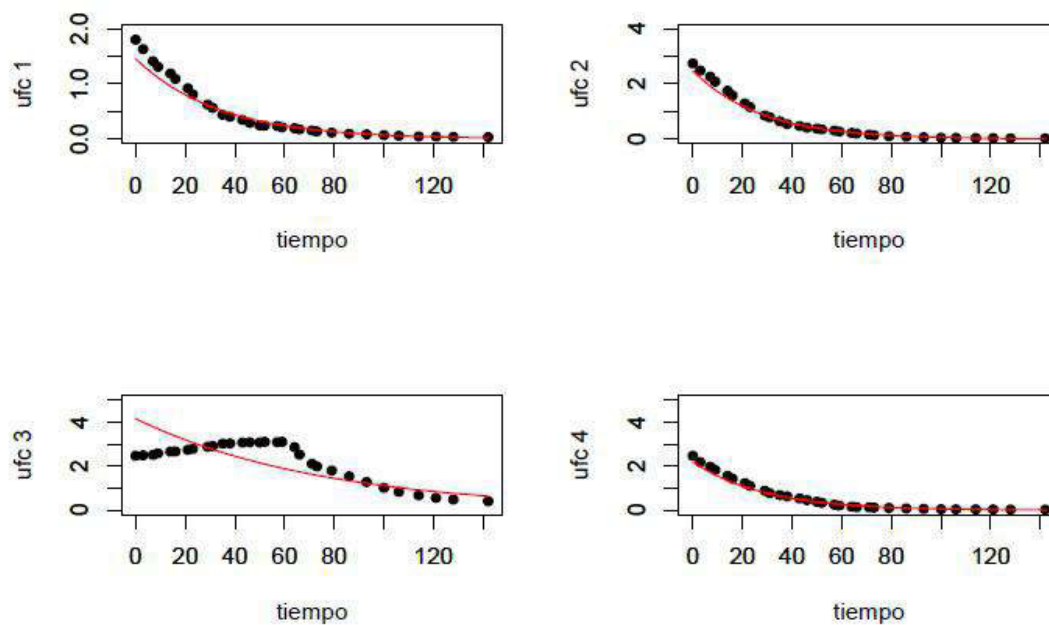
Donde se observa que todos los valores son menores o casi iguales a 0.05, con lo que se rechaza la hipótesis nula de normalidad no cumpliéndose así este supuesto.

```
##
## 1 ufc 1 ufc 2 ufc 3 ufc 4
## 2 0.104 0.076 0.306 0.023
```

Donde se observa que en solo un caso se rechaza la hipótesis nula de no normalidad.

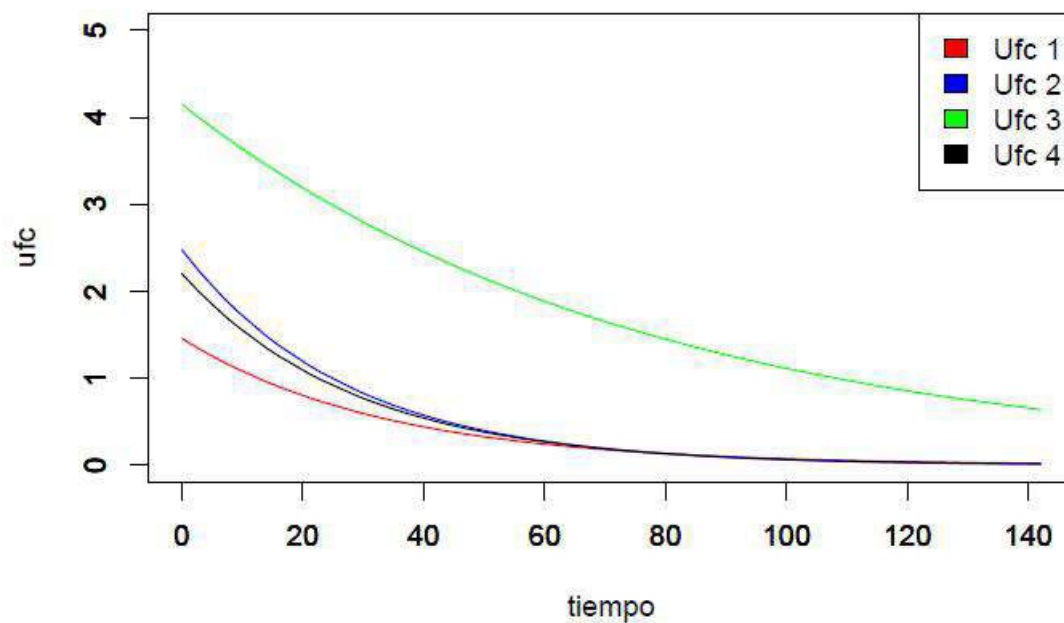
Visualización de resultados

Se puede realizar el gráfico de la curva exponencial correspondiente en cada caso:

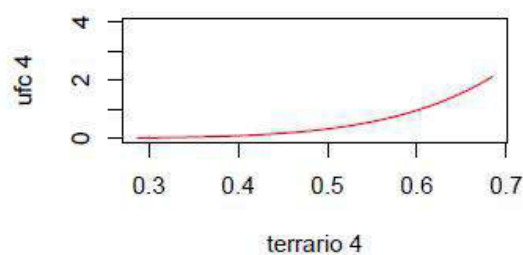
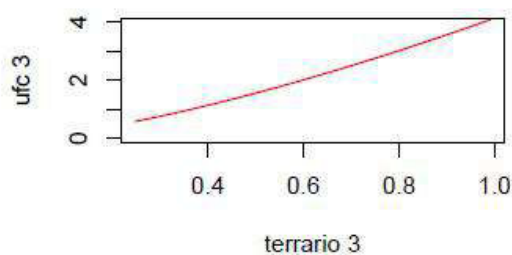
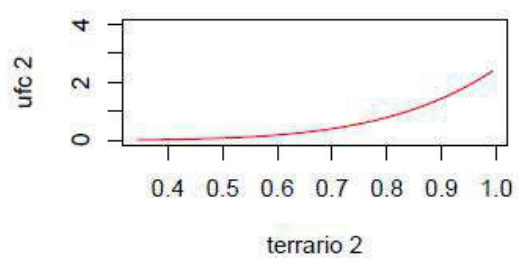
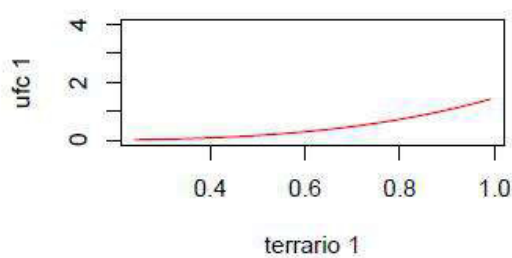


Asimismo, se puede observar las curvas exponenciales estimadas:

Aproximación exponencial



Se grafica la relación ufc_i vs. terrario usando sus aproximaciones debido a que se cuenta con los datos para diferentes períodos de tiempo, lo que impide una regresión.

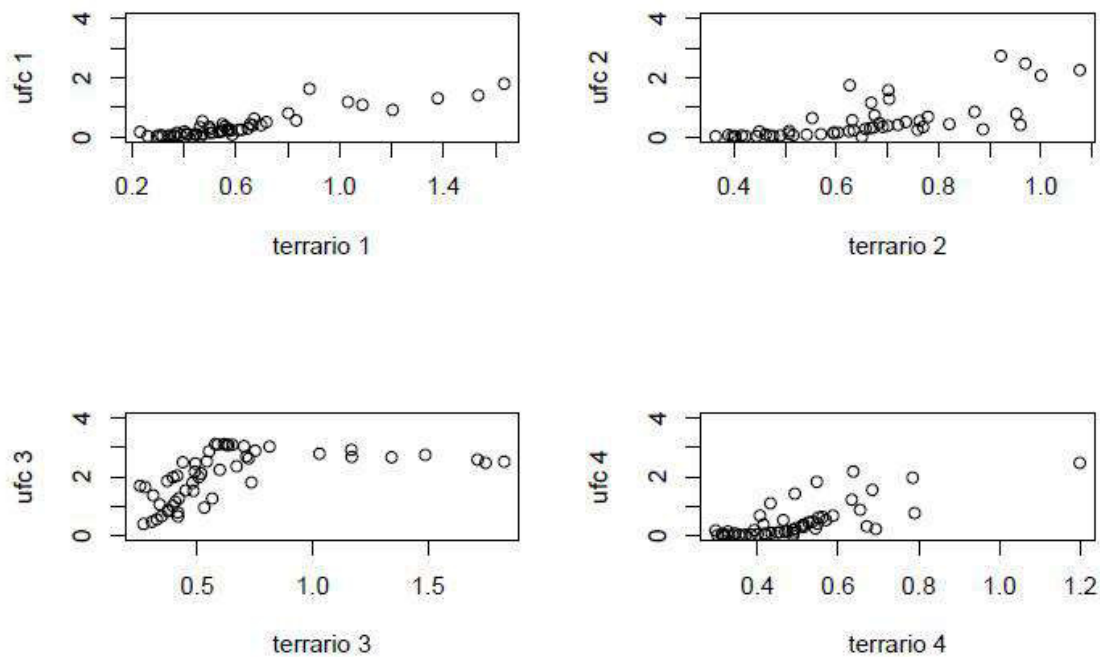


Ufc vs. terrario

Se puede plantear regresiones no tan precisas, haciendo uso de predicciones.

Análisis preliminar

Se evalúa en gráficos de dispersión terrario vs. ufc , y se obtiene:



Las gráficas representan la relación entre las UFC/kg y HTP de cada una de los 4 terrarios del proceso de investigación, en el cual se realizará un modelamiento de regresión lineal para cada uno de ellos.

Modelamiento

Ahora, se aplica regresión lineal teniendo en cuenta los atípicos, y se obtiene:

Tabla resumen de regresión de ufc vs. terrario.

	R ²	beta_0	beta_1	pv-beta_0	pv-beta_1	pv-global
Ufc 1	0.8289	-0.3983	1.2905	0	0e+00	0e+00
Ufc 2	0.4760	-1.1528	2.5951	0	0e+00	0e+00
Ufc 3	0.2790	1.2698	1.1588	0	1e-04	1e-04
Ufc 4	0.5409	-0.8931	2.7962	0	0e+00	0e+00

En este caso, todos los coeficientes son significativos; sin embargo, debido a que se usan aproximaciones, es notable que se tenga R² bajo, lo cual indica que es inadecuado considerarlos en este caso. Se analiza también si se verifica la normalidad a través de una prueba paramétrica (Shapiro-Wilks) y una prueba no paramétrica (Lilliefors) en los residuos de su p-valor.

```
##
## 1 Terrario 1 Terrario 2 Terrario 3 Terrario 4
## 2          0          0.001          0.018          0
```

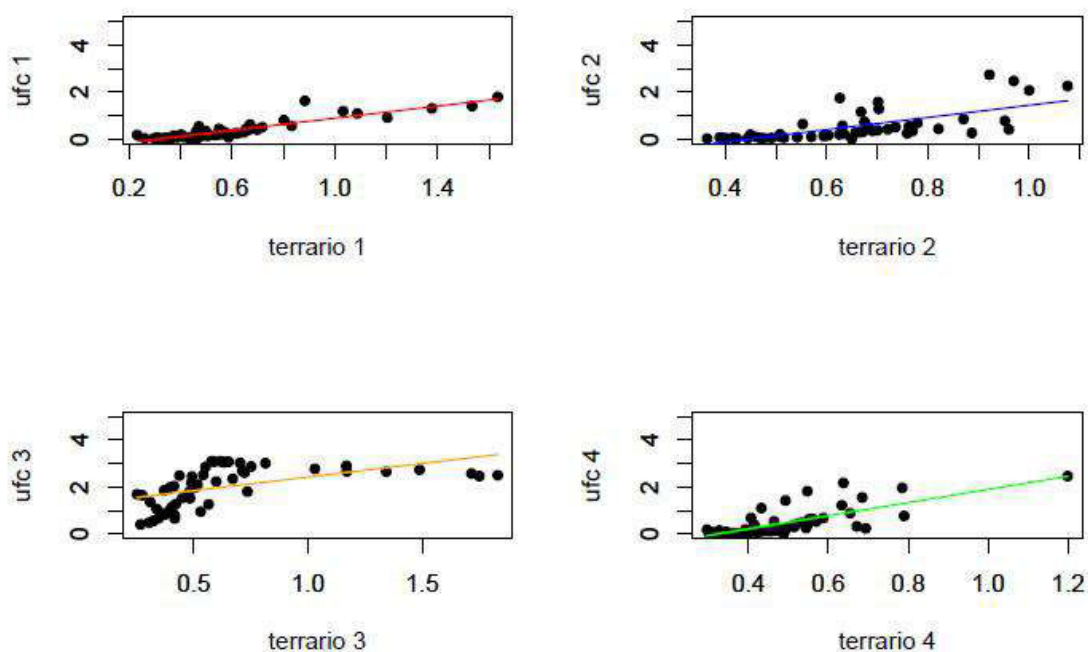
Donde se observa que todos los valores son menores a 0.05, con lo que se rechaza la hipótesis nula de normalidad incumpléndose así este supuesto.

```
##
## 1 Terrario 1 Terrario 2 Terrario 3 Terrario 4
## 2          0.028          0.007          0.236          0
```

Donde se observa que en un solo caso no se rechaza la hipótesis de normalidad.

Visualización de resultados

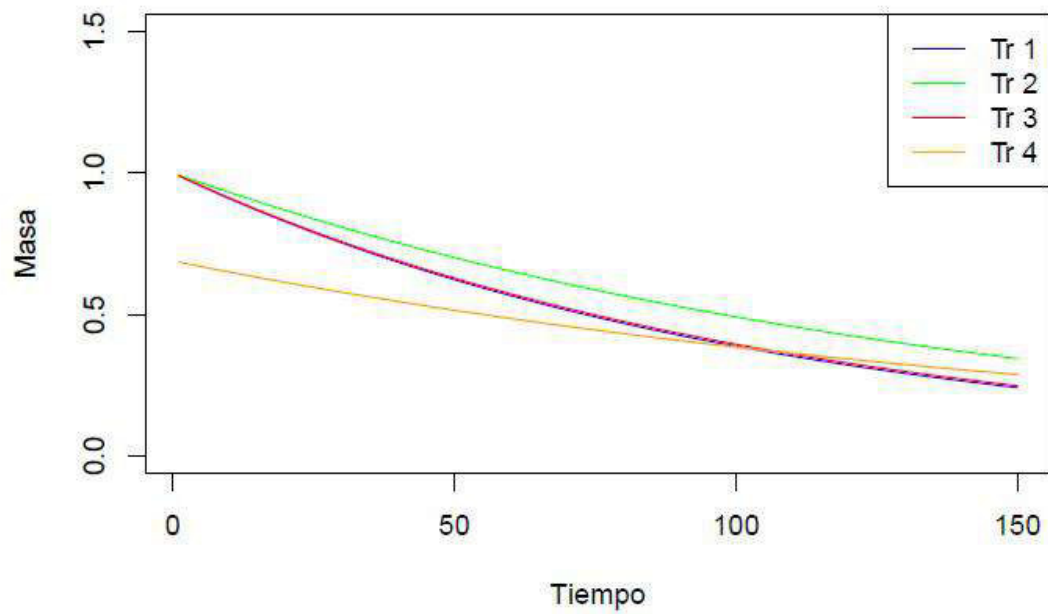
Se observa ahora una aproximación lineal de cada caso:



Finalmente, se muestra un gráfico de curvas de nivel sobre el terrario vs. tiempo.

```
## glX
## 1
```

Proyeccion curvas de nivel

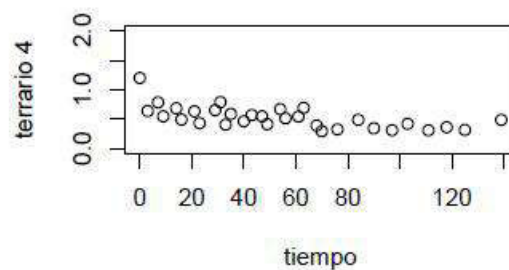
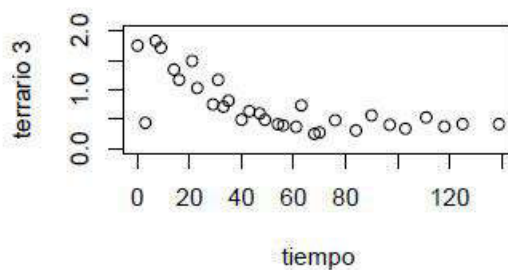
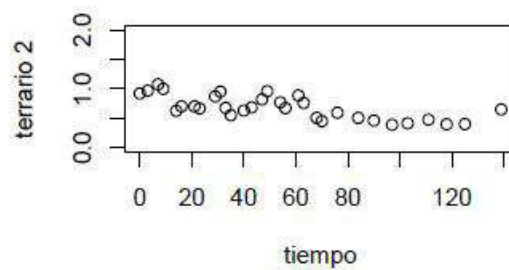
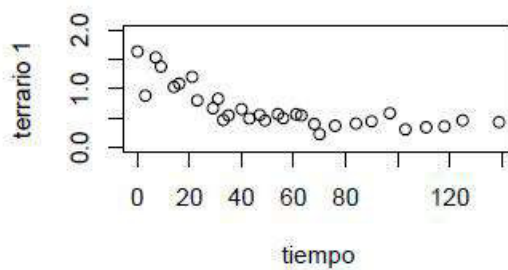


Análisis sin Outliers

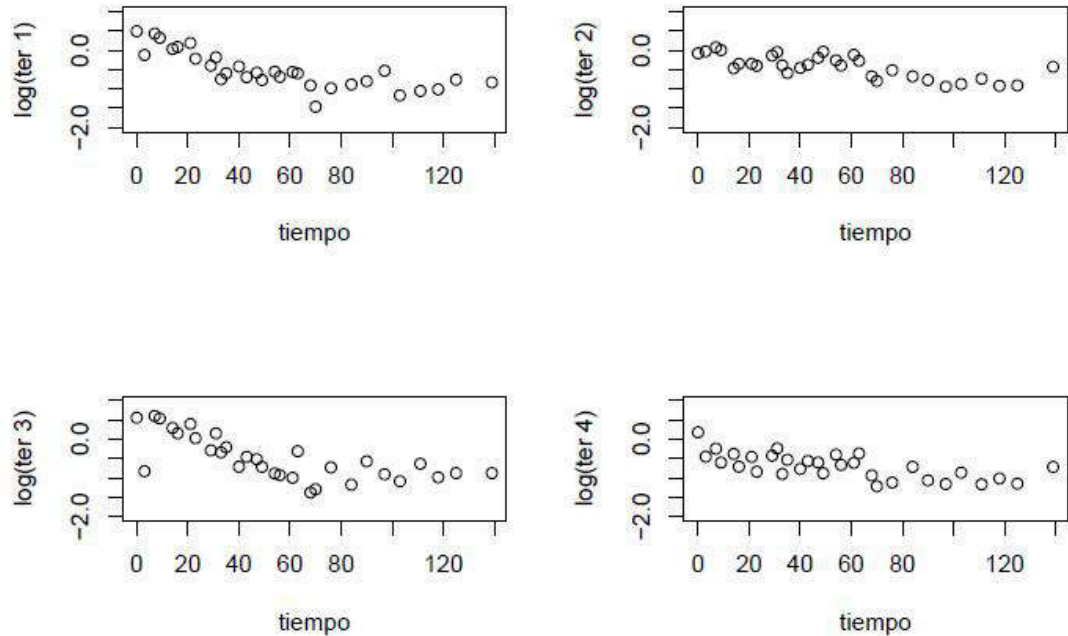
Tiempo vs. terrario

Análisis preliminar

Se dibuja un gráfico de dispersión para evaluar las relaciones preliminares.



Donde aparentan un comportamiento del tipo exponencial; además, se observan valores atípicos: en el terrario 1 y 3, y el dato 2, mientras que en los demás, el último dato. Sacando logaritmo:



Modelamiento

Para el modelamiento, no se consideran los datos atípicos; se evalúan las correlaciones.

##	t	11	12	13	14
## t	1.0000000	-0.7718446	-0.7847236	-0.7606889	-0.7072799
## 11	-0.7718446	1.0000000	0.6444850	0.8801877	0.6737317
## 12	-0.7847236	0.6444850	1.0000000	0.5987574	0.7438889
## 13	-0.7606889	0.8801877	0.5987574	1.0000000	0.6077756
## 14	-0.7072799	0.6737317	0.7438889	0.6077756	1.0000000

Donde se observa que existe una marcada correlación lineal entre el tiempo y cada uno de los logaritmos de los valores medidos en cada terrario (valor absoluto mayor a 0.6). Se propone:

$$\log(ter_i) = \beta_0 + \beta_1 \times t + \varepsilon$$

Donde $i = 1, 2, 3, 4$ y $teri$ indica la medida en el terrario i , t es el tiempo, mientras que ε es el error aleatorio. Ejecutando las regresiones, se tiene:

Tabla resumen de la regresión terrario vs. tiempo.

	R ²	beta_0	beta_1	pv-beta_0	pv-beta_1	pv-global
Terrario 1	0.5896	-0.0304	-0.0099	0.7760	0	0
Terrario 2	0.6554	-0.0573	-0.0070	0.3530	0	0
Terrario 3	0.5820	0.1985	-0.0117	0.1322	0	0
Terrario 4	0.5154	-0.3935	-0.0061	0.0000	0	0

Donde el valor de p valor 0 indica que este es muy pequeño, menor a 0.005. Se observa que la regresión es significativa en todos los casos. Sin embargo, en algunos, el término independiente no es significativo; por ello, se vuelve a calcular las regresiones.

Tabla resumen de regresión terrario vs. tiempo.

	R ²	beta_0	beta_1	pv-beta_0	pv-beta_1	pv-global
Terrario 1	0.8166	NA	-0.0095	NA	0	0
Terrario 2	0.8798	NA	-0.0078	NA	0	0

	R ²	beta_0	beta_1	pv-beta_0	pv-beta_1	pv-global
Terrario 3	0.7297	NA	-0.0093	NA	0	0
Terrario 4	0.5154	-0.3935	-0.0061	0	0	0

Donde el valor de p valor 0 indica que este es muy pequeño, menor a 0.005. Se observa mejoras en R². Se analiza también si se verifica la normalidad a través de una prueba paramétrica (Shapiro-Wilks) y una prueba no paramétrica (Lilliefors) en los residuos a través de su p-valor:

```
##
## 1 Terrario 1 Terrario 2 Terrario 3 Terrario 4
## 2      0.205      0.906      0.387      0.659
```

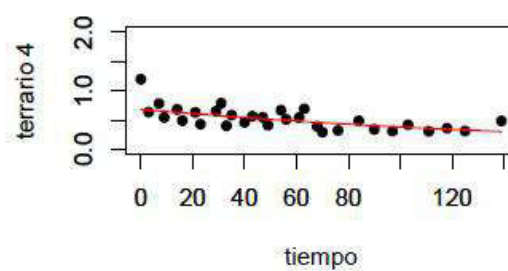
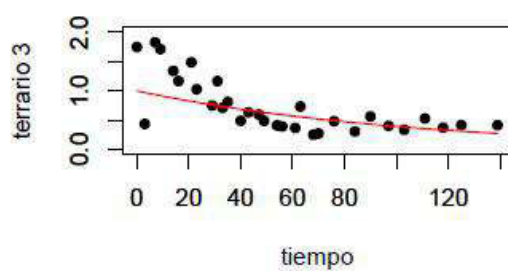
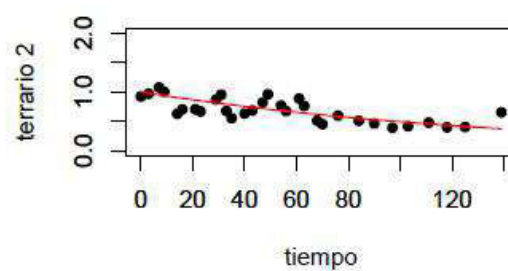
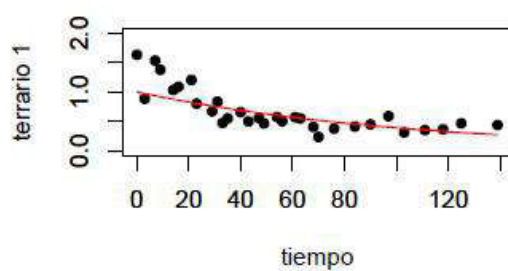
Donde se observa que todos los valores son mayores a 0.05, con lo que no se rechaza la hipótesis nula de normalidad cumpliéndose así este supuesto.

```
##
## 1 Terrario 1 Terrario 2 Terrario 3 Terrario 4
## 2      0.332      0.937      0.388      0.148
```

Donde se observa que todos los valores son mayores a 0.05, con lo que no se rechaza la hipótesis nula de normalidad cumpliéndose así este supuesto.

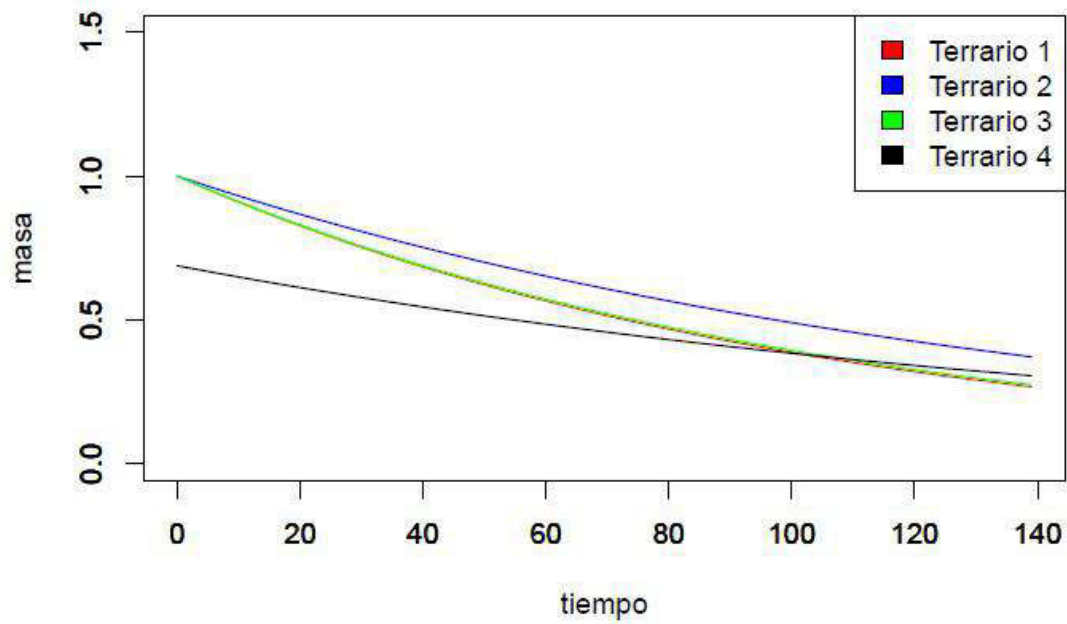
Visualización de resultados

Se puede dibujar el gráfico de la curva exponencial correspondiente en cada caso:



Asimismo, se puede observar las curvas exponenciales estimadas:

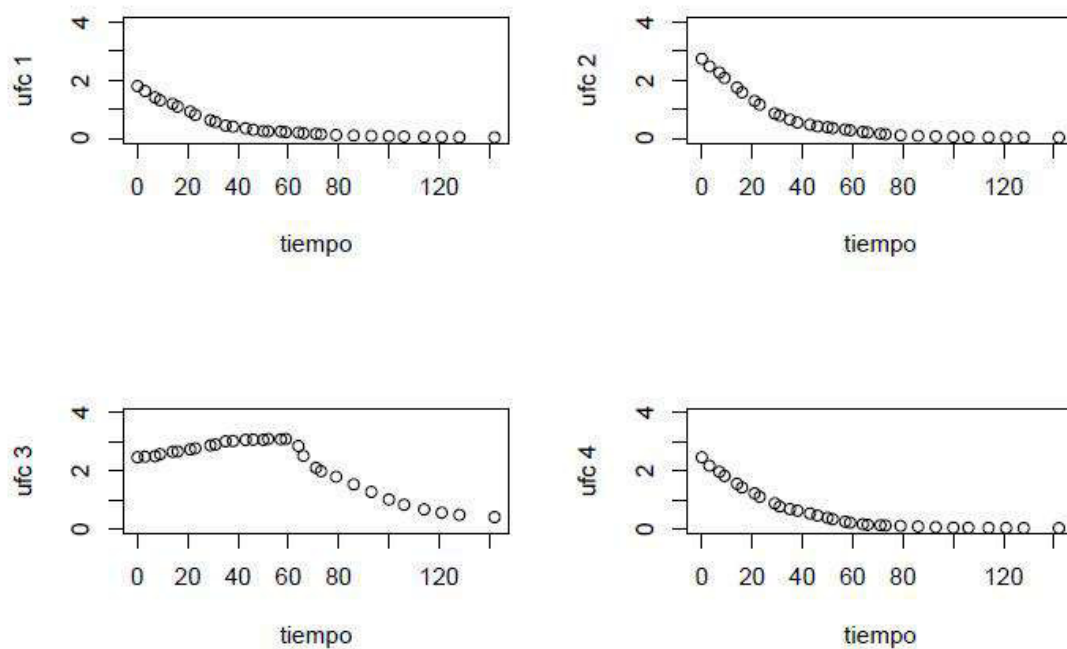
Aproximación exponencial



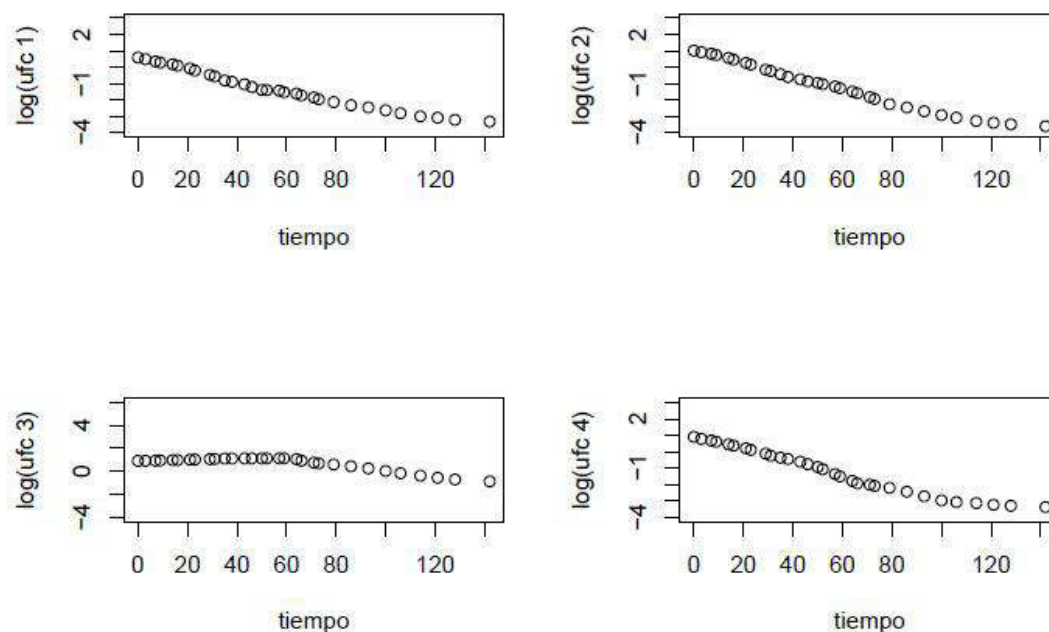
Tiempo vs. ufc

Análisis preliminar

Se dibujan unas gráficas de dispersión para evaluar relaciones preliminares.



Donde aparentan un comportamiento del tipo exponencial. Sacando logaritmo:



Donde no se observa un dato atípico en ufc.

Modelamiento

Para el modelamiento, no se consideran los datos atípicos. Se evalúan las correlaciones.

```
##          t          11          12          13          14
## t    1.0000000 -0.9889751 -0.9919796 -0.8530984 -0.9842182
## 11 -0.9889751  1.0000000  0.9976957  0.7773926  0.9935731
## 12 -0.9919796  0.9976957  1.0000000  0.8042289  0.9956872
## 13 -0.8530984  0.7773926  0.8042289  1.0000000  0.7781462
## 14 -0.9842182  0.9935731  0.9956872  0.7781462  1.0000000
```

Donde se observa que existe una marcada correlación lineal entre el tiempo y cada uno de los logaritmos de los valores medidos en cada ufc (valor absoluto mayor a 0.6). Se propone:

$$\log(ufc_i) = \beta_0 + \beta_1 \times t + \varepsilon$$

Donde $i = 1, 2, 3, 4$, y ufc_i indican la medida en el ufc_i , t es el tiempo, mientras que ε es el error aleatorio. Ejecutando las regresiones, se tiene:

Tabla resumen de la regresión ufc vs. tiempo.

	R ²	beta_0	beta_1	pv-beta_0	pv-beta_1	pv-global
Ufc 1	0.9762	0.3763	-0.0299	0	0	0
Ufc 2	0.9840	0.9064	-0.0366	0	0	0
Ufc 3	0.7212	1.4229	-0.0132	0	0	0
Ufc 4	0.9687	0.7889	-0.0351	0	0	0

Donde el valor de p valor 0 indica que este es muy pequeño, menor a 0.005; además el R² es elevado en todos los casos. Se observa que la regresión es significativa en todos los casos. Se analiza también si se verifica la normalidad a través de una prueba paramétrica (Shapiro-Wilks) y una prueba no paramétrica (Lilliefors) en los residuos a través de su p-valor:

```
##
## 1 Ufc 1 Ufc 2 Ufc 3 Ufc 4
## 2 0.018 0.004 0.052 0.006
```

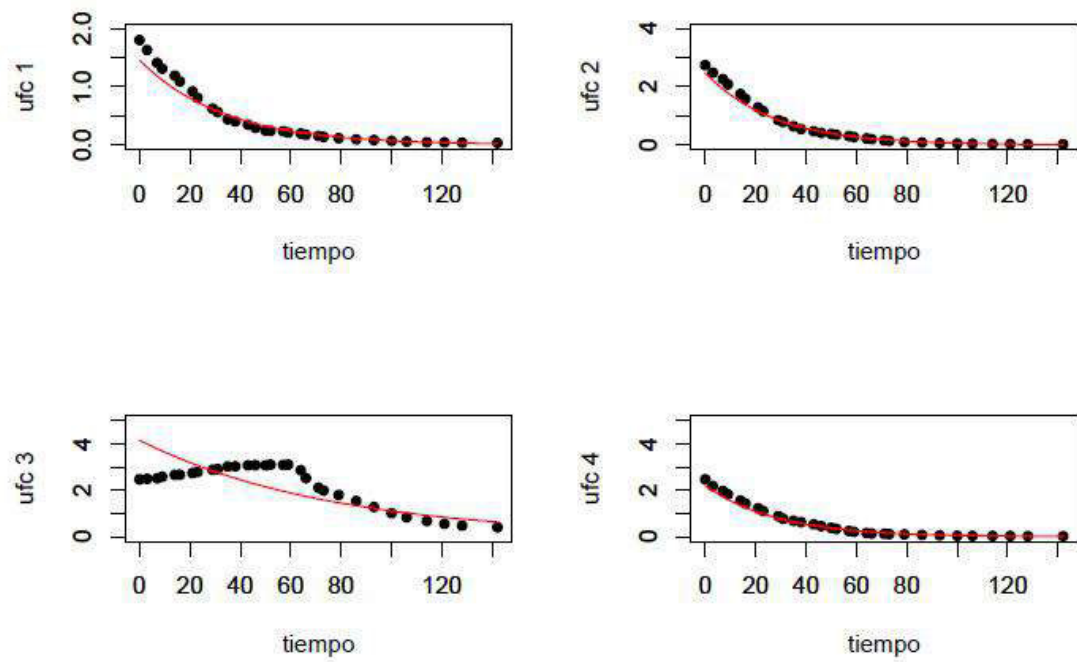
Donde se observa que todos los valores son menores o casi iguales a 0.05, con lo que se rechaza la hipótesis nula de normalidad no cumpliéndose así este supuesto.

```
##
## 1 Ufc 1 Ufc 2 Ufc 3 Ufc 4
## 2 0.104 0.076 0.306 0.023
```

Donde se observa que en un solo caso se rechaza la hipótesis de normalidad.

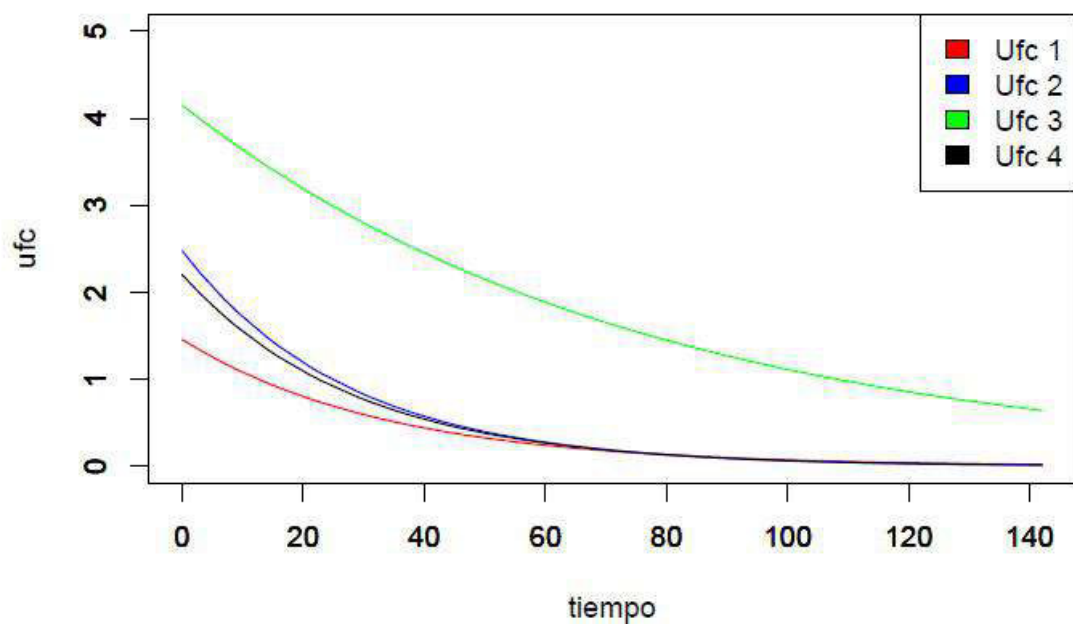
Visualización de resultados

Se puede realizar el gráfico de la curva exponencial correspondiente en cada caso.

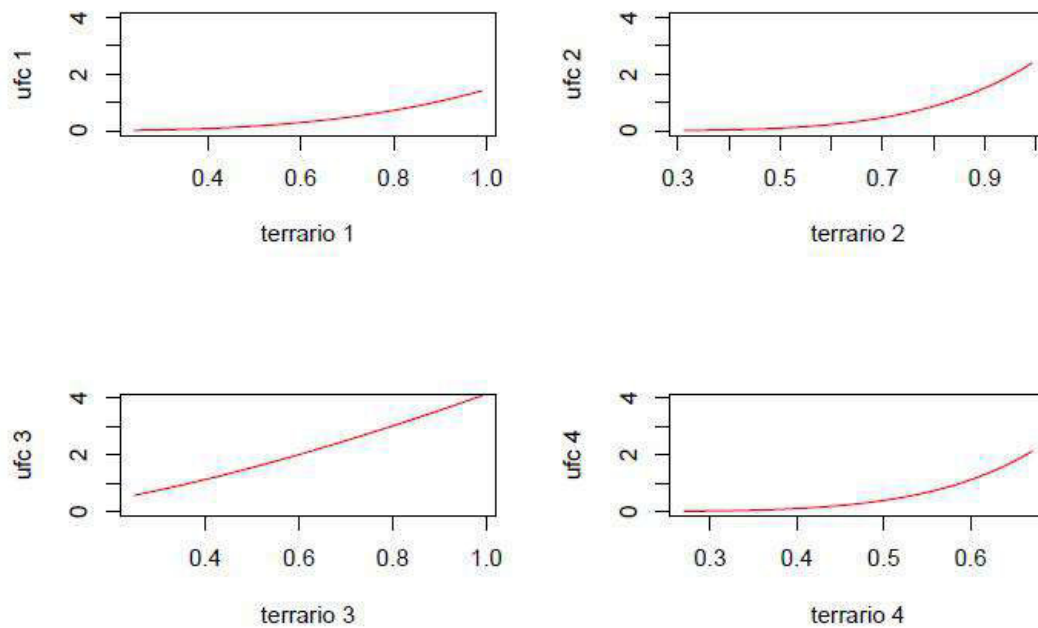


Asimismo, se puede observar las curvas exponenciales estimadas:

Aproximación exponencial



Se grafica la relación $ufci$ vs. terrario i usando sus aproximaciones, debido a que se cuenta con los datos para diferentes períodos de tiempo, lo que impide una regresión.

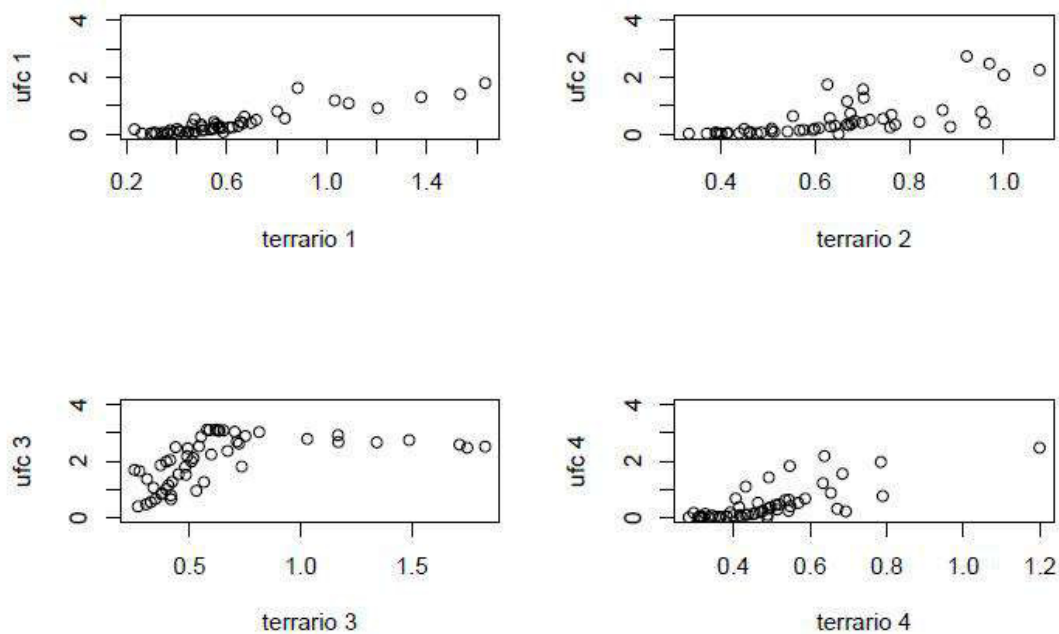


Ufc vs. terrario

Se puede plantear regresiones no tan precisas haciendo uso de las predicciones.

Análisis preliminar

Se evalúa en gráficos de dispersión terrario vs. ufc y se obtiene:



Modelamiento

En este, se aplica regresión lineal obviando los atípicos en 3 y 2, y se obtiene:

Tabla resumen de la regresión de ufc vs. tiempo.

	R ²	beta_0	beta_1	pv-beta_0	pv-beta_1	pv-global
Ufc 1	0.8288	-0.3983	1.2905	0.0000	0	0
Ufc 2	0.4854	-0.9691	2.2824	0.0001	0	0
Ufc 3	0.5437	0.0286	3.6965	0.9203	0	0
Ufc 4	0.5547	-0.8694	2.7881	0.0000	0	0

En este caso, todos los coeficientes son significativos menos el independiente del terrario 3. Ejecutando la regresión, se obtiene:

Tabla resumen de la regresión ufc vs. tiempo.

	R ²	beta_0	beta_1	pv-beta_0	pv-beta_1	pv-global
Ufc 1	0.8288	-0.3983	1.2905	0e+00	0	0
Ufc 2	0.4854	-0.9691	2.2824	1e-04	0	0
Ufc 3	0.9206	NA	3.7469	NA	0	0
Ufc 4	0.5547	-0.8694	2.7881	0e+00	0	0

En este caso, todos los coeficientes son significativos; sin embargo, ya que se usaron aproximaciones, es notable que tengan R² bajo algunos modelos: ello indica que es inadecuado considerarlos en este caso. Se analiza también si se verifica la normalidad a través de una prueba paramétrica (Shapiro-Wilks) y una prueba no paramétrica (Lilliefors) en los residuos de su p.valor:

```
## 1 Terrario 1 Terrario 2 Terrario 3 Terrario 4
## 2          0          0      0.193          0
```

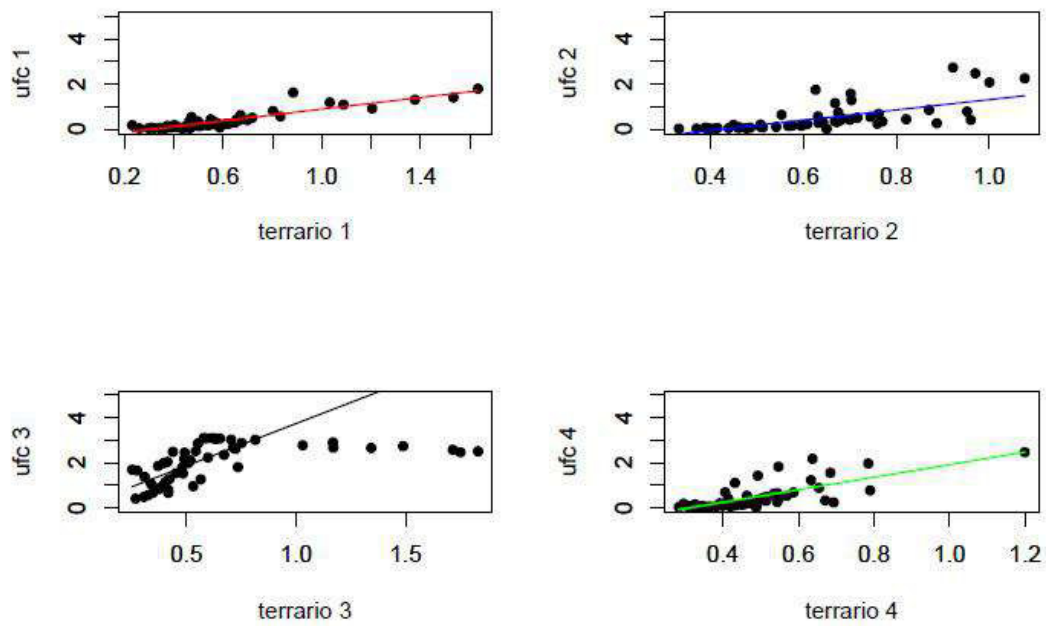
Donde se observa que todos los valores son menores a 0.05 (excepto en el terrario 3), con lo que se rechaza la hipótesis nula de normalidad incumpléndose así este supuesto en tres de los cuatro terrarios.

```
##
## 1 Terrario 1 Terrario 2 Terrario 3 Terrario 4
## 2      0.028          0      0.201          0
```

Donde se observa que solo en un caso no se rechaza la hipótesis de normalidad.

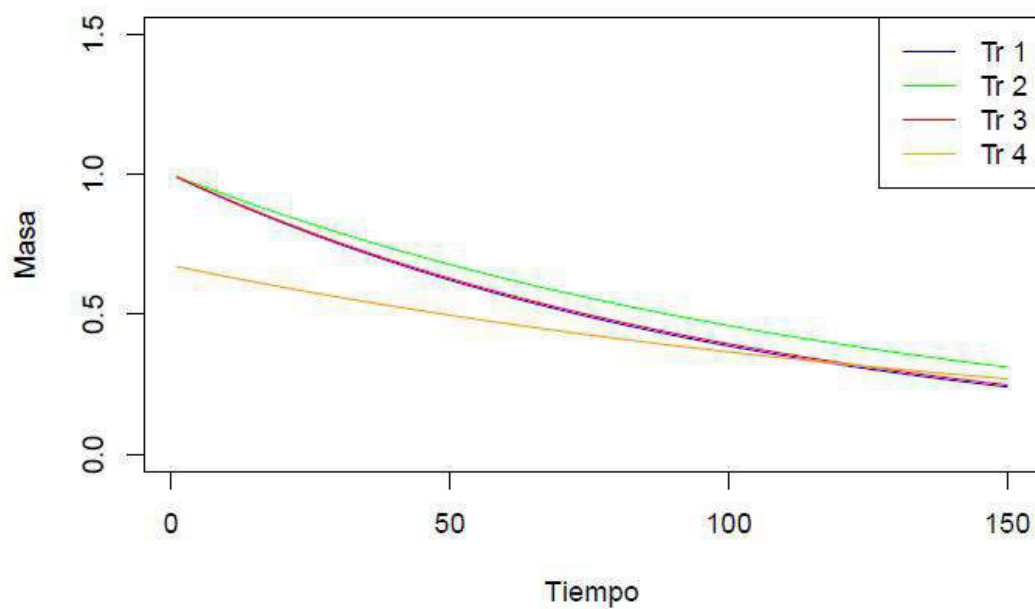
Visualización de resultados

Se observa ahora una aproximación lineal de cada caso.



Finalmente, se muestra un gráfico de curvas de nivel sobre el terrario vs. Tiempo.

Proyeccion curvas de nivel



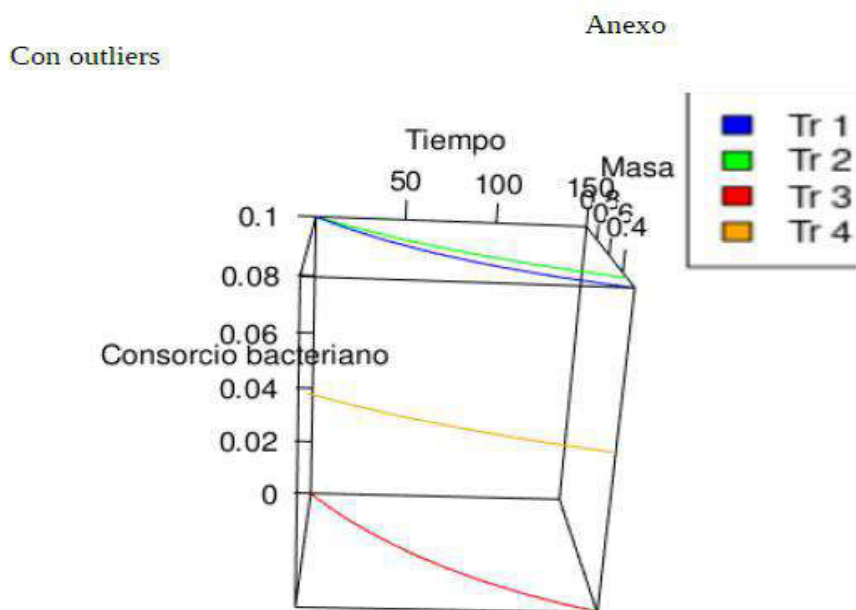


Figura 35. Correlación de las variables tiempo, masa y consorcio bacteriano con outliers.

En la figura 35, se muestra la correlación de las variables masa de HTP, consorcio bacteriano y tiempo para los 4 terrarios con outliers, en el cual el terrario 1 muestra mayor porcentaje de degradación de HTP.

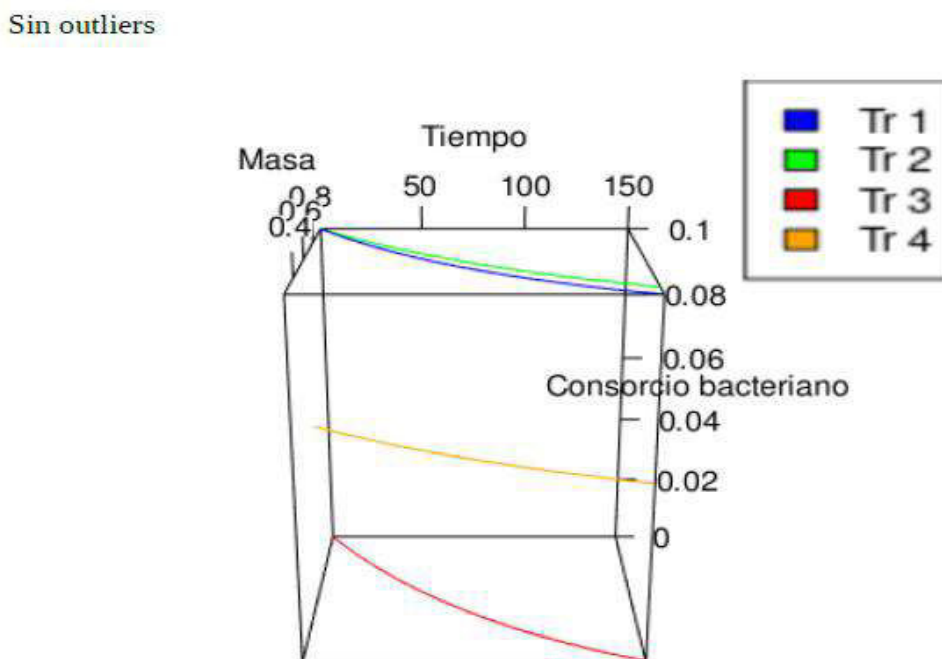


Figura 36. Correlación de las variables tiempo, masa y consorcio bacteriano sin outliers.

En la figura 36, se muestra la correlación de las variables masa de HTP, consorcio bacteriano y tiempo para los 4 terrarios sin outliers, en el cual el terrario 1 muestra mayor porcentaje de degradación de HTP.

CONCLUSIONES

- Se determinó el rendimiento de biorremediación del consorcio bacteriano *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Agrobacterium tumefaciens* en suelo contaminado con petróleo crudo: en el terrario 1, un porcentaje de biorremediación de petróleo de 73.40 %; en el terrario 2, de 29.50 %; en el terrario 3, de 44.49 %; y en el terrario 4, de 59.29 %, utilizando el método del Soxhlet (EPA 3540). En el terrario 1: HTP (63.76 %), en el terrario 2: HTP (56.71 %), en el terrario 3: HTP (31.78 %) y en el terrario 4: HTP (73.76 %), en el equipo cromatografía de gases (GC). El terrario 1 es el que tiene mayor porcentaje de biorremediación de petróleo contenido en el suelo arenoso.
- Se determinó que la influencia del comportamiento degradativo del consorcio bacteriano *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Agrobacterium tumefaciens* en la biorremediación del suelo arenoso contaminado con petróleo crudo es mayor en comparación con las otras cepas estudiadas del Consorcio Bacteriano liofilizado – Ultra Archaea. Ultratech International Inc.
- Se reportaron las características del consorcio bacteriano *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Agrobacterium tumefaciens* en la biorremediación del suelo arenoso contaminado con petróleo crudo.
- Se determinó que las condiciones de operación del consorcio bacteriano *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Agrobacterium tumefaciens* en la biorremediación de suelo arenoso contaminado con petróleo crudo comprendieron la máxima acumulación de CO₂: de 30 378 ppm en el terrario 1, a un pH de 6 y la temperatura de 22 °C.
- Se determinó que el porcentaje de biodegradación del suelo arenoso contaminado con petróleo crudo, utilizando el consorcio bacteriano *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Agrobacterium tumefaciens*, fue en el terrario 1 un porcentaje de biodegradación de petróleo de 73.40 %.

RECOMENDACIONES

Se recomienda:

- Implementar otras técnicas de detección de hidrocarburos para los suelos contaminados con petróleo crudo; asimismo, utilizar diferentes pruebas bioquímicas para la identificación de diferentes microorganismos presentes en estos suelos que degradan los hidrocarburos, así como equipos de mayor precisión y resolución.
- Realizar la investigación de biorremediación utilizando diferentes tipos de suelos contaminados con diversas características fisicoquímicas de petróleo crudo.
- Realizar las mediciones del rendimiento de biorremediación en un suelo contaminado *in situ* con petróleo crudo.
- Continuar realizando las pruebas experimentales, bajo otras condiciones de operación, así como utilizando otros consorcios bacterianos similares y materias primas para mejorar el proceso de biorremediación en suelos contaminados con petróleo crudo, además de ampliar el conocimiento teórico y práctico de la investigación.
- Utilizar equipos automatizados, que tengan mayor precisión y mediciones en línea para evitar márgenes de error en los resultados de cada uno de los parámetros de operación.
- Utilizar una mayor concentración del consorcio bacteriano *Bacillus subtilis*, *Bacillus smyloliquefaciens* y *Agrobacterium tumefaciens*, porque implicaría un mayor costo de operación y no hay un aumento significativo en la biodegradación de contaminantes en el suelo.
- Realizar los análisis fisicoquímicos en laboratorios certificados con métodos de análisis validados para la obtención de resultados más precisos y óptimos.

- Seguir investigando la biorremediación en suelos contaminados con petróleo, para mejorar el tiempo del proceso de descontaminación de los suelos o para implementar soluciones que puedan ser aplicadas por diversas empresas petroleras o petroquímicas con el fin de preservar el bienestar de la sociedad.
- Optimizar el proceso de biorremediación utilizado complementando el proceso biológico con otros procesos fisicoquímicos, con el fin de que se continúe realizando el aporte biotecnológico para el cuidado del medioambiente y de los diversos ecosistemas terrestres, acuáticos y aéreos.
- Realizar el proceso de biorremediación en suelos contaminados con petróleo crudo, superando las limitaciones técnicas y económicas utilizando sistemas de medición de alta tecnología y exactitud, adecuados para ser medidos en laboratorio y en campo para el monitoreo de los parámetros de operación de dicho proceso, por el bienestar y salud de los seres vivos del medio ambiente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afkar E., Hafez, A. M., Ibrahim, R. I. H., & Aldayel, M. (2022). Effective Removal of Alkanes and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria from Soil Chronically Exposed to Crude Petroleum Oil. *Research Square*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-207407/v1>
- Ahmed, P. M., De Figueroa, L. I. C., & Pajot, H. F. (2020). Application of microbial consortia in degradation and detoxification of industrial pollutants. En *Microorganisms for Sustainable Environment and Health*. Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, pp. 401–418.
- Aislabie, J., Saul, D., & Foght, J. (2006). Bioremediation of hydrocarbon contaminated polar soils. *Extremophiles*, 10(3), 171-179.
- Ambade, B., & Sethi, S. S. (2021). Health risk assessment and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon from the hydrosphere. *Journal of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste* 25(2), 5020008.
- Ambade, B., Kumar, A., & Sahu, L. K. (2021). Characterization and health risk assessment of particulate bound polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in indoor and outdoor atmosphere of Central East India. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 56269–56280.
- Atlas, R. M., & Unterman, R. (1999). *Bioremediation*. In: Demain AL & Davies JE (Eds) *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology* (2.^a ed.) Washintong D. C.: ASM Press.
- Barbieri, P., Bestetti, G., Galli, E., & Zannoni, D. (2012). *Microbiologia ambientale ed elementi di biologia microbica*. Ambrosiana, pp. 218–388.
- Benavides, J., Quintero, G., Guevara, A., Jaimes, D., Gutiérrez, S., & Miranda, J. (2006). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *NOVA*, 4(5), 82-90.
- Benguenab, A., & Chibani, A. (2021). Biodegradation of petroleum hydrocarbons by filamentous fungi (*Aspergillus ustus* and *Purpureocillium lilacinum*) isolated from used engine oil contaminated soil. *Acta Ecologica Sinica*, 41(5), 416–423. <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2020.10.008>
- Bento, F., Camargo, F., Okeke, B., & Frankenberger, W. (2005). Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation,

- biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology*, 96(9), 1049-1055.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.09.008>
- Bocángel, C. D. R. (2016). *Evaluación de la eficacia de un consorcio bacteriano aislado en la base peruana "Machu Picchu"-Antártida en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo, a nivel de terrarios* [Tesis de grado]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Bodor, A., Bounedjoum, N., Feigl, G., Duzs, A., Laczi, K., Szilágyi, A., Rakhely, G., & Perei, K. (2021). Exploitation of extracellular organic matter from *Micrococcus luteus* to enhance ex situ bioremediation of soils polluted with used lubricants. *Journal of Hazardous Materials*, 417.
- Bowman, J., McCammon, S., Brown, M., Nichols, D., & McMeekin, T. (1997). Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(8), 3068-3078.
- Braddock, J. F., Ruth, M. F., Caterrall, P. H., Walworth, J. L., & McCarthy, K. A. (1997). Enhancement and inhibition of microbial activity in hydrocarbon-contaminated arctic soils: implications for nutrient-amended bioremediation. *Environmental Science & Technology*, 31(7), 2078-2084.
- Bugallo, A. (2002). *From Late Francoist Regime to Spanish Transition: Woman, Sexuality and National Project through Filmic Comedies* [Doctoral dissertation]. University of Massachusetts Amherst.
- Briones, M., & Irigoien, N. (2015). *Zonificación mediante el sistema unificado de clasificación de suelos (SUCS) y la capacidad portante del suelo para viviendas unifamiliares en la expansión urbana del Anexo Lucmacucho Alto-Sector Lucmacucho, distrito de Cajamarca* [Tesis de grado]. Lima: Universidad Privada del Norte.
- Cabanillas, J., & Pissani, V. (2015). Efecto de la bioaumentación y bioestimulación en la eficiencia de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo [Tesis de licenciatura]. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Callicott, J. (1987). The conceptual foundations of the land ethic. En J. Callicott (Ed.), *Companion to A Sand County Almanac. Interpretative and Critical Essays*, pp. 186-217.
- Chaineau, C. H., Yepremian, C., Vidalie, J. F., & Ducreux, J. (2003). Bioremediation of a Crude Oil-Polluted Soil: Biodegradation, Leaching and Toxicity Assessments. *Water, Air, and Soil Pollution*, 144(1), 419-440.

- Chiesa, L. M., Zanardi, E., Nobile, M., Panseri, S., Ferretti, E., Ghidini, S., Foschini, S., Ianieri, A., & Arioli, F. (2019). Food risk characterization from exposure to persistent organic pollutants and metals contaminating eels from an Italian lake. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 36(5), 779–788.
- Chirinos, I., & Pereira, N. (1999). Parcelas de lodo: Una alternativa de uso y manejo de lodos petroquímicos provenientes de sistemas de tratamiento de efluentes. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia*, 16(1), 206-212.
- Coulon, F., & Delille, D. (2003). Effects of bioestimulation on growth of indigenous bacteria in sub-antarctic soil contaminated with oil hydrocarbons. *Oil & Gas Science and technology*, 58(4), 469-479.
- Coppotelli, G., Summers, A., Chidakel, A., Ross, J., & Celi, F. (2006). Functional characterization of the 258 A/G (D2-ORFa-Gly3Asp) human type-2 deiodinase polymorphism: a naturally occurring variant increases the enzymatic activity by removing a putative repressor site in the 5' UTR of the gene. *Thyroid*, 16(7), 625–632.
- Dasgupta, D., Ghosh, R., & Sengupta, T. (2013). Biofilm-Mediated Enhanced Crude Oil Degradation by Newly Isolated Pseudomonas Species. *International Scholarly Research Notices Biotecnología*. 2013:250749. <https://doi.org/10.5402/2013/250749>
- Das, K., & Mukherjee, A. K. (2007). Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of Bacillus subtilis and Pseudomonas aeruginosa strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource technology*, 98(7): 1339-1345. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.05.032>
- Dean, R. D. (2001). *Imperial Brotherhood: Gender and the Making of Cold War Foreign Policy*. Amherst: University of Massachusetts Press.
- Delgado, G. C. (2011). Petróleo, medio ambiente, cambio climático y seguridad: Macondo, otra advertencia más. *Nómadas. Revista Crítica de Ciencias Sociales y Jurídicas*, 30(2). https://doi.org/10.5209/rev_NOMA.2011.v30.n2.36554
- De Sousa, C. A., & Spiess, T. B., (2018). The management of brownfields in Ontario: a comprehensive review of remediation and reuse characteristics, trends, and outcomes, 2004–2015. *Environmental Practice*, 20(1), 4–15.
- Dibble, J., & Bartha, R. (1979). Effect of Environmental Parameters on the Biodegradation of Oil Sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 37(4), 729-739.
- Douglas, G., Prince, R., Butler, E., & y Steinhauer, W. (1994). The use of internal chemical indicators in petroleum and refined products to evaluate the extend of biodegradation.

- En R. Hinchee, B. Alleman & R. Miller (Eds.), *Hydrocarbon remediation*. Lewis Publ, pp. 219-236.
- Environmental Protection Agency - EPA. (1996a). Method 3540C: Soxhlet extraction.
- Environmental Protection Agency - EPA 3540C. (1996b). Soxhlet extraction organics. SW-846 Test methods for evaluating solid waste physical/chemical methods. (Revision 3).
- Ercoli, E., Galvez, J., Di Paola, M., Cantero, J., Medaura, M., & Bauza, J. (2001). Análisis y evaluación de parámetros críticos en biodegradación de hidrocarburos en suelo. Laboratorio de Bioprocesos, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza.
- Eze, M. O., & George, S. C. (2022). The potential of oxygenates to increase the risk of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons through groundwater contamination. *Water*, 14(5), 739. <https://doi.org/10.3390/w14050739>.
- Fári, M. G., & Kralovánszky, U. P. (2006). The Founding Father of Biotechnology: Károly (Karl) Ereky. *International Journal of Horticultural Science*, 12(1), 1-9. <https://core.ac.uk/download/160939234.pdf>
- Fonseca, A., & Vargas, F. (2006). *Evaluación de consorcios microbianos con capacidad degradadora de residuos de hidrocarburos y su aplicación en biorremediación de suelos contaminados con aceites lubricantes usados*. Bucaramanga: Universidad de Santander.
- Funtikova, T. V., Akhmetov, L. I., Puntus, I. F., Mikhailov, P. A., Appazov, N. O., Narmanova, R. A., & Solyanikova, I. P. (2023). Bioremediation of Oil-Contaminated Soil of the Republic of Kazakhstan Using a New Biopreparation. *Microorganisms*, 11(2), 522.
- Gaur, V. K., Gupta, S., & Pandey, A., (2021). Evolution in mitigation approaches for petroleum oil-polluted environment: recent advances and future directions. *Environmental Science and Pollution*, 29, Control Ser. 1–17.
- Gideon, O., & Paschal, O. (2008). A study of natural attenuation processes involved in a microcosm model of a crude oil-impacted wetland sediment in the Niger Delta. *Bioresource Technology*, 99(11), 4761–4767.
- Gidudu, B., & Chirwa, E. M. N. (2020). The combined application of a high voltage, low electrode spacing, and biosurfactants enhances the bio-electrokinetic remediation of petroleum contaminated soil. *Journal of Cleaner Production*, 276. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.122745>

- Gonzales, G., Ordoñez, C., & Vásquez, C. (2022). Derrame de petróleo en Ventanilla, Callao. *Revista de la Sociedad Peruana de Medicina Interna*, 35(1), 47-49. <https://doi.org/10.36393/spmi.v35i1.658>
- Gómez, S., Gutiérrez, D., Hernández, A., Hernández, C., Losada, M., & Mantilla, P. (2008). Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos. *Bacteriología y Laboratorio Clínico de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca*. Bogotá. Colombia.
- Guevara-Luna, J., Alvarez, P., Ríos, E., Acevedo, M., Encarnación, S., Moreno, M. E. Castellanos, M., Toribio, J., & Romero, Y. (2018). Biotransformation of benzo[a]pyrene by the thermophilic bacterium *Bacillus licheniformis* M2-7. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(7), 34-88.
- Hamdi, H., Benzarti, S., Manusadžianas, L., Aoyama, I., & Jedidi, N. (2007). Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions. *Soil Biology & Biochemistry* 39(8), 1926–1935.
- Hamme, J., Sing, A., & Ward, O. (2003). Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67, 503-549.
- Holliger, C., & Zehnder, A. (1996). Anaerobic biodegradation of hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnol*, 7(3), 326-330.
- Holt, J., Krieg, N., Snetl, P., & Stanley, J. (1999). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. USA: Williams & Wilkins.
- Hosokawa, R., Nagai, M., Morikawa, M., & Okuyama, H. (2009). Autochthonous bioaugmentation and its possible application to oil spills. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 1519–1528.
- Iturbe, R., Flores, C., Chávez, C., & Roldán, A. (2002). Saneamiento de suelos contaminados con hidrocarburos mediante biopilas. *Ingeniería, Investigación y Tecnología*, III(1), 25-35.
- Jiao, S., Liu, Z., Lin, Y., Yang, J., Chen, W., & Wei, G. (2016). Bacterial communities in oil contaminated soils: biogeography and co-occurrence patterns. *Soil Biol. Biochem*, 98, 64–73.
- Jiji, J., & Prabakaran, P. (2020). Isolation and identification of microorganisms from total petroleum hydrocarbon-contaminated soil sites. *Malaysian Journal of Soil Science*, 24, 107–119.

- Kim, Y., Oh, J. I., Lee, S. S., Lee, K. H., Lee, J., & Kwon, E. E. (2019). Decontamination of petroleum-contaminated soil via pyrolysis under carbon dioxide atmosphere. *Journal of Cleaner Production*, 236. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.117724>
- Lázaro-Mass, S., Gómez-Cornelio, S., Castillo-Vidal, M., Alvarez-Villagomez, C. S., Quintana, P., & De la Rosa-García, S. (2023). Biodegradation of hydrocarbons from contaminated soils by microbial consortia: A laboratory microcosm study. *Electronic Journal of Biotechnology*, 61, 24-32.
- Leahy, J. & Colwell, R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environmental. *Microbial Reviews*, 54(3): 3.5-315.
- Levin. M., & Gealt, M. (1997). *Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos* (3.^a ed.). Editorial Mc Graw Hill. Madrid – España, pp 643-651.
- Li, L., Zhang, Z., Wang, Y., & Xu, J. (2022). Efficient removal of heavily oil-contaminated soil using a combination of fenton pre-oxidation with biostimulated iron and bioremediation. *Journal of Environmental management*, 308, 114590.
- Liu, X., He, L., Zhang, X., Kong, D., Chen, Z., Lin, J., & Wang, C. (2022). Bioremediation of petroleum-contaminated saline soil by *Acinetobacter baumannii* and *Talaromyces sp.* And functional potential analysis using metagenomic sequencing. *Environmental Pollution*, 311, 119970.
- Lozada, J. (2016). Investigación aplicada: definición, propiedad intelectual e industria. *Cienciaamérica*, 1(3), 34-39. <http://www.uti.edu.ec/documents/investigacion/volumen3/06Lozada-014.pdf>.
- Lugo, G., & Mesa, Y. (2001). *Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos utilizando lodos residuales domésticos tratados* [Trabajo especial de grado]. Venezuela: LUZ.
- Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (2003). *Brock. Biología de los microorganismos* (10.^a ed.). España: Pearson.
- McKibben, B. (2017). *The Resistance to Climate Change*. The New York Review of Books.
- Madueño, L., Coppotelli, B., Alvarez, H., & Morelli, I. (2011). Isolation and characterization of indigenous soil bacteria for bioaugmentation of PAH contaminated soil of semiarid Patagonia, Argentina. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(2), 345-351.
- Maqsood, Q., Sumrin, A., Waseem, R., Hussain, M., Imtiaz, M., & Hussain, N. (2023). Bioengineered Microbial Strains for Detoxification of Toxic Environmental Pollutants. *Environmental Research*, 227, 115665.

- Marchand, C., St-Arnaud, M., Hogland, W., Bell, T. H., & Hijri, M. (2017). Petroleum biodegradation capacity of bacteria and fungi isolated from petroleum-contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 116, 48–57.
- Marguesin, R., & Schinner, F. (1997). Bioremediation of Diesel oil contaminated alpine soils at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 47, 462-468.
- Maroto Arroyo, M., & Rogel Quesada, J. M. (2001). Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos. *División de Protección Ambiental de Suelos*, 297-305.
- Mohn, W., Radziminski, C., Fortin, M C., & Reimer, K. (2001). On site bioremediation of hydrocarbon-contaminated Arctic tundra soils in inoculated biopiles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, 242-247.
- Molina, M., Gonzáles, N., Bautista, L., Sanz, R., Simarro, R., Sánchez, I., & Sanz, L. (2009). Isolation and genetic identification of PAH degrading bacteria from a microbial consortium. *Biodegradation*, 20, 789-800.
- Mrozik, A., & Piotrowska-Segetb, Z. (2010). Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiological Research*, 165(5), 363- 375.
- Nedoroda, V., Trokhymenko, G., Khrapko, T., & Koliehova, A. (2021). Analysis of Petroleum Biodegradation by a Bacterial Consortium of *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *Plantarum* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Ecological Engineering*, 22(11).
- Nikolopoulou, M., & Kalogerakis, N. (2008). Enhanced bioremediation of crude oil utilizing lipophilic fertilizers combined with biosurfactants and molasses. *Marine Pollution Bulletin*, 56(11), 1855–1861.
- Nwankwegu, A. S., Zhang, L., Xie, D., Onwosi, C. O., Muhammad, W. I., Odoh, C. K., Sam, K., & Idenyi, J. N. (2022). Bioaugmentation as a green technology for hydrocarbon pollution remediation. Problems and prospects. *Journal of Environmental Management*, 304.
- Okere, U. V., & Semple, K. T. (2011). Biodegradation of PAHs in ‘Pristine’ Soils from Different Climatic Regions. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, S1, 1–11.
- Pardo, J., Perdomo, M., & Benavides, J. (2004). Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo. *Nova*, 2(002), pp. 40-49.
- Parra, F., Manrique, H., & Martínez, V. (2019). *Derrames de petróleo y afectación a la salud materno infantil en pueblos indígenas de la Amazonía Peruana: Un Análisis*

- exploratorio desde los determinantes de la salud*. Consorcio de Investigación Económica y Social – CIES.
- Passmore, J. (1974). *Man's Responsibility for Nature: Ecological Problems and Western Tradition*. New York, Charles Scribner's Sons.
- Patiño, O.; Robles, H., & León, L. (2021). Biodegradación de petróleo por *Bacillus thuringiensis* como alternativa para la recuperación de suelos agrícolas. *Arnaldoa* 28(2), 339-348. <http://doi.org/10.22497/arnaldoa.282.28205>
- Patowary, K., Patowary, R., Kalita, M. C., & Deka, S. (2016). Development of an Efficient Bacterial Consortium for the Potential Remediation of Hydrocarbons from Contaminated Sites. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1092. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01092>. PMID: 27471499; PMCID: PMC4943938.
- Patowary, K., Patowary, R., Kalita, M. C., & Deka, S. (2017). Characterization of biosurfactant produced during degradation of hydrocarbons using crude oil as sole source of carbon. *Frontiers in Microbiology*, 8, 279. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00279>
- Peñas, E. (2017). Thoreau, el ecologista indómito. *Ethic*. <https://ethic.es/2017/06/thoreau-el-ecologista-indomito>.
- Pinto, D., & Sánchez, V. (2018). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos mediante la utilización de diferentes cepas bacterianas a escala de laboratorio. [Propuesta de trabajo de grado para optar título] Repositorio Universidad Libre de Colombia. [https://repository.unilibre.edu.co/bitstream/handle/10901/15451/Proyecto de investigación Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos mediante la ut.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repository.unilibre.edu.co/bitstream/handle/10901/15451/Proyecto%20de%20investigaci%C3%B3n%20Biorremediaci%C3%B3n%20de%20suelos%20contaminados%20por%20hidrocarburos%20mediante%20la%20utilizaci%C3%B3n%20de%20diferentes%20cepas%20bacterianas%20a%20escala%20de%20laboratorio.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Plumwood, V. (2017). *Environmental culture: The ecological crisis of reason*. Routledge.
- Premnath, N., Mohanrasu, K., Guru Raj Rao, R., Dinesh, G. H., Siva Prakash, G., Ananthi, V., Ponnuchamy, K., Muthusamy, G., & Arun, A. (2021). A crucial review on polycyclic aromatic Hydrocarbons-Environmental occurrence and strategies for microbial degradation. *Chemosphere*, 280, 130608.
- Pretell, J. (2021). *Evaluación de las propiedades para biorremediación de las bacterias psicotolerantes aisladas en la base peruana "Machu Picchu"-Antártida* [Tesis de maestría]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Primack, R., Rozzi, R., Massardo, F., & Feinsinger, P. (2001). VI. Destrucción y degradación del hábitat. En *Fundamentos de Conservación Biológica Perspectivas Latinoamericanas*. México DF: Fondo de Cultura Económica, pp. 183-221.

- Quevedo, N. (2022). *Impactos socioeconómicos inmediatos percibidos por el derrame de petróleo en la comunidad pesquera de Ventanilla* [Tesis para optar el título profesional en Ingeniería Ambiental. Universidad César Vallejo]. Scribd. <https://es.scribd.com/document/683750140/Quevedo-UNC-SD>
- Rahman, K., Banat, I., Thahira, J., Thayumanavan, T., & Lakshmanaperumalsamy, P. (2001). Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. *Bioresource Technology*, 81(1), 25-32. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00105-5](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00105-5)
- Renneberg, R. (2019). *Biotecnología para principiantes* (pp. 2-9). Reverté.
- Ríos, R. (2005). *Estudio de la estimulación biológica para el tratamiento de residuos de perforación petrolera empleando lisímetros* [Tesis de maestría]. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa.
- Romaniuk, R., Giuffré, L., & Costantini, A. (2012). Suelos contaminados con hidrocarburos: un caso de estudio. Instituto de Suelos, INTA Castelar.
- Schramm, F. R., & Kottow Lang, M. (2001). Bioética y biotecnología: lo humano entre dos paradigmas. *Acta bioethica*, 7(2), 259-267. <https://dx.doi.org/10.4067/S1726-569X2001000200007>
- Simarro, R. (2012). *Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos aromáticos policíclicos* [Tesis doctoral]. Universidad Rey Juan Carlos, España.
- Silverio, S., & Sordo, R. (1989). *Introducción a la microbiología del suelo*. Editorial Puebla y edición. Playa, Ciudad de la Habana, pp. 307-323.
- Tian, X., Wang, X., Peng, S., Wang, Z., Zhou, R., & Tian, H. (2018). Isolation, screening, and crude oil degradation characteristics of hydrocarbons-degrading bacteria for treatment of oily wastewater. *Water Science & Technology*, 78(12), 2626–2638.
- Torres, G. (2015). Educación ambiental para el desarrollo compatible. Guerra ambiental y transición civilizatoria. *Pacarina del Sur*, año 6, 24.
- Torres, K., & Zuluaga, T. (2009). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos. [Proyecto de grado]. Universidad Nacional de Colombia. Medellín.
- Towsend, R., Bonner, J., & Autenrieth, R. (2000). Microbial dynamics during bioremediation of a crude oil-contaminated coastal wetland. *Bioremediation Journal*, 4(3), 203-218.
- Vargas, P., Cuéllar, R., & Dussán, J. (2004). *Biorremediación de residuos del petróleo. Ecopetrol*. Hipótesis. Apuntes Científicos Uniandinos n.º 4. Colombia.

- Ventorino, V., Pascale, A., Fagnano, M., Adamo, P., Faraco, V., Rocco, C., Fiorentino, N., & Pepe, O. (2019). Soil tillage and compost amendment promote bioremediation and biofertility of polluted area. *Journal of Cleaner Production*, 239. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.118087>
- Viñas, M. (2005). *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos, caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica* [Tesis de doctorado]. Universidad de Barcelona.
- Volke, T., & Velasco, J. (2002). *Tecnologías de remediación para suelos contaminados*. Instituto Nacional de Ecología. INE-SEMARNAT. México. D. F.
- Weisman, W. (1998). *Analysis of petroleum hydrocarbons in environmental media* (V.1). Total petroleum hydrocarbon criteria working group series. Amherst, Massachusetts.
- Yang, S., Zhang, J., Liu, Y., & Feng, W. (2023). Biodegradation of hydrocarbons by *Purpureocillium lilacinum* and *Penicillium chrysogenum* from heavy oil sludge and their potential for bioremediation of contaminated soils. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 178, 105566.
- Yuniati, M. D. (2018, febrero). Bioremediation of petroleum-contaminated soil: A Review. En *IOP conference series: earth and environmental science*, 118, p. 012063. IOP Publishing.
- Zhu, X., Venosa, A., Suidan, M., & Lee, K. (2001). *Guidelines for the bioremediation of marine shorelines and freshwater Wetland*. University of Cincinnati, Department of Civil And Environmental Engineering. US Environmental Protection Agency. pp 51-53, 3-7.

ANEXOS

Anexo 1. Matriz de Consistencia y Matriz de Operacionalización

Problema	Objetivos	Hipótesis	Variables	Indicadores	Instrumentos de recolección de datos
Problema Principal ¿Cuál es la eficiencia de biorremediación del consorcio bacteriano (<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> y <i>Agrobacterium tumefaciens</i>) en suelo arenoso contaminado con petróleo crudo?	Objetivo Principal . Determinar la eficiencia de biorremediación del consorcio bacteriano (<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> y <i>Agrobacterium tumefaciens</i>) en suelo arenoso contaminado con petróleo crudo.	Hipótesis Principal . La eficiencia de biorremediación del consorcio bacteriano (<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> y <i>Agrobacterium tumefaciens</i>), logrará un rendimiento biodegradación de 60% en suelo contaminado con petróleo crudo.	Variable Dependiente . Biorremediación en suelos arenosos contaminados con petróleo crudo	. Rendimiento de biodegradación de petróleo crudo (% Hidrocarburos totales de petróleo). . Concentración de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) (g/L).	. Soxleth . Cromatógrafo de Gases (GC)
Problemas Secundarios 1. ¿En qué medida influye el comportamiento degradativo del consorcio bacteriano (<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> y <i>Agrobacterium tumefaciens</i>) para la biorremediación en suelo arenoso contaminado con petróleo crudo?	. Determinar la influencia del comportamiento degradativo del consorcio bacteriano (<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> y <i>Agrobacterium tumefaciens</i>) para la biorremediación en suelo arenoso contaminado con petróleo crudo.	Hipótesis secundaria . La influencia del comportamiento degradativo del consorcio bacteriano (<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> y <i>Agrobacterium tumefaciens</i>) permitirá una adecuada eficiencia para la biorremediación en suelo arenoso contaminado con petróleo crudo.	Variable Independiente . Biorremediación del consorcio bacteriano (<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> y <i>Agrobacterium tumefaciens</i>).	. Conteo de UFC/kg de suelo contaminado	. Conteo de microorganismos.
2. ¿Cómo determinar las características	. Determinar las características del consorcio bacteriano	. Las características del consorcio bacteriano (<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus</i>	Variable Independiente	. Conteo de UFC/kg de suelo contaminado	

del consorcio bacteriano (<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> y <i>Agrobacterium tumefaciens</i>) para la biorremediación en suelo arenoso contaminado con petróleo crudo?	(<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> y <i>Agrobacterium tumefaciens</i>) para la biorremediación en suelo arenoso contaminado con petróleo crudo.	<i>amyloliquefaciens</i> y <i>Agrobacterium tumefaciens</i>), permitirá una adecuada eficiencia para la biorremediación en suelo arenoso contaminado con petróleo crudo.	. Características físicoquímicas del suelo contaminado.	. Dosis del consorcio de bacterias (%). . Concentración de CO ₂ del medio (ppm)	. Conteo de microorganismos. . Medidor de CO ₂ .
3. Cuáles son las condiciones de operación del consorcio bacteriano (<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> y <i>Agrobacterium tumefaciens</i>) para la biorremediación en suelo arenoso contaminado con petróleo crudo?	. Determinar las condiciones de operación del consorcio bacteriano (<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> y <i>Agrobacterium tumefaciens</i>) para la biorremediación en suelo arenoso contaminado con petróleo crudo.	. Las condiciones de operación del consorcio bacteriano (<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> y <i>Agrobacterium tumefaciens</i>), permitirá una adecuada eficiencia para la biorremediación en suelo arenoso contaminado con petróleo crudo.	Variable Independiente . Condiciones de operación de (<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> y <i>Agrobacterium tumefaciens</i>)	. Temperatura del proceso de biodegradación. . pH	. Termómetro . Medidor de pH
4. Cuál es el porcentaje de biodegradación del consorcio bacteriano (<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> y <i>Agrobacterium tumefaciens</i>) en suelo arenoso contaminado con petróleo crudo?	. Determinar el porcentaje de biodegradación del consorcio bacteriano (<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> y <i>Agrobacterium tumefaciens</i>) en suelo arenoso contaminado con petróleo crudo.	. El porcentaje de biodegradación del consorcio bacteriano (<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> y <i>Agrobacterium tumefaciens</i>), permitirá una adecuada eficiencia para la biorremediación en suelo arenoso contaminado con petróleo crudo.	Variable Independiente . Porcentaje de biodegradación del consorcio bacteriano (<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> y <i>Agrobacterium tumefaciens</i>) en suelo con petróleo crudo	. Rendimiento de biodegradación en petróleo crudo (% Hidrocarburos totales de petróleo). . Concentración de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) (g/L).	. Soxleth . Cromatógrafo de Gases (GC)

Matriz de Operacionalización de Variables

Variables	Definición Conceptual	Definición Operacional	Dimensiones	Indicadores	Unidades Escala
Consorcio bacteriano <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> y <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Asociación de dos o más procariotas o bacterias viviendo en simbiosis íntima (Madigan et al., 2003).	Es un conjunto de dos o más microorganismos de diferentes características que en pueden coexistir para degradar hidrocarburos.	Comportamiento degradativo.	Degradación de <i>Bacillus subtilis</i>	Valroativo (+/-)
				Degradación de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	
				Degradación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	
			Características	Conteo del consorcio bacteriano	UFC/mL
				Forma	Nominal
				Aspecto	Nominal
				Propiedades	
			Condiciones de operación	pH	0-14
				T	0°C – 25°C
				CO ₂	500-27000 ppm
Biorremediación del	Es un proceso que consiste en promover la conversión de compuestos contaminantes en energía, masa celular y en productos	Es un proceso que utiliza microorganismos eficientes para realizar la	Eficiencia de biodegradación	Porcentaje de concentración de degradación	%

consorcio bacteriano <i>(Bacillus subtilis,</i> <i>Bacillus</i> <i>amyloliquefaciens y</i> <i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens)</i> en suelo arenoso contaminado con petróleo crudo.	biológicos inofensivos e inocuos (Rahman et al., 2001).	degradación de cadenas hidrocarbonadas.	Propiedades del suelo	Físicas Químicas	
--	--	--	-----------------------	---------------------	--

Anexo 2. Ficha 1: Registro de Datos de Análisis de Suelo Arenoso.



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



ANALISIS DE SUELOS : SALINIDAD

Procedencia

Departamento : LIMA
Distrito : VENTANILLA
Referencia : H.R. 80710-160S-23

Solicitante: UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERIA

Provincia: CALLAO
Predio : PLAYA

Número de Muestra		C.E.	Análisis Mecánico					pH	CaCO ₃	M.O.	P	K	Cationes Cambiables						Suma	Suma	%
Lab.	Campo	dS/m	Arena	Limo	Arcilla	Textura	Ca ²⁺						Mg ²⁺	K ⁺	Na ⁺	Al ³⁺ + H ⁺	de	de	Sat. De		
10434		11.92	99	1	0	A.	7.33	0.09	0.14	8.2	176	2.56	0.97	0.84	0.45	0.30	0.00	2.56	2.56	100	

A = Arena ; A.F. = Arena Franco ; 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

Lab.	No. Muest.	Saturación %	pH	C.E.	Cationes Solubles (meq/L)					Aniones Solubles (meq/L)					Boro Soluble ppm	Yodo Soluble %	PSI
					Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	Na ⁺	SUMA	NO ₃ ⁻	CO ₃ ²⁻	HCO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	Cl ⁻			
10434	30	7.01	33.58	24.50	48.67	5.54	265.22	341.92	0.18	0.00	4.12	1.90	350.00	366.20	2.91	0.00	11.88

La Molina, 25 de Setiembre del 2023



Constantino Calderón Mendoza
Jefe de Laboratorio



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



INFORME DE ANALISIS ESPECIAL EN SUELO

SOLICITANTE : UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERIA

PROCEDENCIA : LIMA/ CALLAO/ VENTANILLA/ PLAYA

REFERENCIA : H.R. 80710

FECHA : 25/09/2023

Lab.	Número Muestra	Claves	Cu*	Mn*	Fe*	Zn*	B*
			disp. ppm	disp. ppm	disp. ppm	disp. ppm	disp. ppm
10434			0.23	0.36	6.56	0.45	2.19

Lab.	Número Muestra	Claves	Cu**	Mn**	Fe**	Zn**	B**
			total ppm	total ppm	total ppm	total ppm	total ppm
10434			8.39	187.87	12581.97	33.93	14.92

Lab.	Número Muestra	Claves	Pb	Cr	Cd	Pb	Cr	Cd
			total ppm	total ppm	total ppm	sol. agua ppm	sol. agua ppm	sol. agua ppm
10434			9.03	7.08	0.30	0.07	0.03	0.01

Lab.	Número Muestra	Claves	D.A.	D.R.	H.G.	Sólidos	RAS	Porosidad
			g/cc	g/cc	%	sol. totales ppm	%	%
10434			1.35	2.57	0.01	21491.20	44.46	47.49

* Micronutrientes disponibles: Solución extractante Agro Service Internacional (ASI) o Húnder para suelo.
** Micronutrientes y metales pesados totales: Solución extractante HClO₄-HNO₃ (1:5) para suelo.



Dr. Constantino Calderón Mendoza
Jefe del Laboratorio

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. Calcareo total (CaCO_3): método gaso-volumétrico utilizando un calcímetro.
5. Materia orgánica: método de Walkley y Black, oxidación del carbono orgánico con dicromato de potasio. %M.O. $n\% \text{Cx} 1.724$.
6. Nitrógeno total: método del micro-Kjeldahl.
7. Fósforo disponible: método del Olsen modificado, extracción con NaHCO_3 0.05M, pH 8.5.
8. Potasio disponible: extracción con acetato de amonio ($\text{CH}_3\text{-COONH}_4$)N, pH 7.0.
9. Capacidad de intercambio catiónico (CIC): saturación con acetato de amonio ($\text{CH}_3\text{-COOCH}_4$)N; pH 7.0.
10. Ca^{+2} , Mg^{+2} , Na^+ , K^+ cambiables: reemplazamiento con acetato de amonio ($\text{CH}_3\text{-COONH}_4$)N; pH 7.0 cuantificación por fotometría de llama y/o absorción atómica.
11. $\text{Al}^{+3} + \text{H}^+$: método de Yuan. Extracción con KCl. N
12. Iones solubles:
 - a) Ca^{+2} , Mg^{+2} , K^+ , Na^+ solubles: fotometría de llama y/o absorción atómica.
 - b) Cl^- , CO_3^{2-} , HCO_3^- , NO_3^- solubles: volumetría y colorimetría, SO_4 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/100g = 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 Interpretación**Salinidad**

Clasificación del Suelo	CE(es)
* muy ligeramente salino	<2
* ligeramente salino	2-4
* moderadamente salino	4-8
* fuertemente salino	>8

Reacción o pH

Clasificación del Suelo	pH
*fuertemente ácido	<5.5
*moderadamente ácido	5.6-6.0
*ligeramente ácido	6.1-6.5
*neutro	6.6-7.0
*ligeramente alcalino	7.1-7.8
*moderadamente alcalino	7.9-8.4
*fuertemente alcalino	>8.5

	Materia orgánica	Fósforo disponible	Potasio disponible
Clasificación	%	ppm P	ppm K
*bajo	<2.0	<7.0	<100
*medio	2-4	7.0-14.0	100-240
*alto	>4.0	>14.0	>240

Relaciones Catiónicas

Clasificación	K/Mg	Ca/Mg
*Normal	0.2-0.3	5-9
*defc. Mg	>0.5	
*defc. K	>0.2	
*defc. Mg		>10

Clases Texturales

A = arena	Fr.Ar.A. = franco arcillo arenoso
A. Fr = arena franca	Fr.Ar. = franco arcilloso
Fr. A = franco arenoso	Fr.Ar.L. = franco arcilloso limoso
Fr. = franco	Ar.A. = arcilloso arenoso
Fr. L. = franco limoso	Ar.l: = arcilloso limoso
L = limoso	Ar. = arcilloso

Distribución de

Cationes %

$\text{Ca}^{+2} = 60-75$
$\text{Mg}^{+2} = 15-20$
$\text{K}^{+} = 3-7$
$\text{Na}^{+} = <15$

Anexo 3. Ficha 2: Registro de Datos de Análisis de Petróleo Crudo.

Refinería La Pampilla S.A.A.

CRUDO BUZIOS - BRASIL



PROPIEDADES PRINCIPALES

Propiedad	Unidad	Valor	Norma
Densidad a 15°C	g/ml	0,8835	ASTM D-1298
P. Específico 15,6/15,6 °C	g/ml	0,8840	CALCULADO
Densidad API	°API	28,57	CALCULADO
Ázufre	%p/p	0,273	ASTM D-4294
Nº de Neutralización	mg KOH/g	0,19	ASTM D-961
Presión de Vapor REID	kPa	21,3	ASTM D-6377
Punto de Vertido	°C	-18	ASTM D-67
Viscosidad 20°C	cSt	64,21	ASTM D-445
Viscosidad 40°C	cSt	17,57	ASTM D-445
Sulfídrico disuelto	ppm w/v	2	ARAMCO H-3
Sulfídrico evol. a 340°C	ppm p/p	9	REPSOL
Residuo de Carbón	%p/p	4,51	ASTM D-4520
Asfaltenos	%p/p	1,70	CALCULADO
Nitrógeno	ppm p/p	2861	ASTM D-4626
Cadmio	ppb	1	-
Cromo	ppm p/p	0,8	Abc. Atómica
Cobalto	ppm p/p	0,7	Abc. Atómica
Fósforo	ppm p/p	<5	Abc. Atómica
Hierro	ppm p/p	1,2	Abc. Atómica
Níquel	ppm p/p	6,9	Abc. Atómica
Plomo	ppm	1	-
Silicio	ppm p/p	<10	Abc. Atómica
Sodio	ppm p/p	3,5	Abc. Atómica
Vanadio	ppm p/p	9,6	Abc. Atómica
Oloro total	ppm	98,3	ASTM D-7536
Oloro base inorgánica	ppm	67,0	ASTM D-7536
Oloro base orgánica	ppm	11,3	ASTM D-7536
Agua por Destilación	%wt	1,51	ASTM D-4006
Aromaticidad disponible 40°C	-	0,56	REPSOL
Aromaticidad requerida 40°C	-	0,0010	REPSOL
Valor P 40°C	°C	>3,9	REPSOL
Contenido en LPG			
Contenido en C2	%p/p	0,01	Cromat. Gases
Contenido en C3	%p/p	0,14	Cromat. Gases
Contenido en iC4	%p/p	0,12	Cromat. Gases
Contenido en nC4	%p/p	0,44	Cromat. Gases
Contenido en iC5	%p/p	0,38	Cromat. Gases
Contenido en nC5	%p/p	0,71	Cromat. Gases

Fuentes: Assay Crudo Buzios

Sebastian Victor Guzman Brioso
Gerente Tanques y Terminales



CADENA DE CUSTODIA DE MONITOREO - DE AGUAS Y SUELOS

FR-005
Versión: 01
F.E. 12/2022
Página: 1 de 1

Cliente: UNIVERSIDAD NACIONAL DE ING. Contacto: Ing. Jaqueline Heidy Chirre Flores E-mail: jchirre@uniazulpey Telef.(s) 992055523
Lugar: LIMA Empresa: _____ Planta: _____ Proyecto: VICE RECT. DE INV.
Carta/Cotización: 2023-06VH-56-1 MUESTREO POR SAG ☐ MUESTREO POR CLIENTE ☒

PUNTO DE MUESTREO o CÓDIGO DEL CLIENTE	MUESTREO		TIPO DE MATRIZ	PARAMETROS IN SITU										ANÁLISIS DE LABORATORIO										Nº Informe: 179827-2023																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
	FECHA	HORA																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
SEH-08	18-12-23	16:00	Suelo																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																</

Observaciones de Muestreo: _____

Nombre(s) y Apellido(s) del Responsable del muestreo: Ing. Jaqueline Heidy Chirre Flores Firma(s): [Firma] Recibido en laboratorio: RF
Nombre(s) y Apellido(s) del Responsable o Supervisor en campo: _____ Firma(s): _____ Día/Hora: 16:00

Activar VAFir

Anexo 4. Ficha 3: Hoja de Cadena de Custodia – Empresa SAG Perú S. A. C.



CADENA DE CUSTODIA DE MONITOREO - DE AGUAS Y SUELOS

FR-005
Version: 07
E.F. 12/2022

Página de _____

Cliente: UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERIA Contacto: ING. JAQUELINE CHIRRE FLORES E-mail: jchirref@univ-deu.pe Telef. (s) 997055523
 Lugar: AV. TUPAC AMARU N° 210 - RIMAC Empresa: _____ Planta: _____ Proyecto: VICERRECTORADO DE INVESTIGACION
 Carta/Cotización: 2023-06VH-56-1

MUESTREADO POR SAG	☐
--------------------	--------------------------

MUESTREADO POR CLIENTE	☐
------------------------	--------------------------

MUESTREO				PARAMETROS IN SITU													ANÁLISIS DE LABORATORIO													N° Informe: 175173-42	
PUNTO DE MUESTREO o CÓDIGO DEL CLIENTE	FECHA	HORA	TIPO DE MATRIZ																											CÓDIGO DE LABORATORIO	DATOS ADICIONALES
SEH-01	18-07-2023	15:00	Suelo																											23072767	
SEH-02	18-07-2023	15:00	Suelo																											23072768	

Observaciones de Muestreo:

Nombre(s) y Apellido(s) del Responsable del muestreo: JAQUELINE HEIDY CHIRRE FLORES

Firma(s): _____

Recibido en laboratorio: FG

Nombre(s) y Apellido(s) del Responsable o Supervisor en campo:

Firma(s): _____

Dia/Hora: 14:10pm

Activar Win

Anexo 5. Ficha 4 – Registro de Resultados de medición de CO₂ y pH.

Muestra	Día	Hora (pm)	CO ₂ (ppm)	pH	T (°C)
1	17-07-2023	12:00	502	5.5	23
	20-07-2023	12:00	1011	6	23.5
2	17-07-2023	12:00	503	5	22
	20-07-2023	12:00	1180	5	24
3	17-07-2023	12:00	504	5	23.5
	20-07-2023	12:00	1275	5	23
4	17-07-2023	12:00	506	5.5	23
	20-07-2023	12:00	1191	5.5	22

Muestra	Día	Hora (pm)	CO ₂ (ppm)	pH	T (°C)
1	24-07-2023	12:00	1529	5.5	22.5
	26-07-2023	12:00	1991	6	22
2	24-07-2023	12:00	1651	5	21.5
	26-07-2023	12:00	2159	5.5	22
3	24-07-2023	12:00	1981	5	23
	26-07-2023	12:00	2502	5	22
4	24-07-2023	12:00	1749	5.5	24
	26-07-2023	12:00	2294	5.5	21

Muestra	Día	Hora (pm)	CO ₂ (ppm)	pH	T (°C)
1	31-07-2023	12:00	2509	5.5	22.3
	02-08-2023	12:00	3127	5.5	21
2	31-07-2023	12:00	2718	5	22.5
	02-08-2023	12:00	3348	5	22
3	31-07-2023	12:00	2999	5.5	21.5
	02-08-2023	12:00	3598	5	21.8
4	31-07-2023	12:00	2850	5	21.5
	02-08-2023	12:00	3459	5	21.6

Muestra	Día	Hora (pm)	CO ₂ (ppm)	pH	T (°C)
1	07-08-2023	12:00	3714	5.5	21
	09-08-2023	12:00	4695	5	21.5
2	07-08-2023	12:00	4145	5.5	21
	09-08-2023	12:00	4971	5.5	22
3	07-08-2023	12:00	4382	5	21
	09-08-2023	12:00	5354	5	22
4	07-08-2023	12:00	4533	5	21
	09-08-2023	12:00	5535	5	21.5

Muestra	Día	Hora (pm)	CO ₂ (ppm)	pH	T (°C)
1	15-08-2023	12:00	8197	5.5	21.5
	17-08-2023	12:00	10414	5	20.5
2	15-08-2023	12:00	8009	5.5	21.5
	17-08-2023	12:00	8790	5.5	21
3	15-08-2023	12:00	8458	5.5	21
	17-08-2023	12:00	10821	5.5	20
4	15-08-2023	12:00	8481	5	21
	17-08-2023	12:00	9776	5	19.5

Muestra	Día	Hora (pm)	CO ₂ (ppm)	pH	T (°C)
1	21-08-2023	12:00	13335	5.5	20.5
	23-08-2023	12:00	13937	5.5	19
2	21-08-2023	12:00	10374	5.5	20.3
	23-08-2023	12:00	11190	5.5	20
3	21-08-2023	12:00	13338	5.5	20
	23-08-2023	12:00	14550	5.5	20
4	21-08-2023	12:00	11155	5	21
	23-08-2023	12:00	12480	5.5	20

Muestra	Día	Hora (pm)	CO ₂ (ppm)	pH	T (°C)
1	28-08-2023	12:00	14659	6	20.5
	31-08-2023	12:00	15859	6	22
2	28-08-2023	12:00	11976	5.5	20.2
	31-08-2023	12:00	12858	6	21
3	28-08-2023	12:00	15173	5.5	20.3
	31-08-2023	12:00	15943	5.5	21
4	28-08-2023	12:00	13304	5.5	20.1
	31-08-2023	12:00	14296	5.5	22

Muestra	Día	Hora (pm)	CO ₂ (ppm)	pH	T (°C)
1	04-09-2023	12:00	17090	6	20
	06-09-2023	12:00	17718	5.5	20
2	04-09-2023	12:00	13750	5.5	20
	06-09-2023	12:00	14247	5.5	20
3	04-09-2023	12:00	17234	5.5	20
	06-09-2023	12:00	18010	5.5	20
4	04-09-2023	12:00	15421	5.5	20
	06-09-2023	12:00	16196	5.5	20

Muestra	Día	Hora (pm)	CO ₂ (ppm)	pH	T (°C)
1	11-09-2023	12:00	18753	5	18.5
	13-09-2023	12:00	19307	5	19
2	11-09-2023	12:00	15441	5.5	18.6
	13-09-2023	12:00	15945	5.5	19
3	11-09-2023	12:00	18650	5	18.2
	13-09-2023	12:00	19120	5	19
4	11-09-2023	12:00	17137	5.5	18.8
	13-09-2023	12:00	17691	5.5	19

Muestra	Día	Hora (pm)	CO ₂ (ppm)	pH	T (°C)
1	18-09-2023	12:00	20156	6	19.5
	20-09-2023	12:00	20663	6	19
2	18-09-2023	12:00	16581	5.5	20
	20-09-2023	12:00	17107	5.5	20
3	18-09-2023	12:00	19641	6	20
	20-09-2023	12:00	20153	6	19.5
4	18-09-2023	12:00	18417	6	19
	20-09-2023	12:00	18925	6	20

Muestra	Día	Hora (pm)	CO ₂ (ppm)	pH	T (°C)
1	25-09-2023	12:00	21391	6	19.5
	27-09-2023	12:00	23764	6	21
2	25-09-2023	12:00	17761	5.5	19.5
	27-09-2023	12:00	18843	5.5	21
3	25-09-2023	12:00	20686	5.5	19
	27-09-2023	12:00	22355	5.5	21
4	25-09-2023	12:00	19627	6	19
	27-09-2023	12:00	20938	6	21

Muestra	Día	Hora (pm)	CO ₂ (ppm)	pH	T (°C)
1	03-10-2023	12:00	25864	5.5	21
	10-10-2023	12:00	26356	6	22
2	03-10-2023	12:00	19919	6	21
	10-10-2023	12:00	20579	6	22
3	03-10-2023	12:00	23798	5	21
	10-10-2023	12:00	24334	5.5	22
5	03-10-2023	12:00	22242	5.5	21.5
	10-10-2023	12:00	22756	6	22.5

Muestra	Día	Hora (pm)	CO ₂ (ppm)	pH	T (°C)
1	17-10-2023	12:00	27156	6	20
	24-10-2023	12:00	27654	5	22
2	17-10-2023	12:00	21179	5	20
	24-10-2023	12:00	21717	5	21
3	17-10-2023	12:00	25041	5.5	21
	24-10-2023	12:00	25548	5	21
4	17-10-2023	12:00	23383	6	21
	24-10-2023	12:00	23900	5	21

Muestra	Día	Hora (pm)	CO ₂ (ppm)	pH	T (°C)
1	30-10-2023	12:00	28422	6	20
	07-11-2023	12:00	28907	5.5	20
2	30-10-2023	12:00	22412	5.5	20.5
	07-11-2023	12:00	22937	5	20
3	30-10-2023	12:00	26266	6	21
	07-11-2023	12:00	26726	5	20
4	30-10-2023	12:00	24550	5.5	20
	07-11-2023	12:00	25030	5	21

Muestra	Día	Hora (pm)	CO ₂ (ppm)	pH	T (°C)
1	05-12-2023	12:00	30378	6	22
2	05-12-2023	12:00	24486	5.5	22
3	05-12-2023	12:00	28248	5	22.5
4	05-12-2023	12:00	26635	6	22.5

Tabla CO₂ (ppm) Acumulado vs. Tiempo (días)

Muestra	Día	Hora (pm)	CO ₂ (ppm)	pH	T (°C)
1	14-11-2023	12:00	29420	5.5	21
	21-11-2023	12:00	29904	5	22
2	14-11-2023	12:00	23447	5	21
	21-11-2023	12:00	23984	6	22
3	14-11-2023	12:00	27197	5	22
	21-11-2023	12:00	27724	6	22
4	14-11-2023	12:00	25490	5.5	22
	21-11-2023	12:00	26017	5.5	22.5

Tiempo (día)	CO₂ (1)	CO₂(2)	CO₂(3)	CO₂(4)
0	502	503	504	506
3	1011	1180	1275	1191
7	1529	1651	1981	1749
9	1991	2159	2502	2294
14	2509	2718	2999	2850
16	3127	3348	3598	3459
21	3714	4145	4382	4533
23	4695	4971	5354	5535
29	8197	8009	8458	8481
31	10414	8790	10821	9776
35	13335	10374	13338	11155
37	13937	11190	14550	12480
42	14659	11976	15173	13304
45	15859	12858	15943	14296
52	17090	13750	17234	15421
54	17718	14247	18010	16196
58	18753	15441	18650	17137
63	19307	15945	19120	17691
65	20156	16581	19641	18417
70	20663	17107	20153	18925
72	21391	17761	20686	19627
77	23764	18843	22355	20938
79	25864	19919	23798	22242
85	26356	20579	24334	22756
92	27156	21179	25041	23383
101	27654	21717	25548	23900
108	28422	22412	26266	24550
115	28907	22937	26726	25030
121	29420	23447	27197	25490
128	29904	23984	27724	26017
135	30378	24486	28248	26635

Anexo 6. Ficha 5 – Registro de Resultados de medición de Análisis Microbiológico.



INNOVA BIOTECH AGRO S.A.C.

INFORME DE SERVICIO (2 DE 2)

ORDEN DE SERVICIO N° 0004449

N. EXP. SIAP: 8561

REF. SERVICIO DE ANALISIS DE MUESTRAS PARA EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN FORMATIVA 2023 - FIPGP - PFR - 02 - 2023.

INFORME 2: SERVICIO DE ANALISIS EN LABORATORIO DE PCR EN CEPAS BACTERIANAS

PARA : UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERIA
RUC : 20169004359
ATENCIÓN : MAGISTER JAQUELINE HEIDY CHIRRE FLORES
FECHA : 15 DE JULIO, 2023

REPORTE DE TAXONOMIA MOLECULAR DE BACTERIAS

MUESTRAS RECIBIDAS:

- Cepas bacterias, puras aisladas y rotulados como:

BACTERIAS		
N°	CÓDIGO DE MUESTRA	CÓDIGO DE SECUENCIAMIENTO
1	UNI 1	IR1
2	UNI 5	IR2
3	UNI KA	IR3

ANÁLISIS REALIZADOS:

1. Extracción de ADN genómico.
2. Amplificación del gen del ARNr 16S (bacterias) por PCR.
3. Purificación del amplicon.
4. Secuenciación de dos sentidos.
5. Análisis de las secuencias en bancos de datos (GenBank del NCBI) mediante alineamiento de homología usando el BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

RESULTADOS DE ANÁLISIS:

El proceso de extracción de ADN genómico (ADNg) permitió la obtención de un pellet de ADNg visible para todas las muestras.

Los ADNg fueron extraídos exitosamente, se amplificó el gen del ARNr 16S mediante PCR. Los productos de PCR son separados en un gel de agarosa al 1.2 %. La no amplificación de los controles de extracción y del control negativo de PCR (C-), indicaron que la extracción de ADNg y la PCR fueron realizados correctamente. Asimismo, la amplificación del control positivo de PCR (C+) indica que la PCR se realizó de forma correcta.

Las muestras de amplicones fueron conservados a -20°C hasta su envío a la empresa de Macrogen Korea. Los amplicones se codificaron como:

BACTERIAS		
Nº	CÓDIGO DE MUESTRA	CÓDIGO DE SECUENCIAMIENTO
1	UNI 1	BR1
2	UNI 5	BR2
3	UNI RA	BR3

Las secuencias de nucleótidos de todos los cultivos presentaron niveles de pureza adecuados para realizar el análisis genético.

Después de la edición de las secuencias mediante Mega10, se procedió a la reconstrucción del amplicon.

Las secuencias fueron analizadas mediante el programa Nucleotide BLAST del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).



INNOVA BIOTECH AGRO S.A.C.

INFORME DE SERVICIO (2 DE 2)

ORDEN DE SERVICIO N° 0004449

N. EXP. SLAF: 8561

REF. SERVICIO DE ANALISIS DE MUESTRAS PARA EL PROYECTO DE
INVESTIGACIÓN FORMATIVA 2023 – FIPGP – PFR – 02 – 2023.

INFORME 2: SERVICIO DE ANALISIS EN LABORATORIO DE PCR EN CEPAS BACTERIANAS

PARA : UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERIA
RUC : 20169004359
ATENCIÓN : MAGISTER JAQUELINE HEIDY CHIRRE FLORES
FECHA : 15 DE JULIO, 2023

REPORTE DE TAXONOMIA MOLECULAR DE BACTERIAS

MUESTRAS RECIBIDAS

- Cepas bacterias, puras aisladas y rotulados como:

BACTERIAS		
N°	CÓDIGO DE MUESTRA	CÓDIGO DE SECUENCIAMIENTO
1	UNI 1	BR1
2	UNI 3	BR2
3	UNI 8A	BR3

ANÁLISIS REALIZADOS:

1. Extracción de ADN genómico.
2. Amplificación del gen del ARNr 16S (bacterias) por PCR.
3. Purificación del amplicon.
4. Secuenciación de dos sentidos.
5. Análisis de las secuencias en bancos de datos (GenBank del NCBI) mediante alineamiento de homología usando el BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

RESULTADOS DE ANÁLISIS:

El proceso de extracción de ADN genómico (ADNg) permitió la obtención de un pellet de ADNg visible para todas las muestras.

CONCLUSIONES:

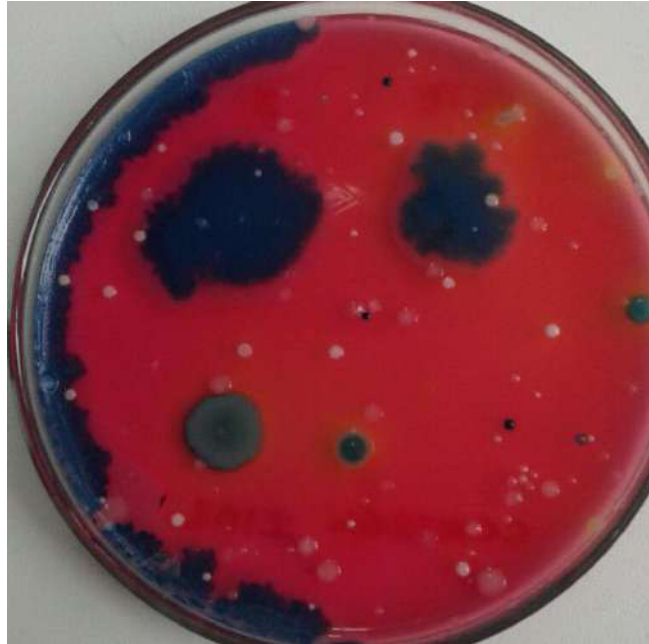
BACTERIAS										
Nº	CÓDIGO DE MUESTRA	CÓDIGO DE SECUENCIAMIENTO	NOMBRE CIENTIFICO	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
1	UNI 1	BR1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	2671	2671	99%	0.0	99.86%	1455	FJ705346.1
2	UNI 8A	BR3	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	2573	2573	99%	0.0	99.58%	1447	KM884893.1
3	UNI 5	BR2	<i>Bacillus subtilis</i>	2460	2460	98%	0.0	97.71%	1514	KJ567106.2


 JESSI YOLANDA CLAUDIO FONSECA
 BIOLOGO MICROBIOLOGO
 GERENTE GENERAL



QUEDA TERMINANTEMENTE PROHIBIDO LA REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL DEL PRESENTE DOCUMENTO SIN AUTORIZACION DEL LABORATORIO.

Fotos del Consorcio bacteriano en el proceso de degradación del petróleo crudo



Placa de agar hicrome con las cepas en conteo durante la cinética de degradación: las cepas *Bacillus subtilis* con coloración verdosa y las de *Bacillus amyloliquefaciens* con colonias redondeadas con bordes irregulares amarillentos



Placa de agar cetrimide con las cepas en conteo durante la cinética de degradación: *Pseudomonas* con colonias poco translucidas, elevadas con bordes irregulares y brillo tornasolado verdoso.



Placa de agar nutritivo con cepas de heterótrofos viables totales

Tablas de UFC/mL en los terrarios

Promedio de conteo por triplicado de UFC/mL del terrario 1.

Tiempo (Días)	<i>Agrobacterium</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>	Heterótrofos	Promedio
	<i>Tumefaciens</i> (10 ⁸)	<i>Subtilis</i> (10 ⁸)	<i>Amyloliquefaciens</i> (10 ⁸)	Viables (10 ⁶)	Bacterias Oleofilicas (10 ⁸)
0	1.37	2.72	1.30	6.28	1.80
3	1.13	2.52	1.24	6.46	1.63
7	0.955	2.23	1.06	6.84	1.41
9	0.841	2.15	0.927	7.08	1.31
14	0.772	1.98	0.825	7.72	1.19
16	0.673	1.84	0.747	7.97	1.09
21	0.610	1.52	0.637	8.53	0.921
23	0.540	1.35	0.540	8.71	0.809
29	0.427	1.14	0.310	9.25	0.625
31	0.355	1.05	0.290	9.20	0.565
35	0.133	0.967	0.223	9.14	0.441
38	0.0943	0.907	0.215	9.01	0.405
43	0.0833	0.770	0.194	8.76	0.349
46	0.0630	0.633	0.189	8.66	0.295
50	0.0470	0.510	0.185	8.39	0.247
52	0.0533	0.495	0.184	8.19	0.244
57	0.0527	0.477	0.181	7.66	0.237
59	0.0520	0.410	0.179	7.17	0.214
64	0.0512	0.363	0.175	6.12	0.197
66	0.0471	0.307	0.173	5.60	0.176
71	0.0430	0.270	0.155	4.36	0.156
73	0.0402	0.230	0.147	3.62	0.139
79	0.0376	0.177	0.137	2.78	0.117
86	0.0332	0.130	0.127	1.76	0.0967
93	0.0268	0.110	0.118	1.07	0.0848
100	0.0220	0.0833	0.107	0.647	0.0709
106	0.0205	0.0610	0.0963	0.420	0.0593
114	0.0173	0.0410	0.0880	0.282	0.0488
121	0.0135	0.0400	0.0817	0.163	0.0451
128	0.0120	0.0343	0.0723	0.146	0.0396
142	0.0114	0.0282	0.0673	0.132	0.0356

Promedio de conteo por triplicado de UFC/mL del terrario 2.

Tiempo (Días)	<i>Agrobacterium</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>	Heterótrofos	Promedio
	<i>Tumefaciens</i> (10 ⁸)	<i>Subtilis</i> (10 ⁸)	<i>Amyloliquefaciens</i> (10 ⁸)	Viables (10 ⁶)	Bacterias Oleofilicas (10 ⁸)
0	2.10	3.83	2.30	3.53	2.74
3	1.70	3.64	2.10	3.85	2.48
7	1.50	3.48	1.79	4.06	2.26
9	1.30	3.33	1.61	4.13	2.08
14	1.07	2.86	1.32	4.33	1.75
16	0.923	2.61	1.22	4.39	1.58
21	0.672	2.26	0.932	4.54	1.29
23	0.543	2.06	0.870	4.63	1.16
29	0.243	1.63	0.694	4.74	0.855
31	0.151	1.57	0.634	4.71	0.785
35	0.0940	1.32	0.521	4.71	0.644
38	0.0643	1.12	0.454	4.71	0.547
43	0.0643	0.933	0.420	4.67	0.473
46	0.0623	0.800	0.383	4.68	0.415
50	0.0570	0.720	0.364	4.69	0.380
52	0.0587	0.633	0.362	4.68	0.351
57	0.0513	0.510	0.354	4.14	0.305
59	0.0483	0.430	0.345	3.85	0.275
64	0.0427	0.303	0.327	3.47	0.224
66	0.0390	0.250	0.316	3.17	0.202
71	0.0340	0.190	0.253	2.88	0.159
73	0.0323	0.160	0.233	2.56	0.142
79	0.0247	0.110	0.175	1.85	0.103
86	0.0217	0.0890	0.142	1.35	0.0842
93	0.0210	0.0647	0.115	1.13	0.0668
100	0.0200	0.0400	0.0990	0.747	0.0530
106	0.0193	0.0280	0.0880	0.556	0.0451
114	0.0173	0.0160	0.0777	0.361	0.0370
121	0.0153	0.0120	0.0720	0.247	0.0331
128	0.0143	0.00893	0.0670	0.200	0.0301
142	0.0125	0.00654	0.0610	0.156	0.0267

Promedio de conteo por triplicado de UFC/mL del terrario 3.

Tiempo (Días)	Promedio de Conteo de Heterótrofos Viables
	(10⁶)
0	2.47
3	2.49
7	2.51
9	2.58
14	2.66
16	2.67
21	2.74
23	2.78
29	2.88
31	2.91
35	3.02
38	3.03
43	3.07
46	3.08
50	3.07
52	3.10
57	3.09
59	3.10
64	2.86
66	2.52
71	2.11
73	1.99
79	1.80
86	1.54
93	1.28
100	1.02
106	0.840
114	0.679
121	0.567
128	0.488
142	0.412

Promedio de conteo por triplicado de UFC/mL del terrario 4.

Tiempo (Días)	<i>Agrobacterium Tumefaciens</i> (10⁸)	<i>Bacillus Subtilis</i> (10⁸)	<i>Bacillus Amyloliquefaciens</i> (10⁸)	Heterótrofos Viabiles (10⁶)	Promedio Bacterias Oleofilicas (10⁸)
0	2.10	3.34	1.97	2.54	2.47
3	1.70	3.08	1.76	2.66	2.18
7	1.50	2.78	1.64	2.80	1.97
9	1.30	2.61	1.59	2.94	1.83
14	1.07	2.25	1.38	3.09	1.56
16	0.923	2.10	1.27	3.19	1.43
21	0.672	1.90	1.12	3.26	1.23
23	0.543	1.76	1.02	3.24	1.11
29	0.243	1.58	0.840	3.27	0.887
31	0.151	1.46	0.724	3.25	0.777
35	0.0940	1.31	0.661	3.26	0.689
38	0.0643	1.20	0.641	3.24	0.635
43	0.0643	0.923	0.630	3.23	0.539
46	0.0623	0.717	0.612	3.17	0.464
50	0.0570	0.527	0.583	3.15	0.389
52	0.0587	0.423	0.540	3.16	0.341
57	0.0540	0.293	0.418	2.84	0.255
59	0.0533	0.253	0.350	2.59	0.219
64	0.0490	0.193	0.254	2.25	0.166
66	0.0460	0.167	0.221	2.13	0.144
71	0.0420	0.133	0.220	1.75	0.132
73	0.0387	0.112	0.219	1.67	0.123
79	0.0320	0.0907	0.204	1.33	0.109
86	0.0247	0.0703	0.163	0.733	0.0861
93	0.0213	0.0570	0.117	0.590	0.0652
100	0.0177	0.0420	0.0917	0.439	0.0504
106	0.0170	0.0403	0.0790	0.401	0.0454
114	0.0140	0.0377	0.0770	0.357	0.0429
121	0.0130	0.0362	0.0673	0.322	0.0389
128	0.0117	0.0343	0.0630	0.291	0.0363
142	0.0107	0.0331	0.0571	0.226	0.0336

Comparación del conteo de UFC/mL de los promedios generales de los microorganismos del consorcio degradador por terrario.

Tiempo (Días)	Terrario 1 (10⁸)	Terrario 2 (10⁸)	Terrario 4 (10⁸)
0	1.80	2.74	2.47
3	1.63	2.48	2.18
7	1.41	2.26	1.97
9	1.31	2.08	1.83
14	1.19	1.75	1.56
16	1.09	1.58	1.43
21	0.921	1.29	1.23
23	0.809	1.16	1.11
29	0.625	0.855	0.887
31	0.565	0.785	0.777
35	0.441	0.644	0.689
38	0.405	0.547	0.635
43	0.349	0.473	0.539
46	0.295	0.415	0.464
50	0.247	0.380	0.389
52	0.244	0.351	0.341
57	0.237	0.305	0.255
59	0.214	0.275	0.219
64	0.197	0.224	0.166
66	0.176	0.202	0.144
71	0.156	0.159	0.132
73	0.139	0.142	0.123
79	0.117	0.103	0.109
86	0.0967	0.0842	0.0861
93	0.0848	0.0668	0.0652
100	0.0709	0.0530	0.0504
106	0.0593	0.0451	0.0454
114	0.0488	0.0370	0.0429
121	0.0451	0.0331	0.0389
128	0.0396	0.0301	0.0363
142	0.0356	0.0267	0.0336

Comparación del conteo de UFC/mL de los microorganismos heterótrofos viables por terrario.

Tiempo (Días)	Terrario 1 (10 ⁶)	Terrario 2 (10 ⁶)	Terrario 3 (10 ⁶)	Terrario 4 (10 ⁶)
0	6.28	3.53	2.47	4.19
3	6.46	3.85	2.49	4.19
7	6.84	4.06	2.51	4.19
9	7.08	4.13	2.58	4.20
14	7.72	4.33	2.66	4.24
16	7.97	4.39	2.67	4.28
21	8.53	4.54	2.74	4.40
23	8.71	4.63	2.78	4.48
29	9.25	4.74	2.88	4.66
31	9.20	4.71	2.91	4.65
35	9.14	4.71	3.02	4.64
38	9.01	4.71	3.03	4.65
43	8.76	4.67	3.07	4.65
46	8.66	4.68	3.08	4.67
50	8.39	4.69	3.07	4.67
52	8.19	4.68	3.10	4.60
57	7.66	4.14	3.09	4.16
59	7.17	3.85	3.10	3.92
64	6.12	3.47	2.86	3.72
66	5.60	3.17	2.52	3.37
71	4.36	2.88	2.11	2.81
73	3.62	2.56	1.99	2.62
79	2.78	1.85	1.80	1.91
86	1.76	1.35	1.54	1.73
93	1.07	1.13	1.28	1.61
100	0.647	0.747	1.02	1.38
106	0.420	0.556	0.840	1.22
114	0.282	0.361	0.679	1.04
121	0.163	0.247	0.567	0.920
128	0.146	0.200	0.488	0.851
142	0.132	0.156	0.412	0.615



INNOVA BIOTECH AGRO S.A.C.

DATA DE RESULTADOS.

Los conteos de las unidades formadoras de colonia por Terrario se verifican en las siguientes tablas:

Tabla N°1: Conteo de UFC/mL del Terrario N° 1 (Promedios de las 3 repeticiones)

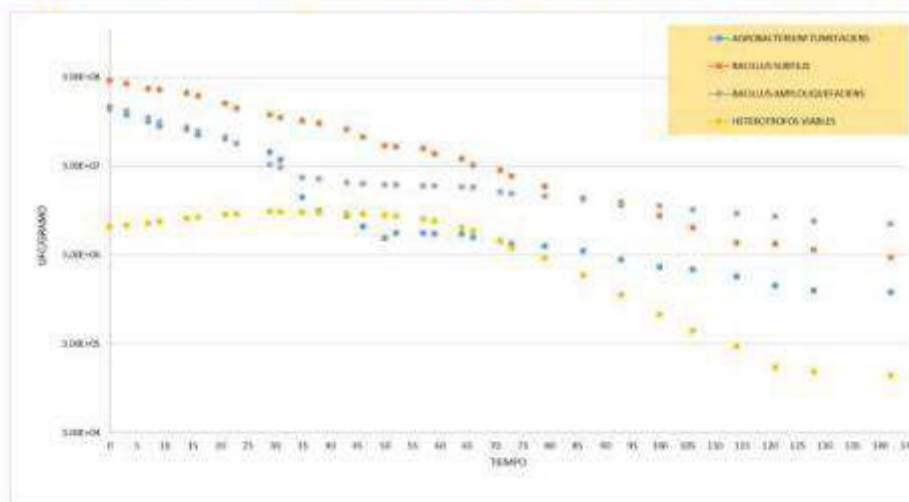
TIEMPO	AGROBACTERIUM TUMEFACIENS	BACILLUS SUBTILIS	BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS	HETEROTROFOS VIABLES
0	1.37E+08	2.72E+08	1.30E+08	6.28E+06
3	1.13E+08	2.52E+08	1.24E+08	6.46E+06
7	9.55E+07	2.23E+08	1.06E+08	6.84E+06
9	8.41E+07	2.15E+08	9.27E+07	7.08E+06
14	7.72E+07	1.98E+08	8.25E+07	7.72E+06
16	6.73E+07	1.84E+08	7.47E+07	7.97E+06
21	6.10E+07	1.52E+08	6.37E+07	8.53E+06
23	5.40E+07	1.35E+08	5.40E+07	8.71E+06
29	4.27E+07	1.14E+08	3.10E+07	9.25E+06
31	3.55E+07	1.05E+08	2.90E+07	9.20E+06
35	1.33E+07	9.67E+07	2.23E+07	9.14E+06
38	9.43E+06	9.07E+07	2.15E+07	9.01E+06
43	8.33E+06	7.70E+07	1.94E+07	8.76E+06
46	6.30E+06	6.33E+07	1.89E+07	8.66E+06
50	4.70E+06	5.10E+07	1.85E+07	8.39E+06
52	5.33E+06	4.95E+07	1.84E+07	8.19E+06
57	5.27E+06	4.77E+07	1.81E+07	7.66E+06
59	5.20E+06	4.10E+07	1.79E+07	7.17E+06
64	5.12E+06	3.63E+07	1.75E+07	6.12E+06
66	4.71E+06	3.07E+07	1.73E+07	5.60E+06
71	4.30E+06	2.70E+07	1.55E+07	4.36E+06
73	4.02E+06	2.30E+07	1.47E+07	3.62E+06
79	3.76E+06	1.77E+07	1.37E+07	2.78E+06
86	3.32E+06	1.30E+07	1.27E+07	1.76E+06
93	2.68E+06	1.10E+07	1.18E+07	1.07E+06
100	2.20E+06	8.33E+06	1.07E+07	6.47E+05
106	2.05E+06	6.10E+06	9.63E+06	4.20E+05
114	1.73E+06	4.10E+06	8.80E+06	2.82E+05
121	1.35E+06	4.00E+06	8.17E+06	1.63E+05
128	1.20E+06	3.43E+06	7.23E+06	1.46E+05
142	1.14E+06	2.82E+06	6.73E+06	1.32E+05

INNOVA BIOTECH AGRO SAC
JESSY YOLANDA CLAUDIO FONSECA
Representante Legal

Dr. ABAD FLORES PAUCARIMA
GERENTE DE INVESTIGACIÓN
INNOVA BIOTECH AGRO SAC
CBP 567

INNOVA
BIOTECH
AGRO

GRAFICO N° 1: CURVAS DE DESARROLLO DE LOS MICROORGANISMOS EVALUADOS –TERRARIO N° 1



INNOVA BIOTECH AGRO SAC

 JESSI YOLANDA CLAUDIO FONSECA
 Representante Legal


 Dr. ABAD FLORES PAUCARIMA
 GERENTE DE INVESTIGACIÓN
 INNOVA BIOTECH AGRO SAC
 CBP 567



Tabla N°2: Conteo de UFC/mL del Terrario N° 2 (Promedios de las 3 repeticiones)

TIEMPO	AGROBACTERIUM TUMEFACIENS	BACILLUS SUBTILIS	BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS	HETEROTROFOS VIABLES
0	2.10E+08	3.83E+08	2.30E+08	3.53E+06
3	1.70E+08	3.64E+08	2.10E+08	3.85E+06
7	1.50E+08	3.48E+08	1.79E+08	4.06E+06
9	1.30E+08	3.33E+08	1.61E+08	4.13E+06
14	1.07E+08	2.86E+08	1.32E+08	4.33E+06
16	9.23E+07	2.61E+08	1.22E+08	4.39E+06
21	6.72E+07	2.26E+08	9.32E+07	4.54E+06
23	5.43E+07	2.06E+08	8.70E+07	4.63E+06
29	2.43E+07	1.63E+08	6.94E+07	4.74E+06
31	1.51E+07	1.57E+08	6.34E+07	4.71E+06
35	9.40E+06	1.32E+08	5.21E+07	4.71E+06
38	6.43E+06	1.12E+08	4.54E+07	4.71E+06
43	6.43E+06	9.33E+07	4.20E+07	4.67E+06
46	6.23E+06	8.00E+07	3.83E+07	4.68E+06
50	5.70E+06	7.20E+07	3.64E+07	4.69E+06
52	5.87E+06	6.33E+07	3.62E+07	4.68E+06
57	5.13E+06	5.10E+07	3.54E+07	4.14E+06
59	4.83E+06	4.30E+07	3.45E+07	3.85E+06
64	4.27E+06	3.03E+07	3.27E+07	3.47E+06
66	3.90E+06	2.50E+07	3.16E+07	3.17E+06
71	3.40E+06	1.90E+07	2.53E+07	2.88E+06
73	3.23E+06	1.60E+07	2.33E+07	2.56E+06
79	2.47E+06	1.10E+07	1.75E+07	1.85E+06
86	2.17E+06	8.90E+06	1.42E+07	1.35E+06
93	2.10E+06	6.47E+06	1.15E+07	1.13E+06
100	2.00E+06	4.00E+06	9.90E+06	7.47E+05
106	1.93E+06	2.80E+06	8.80E+06	5.56E+05
114	1.73E+06	1.60E+06	7.77E+06	3.61E+05
121	1.53E+06	1.20E+06	7.20E+06	2.47E+05
128	1.43E+06	8.93E+05	6.70E+06	2.00E+05
142	1.25E+06	6.54E+05	6.10E+06	1.56E+05



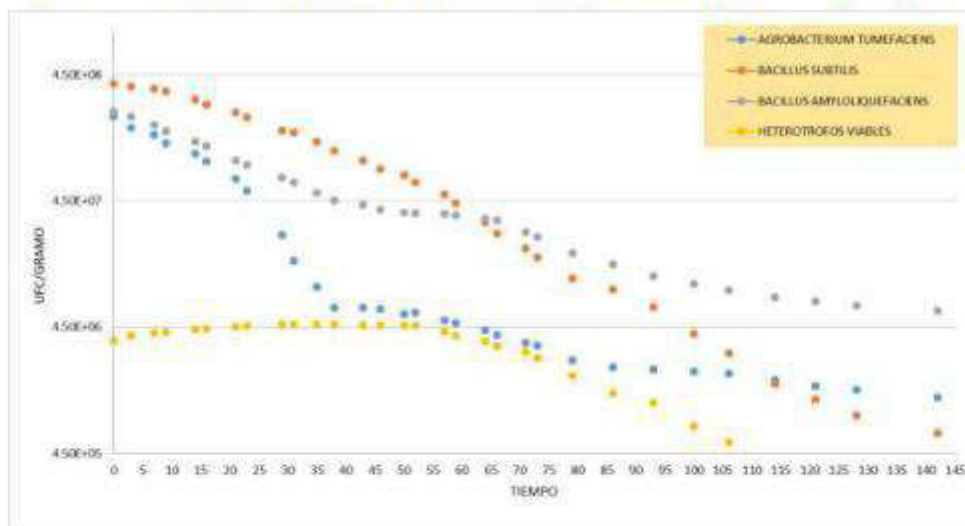
INNOVA BIOTECH AGRO SAC
JESSY YOLANDA CLAUDIO FONSECA
Representante Legal



Dr. ABAD FLORES PAUCARIMA
GERENTE DE INVESTIGACIÓN
INNOVA BIOTECH AGRO SAC
CBP 567



GRAFICO N° 2: CURVAS DE DESARROLLO DE LOS MICROORGANISMOS EVALUADOS –TERRARIO N° 2




INNOVA BIOTECH AGRO SAC
 JESSI YOLANDA CLAUDIO FONSECA
 Representante Legal


Dr. ABAD FLORES PAUCARIMA
 GERENTE DE INVESTIGACIÓN
 INNOVA BIOTECH AGRO SAC
 CBP 567


INNOVA BIOTECH AGRO

Tabla N°3: Conteo de UFC/mL del Terrario N° 3 (Promedios de las 3 repeticiones)

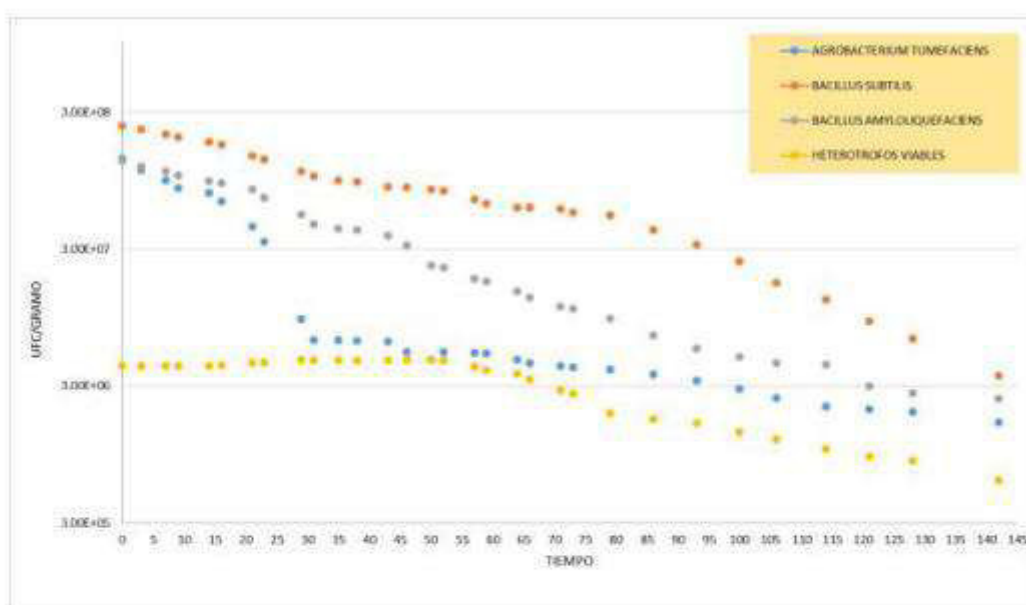
TIEMPO	AGROBACTERIUM TUMEFACIENS	BACILLUS SUBTILIS	BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS	HETEROTROFOS VIABLES
0	1.37E+08	2.39E+08	1.33E+08	4.19E+06
3	1.13E+08	2.25E+08	1.21E+08	4.19E+06
7	9.55E+07	2.08E+08	1.11E+08	4.19E+06
9	8.41E+07	1.97E+08	1.04E+08	4.20E+06
14	7.72E+07	1.82E+08	9.47E+07	4.24E+06
16	6.73E+07	1.73E+08	9.10E+07	4.28E+06
21	4.40E+07	1.44E+08	8.18E+07	4.40E+06
23	3.40E+07	1.35E+08	7.11E+07	4.48E+06
29	9.20E+06	1.11E+08	5.38E+07	4.66E+06
31	6.50E+06	1.02E+08	4.56E+07	4.65E+06
35	6.47E+06	9.50E+07	4.23E+07	4.64E+06
38	6.43E+06	9.27E+07	4.17E+07	4.65E+06
43	6.33E+06	8.63E+07	3.78E+07	4.65E+06
46	5.30E+06	8.50E+07	3.20E+07	4.67E+06
50	4.70E+06	8.23E+07	2.29E+07	4.67E+06
52	5.33E+06	8.03E+07	2.19E+07	4.60E+06
57	5.27E+06	6.97E+07	1.83E+07	4.16E+06
59	5.20E+06	6.47E+07	1.74E+07	3.92E+06
64	4.70E+06	6.07E+07	1.48E+07	3.72E+06
66	4.40E+06	6.07E+07	1.33E+07	3.37E+06
71	4.20E+06	5.87E+07	1.15E+07	2.81E+06
73	4.10E+06	5.57E+07	1.11E+07	2.62E+06
79	3.97E+06	5.30E+07	9.30E+06	1.91E+06
86	3.67E+06	4.17E+07	7.03E+06	1.73E+06
93	3.30E+06	3.23E+07	5.63E+06	1.61E+06
100	2.87E+06	2.43E+07	4.93E+06	1.38E+06
106	2.47E+06	1.70E+07	4.40E+06	1.22E+06
114	2.13E+06	1.28E+07	4.30E+06	1.04E+06
121	2.03E+06	8.93E+06	3.00E+06	9.20E+05
128	1.93E+06	6.63E+06	2.67E+06	8.51E+05
142	1.63E+06	3.56E+06	2.43E+06	6.15E+05


 INNOVA BIOTECH AGRO SAC
 JESSI YOLANDA CLAUDIO FONSECA
 Representante Legal


 Dr. ABAD FLORES PAUCARIMA
 GERENTE DE INVESTIGACIÓN
 INNOVA BIOTECH AGRO SAC
 CBP 567



GRAFICO N° 3: CURVAS DE DESARROLLO DE LOS MICROORGANISMOS EVALUADOS –TERRARIO N° 3




INNOVA BIOTECH AGRO SAC

JESSI YOLANDA CLAUDIO FONSECA
 Representante Legal


Dr. ABAD FLORES PAUCARIMA
 GERENTE DE INVESTIGACIÓN
 INNOVA BIOTECH AGRO SAC
 CBP 567



Tabla N°4: Conteo de UFC/mL del Terrario N° 4 (Promedios de las 3 repeticiones)

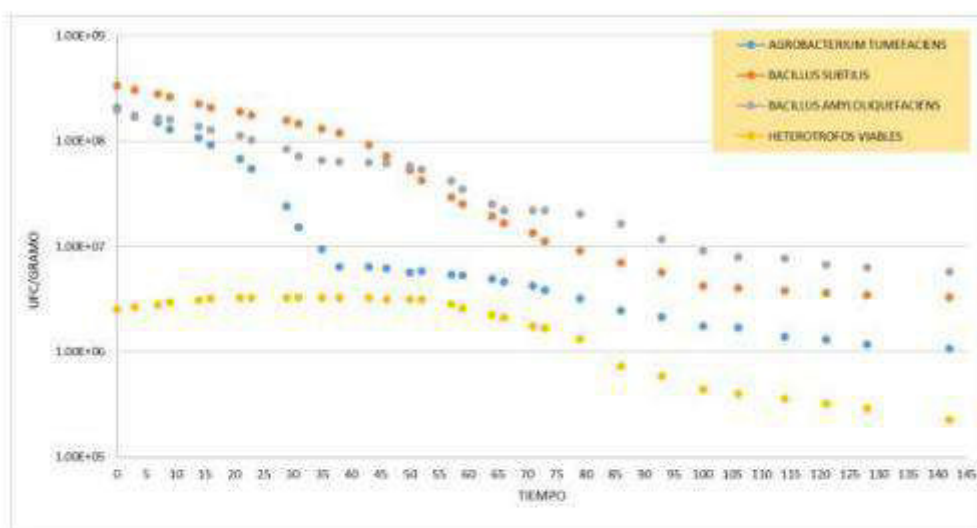
TIEMPO	AGROBACTERIUM TUMEFACIENS	BACILLUS SUBTILIS	BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS	HETEROTROFOS VIABLES
0	2.10E+08	3.34E+08	1.97E+08	2.54E+06
3	1.70E+08	3.08E+08	1.76E+08	2.66E+06
7	1.50E+08	2.78E+08	1.64E+08	2.80E+06
9	1.30E+08	2.61E+08	1.59E+08	2.94E+06
14	1.07E+08	2.25E+08	1.38E+08	3.09E+06
16	9.23E+07	2.10E+08	1.27E+08	3.19E+06
21	6.72E+07	1.90E+08	1.12E+08	3.26E+06
23	5.43E+07	1.76E+08	1.02E+08	3.24E+06
29	2.43E+07	1.58E+08	8.40E+07	3.27E+06
31	1.51E+07	1.46E+08	7.24E+07	3.25E+06
35	9.40E+06	1.31E+08	6.61E+07	3.26E+06
38	6.43E+06	1.20E+08	6.41E+07	3.24E+06
43	6.43E+06	9.23E+07	6.30E+07	3.23E+06
46	6.23E+06	7.17E+07	6.12E+07	3.17E+06
50	5.70E+06	5.27E+07	5.83E+07	3.15E+06
52	5.87E+06	4.23E+07	5.40E+07	3.16E+06
57	5.40E+06	2.93E+07	4.18E+07	2.84E+06
59	5.33E+06	2.53E+07	3.50E+07	2.59E+06
64	4.90E+06	1.93E+07	2.54E+07	2.25E+06
66	4.60E+06	1.67E+07	2.21E+07	2.13E+06
71	4.20E+06	1.33E+07	2.20E+07	1.75E+06
73	3.87E+06	1.12E+07	2.19E+07	1.67E+06
79	3.20E+06	9.07E+06	2.04E+07	1.33E+06
86	2.47E+06	7.03E+06	1.63E+07	7.33E+05
93	2.13E+06	5.70E+06	1.17E+07	5.90E+05
100	1.77E+06	4.20E+06	9.17E+06	4.39E+05
106	1.70E+06	4.03E+06	7.90E+06	4.01E+05
114	1.40E+06	3.77E+06	7.70E+06	3.57E+05
121	1.30E+06	3.62E+06	6.73E+06	3.22E+05
128	1.17E+06	3.43E+06	6.30E+06	2.91E+05
142	1.07E+06	3.31E+06	5.71E+06	2.26E+05


 INNOVA BIOTECH AGRO SAC
 JESSI YOLANDA CLAUDIO FONSECA
 Representante Legal


 Dr. ABAD FLORES PAUCARIMA
 GERENTE DE INVESTIGACIÓN
 INNOVA BIOTECH AGRO SAC
 CBP 567



GRAFICO N° 4: CURVAS DE DESARROLLO DE LOS MICROORGANISMOS EVALUADOS –TERRARIO N° 4




 INNOVA BIOTECH AGRO SAC
 JESSI YOLANDA CLAUDIO FONSECA
 Representante Legal


 Dr. ABAD FLORES PAUCARIMA
 GERENTE DE INVESTIGACIÓN
 INNOVA BIOTECH AGRO SAC
 CBP 567



Tabla N°5: Conteo de UFC/mL del Terrario N° 5 (Promedios de las 3 repeticiones)

TIEMPO	HETEROTROFOS VIABLES
0	2.47E+06
3	2.49E+06
7	2.51E+06
9	2.58E+06
14	2.66E+06
16	2.67E+06
21	2.74E+06
23	2.78E+06
29	2.88E+06
31	2.91E+06
35	3.02E+06
38	3.03E+06
43	3.07E+06
46	3.08E+06
50	3.07E+06
52	3.10E+06
57	3.09E+06
59	3.10E+06
64	2.86E+06
66	2.52E+06
71	2.11E+06
73	1.99E+06
79	1.80E+06
86	1.54E+06
93	1.28E+06
100	1.02E+06
106	8.40E+05
114	6.79E+05
121	5.67E+05
128	4.88E+05
142	4.12E+05

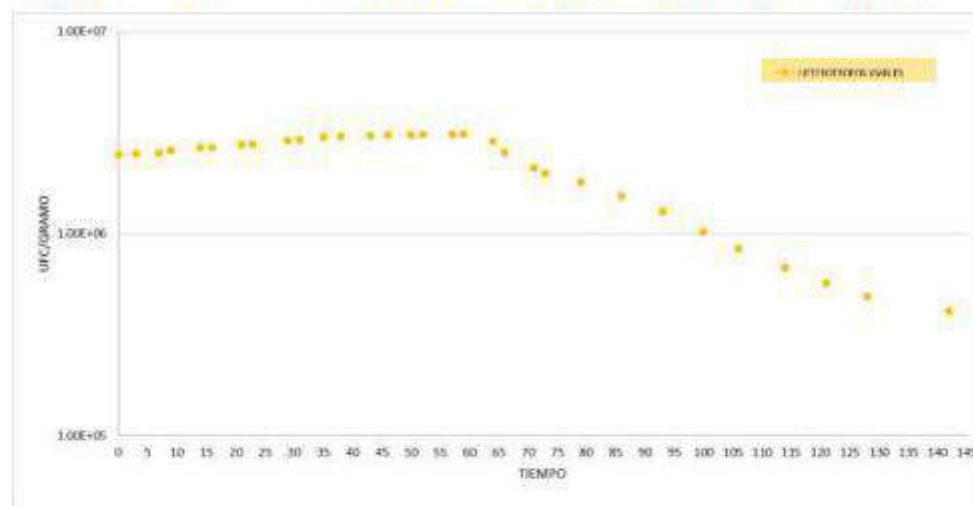


INNOVA BIOTECH AGRO SAC

 JESSI YOLANDA CLAUDIO FONSECA
 Representante Legal


 Dr. ABAD FLORES PAUCARIMA
 GERENTE DE INVESTIGACIÓN
 INNOVA BIOTECH AGRO SAC
 CBP 567


GRAFICO N° 5: CURVAS DE DESARROLLO DE LOS MICROORGANISMOS EVALUADOS –TERRARIO N° 5




INNOVA BIOTECH AGRO SAC

JESSI YOLANDA CLAUDIO FONSECA
 Representante Legal


Dr. ABAD FLORES PAUCARIMA
 GERENTE DE INVESTIGACIÓN
 INNOVA BIOTECH AGRO SAC
 CBP 567



Tabla N°6: Conteo de UFC/mL del Terrario N° 6 (Promedios de las 3 repeticiones)

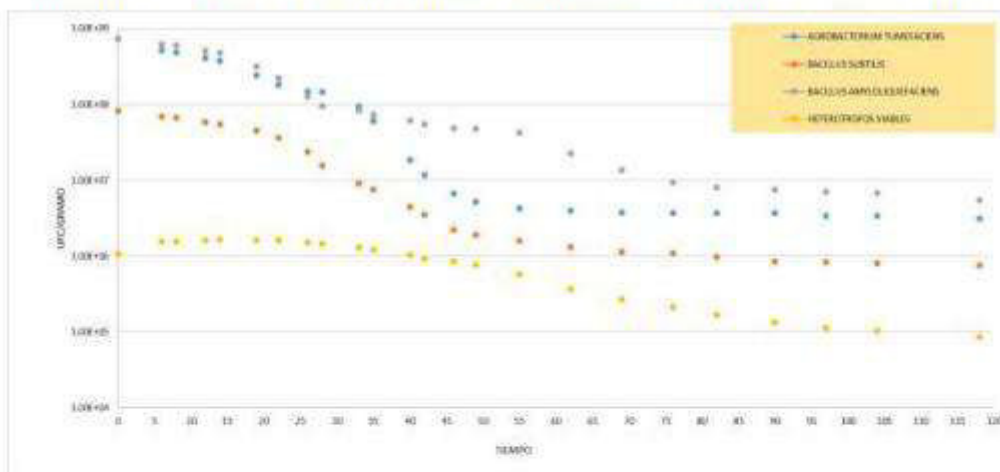
TIEMPO	AGROBACTERIUM TUMEFACIENS	BACILLUS SUBTILIS	BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS	HETEROTROFOS VIABLES
0	7.23E+08	8.13E+07	7.41E+08	1.08E+06
6	5.18E+08	6.90E+07	6.20E+08	1.55E+06
8	4.82E+08	6.63E+07	5.96E+08	1.57E+06
12	4.07E+08	5.87E+07	5.11E+08	1.62E+06
14	3.74E+08	5.47E+07	4.74E+08	1.64E+06
19	2.41E+08	4.50E+07	3.18E+08	1.62E+06
22	1.80E+08	3.60E+07	2.20E+08	1.60E+06
26	1.46E+08	2.37E+07	1.26E+08	1.51E+06
28	1.44E+08	1.55E+07	9.55E+07	1.45E+06
33	9.33E+07	9.00E+06	8.33E+07	1.29E+06
35	6.07E+07	7.50E+06	7.27E+07	1.21E+06
40	1.83E+07	4.45E+06	6.13E+07	1.05E+06
42	1.17E+07	3.52E+06	5.43E+07	9.27E+05
46	6.63E+06	2.22E+06	4.85E+07	8.50E+05
49	5.20E+06	1.92E+06	4.72E+07	7.63E+05
55	4.23E+06	1.58E+06	4.19E+07	5.70E+05
62	3.93E+06	1.32E+06	2.26E+07	3.64E+05
69	3.73E+06	1.13E+06	1.35E+07	2.70E+05
76	3.70E+06	1.10E+06	9.44E+06	2.10E+05
82	3.70E+06	9.75E+05	8.04E+06	1.66E+05
90	3.67E+06	8.43E+05	7.51E+06	1.34E+05
97	3.37E+06	8.29E+05	7.08E+06	1.14E+05
104	3.37E+06	8.02E+05	6.75E+06	1.04E+05
118	3.14E+06	7.56E+05	5.48E+06	8.70E+04


 INNOVA BIOTECH AGRO SAC
 JESSI YOLANDA CLAUDIA FONSECA
 Representante Legal


 Dr. ABAD FLORES PAUCARIMA
 GERENTE DE INVESTIGACIÓN
 INNOVA BIOTECH AGRO SAC
 CBP 567



GRAFICO N° 6: CURVAS DE DESARROLLO DE LOS MICROORGANISMOS EVALUADOS –TERRARIO N° 6




INNOVA BIOTECH AGRO SAC

JESSY YOLANDA CLAUDIO FONSECA
 Representante Legal

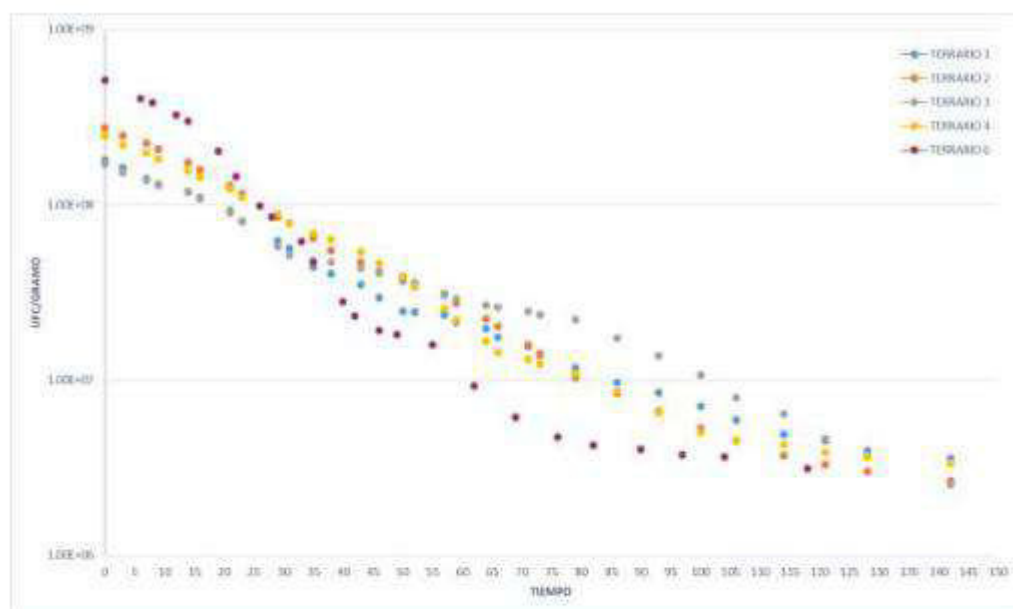

Dr. ABAD FLORES PAUCARIMA
 GERENTE DE INVESTIGACIÓN
 INNOVA BIOTECH AGRO SAC
 CBP 567



Tabla N° 7: Comparación del Conteo de UFC/mL de los promedios generales de los microorganismos del consorcio degradador por terrario.

TIEMPO	TERRARIO 1	TERRARIO 2	TERRARIO 3	TERRARIO 4	TERRARIO 6
0	1.80E+08	2.74E+08	1.70E+08	2.47E+08	5.15E+08
3	1.63E+08	2.48E+08	1.53E+08	2.18E+08	
6					4.02E+08
7	1.41E+08	2.26E+08	1.38E+08	1.97E+08	
8					3.81E+08
9	1.31E+08	2.08E+08	1.28E+08	1.83E+08	
12					3.26E+08
14	1.19E+08	1.75E+08	1.18E+08	1.56E+08	3.01E+08
16	1.09E+08	1.58E+08	1.10E+08	1.43E+08	
19					2.01E+08
21	9.21E+07	1.29E+08	8.99E+07	1.23E+08	
22					1.45E+08
23	8.09E+07	1.16E+08	8.01E+07	1.11E+08	
26					9.87E+07
28					8.50E+07
29	6.25E+07	8.55E+07	5.80E+07	8.87E+07	
31	5.65E+07	7.85E+07	5.14E+07	7.77E+07	
33					6.19E+07
35	4.41E+07	6.44E+07	4.79E+07	6.89E+07	4.69E+07
38	4.05E+07	5.47E+07	4.69E+07	6.35E+07	
40					2.80E+07
42					2.32E+07
43	3.49E+07	4.73E+07	4.35E+07	5.39E+07	
46	2.95E+07	4.15E+07	4.08E+07	4.64E+07	1.91E+07
49					1.81E+07
50	2.47E+07	3.80E+07	3.67E+07	3.89E+07	
52	2.44E+07	3.51E+07	3.59E+07	3.41E+07	
55					1.59E+07
57	2.37E+07	3.05E+07	3.11E+07	2.55E+07	
59	2.14E+07	2.75E+07	2.91E+07	2.19E+07	
62					9.28E+06
64	1.97E+07	2.24E+07	2.67E+07	1.66E+07	
66	1.76E+07	2.02E+07	2.61E+07	1.44E+07	
69					6.13E+06
71	1.56E+07	1.59E+07	2.48E+07	1.32E+07	
73	1.39E+07	1.42E+07	2.36E+07	1.23E+07	
76					4.75E+06
79	1.17E+07	1.03E+07	2.21E+07	1.09E+07	
82					4.24E+06
86	9.67E+06	8.42E+06	1.75E+07	8.61E+06	
90					4.01E+06
93	8.48E+06	6.68E+06	1.38E+07	6.52E+06	
97					3.76E+06
100	7.09E+06	5.30E+06	1.07E+07	5.04E+06	
104					3.64E+06
106	5.93E+06	4.51E+06	7.96E+06	4.54E+06	
114	4.88E+06	3.70E+06	6.41E+06	4.29E+06	
118					3.13E+06
121	4.51E+06	3.31E+06	4.66E+06	3.89E+06	
128	3.96E+06	3.01E+06	3.74E+06	3.63E+06	
142	3.56E+06	2.67E+06	2.54E+06	3.36E+06	

GRAFICO N° 7: COMPARACIÓN DEL CONTEO DE UFC/ML DE LOS PROMEDIOS GENERALES DE LOS MICROORGANISMOS DEL CONSORCIO DEGRADADOR POR TERRARIO.




INNOVA BIOTECH AGRO SAC
 JESSY YOLANDA CLAUDIO FONSECA
 Representante Legal

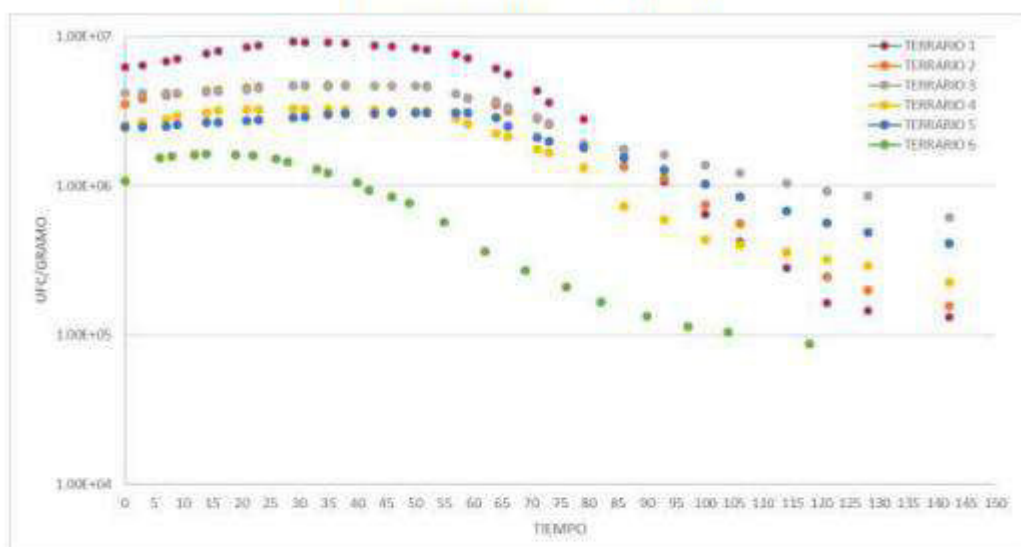

DR. ABAD FLORES PAUCARIMA
 GERENTE DE INVESTIGACIÓN
 INNOVA BIOTECH AGRO SAC
 CBP 567



Tabla N° 8: Comparación del Conteo de UFC/mL de los microorganismos heterótrofos viables por terrario.

TIEMPO	TERRARIO 1	TERRARIO 2	TERRARIO 3	TERRARIO 4	TERRARIO 5	TERRARIO 6
0	6.28E+06	3.53E+06	4.19E+06	2.54E+06	2.47E+06	1.08E+06
3	6.46E+06	3.85E+06	4.19E+06	2.66E+06	2.49E+06	
6						1.55E+06
7	6.84E+06	4.06E+06	4.19E+06	2.80E+06	2.51E+06	
8						1.57E+06
9	7.08E+06	4.13E+06	4.20E+06	2.94E+06	2.58E+06	
12						1.62E+06
14	7.72E+06	4.33E+06	4.24E+06	3.09E+06	2.66E+06	1.64E+06
16	7.97E+06	4.39E+06	4.28E+06	3.19E+06	2.67E+06	
19						1.62E+06
21	8.53E+06	4.54E+06	4.40E+06	3.26E+06	2.74E+06	
22						1.60E+06
23	8.71E+06	4.63E+06	4.48E+06	3.24E+06	2.78E+06	
26						1.51E+06
28						1.45E+06
29	9.25E+06	4.74E+06	4.66E+06	3.27E+06	2.88E+06	
31	9.20E+06	4.71E+06	4.65E+06	3.25E+06	2.91E+06	
33						1.29E+06
35	9.14E+06	4.71E+06	4.64E+06	3.26E+06	3.02E+06	1.21E+06
38	9.01E+06	4.71E+06	4.65E+06	3.24E+06	3.03E+06	
40						1.05E+06
42						9.27E+05
43	8.76E+06	4.67E+06	4.65E+06	3.23E+06	3.07E+06	
46	8.66E+06	4.68E+06	4.67E+06	3.17E+06	3.08E+06	8.50E+05
49						7.63E+05
50	8.39E+06	4.69E+06	4.67E+06	3.15E+06	3.07E+06	
52	8.19E+06	4.68E+06	4.60E+06	3.16E+06	3.10E+06	
55						5.70E+05
57	7.66E+06	4.14E+06	4.16E+06	2.84E+06	3.09E+06	
59	7.17E+06	3.85E+06	3.92E+06	2.59E+06	3.10E+06	
62						3.64E+05
64	6.12E+06	3.47E+06	3.72E+06	2.25E+06	2.86E+06	
66	5.60E+06	3.17E+06	3.37E+06	2.13E+06	2.52E+06	
69						2.70E+05
71	4.36E+06	2.88E+06	2.81E+06	1.75E+06	2.11E+06	
73	3.62E+06	2.56E+06	2.62E+06	1.67E+06	1.99E+06	
76						2.10E+05
79	2.78E+06	1.85E+06	1.91E+06	1.33E+06	1.80E+06	
82						1.66E+05
86	1.76E+06	1.35E+06	1.73E+06	7.33E+05	1.54E+06	
90						1.34E+05
93	1.07E+06	1.13E+06	1.61E+06	5.90E+05	1.28E+06	
97						1.14E+05
100	6.47E+05	7.47E+05	1.38E+06	4.39E+05	1.02E+06	
104						1.04E+05
106	4.20E+05	5.56E+05	1.22E+06	4.01E+05	8.40E+05	
114	2.82E+05	3.61E+05	1.04E+06	3.57E+05	6.79E+05	
118						8.70E+04
121	1.63E+05	2.47E+05	9.20E+05	3.22E+05	5.67E+05	
128	1.46E+05	2.00E+05	8.51E+05	2.91E+05	4.88E+05	
142	1.32E+05	1.56E+05	6.15E+05	2.26E+05	4.12E+05	

GRAFICO N° 8: COMPARACIÓN DEL CONTEO DE UFC/ML DE LOS MICROORGANISMOS HETERÓTROFOS VIABLES POR TERRARIO.




INNOVA BIOTECH AGRO SAC
 JESSI YOLANDA CLAUDIO FONSECA
 Representante Legal


Dr. ABAD FLORES PAUCARIMA
 GERENTE DE INVESTIGACIÓN
 INNOVA BIOTECH AGRO SAC
 CBP 567


INNOVA BIOTECH AGRO

Anexo 7. Ficha 6 – Registro de Resultados de Medición de Hidrocarburos.

		LABORATORIO DE ENSAYO ACREDITADO POR EL ORGANISMO INTERNATIONAL ACCREDITATION SERVICE, INC. - IAS CON REGISTRO TL - 829				LABORATORIO DE ENSAYO ACREDITADO POR EL ORGANISMO DE ACREDITACIÓN INACAL-DA CON REGISTRO N° LE - 047			
INFORME DE ENSAYO N° 175173-2023 CON VALOR OFICIAL									
RAZÓN SOCIAL		: UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA							
DOMICILIO LEGAL		: AV. TÚPAC AMARU NRO. 210 KM. 4.5 - RÍMAC - LIMA - LIMA							
SOLICITADO POR		: ENL. JAQUELINE CHIRRE FLORES							
REFERENCIA		: VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN							
PROCEDENCIA		: AV. TÚPAC AMARU NRO. 210 KM. 4.5 - RÍMAC - LIMA - LIMA							
FECHA(S) DE RECEPCIÓN DE MUESTRAS		: 2023-07-20							
FECHA(S) DE ANÁLISIS		: 2023-07-20 AL 2023-07-27							
FECHA(S) DE MUESTREO		: 2023-07-18							
MUESTREADO POR		: EL CLIENTE							
CONDICIÓN DE LA MUESTRA		: LOS RESULTADOS DE ANÁLISIS SE APLICAN A LA MUESTRA(S) TAL COMO SE RECIBIÓ.							
I. METODOLOGÍA DE ENSAYO:									
Total Petroleum Hydrocarbons (TPH): FRACCIÓN DE HIDROCARBUROS P1 (C ₉ -C ₁₁)		Método		EPA 8015 C, Nonhalogenated Organics by Gas Chromatography, Rev 3 / February 2007.		L.C.		Unidades	
Hidrocarburos totales de petróleo (TPH): FRACCIÓN DE HIDROCARBUROS P2 (C ₁₀ -C ₂₀)		Método		EPA 8015 C, Rev 3, Nonhalogenated Organics by Gas Chromatography, 2007		1.9		mg/kg	
Hidrocarburos totales de petróleo (TPH): FRACCIÓN DE HIDROCARBUROS P3 (C ₂₁ -C ₄₀)		Método		EPA 8015 C, Rev 3, Nonhalogenated Organics by Gas Chromatography, 2007		1.9		mg/kg	
L.C.: límite de cuantificación.									
II. RESULTADOS:									
Producto declarado		Suelo		Suelo		Suelo		Suelo	
Matriz analizada		Suelo		Suelo		Suelo		Suelo	
Fecha de muestreo		2023-07-18		2023-07-18		2023-07-18		2023-07-18	
Hora de inicio de muestreo (h)		15:00		15:00		15:00		15:00	
Condiciones de la muestra		Conservada		Conservada		Conservada		Conservada	
Código del Cliente		SEN-01		SEN-02		SEN-02		SEN-02	
Código del Laboratorio		23072787		23072787		23072787		23072787	
ENSAYO ACREDITADO ANTE IAS-829									
Ensayo		Unidades		Resultados		Resultados		Resultados	
Total Petroleum Hydrocarbons (TPH): FRACCIÓN DE HIDROCARBUROS P1 (C ₉ -C ₁₁)		mg/kg		38989.623		27508.091		27508.091	
ENSAYOS ACREDITADOS ANTE INACAL-DA (SEDE LIMA 1)									
Ensayo		Unidades		Resultados		Resultados		Resultados	
Hidrocarburos totales de petróleo (TPH): FRACCIÓN DE HIDROCARBUROS P2 (C ₁₀ -C ₂₀)		mg/kg		127817.4		155265.3		155265.3	
Hidrocarburos totales de petróleo (TPH): FRACCIÓN DE HIDROCARBUROS P3 (C ₂₁ -C ₄₀)		mg/kg		56374.1		88842.6		88842.6	
Resultados de Suelo reportados en base seca.									

Lima, 03 de Agosto del 2023.


ING. TELLO PAUCAR MARILU
SERVICIOS ANALÍTICOS GENERALES SAC
 Firmado con www.tocapu.pe

DIRECTOR TÉCNICO DE LABORATORIO

**EXPERTS
WORKING
FOR YOU**

Este informe de ensayo al estar en el marco de la acreditación del INACAL-DA y del Organismo Internacional de Acreditación-ISO, se encuentra dentro del ámbito de reconocimiento multilateral mutuo de los miembros firmantes de IAG e ILAC.

OBSERVACIONES: • Está prohibida la reproducción parcial o total del presente documento a menos que sea bajo la autorización expresa de Servicios Analíticos Generales S.A.C. • Los resultados emitidos en este documento sólo son válidos para las muestras referidas en el presente informe. • Las muestras serán conservadas de acuerdo al periodo de perechibilidad del parámetro analizado con un máximo de 30 días de haber ingresado las muestras al laboratorio. Luego será eliminadas.

IMPORTANTE: • Este documento fue emitido con firma electrónica de valor legal en formato PDF. Debe recibirla su documento electrónico para verificar la autenticidad. Puede comprobar la validez del informe haciendo clic sobre la firma, selecto un aviso. Validez de firma: "firma válida", de no validarse el documento es falso. Notifícase al correo: info@saagenerales.com si su informe ha sido autenticado.

SERVICIOS ANALÍTICOS GENERALES S.A.C.

Laboratorio: INACAL-DA (Sede Lima 1) y Organismo Internacional de Acreditación (IAS-829) de Naciones Unidas Nº 1565 (15), Chuaca Roca Norte - Lima y
 INACAL-DA (Sede Lima 2) - Pasaje Chaurina Norte de Tumbes Nº 2029 (15), Chuaca Roca Norte - Lima.

• Central telefónica: (511) 425-6800 • Web: www.saagenerales.com • Contacto Electrónico: saagenerales@saagenerales.com

Página 1 de 1

Tablas de HTP (g) em 139 dias.

	Terrario 1	Terrario 2	Terrario 3	Terrario 4
t (días)	m (g)	m (g)	m (g)	m(g)
0	1.6338	0.9219	0.7493	1.199
3	0.8837	0.9699	0.4368	0.6374
7	1.5337	1.0764	1.8297	0.7848
9	1.3777	1.0004	1.7144	0.5471
14	1.0322	0.6263	1.3418	0.6845
16	1.0877	0.7019	1.1690	0.4925
21	1.2040	0.7033	1.4874	0.6335
23	0.8018	0.6682	1.0292	0.432
29	0.6702	0.8706	0.7506	0.6543
31	0.8322	0.9524	1.1673	0.7897
33	0.4712	0.675	0.7125	0.406
35	0.5493	0.553	0.813	0.5872
40	0.655	0.6313	0.4911	0.4638
43	0.497	0.6841	0.635	0.5695
47	0.5579	0.8213	0.5971	0.5484
49	0.4618	0.9602	0.4891	0.4145

54	0.5713	0.7699	0.4125	0.671
56	0.5004	0.6723	0.3947	0.5143
61	0.5675	0.8871	0.3692	0.5439
63	0.5479	0.7593	0.734	0.6933
68	0.4017	0.5078	0.2515	0.392
70	0.2308	0.4495	0.2737	0.2961
76	0.3732	0.5951	0.4828	0.3264
84	0.4106	0.5074	0.3083	0.4893
90	0.4472	0.4618	0.5642	0.3449
97	0.5859	0.3891	0.4041	0.3137
103	0.3098	0.4149	0.3372	0.421
111	0.3475	0.4766	0.5299	0.3115
118	0.3621	0.3969	0.3735	0.3623
125	0.4648	0.4012	0.4157	0.3168
139	0.4345	0.6499	0.4159	0.4881

Resultados de las mediciones de HTP en el equipo Soxhlet durante 139 días.

Certificado



INACAL
Instituto Nacional
de Calidad
Acreditación

La Dirección de Acreditación del Instituto Nacional de Calidad – INACAL, en el marco de la Ley N° 30224, **OTORGA** el presente certificado de Renovación a:

SERVICIOS ANALÍTICOS GENERALES S.A.C.

Laboratorio de Ensayo

En su sede ubicada en: Av. Naciones Unidas N° 1565, Urb. Chacra Ríos Norte, distrito de Cercado de Lima, departamento de Lima.
Con base en la norma

NTP-ISO/IEC 17025:2017 Requisitos Generales para la Competencia de los Laboratorios de Ensayo y Calibración.

Facultándolo a emitir Informes de Ensayo con Símbolo de Acreditación. En el alcance de la acreditación otorgada que se detalla en el DA-acr-06P-21F que forma parte integral del presente certificado llevando el mismo número del registro indicado líneas abajo.

Fecha de Renovación: 25 de marzo de 2021

Fecha de Vencimiento: 24 de marzo de 2025



Firmado digitalmente por RODRIGUEZ ALEGRIA Alejandra FAU
20600283015 soft
Fecha: 2021-03-26 14:44:02
Motivo: Soy el Autor del Documento

ALEJANDRA RODRIGUEZ ALEGRÍA
Directora, Dirección de Acreditación - INACAL

Cédula N° : 0135-2021-INACAL
Contrato N° : N° 012-2021-INACAL-DA
Registro N° : LE-047

Fecha de emisión: 26 de marzo de 2021

El presente certificado tiene validez con su correspondiente Alcance de Acreditación y cédula de notificación dado que el alcance puede estar sujeto a ampliaciones, reducciones, actualizaciones y suspensiones temporales. El alcance y vigencia debe confirmarse en la página web www.inacal.gob.pe/acreditacion/categorias/acreditados al momento de hacer uso del presente certificado.

La Dirección de Acreditación del INACAL es firmante del Acuerdo de Reconocimiento Multilateral (MLA) de Inter American Accreditation Cooperation (IAAC) e International Accreditation Forum (IAF) y del Acuerdo de Reconocimiento Mutuo con la International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC).

DA-acr-01P-02M Ver. 02



CERTIFICATE OF ACCREDITATION

This is to attest that

SERVICIOS ANALITICOS GENERALES S.A.C.

AV. NACIONES UNIDAS 1565, CHACRA RIOS NORTE
LIMA 1, REPUBLIC OF PERU

Testing Laboratory TL-829

has met the requirements of AC89, IAS Accreditation Criteria for Testing Laboratories, and has demonstrated compliance with ISO/IEC Standard 17025:2017, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. This organization is accredited to provide the services specified in the scope of accreditation.

Effective Date October 14, 2022



IAS is an ILAC MRA Signatory

Qaj Nathan

President

Visit www.iasonline.org for current accreditation information.

Anexo 8. Ficha Técnica del Consorcio Bacteriano.



Instructions

Part# 5238, 5239, 5233

Ultra-Archaea® Shakers & Bulk Bags

Ultra-Archaea are designed to be applied directly into any system that requires bioremediation (grease traps, dumpsters, containment sumps, etc.). The microbes are housed in a clay powder carrier that keeps them supplied with enough moisture and oxygen to survive until they are deployed. Once deployed, the water may become slightly murky due to the clay powder carrier. This is normal, and should be expected.

Simply add the microbes (and water, if necessary) to the area that needs to be bioremediated. For maximum results, ensure that the microbes continue to receive oxygen (via a bubbler, occasional stirring or oxygen tablets) and are kept moist. Failure to keep the microbes moist will cause the colony to die out. The microbe colonies will live up to 90 days as long as there is a food source available for them to eat. Once the food source has been consumed, they will naturally die out.

Note: In some cases where there is constant addition of organic material, or where organic levels are very high, it

may be necessary to add more Ultra-Archaea at staggered time intervals to boost the colonies and their power to consume more waste.

In some applications, where water is not readily present (such as in dumpsters), the Ultra-Archaea can be dissolved in a bucket of water and then splashed or sprayed onto the affected areas. In these cases you will need to add microbes and water whenever the initial application dries out. For larger bioremediation projects (such as bioremediation marshlands or in open water), the Ultra-Archaea can be dissolved in 55-gallon drums of water and applied using an industrial sprayer.

Disclaimer: Ultra-Archaea are not a universal solution for all oil related clean-up applications. It is most effective when the amount of oil is lighter and more of a sheen. Thick layers of oil will require increased amounts of microbes and time to have any noticeable effect. We recommend you contact UltraTech or your local representative/distributor to learn more if your application is a good fit for microbes.

Precautions:

- + Keep Ultra-Archaea dry.
- + Ultra-Archaea can be used at temperatures between 32°F and 120°F. Temperatures outside that range may cause the Archaea to become ineffective.
- + Ultra-Archaea have a minimum storage temperature of -20°F.
- + Ultra-Archaea require a food source (any organic material, such as hydrocarbons, vegetative waste, sewage, fats, oils, grease, etc.), oxygen, and water/moisture to stay alive. Loss of any one of these three will cause the microbes to die off.
- + Ultra-Archaea colonies will naturally degrade in approximately 90 days.
- + Ultra-Archaea should not be exposed to radiation. This may cause the microbes to die.
- + Ultra-Archaea should only be used in applications where the pH is between 5.5 and 8.5.



UltraTech International, Inc. · 11542 Davis Creek Court, Jacksonville, Florida 32256 USA
(800) 353-1611 · 1-904-292-1611 · ultra-archaea.com

Anexo 9: Ficha Técnica de la Balanza Analítica.

Importación y Distribución

3scientific.com



BALANZA ANALITICA RANGO 0.0001 - 220 GR MOD: HZYN-224/323 MARCA 3S CIENTIFICO

Característica

- Estructura del sensor Sensor Super Monoblock
- Modo de calibración CAL interno completamente automático (tiempo y temperatura establecidos por el usuario para activar la calibración automáticamente)
- Nivel anti vibración Función ajustable anti vibración de seis niveles
- Carcasa Base de aluminio + Carcasa superior de ABS + Vidrio antiestático
- Pantalla táctil a color de alta resolución de 5"
- Tiempo estable 3-10 s Ajustable
- Unidad g, mg, ct, oz, ozt, dw, GN, lb, N, dr, dT, ds, dH, T (Tola), ms (Mesghal), bat, / lb (Partes por libra), mamá, kg Totalmente 19 unidades seleccionables y 2 unidades personalizables
- Interfaz RS232 + USB, opcional con función de comunicación inalámbrica
- Bloqueo del modo de pesaje Bloqueo automático del modo de pesaje
- Ajuste Underhook con Underhook
- Adaptador de corriente alterna
- Otra barra de progreso de capacidad, mediciones legibles en PC



Anexo 10. Ficha Técnica de Extractor Soxhlet.



EXTRACTOR SOXHLET

EXTRACTOR SOXHLET




Marca: **EUROLAB**

DESCRIPCIÓN:

- El Soxhlet es un aparato de laboratorio diseñado para extraer sustancias de baja solubilidad en el disolvente de extracción. En el extractor Soxhlet, la muestra se empapa de un disolvente caliente que se extrae periódicamente, se destila y se devuelve a la muestra. Durante cada ciclo, una porción del compuesto no volátil se disuelve en el disolvente. Después de muchos ciclos el compuesto deseado se concentra en el matraz de destilación. El disolvente del matraz se evapora y se mide la masa del líquido restante.

ESPECIFICACIONES:

Sistema	Extractor Soxhlet
Material	Vidrio borosilicato
Capacidad	Balón fondo plano de 500 ml
Marca	EUROLAB
Cuerpo extractor	Esmerilado: Macho 29/32 - Hembra 55/44
Refrigerante Dimroth	Esmerilado: Macho 55/44
Matraz fondo plano 500 ml	Esmerilado: Hembra 29/32

Extracción y Cuantificación de Hidrocarburos Totales de Petróleo Mediante el Método Soxhlet

La extracción mediante el método Soxhlet, es el procedimiento más utilizado para extraer compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles de sólidos como suelos, lodos y residuos.

Para extraer los hidrocarburos totales de petróleo presentes en suelos contaminados con hidrocarburos, se utiliza el método con reflujo Soxhlet tomando como referencia el **MÉTODO 3540C EPA**. El proceso asegura un contacto íntimo de la matriz de la muestra con el solvente de extracción.

Equipos y materiales

- . Balanza analítica
- . Hornilla eléctrica
- . Rotavapor
- . Estufa eléctrica
- . Termómetro digital
- . Equipo Soxhlet de 70 mL
- . Mangueras de polietileno
- . Desecador
- . Vasos precipitados 100 mL, 250 mL y 500 mL
- . Balones de base redonda de 250 mL
- . Probeta 100 mL
- . Cuchara espátula
- . Virutas de ebullición (pedazos chicos de vidrio)
- . Soporte Universal
- . Pinzas de tres dedos
- . Cristalizador de 500 mL

Reactivos

- . Diclorometano CH_2Cl_2 Merck
- . Sulfato de Sodio anhidro (Na_2SO_4) Sigma Aldrich

PROCEDIMIENTO

1. En un soporte universal metálico con ayuda de pinzas se sujeta el equipo Soxhlet y se instala las mangueras del refrigerante conectado al cristizador para el baño María en una cocinilla eléctrica.
2. Se arma un cartucho con papel de filtro para colocar dentro la muestra sólida con hidrocarburo.
3. Pesar 2 g. de sulfato de sodio anhidro y 2 g. de muestra en un vaso de 100 mL, luego mezclar con ayuda de una bagueta de vidrio, colocar la mezcla con ayuda de una cuchara espátula en un cartucho de papel de filtro y cerrarlo.
4. El cartucho de papel de filtro se coloca dentro del sifón del equipo Soxhlet.
5. Se agregó 70 mL del solvente diclorometano dentro del sifón del equipo Soxhlet y se coloca el refrigerante para cerrar el equipo completo Soxhlet (Figura 1).
6. Se encendió la cocinilla eléctrica y regulo la temperatura entre 40 °C - 50 °C para el baño maría, midiendo la temperatura con el digital.
7. El procedo de extracción de hidrocarburos con solvente diclorometano se realiza durante 5 a 12 horas.
8. Posteriormente, se procede a enfriar el equipo Soxhlet durante 1 hora para evitar el deterioro del material de vidrio, luego se extrae el agua del cristizador y se desmonta las partes del equipo.
9. Se retira el cartucho que se encuentra en el sifón y se coloca en el desecador, para luego ser pesado.
10. A continuación, se obtiene el solvente con hidrocarburos y se coloca en el balón de base redonda, sólo el balón es pesado en la balanza analítica y luego se añade el solvente concentrado, luego dicho solvente dentro del balón se coloca en un rotavapor a 35 °C en baño María y a una velocidad de rotación de 40 rpm, con un refrigerante que es agua a 10 °C en un chiller (Figura 2).
11. Después de la recuperación del solvente en el rotavapor, en el balón queda sólo el hidrocarburo que posteriormente se coloca en la estufa a 60 °C durante 2 horas, después el balón se envolvió en papel aluminio y se colocó al desecador hasta temperatura ambiente.
12. Luego el balón con el extracto concentrado se pesa en la balanza analítica, 3 veces y por diferencia de pesos, se obtuvo por gravimetría, la cantidad en gramos de hidrocarburos totales extraídos de la muestra de suelo contaminada con petróleo.

$$\text{HTP} = m(\text{hidrocarburos inicial}) - m(\text{hidrocarburo final}) \text{ (g)}$$



Extracción con el equipo Soxhlet



Anexo 11. Ficha Técnica de Medidor de CO₂ y Temperatura.

Carbon dioxide + Temperature , NDIR

CO₂ METER

Model : GC-2028

ISO-9001, CE, IEC1010



聯特力材料 084-2-5753179
聯特力電子(上海) 86-21-54151730
聯特力電子(廈門) 86-755-83298789
[Http://www.ltdy.com.tw](http://www.ltdy.com.tw)



聯特力材料
聯特力電子(上海)
聯特力電子(廈門)
[Http://www.ltdy.com.tw](http://www.ltdy.com.tw)



Lutron

LUTRON ELECTRONIC

The Art of Measurement

+ Temperature
CO₂ METER
 Model : GC-2028

聯絡力材料 886-3 5733170
 聯絡力電子(上海) 86-21-54181736
 聯絡力電子(廈門) 86-733-83206707
<http://www.16dy.com.tw>

FEATURES

• NDIR method principal for CO ₂ (Carbon dioxide) measurement, available for long term operation.
• High repeatability and high accuracy.
• Separate probe, easy operation and convenient for remote measurement.
• CO ₂ function with alarm setting.
• Large S-TN LCD, high contrast, easy readout.
• Data hold function for freezing the desired value on display.
• Records Maximum and Minimum readings with Recall.
• RS232/USB computer interface.
• Microprocessor circuit assures maximum possible accuracy, provides special functions and features.
• Heavy duty & compact housing with hard carrying case, designed for easy carry out & operation.
• Auto shut off is available to save battery life.
• Power supply from batteries or DC 9V adapter in.

GENERAL SPECIFICATIONS

Circuit	Custom one-chip of microprocessor LSI circuit.
Display	LCD size : 52 mm x 38 mm dual function LCD display.
Measurement	CO ₂ (Carbon dioxide), Temp.
Unit	ppm
Response Time	< 2 min. typically. @ Reach the 63% reading value @ Depend the environment air circulation.
CO ₂ altitude compensation setting	0 to 9,000 meters.
Temperature Compensation	Automatic temp. compensation.
Advanced setting	CO ₂ altitude value setting CO ₂ alarm value setting °C/°F setting Auto power off enable/disable setting
Alarm setting	For CO ₂ measurement only.
Data Hold	Freeze the display reading.
Memory Recall	Maximum & Minimum value.
Display Sampling Time	Approx. 1 second.
Power off	Auto shut off saves battery life or manual off by push button.

Data Output	RS 232/USB PC serial interface. * Connect the optional RS232 cable UPCB-02 will get the RS232 plug. * Connect the optional USB cable USB-01 will get the USB plug.
Operating Temperature	0 to 50 °C.
Operating Humidity	Main instrument : Less than 85% R.H. CO ₂ probe : Less than 85% R.H.
Power Supply	DC 1.5 V battery (UM3, AA) x 6 PCs, or equivalent.
Power Current	Approx. DC 9.6 mA for 90% period. Approx. DC 128 mA for 10% period.
Weight	Main instrument : 372 g/0.82 LB. @ Battery is included. CO ₂ probe : 158 g/0.35 LB.
Dimension	Main instrument : 173 x 68 x 42 mm (7.9 x 2.7 x 1.2 inch) CO ₂ Probe : 165 x 38 x 26 mm
Accessories Included	Instruction manual.....1 PC CO ₂ probe.....1 PC Hard Carrying case.....1 PC
Optional Accessories	RS232 cable, UPCB-02 USB cable, USB-01 Data Acquisition software, SW-U801-WIN

ELECTRICAL SPECIFICATIONS (23±5 °C)

CO₂ (Carbon dioxide)

CO ₂ (Carbon dioxide) 23 ± 5 °C.	Range	0 to 4,000 ppm
	Resolution	1 ppm
	Accuracy	± 40 ppm * ≤ 1,000 ppm. ± 5% of reading * > 1,000 ppm ≤ 3,000 ppm. ± 250 ppm typically * > 3,000 ppm, reference only
	Repeatability	± 20 ppm * ≤ 3,000 ppm.
Temperature	Range	0 °C to 50 °C, 32 °F to 122 °F.
	Resolution	0.1 degree
	Accuracy	°C - 0.8 °C, °F - 1.5 °F.

* Appearance and specifications listed in this brochure are subject to change without notice.

0807-GC2028

Anexo 12. Ficha Técnica del Diclorometano.

		www.sigmaaldrich.com
FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD		Versión 8.15
de acuerdo el Reglamento (CE) No. 1907/2006		Fecha de revisión 12.03.2025 Fecha de impresión 13.03.2025
GENERIC EU MSDS - NO COUNTRY SPECIFIC DATA - NO OEL DATA		
SECCIÓN 1. Identificación de la sustancia o la mezcla y de la sociedad o la empresa		
1.1 Identificadores del producto		
Nombre del producto	:	Diclorometano para analisis EMSURE® ACS,ISO,Reag. Ph Eur
Referencia	:	1.06050
Artículo número	:	106050
Marca	:	Millipore
No. Índice	:	602-004-00-3
REACH No.	:	01-2119480404-41-XXXX
No. CAS	:	75-09-2
1.2 Usos pertinentes identificados de la sustancia o de la mezcla y usos desaconsejados		
Usos identificados	:	Análisis químico
1.3 Datos del proveedor de la ficha de datos de seguridad		
Compañía	:	MERCK PERUANA S.A. PE Av. Los Frutales 220 3 LIMA PERU
Teléfono	:	+51 1 618-7500
Fax	:	+51 1 437-2955

1.4 Teléfono de emergencia

Teléfono de Urgencia : +(51)-17071295 (CHEMTREC Peru) En caso de urgencias: acúdase al Centro de Salud más cercano.

SECCIÓN 2. Identificación de los peligros

2.1 Clasificación de la sustancia o de la mezcla

Irritación cutáneas, (Categoría 2)	H315: Provoca irritación cutánea.
Irritación ocular, (Categoría 2)	H319: Provoca irritación ocular grave.
Carcinogenicidad, (Categoría 2)	H351: Se sospecha que provoca cáncer.
Toxicidad específica en determinados órganos - exposición única, (Categoría 3),	H336: Puede provocar somnolencia o vértigo.

Millipore® 1.06050

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the US and Canada

Página 1 de 14



Anexo 13. Ficha Técnica de la Estufa Eléctrica.

Model FD 56 | Drying and heating chambers with forced convection

A BINDER FD series Avantgarde.Line heating oven is always used when fast drying and sterilization is required. Thanks to its fully homogeneous temperature distribution, quick dynamics and powerful fan, this heating oven saves valuable time.

BENEFITS

- Best energy efficiency on the market
- Excellent temporal and spatial temperature accuracy
- USB connection for recording data
- Temperature range up to 300 °C



Model 56



Model 56

MAIN FEATURES

- Temperature range: ambient temperature plus 10 °C to 300 °C
- Up to 30% lower energy consumption compared to conventional units on the market
- High temperature accuracy thanks to APT.line™ technology
- Forced convection
- Controller with LCD display
- Electromechanical control of the exhaust air flap
- 2 chrome-plated racks
- Stackable
- Class 2 integrated independent adjustable temperature safety device (DIN 12880) with visual alarm
- Ergonomic handle design
- USB port for recording data

ORDERING INFORMATION

Interior volume [L]	Voltage	Option model	Version	Art.-No.
Model FD 56				
60	230 V 1~ ph 50/60 Hz	Standard	FD056-230V	9010-0303
	120 V 1~ ph 60 Hz	Standard	FD056LL-120V	9010-0304

Anexo 14. Termómetro Bimetálico de Acero Inoxidable.

FICHA TECNICA

Descripción del Instrumento

TERMÓMETRO BIMETALICO DE BOLSILLO EN ACERO INOXIDABLE 316

Características:

Los termómetros tipo bimetálico son de alta calidad
 Diales para fácil lectura - Herméticos
 Construidos totalmente en acero inoxidable
 Vástago sensor terminado en punta
 Norma ISO 9001
 Funda protectora del vástago con clip sujetador de bolsillo
 Especial para medir temperaturas en todo tipo
 de productos y fluidos

Especificaciones:

Tamaño del dial : 1" (2.5cm) de diámetro
 Tamaño y diám. Vástago : 5" largo (130 x 4mm)
 Vástago : Posterior (Horizontal)

Rangos de medición:

Rangos : -40 + 70 °C : 2°C - **Temperatura 1**
 : 0 + 150 °C : 2°C - **Temperatura 2**
 : 0 + 250 °C : 2°C - **Temperatura 3**
 Exactitud : (+ -) 2 °C

Marca: "TESS"



Anexo 15. Certificado de Calidad del Rotavapor.

CERTIFICATE

of
Quality Tested by Manufacturer
and Free Warranty up to 2 years
for Laboratory Instrument

Limited Warranty

1. This instrument has gone through our testing process about all functions before shipment.
2. This instrument is warranted for 2 years from purchasing date.
3. A breakdown caused by customer's improper use or natural disaster is excepted from this warranty.
4. This certification is only for international customers.

Item	Digital Rotary Evaporator
Model No.	WEV-1001
Serial No.	
Date	
Customer	

DAIHAN Scientific Co., Ltd.
 326, Sinpyeongseokhwa-ro, Jijeong-myeon,
 Wonji-st, Gangwon-do, Korea
 Tel : +82 2 967 5235
 Fax : +82 963 5231
 email : info@daihansci.co.kr
www.DAIHAN-Sci.com
www.ALLforLAB.com



DAIHAN-Sci.com or ALL for LAB.com Shopping Mall



Digital Rotary Evaporator

Certifications by...

- ☑ CE Marked Products.
- ☑ ISO 9001 Certified.
- ☑ PL Insurance. (Product Liability Insurance)

◇ English Page : P. 1 ~ 27

◇ Korean Page : P. 28 ~ 55

User Manual

(Version 2.2.1)

written for
WEV-1001V/-1001L Models



Digital Rotary Evaporator, Diagonal-type
" WEV-1001L "



Digital Rotary Evaporator, Vertical-type
" WEV-1001V "

Sales & Basic A/S :
By the Nearest Official Distributors.



Man. 227 (20 Jun. 2016)

Anexo 16. Análisis de Calidad de Sulfato de Sodio Anhidro.


www.sigmastdrich.com

FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD

de acuerdo el Reglamento (CE) No. 1907/2006

Versión 7.0
 Fecha de revisión 04.02.2025
 Fecha de impresión 08.02.2025
 GENERIC EU MSDS - NO COUNTRY SPECIFIC DATA - NO OEL DATA

SECCIÓN 1. Identificación de la sustancia o la mezcla y de la sociedad o la empresa

1.1 Identificadores del producto

Nombre del producto : Sodio sulfato anhidro p.a. EMSURE®
 ACS,ISO,Reag. Ph Eur

Referencia : 1.06649
 Artículo número : 106649
 Marca : Millipore
 REACH No. : 01-2119519226-43-XXXX
 No. CAS : 7757-82-6

1.2 Usos pertinentes identificados de la sustancia o de la mezcla y usos desaconsejados

Usos identificados : Análisis químico

1.3 Datos del proveedor de la ficha de datos de seguridad

Compañía : MERCK PERUANA S.A. PE
 Av. Los Frutales 220
 3 LIMA
 PERU

Teléfono : +51 1 618-7500
 Fax : +51 1 437-2955

1.4 Teléfono de emergencia

Teléfono de Urgencia : +(51)-17071295 (CHEMTREC Peru) En caso de urgencias: acúdase al Centro de Salud más cercano.

SECCIÓN 2. Identificación de los peligros

2.1 Clasificación de la sustancia o de la mezcla

No es una sustancia o mezcla peligrosa de acuerdo con el Reglamento (CE) No. 1272/2008.

2.2 Elementos de la etiqueta

No es necesario pictograma(s) de peligro, palabra de advertencia, indicación(es) de peligro ni consejos de prudencia.

Millipore- 1.06649

Página 1 de 11

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the US and Canada





Specification

1.06649.0500 Sodium sulfate anhydrous for analysis EMSURE® ACS,ISO,Reag. Ph Eur

Spec. Values		
Assay (alkalimetric)	≥ 99.0	%
Assay (alkalimetric, calculated on dried substance)	98.5 - 101.0	%
Identity	passes test	
Appearance of solution	passes test	
Insoluble matter	≤ 0.01	%
Acidity or alkalinity	passes test	
pH-value (5 %; water; 25 °C)	5.2 - 8.0	
Chloride (Cl)	≤ 0.001	%
Phosphate (PO ₄)	≤ 0.001	%
Total nitrogen (N)	≤ 0.0005	%
Heavy metals (ACS)	≤ 0.0005	%
Heavy metals (as Pb)	≤ 0.0005	%
As (Arsenic)	≤ 0.0001	%
Ca (Calcium)	≤ 0.005	%
Fe (Iron)	≤ 0.0005	%
K (Potassium)	≤ 0.002	%
Mg (Magnesium)	≤ 0.001	%
Loss on drying (130 °C)	≤ 0.5	%
Loss on ignition (800 °C)	≤ 0.5	%

Kristin Starke

Responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature.

Anexo 17. Ficha Técnica de la Balanza Analítica.

Importación y Distribución

3scientific.com



BALANZA ANALITICA RANGO 0.0001 - 220 GR MOD: HZYN-224/323 MARCA 3S CIENTIFIC

Característica

- Estructura del sensor Sensor Super Monoblock
- Modo de calibración CAL interno completamente automático (tiempo y temperatura establecidos por el usuario para activar la calibración automáticamente)
- Nivel anti vibración Función ajustable anti vibración de seis niveles
- Carcasa Base de aluminio + Carcasa superior de ABS + Vidrio antiestático
- Pantalla táctil a color de alta resolución de 5"
- Tiempo estable 3-10 s Ajustable
- Unidad g, mg, ct, oz, ozt, dwz, GN, lb, N, dr, dT, dS, dH, T (Tola), ms (Mesghal), bax, /lb (Partes por libra), mama, kg Totalmente 19 unidades seleccionables y 2 unidades personalizables
- Interfaz RS232 + USB, opcional con función de comunicación inalámbrica
- Bloqueo del modo de pesaje Bloqueo automático del modo de pesaje
- Ajuste Underhook con Underhook
- Adaptador de corriente alterna
- Otra barra de progreso de capacidad, mediciones legibles en PC



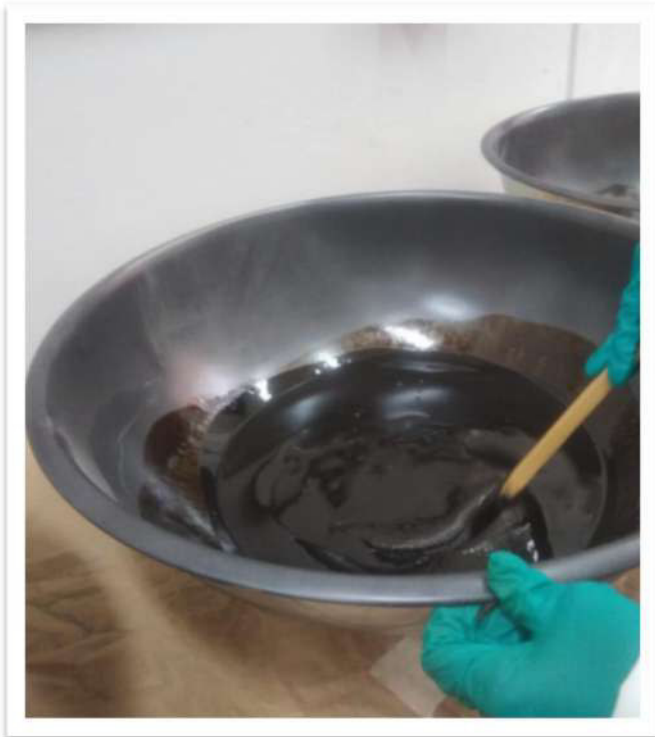
Anexo 18. Fotos de los Terrarios Analizados.



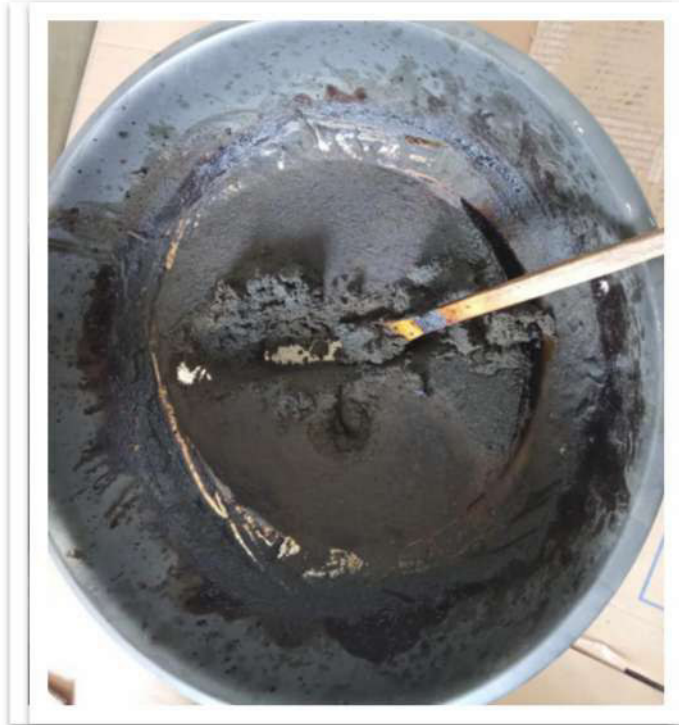
Terrarios de suelos contaminados con petróleo crudo 08/2023

Terrarios de suelos contaminados con petróleo crudo 09/2023





Terrarios de suelos contaminados con petróleo
crudo 11/2023



Anexo 19: Registro de Datos Estadísticos – Soxhlet 3540 EPA.

Librerías para usar

```
#carga de librerías
library(readxl)
library(rgl)
library(olsrr)
library(tidyverse)
library(nortest)
library(knitr)
library(rstudioapi)
ruta <- dirname(rstudioapi::getActiveDocumentContext())$path
setwd(ruta)
```

Carga de Información

```
base_1=read_excel("Datos.xlsx",sheet="Hoja1")
base_2=read_excel("Datos.xlsx",sheet="Hoja2")
base_2=data.frame(sapply(base_2, as.numeric) )
colnames(base_1)=c("t","ter_1","ter_2","ter_3","ter_4")
colnames(base_2)=c("t","ufc_1","ufc_2","ufc_3","ufc_4")
```

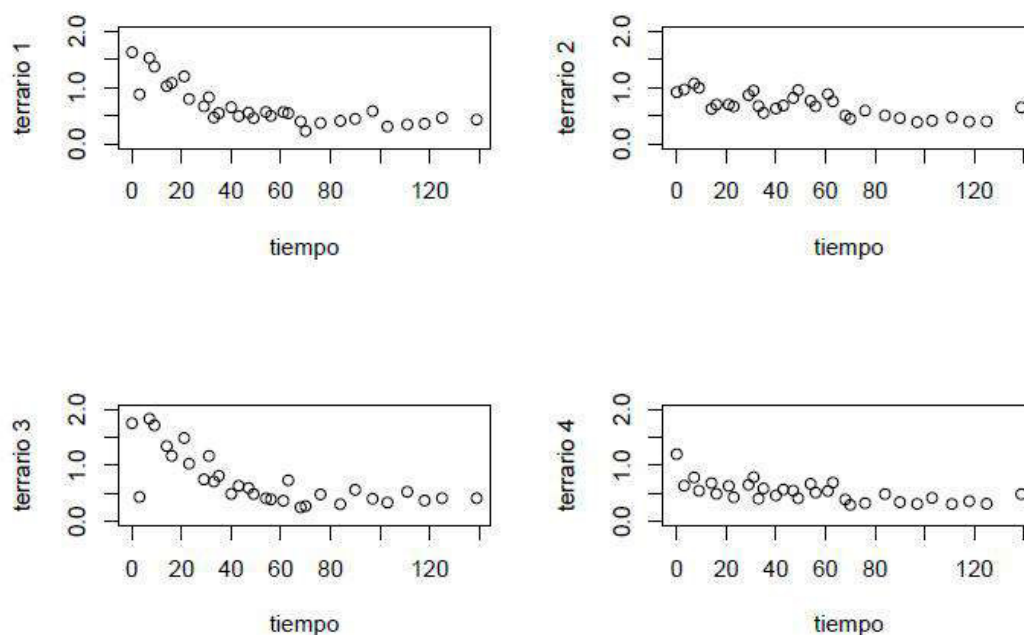
Análisis con Outliers

Tiempo (s) vs. Terrario (g)

Análisis preliminar

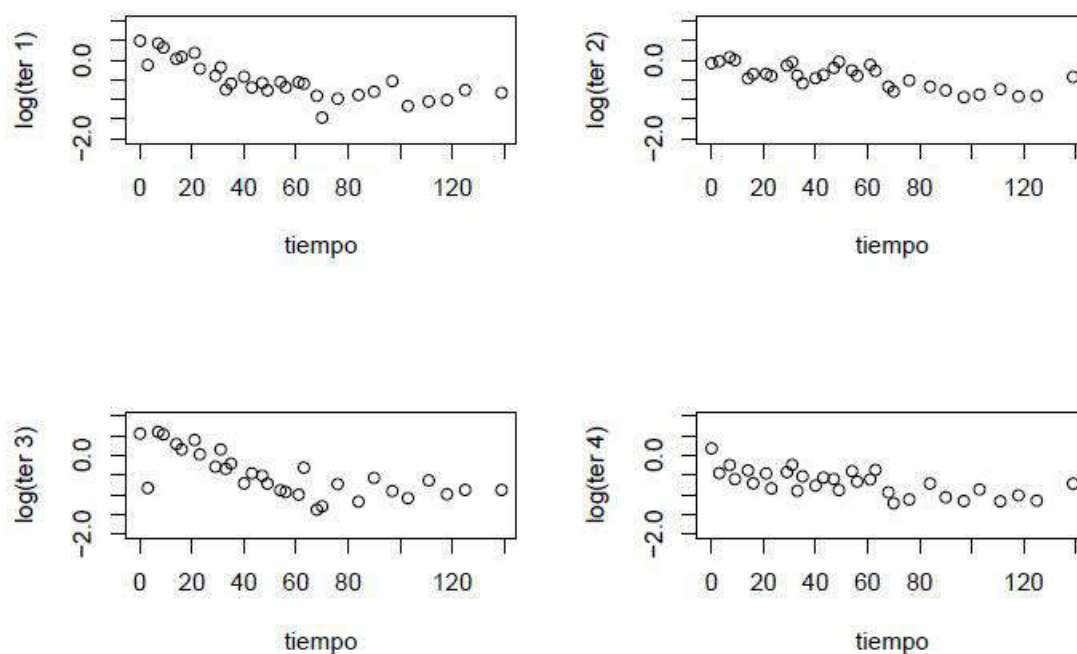
Se realizan unos gráficos de dispersión para examinar las relaciones de manera preliminar:

```
par(mfrow=c(2,2))
plot(x=base_1$t,y=base_1$ter_1,xlab="tiempo",ylab="terrario 1",ylim=c(0,2))
plot(x=base_1$t,y=base_1$ter_2,xlab="tiempo",ylab="terrario 2",ylim=c(0,2))
plot(x=base_1$t,y=base_1$ter_3,xlab="tiempo",ylab="terrario 3",ylim=c(0,2))
plot(x=base_1$t,y=base_1$ter_4,xlab="tiempo",ylab="terrario 4",ylim=c(0,2))
```



Donde aparentan un comportamiento del tipo exponencial; además, se observan valores atípicos, como los siguientes: en el terrario 1 y 3, el dato 2; mientras que en los demás, el último dato. Sacando logaritmo, se observa un comportamiento lineal:

```
par(mfrow=c(2,2))
plot(x=base_1$t,y=log(base_1$ter_1),xlab="tiempo",ylab="log(ter 1)",ylim=c(-2,1))
plot(x=base_1$t,y=log(base_1$ter_2),xlab="tiempo",ylab="log(ter 2)",ylim=c(-2,1))
plot(x=base_1$t,y=log(base_1$ter_3),xlab="tiempo",ylab="log(ter 3)",ylim=c(-2,1))
plot(x=base_1$t,y=log(base_1$ter_4),xlab="tiempo",ylab="log(ter 4)",ylim=c(-2,1))
```



Modelamiento

Para el modelamiento, se consideran los datos atípicos. Se extrae la matriz de correlación:

```
base1=cbind(base_1$t,log(base_1[,c(2:5)]))
colnames(base1)=c("t","l1","l2","l3","l4")
#matriz de correlacion
cor(base1)
```

```
##           t           l1           l2           l3           l4
## t    1.0000000 -0.7727206 -0.7417455 -0.7053378 -0.6788210
## l1 -0.7727206  1.0000000  0.6702216  0.8626650  0.7355757
## l2 -0.7417455  0.6702216  1.0000000  0.5700833  0.7442030
## l3 -0.7053378  0.8626650  0.5700833  1.0000000  0.6323293
## l4 -0.6788210  0.7355757  0.7442030  0.6323293  1.0000000
```

Donde se observa que existe una marcada correlación lineal entre el tiempo y cada uno de los logaritmos medidos en cada terrario (valor mayor a 6.0).

Se propone:

$$\log(ter_i) = \beta_0 + \beta_1 \times t + \varepsilon$$

Donde $i = 1, 2, 3, 4$ y ter indican la medida en el terrario i ; t es el tiempo, mientras que ε es el error aleatorio. Ejecutando las regresiones, se tiene:

```
mod1=summary(lm(l1~t,data=base1))
mod2=summary(lm(l2~t,data=base1))
mod3=summary(lm(l3~t,data=base1))
mod4=summary(lm(l4~t,data=base1))
c1 <- c(mod1$r.squared,mod2$r.squared,mod3$r.squared,mod4$r.squared)
c2 <- rbind(t(mod1$coefficients[1:2,1]),t(mod2$coefficients[1:2,1]),
            t(mod3$coefficients[1:2,1]),t(mod4$coefficients[1:2,1]))
c3 <- rbind(t(mod1$coefficients[1:2,4]),t(mod2$coefficients[1:2,4]),
            t(mod3$coefficients[1:2,4]),t(mod4$coefficients[1:2,4]))
c4 <- c(pf(mod1$fstatistic[1],1,29,lower.tail = FALSE),
        pf(mod2$fstatistic[1],1,29,lower.tail = FALSE),
        pf(mod3$fstatistic[1],1,29,lower.tail = FALSE),
        pf(mod4$fstatistic[1],1,29,lower.tail = FALSE))
table <-round(data.frame(cbind(c1,c2,c3,c4)),4)
names(table) <- c("R²","beta_0","beta_1","pv-beta_0","pv-beta_1","pv-global")
rownames(table) <- c("Terrario 1","Terrario 2","Terrario 3","Terrario 4")
kable(table, format = "markdown", caption = "Resumen de la regresión",align="c")
```

Tabla. Resumen de la regresión terrario vs. tiempo

	R ²	beta_0	beta_1	pv-beta_0	pv-beta_1	pv-global
Terrario 1	0.5971	0.0182	-0.0097	0.8554	0	0
Terrario 2	0.5502	-0.1008	-0.0059	0.1380	0	0
Terrario 3	0.4975	0.1017	-0.0106	0.4475	0	0
Terrario 4	0.4608	-0.3732	-0.0058	0.0001	0	0

Donde el valor de p, valor 0, indica que este es muy pequeño: menor a 0.005. Se observa que la regresión es significativa en todos los casos; sin embargo, en algunos el término independiente no es significativo, razón por la cual se vuelve a calcular las regresiones:

```
mod1=summary(lm(l1~0+t,data=base1))
mod2=summary(lm(l2~0+t,data=base1))
mod3=summary(lm(l3~0+t,data=base1))
mod4=summary(lm(l4~t,data=base1))
c1 <- c(mod1$r.squared,mod2$r.squared,mod3$r.squared,mod4$r.squared)
c2 <- rbind(c(NA,mod1$coefficients[1,1]),c(NA,mod2$coefficients[1,1]),
            c(NA,mod3$coefficients[1,1]),t(mod4$coefficients[1:2,1]))
c3 <- rbind(c(NA,mod1$coefficients[1,4]),c(NA,mod2$coefficients[1,4]),
            c(NA,mod3$coefficients[1,4]),t(mod4$coefficients[1:2,4]))
c4 <- c(pf(mod1$fstatistic[1],1,30,lower.tail = FALSE),
        pf(mod2$fstatistic[1],1,30,lower.tail = FALSE),
        pf(mod3$fstatistic[1],1,30,lower.tail = FALSE),
        pf(mod4$fstatistic[1],1,29,lower.tail = FALSE))
table <- round(data.frame(cbind(c1,c2,c3,c4)),4)
names(table) <- c("R²","beta_0","beta_1","pv-beta_0","pv-beta_1","pv-global")
rownames(table) <- c("Terrario 1","Terrario 2","Terrario 3","Terrario 4")
kable(table, format = "markdown", caption = "Resumen de la regresión",align="c")
```

Tabla. Resumen de la regresión terrario vs. tiempo, con p valor significativos

	R ²	beta_0	beta_1	pv-beta_0	pv-beta_1	pv-global
Terrario 1	0.8162	NA	-0.0095	NA	0	0
Terrario 2	0.8393	NA	-0.0071	NA	0	0
Terrario 3	0.7032	NA	-0.0093	NA	0	0
Terrario 4	0.4608	-0.3732	-0.0058	1e-04	0	0

Donde el valor de p, valor 0, indica que este es muy pequeño: menor a 0.005. Se observan mejoras en R². Se analiza también si se verifica la normalidad a través de una prueba paramétrica (Shapiro-Willks) y una prueba no paramétrica (Lilliefors) en los residuos, a través de su p-valor:

```
#Prueba paramétrica
tab_norm_11 <- data.frame(rbind(c("Terrario 1","Terrario 2","Terrario 3","Terrario 4"),
    round(c(shapiro.test(resid(mod1))$p.value,shapiro.test(resid(mod2))$p.value,
    shapiro.test(resid(mod3))$p.value,shapiro.test(resid(mod4))$p.value),3)))
colnames(tab_norm_11) <- c("", "", "", "")
print(tab_norm_11)
```

```
##
## 1 Terrario 1 Terrario 2 Terrario 3 Terrario 4
## 2      0.18      0.371      0.292      0.552
```

Donde se observa que todos los valores son mayores a 0.05, con lo que no se rechaza la hipótesis nula de normalidad, cumpliendo así este supuesto.

```
#Prueba no paramétrica
tab_norm_12 <- data.frame(rbind(c("Terrario 1","Terrario 2","Terrario 3","Terrario 4"),
    round(c(lillie.test(resid(mod1))$p.value,lillie.test(resid(mod2))$p.value,
    lillie.test(resid(mod3))$p.value,lillie.test(resid(mod4))$p.value),3)))
colnames(tab_norm_12) <- c("", "", "", "")
print(tab_norm_12)
```

```
##
## 1 Terrario 1 Terrario 2 Terrario 3 Terrario 4
## 2      0.334      0.68      0.366      0.391
```

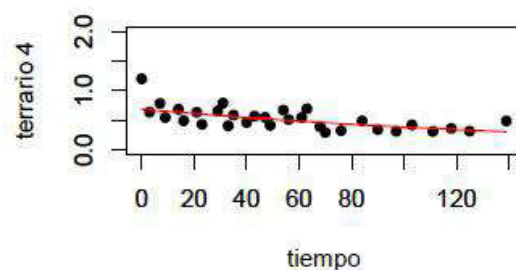
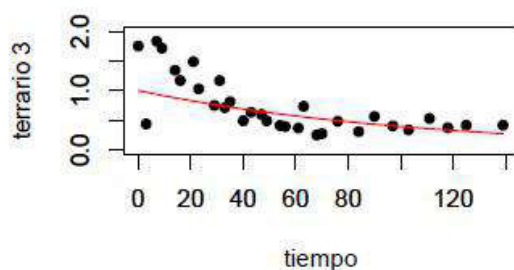
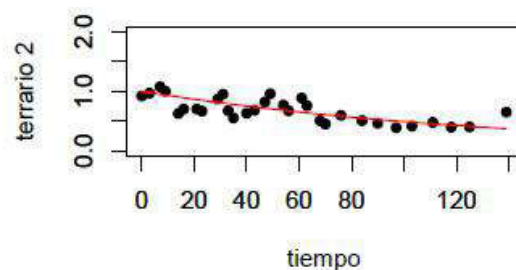
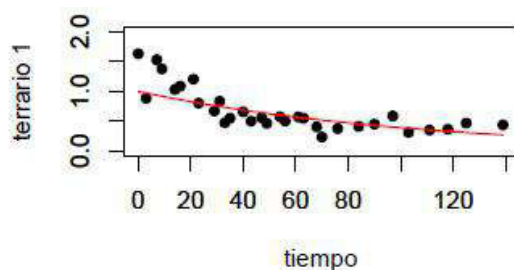
Donde se observa que todos los valores son mayores a 0.05, con lo que no se rechaza la hipótesis nula de normalidad, cumpliendo así este supuesto.

Visualización de resultados

Se puede realizar el gráfico de la curva exponencial correspondiente en cada caso:

```
par(mfrow=c(2,2))
plot(x=base_1$t,y=base_1$ter_1,xlab="tiempo",ylab="terrario 1",ylim=c(0,2),pch=16)
par(new=TRUE)
plot(x=base_1$t,y=exp(mod1$coefficients[1,1]*base_1$t),
     xlab="",ylab="",ylim=c(0,2),type="l",col="red")

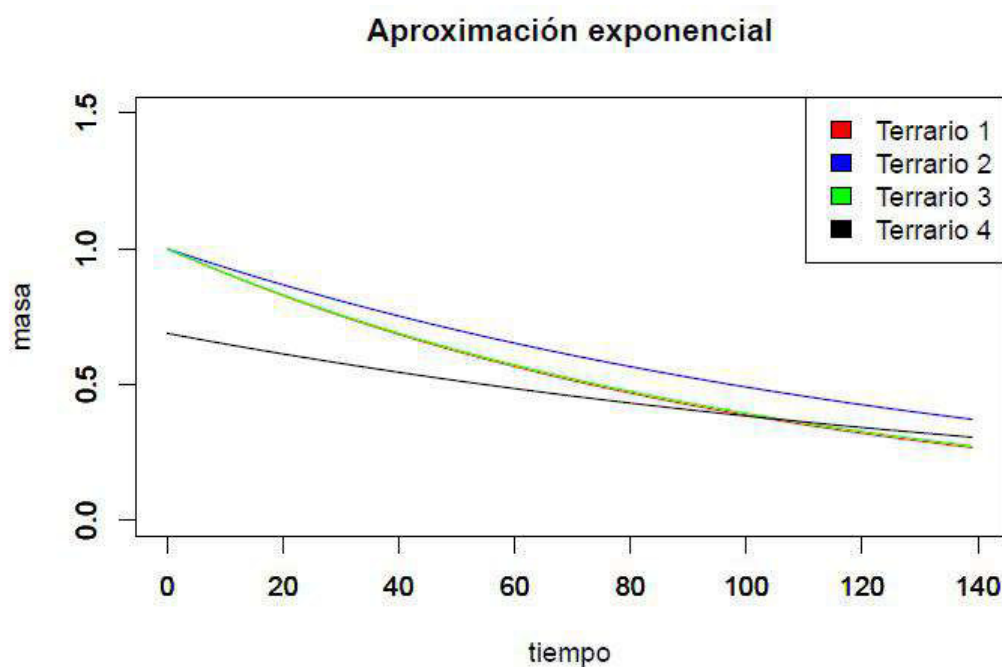
plot(x=base_1$t,y=base_1$ter_2,xlab="tiempo",ylab="terrario 2",ylim=c(0,2),pch=16)
par(new=TRUE)
plot(x=base_1$t,y=exp(mod2$coefficients[1,1]*base_1$t),
     xlab="",ylab="",ylim=c(0,2),type="l",col="red")
plot(x=base_1$t,y=base_1$ter_3,xlab="tiempo",ylab="terrario 3",ylim=c(0,2),pch=16)
par(new=TRUE)
plot(x=base_1$t,y=exp(mod3$coefficients[1,1]*base_1$t),
     xlab="",ylab="",ylim=c(0,2),type="l",col="red")
plot(x=base_1$t,y=base_1$ter_4,xlab="tiempo",ylab="terrario 4",ylim=c(0,2),pch=16)
par(new=TRUE)
plot(x=base_1$t,y=exp(mod4$coefficients[1,1])*exp(mod4$coefficients[2,1]*base_1$t),
     xlab="",ylab="",ylim=c(0,2),type="l",col="red")
```



Asimismo, se puede observar las curvas exponenciales estimadas:

```
plot(x=base_1$t,y=exp(mod1$coefficients[1,1]*base_1$t),
     xlab="tiempo",ylab="masa",ylim=c(0,1.5),type="l",col="red",
     main="Aproximación exponencial")

par(new=TRUE)
plot(x=base_1$t,y=exp(mod2$coefficients[1,1]*base_1$t),
     xlab="",ylab="",ylim=c(0,1.5),type="l",col="blue")
par(new=TRUE)
plot(x=base_1$t,y=exp(mod3$coefficients[1,1]*base_1$t),
     xlab="",ylab="",ylim=c(0,1.5),type="l",col="green")
par(new=TRUE)
plot(x=base_1$t,y=exp(mod4$coefficients[1,1])*exp(mod4$coefficients[2,1]*base_1$t),
     xlab="",ylab="",ylim=c(0,1.5),type="l",col="black")
legend(x = "topright", legend = c("Terrario 1", "Terrario 2",
    "Terrario 3","Terrario 4"),fill = c("red", "blue","green","black"))
```

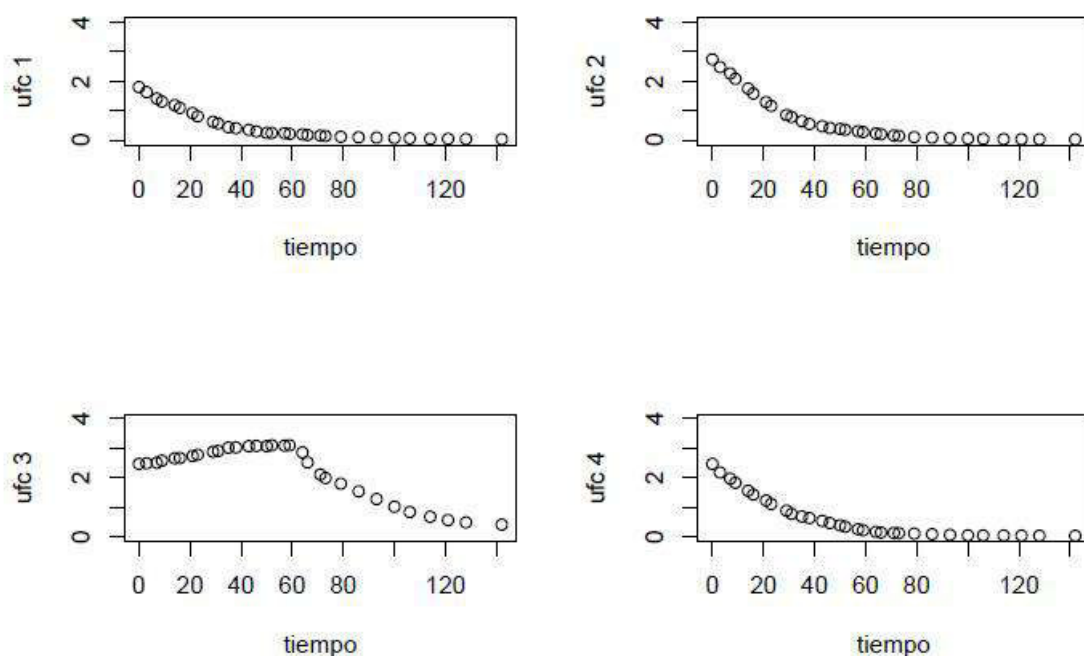


Tiempo vs. Ufc

Análisis preliminar

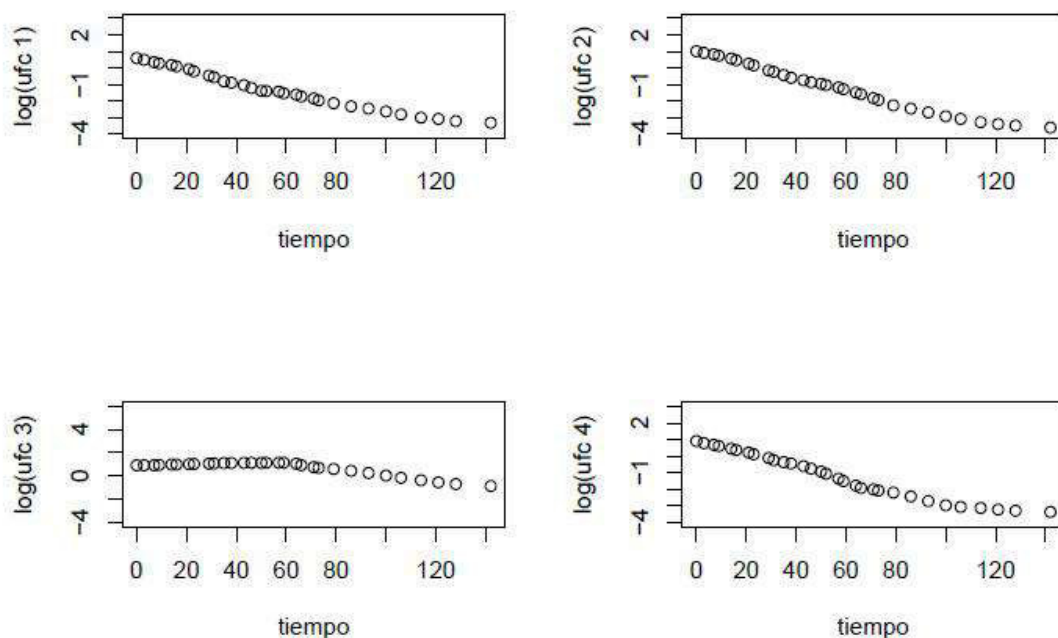
Se realiza una gráfica de dispersión para evaluar las relaciones preliminares.

```
par(mfrow=c(2,2))
plot(x=base_2$t,y=base_2$ufc_1,xlab="tiempo",ylab="ufc 1",ylim=c(0,4))
plot(x=base_2$t,y=base_2$ufc_2,xlab="tiempo",ylab="ufc 2",ylim=c(0,4))
plot(x=base_2$t,y=base_2$ufc_3,xlab="tiempo",ylab="ufc 3",ylim=c(0,4))
plot(x=base_2$t,y=base_2$ufc_4,xlab="tiempo",ylab="ufc 4",ylim=c(0,4))
```



Donde aparentan un comportamiento del tipo exponencial, sacando logaritmo.

```
par(mfrow=c(2,2))
plot(x=base_2$t,y=log(base_2$ufc_1),xlab="tiempo",ylab="log(ufc 1)",ylim=c(-4,3))
plot(x=base_2$t,y=log(base_2$ufc_2),xlab="tiempo",ylab="log(ufc 2)",ylim=c(-4,3))
plot(x=base_2$t,y=log(base_2$ufc_3),xlab="tiempo",ylab="log(ufc 3)",ylim=c(-4,6))
plot(x=base_2$t,y=log(base_2$ufc_4),xlab="tiempo",ylab="log(ufc 4)",ylim=c(-4,3))
```



Donde se observa un dato atípico en ufc 3 (dato 15). Se analizan las correlaciones:

```
base2=cbind(base_2$t,log(base_2[,c(2:5)]))
colnames(base2)=c("t","11","12","13","14")
#matriz de correlacion
cor(base2)
```

```
##           t           11           12           13           14
## t    1.0000000 -0.9880266 -0.9919698 -0.8492208 -0.9842355
## 11 -0.9880266  1.0000000  0.9969834  0.7686893  0.9925222
## 12 -0.9919698  0.9969834  1.0000000  0.8001751  0.9956584
## 13 -0.8492208  0.7686893  0.8001751  1.0000000  0.7752686
## 14 -0.9842355  0.9925222  0.9956584  0.7752686  1.0000000
```

Donde se observa que existe una marcada correlación lineal entre el tiempo y cada uno de los logaritmos de los valores medidos en cada ufc (valor absoluto mayor a 0.6).

Modelamiento

Para el modelamiento, se consideran los datos atípicos. Se propone:

$$\log(ufc_i) = \beta_0 + \beta_1 \times t + \varepsilon$$

Donde $i = 1, 2, 3, 4$ y ufc_i indica la medida en el ufc_i , t es el tiempo, mientras que ε es el error aleatorio. Ejecutando las regresiones tenemos:

```
mod11=summary(lm(l1~t,data=base2))
mod21=summary(lm(l2~t,data=base2))
mod31=summary(lm(l3~t,data=base2))
mod41=summary(lm(l4~t,data=base2))
c1 <- c(mod11$r.squared,mod21$r.squared,mod31$r.squared,mod41$r.squared)
c2 <- rbind(t(mod11$coefficients[1:2,1]),t(mod21$coefficients[1:2,1]),
            t(mod31$coefficients[1:2,1]),t(mod41$coefficients[1:2,1]))
c3 <- rbind(t(mod11$coefficients[1:2,4]),t(mod21$coefficients[1:2,4]),
            t(mod31$coefficients[1:2,4]),t(mod41$coefficients[1:2,4]))
c4 <- c(pf(mod11$fstatistic[1],1,29,lower.tail = FALSE),
        pf(mod21$fstatistic[1],1,29,lower.tail = FALSE),
        pf(mod31$fstatistic[1],1,29,lower.tail = FALSE),
        pf(mod41$fstatistic[1],1,29,lower.tail = FALSE))
table <- round(data.frame(cbind(c1,c2,c3,c4)),4)
names(table) <- c("R²","beta_0","beta_1","pv-beta_0","pv-beta_1","pv-global")
rownames(table) <- c("Ufc 1","Ufc 2","Ufc 3","Ufc 4")
kable(table, format = "markdown", caption = "Resumen de la regresión",align="c")
```

Tabla. Resumen de la regresión Ufc(UFC/mL) vs. tiempo(días)

	R²	beta_0	beta_1	pv-beta_0	pv-beta_1	pv-global
Ufc 1	0.9762	0.3763	-0.0299	0	0	0
Ufc 2	0.9840	0.9064	-0.0366	0	0	0
Ufc 3	0.7212	1.4229	-0.0132	0	0	0
Ufc 4	0.9687	0.7889	-0.0351	0	0	0

Donde el valor de p, valor 0, indica que este es muy pequeño: menor a 0.005; además el R^2 es elevado en todos los casos. Se observa que la regresión es significativa en todos los casos. Se analiza también si se verifica la normalidad a través de una prueba paramétrica (ShapiroWilk) y una prueba no paramétrica (Lilliefors) en los residuos, a través de su p-valor:

```
#Prueba paramétrica
tab_norm_21 <- data.frame(rbind(c("ufc 1","ufc 2","ufc 3","ufc 4"),
  round(c(shapiro.test(resid(mod11))$p.value,shapiro.test(resid(mod21))$p.value,
    shapiro.test(resid(mod31))$p.value,shapiro.test(resid(mod41))$p.value),3)))
colnames(tab_norm_21) <- c("","","","")
print(tab_norm_21)

##
## 1 ufc 1 ufc 2 ufc 3 ufc 4
## 2 0.018 0.004 0.052 0.006
```

Donde se observa que todos los valores son menores o casi iguales a 0.05, con lo que se rechaza la hipótesis nula de normalidad, no cumpliendo así este supuesto.

```
#Prueba no paramétrica
tab_norm_22<- data.frame(rbind(c("ufc 1","ufc 2","ufc 3","ufc 4"),
  round(c(lillie.test(resid(mod11))$p.value,lillie.test(resid(mod21))$p.value,
    lillie.test(resid(mod31))$p.value,lillie.test(resid(mod41))$p.value),3)))
colnames(tab_norm_22) <- c("","","","")
print(tab_norm_22)

##
## 1 ufc 1 ufc 2 ufc 3 ufc 4
## 2 0.104 0.076 0.306 0.023
```

Donde se observa que en solo un caso se rechaza la hipótesis nula de no normalidad.

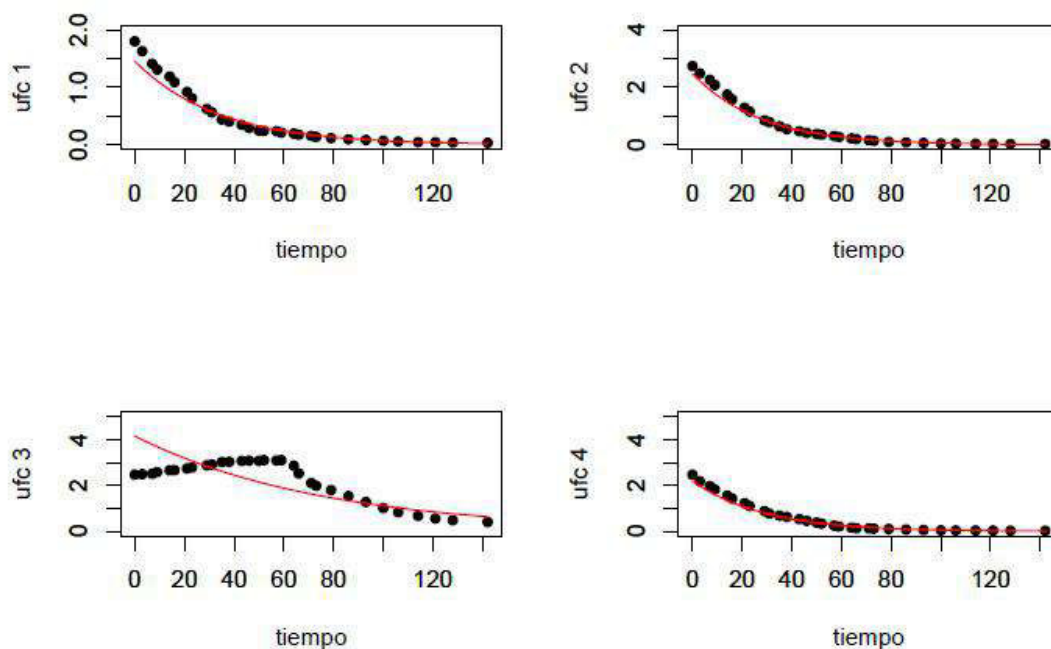
Visualización de resultados

Se puede realizar el gráfico de la curva exponencial correspondiente en cada caso:

```
par(mfrow=c(2,2))
plot(x=base_2$t,y=base_2$ufc_1,xlab="tiempo",ylab="ufc 1",ylim=c(0,2),pch=16)
par(new=TRUE)
plot(x=base_2$t,y=exp(mod11$coefficients[1,1])*exp(mod11$coefficients[2,1]*base_2$t),
  xlab="",ylab="",ylim=c(0,2),type="l",col="red")

plot(x=base_2$t,y=base_2$ufc_2,xlab="tiempo",ylab="ufc 2",ylim=c(0,4),pch=16)
par(new=TRUE)
plot(x=base_2$t,y=exp(mod21$coefficients[1,1])*exp(mod21$coefficients[2,1]*base_2$t),
  xlab="",ylab="",ylim=c(0,4),type="l",col="red")
plot(x=base_2$t,y=base_2$ufc_3,xlab="tiempo",ylab="ufc 3",ylim=c(0,5),pch=16)
par(new=TRUE)
plot(x=base_2$t,y=exp(mod31$coefficients[1,1])*exp(mod31$coefficients[2,1]*base_2$t),
  xlab="",ylab="",ylim=c(0,5),type="l",col="red")
plot(x=base_2$t,y=base_2$ufc_4,xlab="tiempo",ylab="ufc 4",ylim=c(0,5),pch=16)

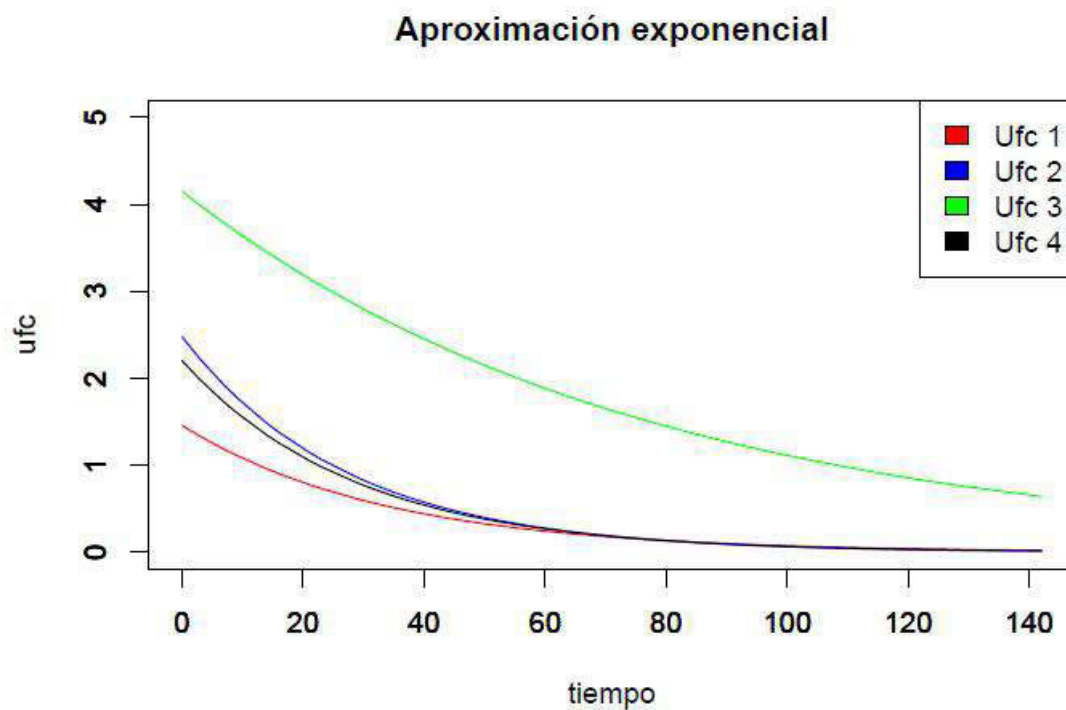
par(new=TRUE)
plot(x=base_2$t,y=exp(mod41$coefficients[1,1])*exp(mod41$coefficients[2,1]*base_2$t),
  xlab="",ylab="",ylim=c(0,5),type="l",col="red")
```



Asimismo, se puede observar las curvas exponenciales estimadas:

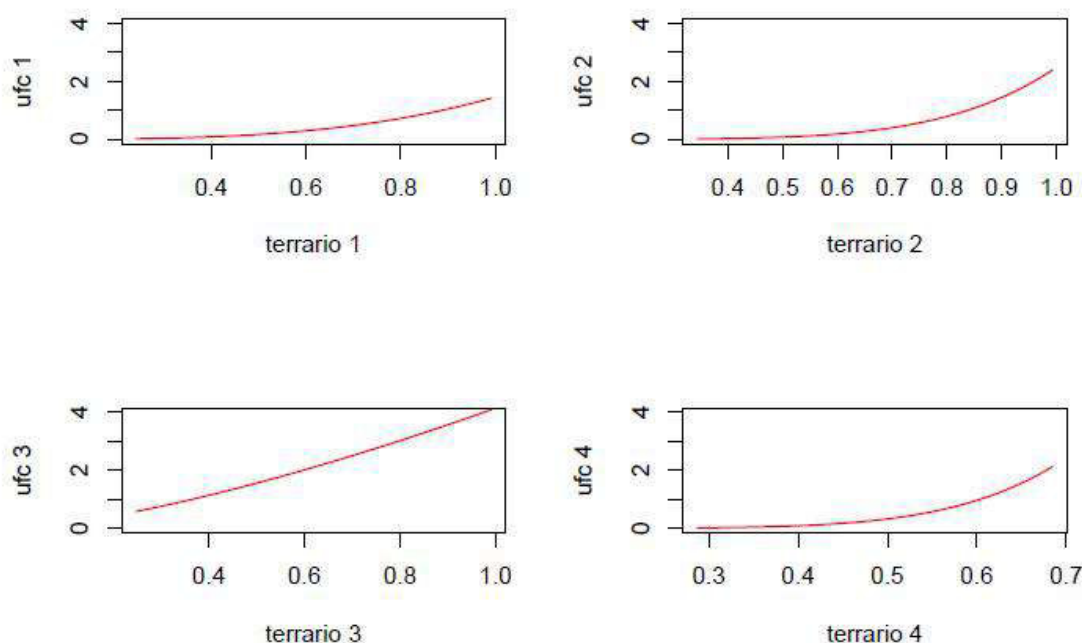
```
plot(x=base_2$t,y=exp(mod1$coefficients[1,1])*exp(mod1$coefficients[2,1]*base_2$t),
     xlab="tiempo",ylab="ufc",ylim=c(0,5),type="l",col="red",
     main="Aproximación exponencial")

par(new=TRUE)
plot(x=base_2$t,y=exp(mod2$coefficients[1,1])*exp(mod2$coefficients[2,1]*base_2$t),
     xlab="",ylab="",ylim=c(0,5),type="l",col="blue")
par(new=TRUE)
plot(x=base_2$t,y=exp(mod3$coefficients[1,1])*exp(mod3$coefficients[2,1]*base_2$t),
     xlab="",ylab="",ylim=c(0,5),type="l",col="green")
par(new=TRUE)
plot(x=base_2$t,y=exp(mod4$coefficients[1,1])*exp(mod4$coefficients[2,1]*base_2$t),
     xlab="",ylab="",ylim=c(0,5),type="l",col="black")
legend(x = "topright", legend = c("Ufc 1", "Ufc 2","Ufc 3","Ufc 4"),
      fill = c("red", "blue","green","black"))
```



Se grafica la relación ufc_i vs. terrario, usando sus aproximaciones debido a que se cuenta con los datos para diferentes períodos de tiempo, lo que impide una regresión:

```
par(mfrow=c(2,2))
plot(x=exp(mod1$coefficients[1,1]*seq(1,150,1)),
     y=exp(mod11$coefficients[1,1])*exp(mod11$coefficients[2,1]*seq(1,150,1)),
     xlab="terrario 1",ylab="ufc 1",ylim=c(0,4),type="l",col="red")
plot(x=exp(mod2$coefficients[1,1]*seq(1,150,1)),
     y=exp(mod21$coefficients[1,1])*exp(mod21$coefficients[2,1]*seq(1,150,1)),
     xlab="terrario 2",ylab="ufc 2",ylim=c(0,4),type="l",col="red")
plot(x=exp(mod3$coefficients[1,1]*seq(1,150,1)),
     y=exp(mod31$coefficients[1,1])*exp(mod31$coefficients[2,1]*seq(1,150,1)),
     xlab="terrario 3",ylab="ufc 3",ylim=c(0,4),type="l",col="red")
plot(x=exp(mod4$coefficients[1,1])*exp(mod4$coefficients[2,1]*seq(1,150,1)),
     y=exp(mod41$coefficients[1,1])*exp(mod41$coefficients[2,1]*seq(1,150,1)),
     xlab="terrario 4",ylab="ufc 4",ylim=c(0,4),type="l",col="red")
```



Ufc vs. terrario

Se puede plantear regresiones no tan precisas haciendo uso de predicciones:

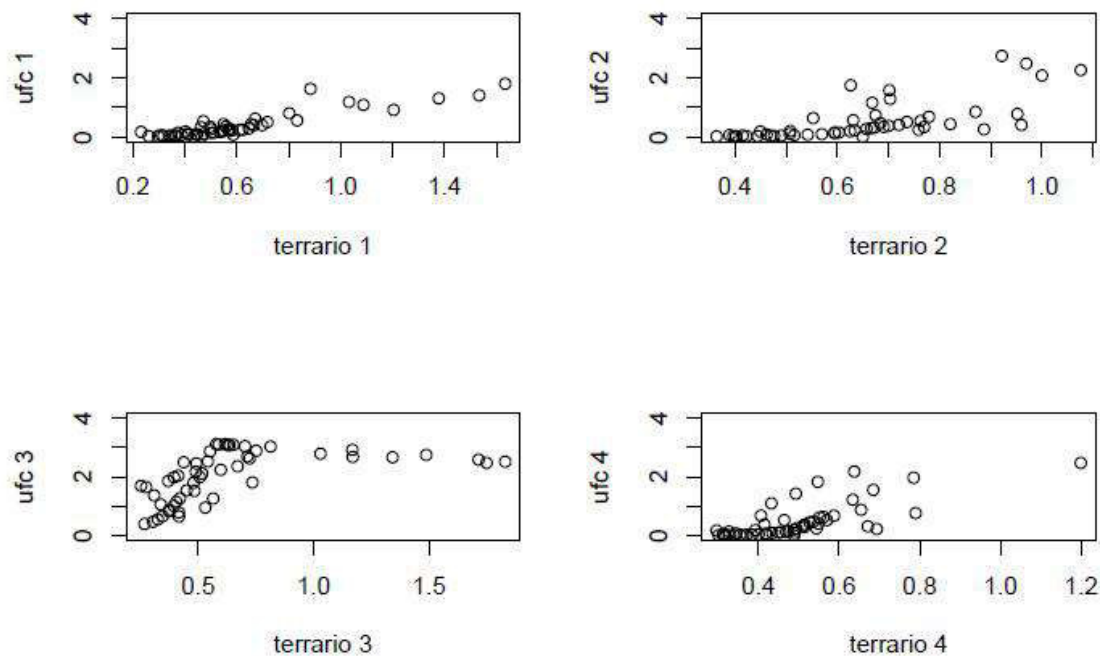
```
t1 <- base_1[!base_1$t==base_2$t,1]
t2 <- base_2[!base_1$t==base_2$t,1]
p1 <- data.frame( t=t2, ter_1=exp(mod1$coefficients[1,1]*t2),
                  ter_2=exp(mod2$coefficients[1,1]*t2),
                  ter_3=exp(mod3$coefficients[1,1]*t2),
                  ter_4=exp(mod4$coefficients[1,1]*exp(mod4$coefficients[2,1]*t2))
p2 <- data.frame(t=t1,
                  ufc_1=exp(mod1$coefficients[1,1]*exp(mod1$coefficients[2,1]*t1),
                  ufc_2=exp(mod2$coefficients[1,1]*exp(mod2$coefficients[2,1]*t1),
                  ufc_3=exp(mod3$coefficients[1,1]*exp(mod3$coefficients[2,1]*t1),
                  ufc_4=exp(mod4$coefficients[1,1]*exp(mod4$coefficients[2,1]*t1))
names(p1)=c("t", "ter_1", "ter_2", "ter_3", "ter_4")
names(p2)=c("t", "ufc_1", "ufc_2", "ufc_3", "ufc_4")
b1 <- rbind(base_1, p1)%>%arrange(t)
b2 <- rbind(base_2, p2)%>%arrange(t)
bf <- cbind(b1[,2:5], b2[,2:5])
```

Análisis preliminar

Se evalúa en gráficos de dispersión terrario vs. Ufc y se obtiene:

```
par(mfrow=c(2,2))
plot(x=bf$ter_1, y=bf$ufc_1, xlab="terrario 1", ylab="ufc 1", ylim=c(0,4))
plot(x=bf$ter_2, y=bf$ufc_2, xlab="terrario 2", ylab="ufc 2", ylim=c(0,4))

plot(x=bf$ter_3, y=bf$ufc_3, xlab="terrario 3", ylab="ufc 3", ylim=c(0,4))
plot(x=bf$ter_4, y=bf$ufc_4, xlab="terrario 4", ylab="ufc 4", ylim=c(0,4))
```



Modelamiento

Ahora, se procede a aplicar regresión lineal teniendo en cuenta los atípicos, y se obtiene:

```
mod12=summary(lm(ufc_1-ter_1,data=bf))
mod22=summary(lm(ufc_2-ter_2,data=bf))
mod32=summary(lm(ufc_3-ter_3,data=bf))
mod42=summary(lm(ufc_4-ter_4,data=bf))
c1 <- c(mod12$r.squared,mod22$r.squared,mod32$r.squared,mod42$r.squared)
c2 <- rbind(t(mod12$coefficients[1:2,1]),t(mod22$coefficients[1:2,1]),
            t(mod32$coefficients[1:2,1]),t(mod42$coefficients[1:2,1]))
c3 <- rbind(t(mod12$coefficients[1:2,4]),t(mod22$coefficients[1:2,4]),
            t(mod32$coefficients[1:2,4]),t(mod42$coefficients[1:2,4]))
c4 <- c(pf(mod12$fstatistic[1],1,50,lower.tail = FALSE),
        pf(mod22$fstatistic[1],1,50,lower.tail = FALSE),
        pf(mod32$fstatistic[1],1,50,lower.tail = FALSE),
        pf(mod42$fstatistic[1],1,50,lower.tail = FALSE))
table <- round(data.frame(cbind(c1,c2,c3,c4)),4)
names(table) <- c("R²","beta_0","beta_1","pv-beta_0","pv-beta_1","pv-global")
rownames(table) <- c("Ufc 1","Ufc 2","Ufc 3","Ufc 4")
kable(table, format = "markdown", caption = "Resumen de la regresión",align="c")
```

Tabla. Resumen de regresión de Ufc vs. terrario

	R ²	beta_0	beta_1	pv-beta_0	pv-beta_1	pv-global
Ufc 1	0.8289	-0.3983	1.2905	0	0e+00	0e+00
Ufc 2	0.4760	-1.1528	2.5951	0	0e+00	0e+00
Ufc 3	0.2790	1.2698	1.1588	0	1e-04	1e-04
Ufc 4	0.5409	-0.8931	2.7962	0	0e+00	0e+00

En cuyo caso todos los coeficientes son significativos, sin embargo, debido a que usamos aproximaciones es notable que tengan R² bajo, lo cual indica que es inadecuado considerarlos en

este caso. Se analiza también si se verifica la normalidad a través de una prueba paramétrica (Shapiro-Wilks) y una prueba no paramétrica (Lilliefors) en los residuos de su p-valor.

```
#Prueba paramétrica
tab_norm_2_11 <- data.frame(rbind(c("Terrario 1","Terrario 2","Terrario 3","Terrario 4"),
  round(c(shapiro.test(resid(mod12))$p.value,shapiro.test(resid(mod22))$p.value,
    shapiro.test(resid(mod32))$p.value,shapiro.test(resid(mod42))$p.value),3)))
colnames(tab_norm_2_11) <- c("", "", "", "")
print(tab_norm_2_11)

##
## 1 Terrario 1 Terrario 2 Terrario 3 Terrario 4
## 2          0          0.001          0.018          0
```

Donde se observa que todos los valores son menores a 0.05, con lo que se rechaza la hipótesis nula de normalidad incumpliendo así este supuesto.

```
#Prueba no paramétrica
tab_norm_2_12 <- data.frame(rbind(c("Terrario 1","Terrario 2","Terrario 3","Terrario 4"),
  round(c(lillie.test(resid(mod12))$p.value,lillie.test(resid(mod22))$p.value,
    lillie.test(resid(mod32))$p.value,lillie.test(resid(mod42))$p.value),3)))
colnames(tab_norm_2_12) <- c("", "", "", "")
print(tab_norm_2_12)

##
## 1 Terrario 1 Terrario 2 Terrario 3 Terrario 4
## 2          0.028          0.007          0.236          0
```

Donde se observa que en un solo caso no se rechaza la hipótesis de normalidad.

Visualización de resultados

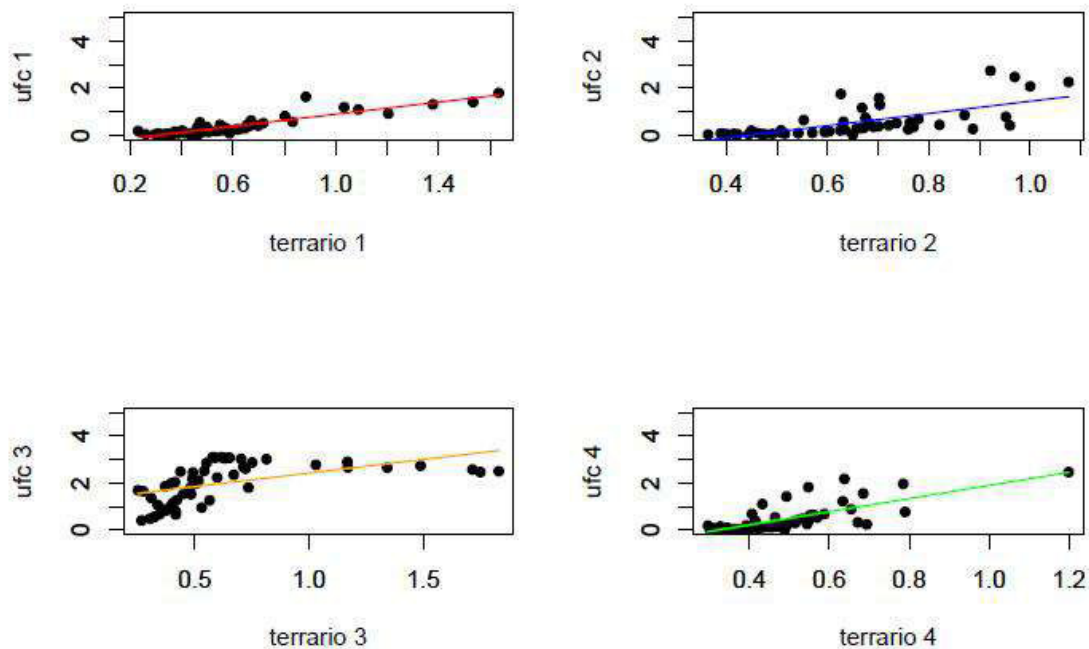
Se observa ahora una aproximación lineal de cada caso:

```
par(mfrow=c(2,2))
plot(x=bf$ter_1,y=bf$ufc_1,xlab="terrario 1",ylab="ufc 1",ylim=c(0,5),pch=16)
par(new=TRUE)
plot(x=bf$ter_1,y=mod12$coefficients[1,1]+mod12$coefficients[2,1]*bf$ter_1,
  xlab="",ylab="",ylim=c(0,5),type="l",col="red")

plot(x=bf$ter_2,y=bf$ufc_2,xlab="terrario 2",ylab="ufc 2",ylim=c(0,5),pch=16)
par(new=TRUE)
plot(x=bf$ter_2,y=mod22$coefficients[1,1]+mod22$coefficients[2,1]*bf$ter_2,
  xlab="",ylab="",ylim=c(0,5),type="l",col="blue")

plot(x=bf$ter_3,y=bf$ufc_3,xlab="terrario 3",ylab="ufc 3",ylim=c(0,5),pch=16)
par(new=TRUE)
plot(x=bf$ter_3,y=mod32$coefficients[1,1]+mod32$coefficients[2,1]*bf$ter_3,
  xlab="",ylab="",ylim=c(0,5),type="l",col="orange")

plot(x=bf$ter_4,y=bf$ufc_4,xlab="terrario 4",ylab="ufc 4",ylim=c(0,5),pch=16)
par(new=TRUE)
plot(x=bf$ter_4,y=mod42$coefficients[1,1]+mod42$coefficients[2,1]*bf$ter_4,
  xlab="",ylab="",ylim=c(0,5),type="l",col="green")
```



Finalmente, se muestra un gráfico de curvas de nivel sobre el terrario vs. tiempo (ver Anexo):

```
z1=0.1
z2=0.05
# Crear un gráfico 3D con las funciones a diferentes alturas
open3d()

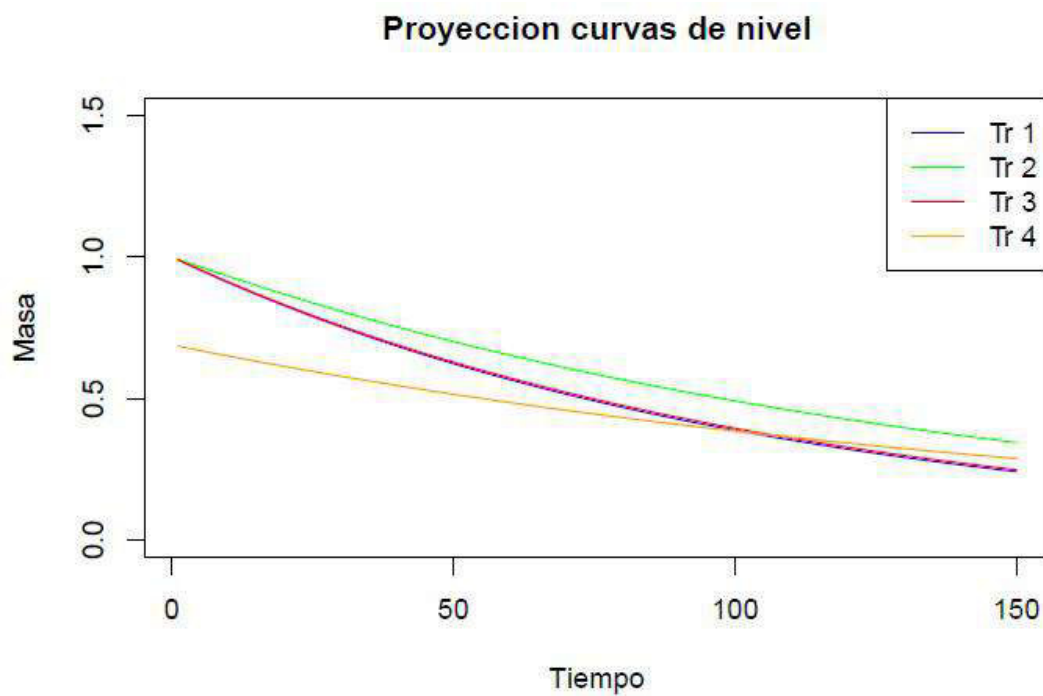
## glX
## 1

plot3d(seq(1,150,1), exp(mod1$coefficients[1,1]*seq(1,150,1)), z1, type = "l",
       col = "blue", xlab = "Tiempo", ylab = "Masa",
       zlab = "Consortio bacteriano")
lines3d(seq(1,150,1), exp(mod2$coefficients[1,1]*seq(1,150,1)), z1, col = "green")
lines3d(seq(1,150,1), exp(mod3$coefficients[1,1]*seq(1,150,1)), 0, col = "red")

lines3d(seq(1,150,1), exp(mod4$coefficients[1,1])*exp(mod4$coefficients[2,1]*seq(1,150,1)), z2, col = "orange")
legend3d(x = "topright", legend = c("Tr 1", "Tr 2", "Tr 3",
                                     "Tr 4"), fill = c("blue", "green", "red", "orange"))

# Proyectando 2D
plot(seq(1, 150, 1), exp(mod1$coefficients[1,1] * seq(1, 150, 1)),
     type = "l", col = "blue", xlab = "Tiempo", ylab = "Masa",
     main = "Proyeccion curvas de nivel", ylim = c(0, 1.5))

lines(seq(1, 150, 1), exp(mod2$coefficients[1,1] * seq(1, 150, 1)), col = "green")
lines(seq(1, 150, 1), exp(mod3$coefficients[1,1] * seq(1, 150, 1)), col = "red")
lines(seq(1, 150, 1), exp(mod4$coefficients[1,1] * exp(mod4$coefficients[2,1] * seq(1, 150, 1))), col = "orange")
legend("topright", legend = c("Tr 1", "Tr 2", "Tr 3", "Tr 4"),
      col = c("blue", "green", "red", "orange"), lty = 1)
```



Análisis sin Outliers

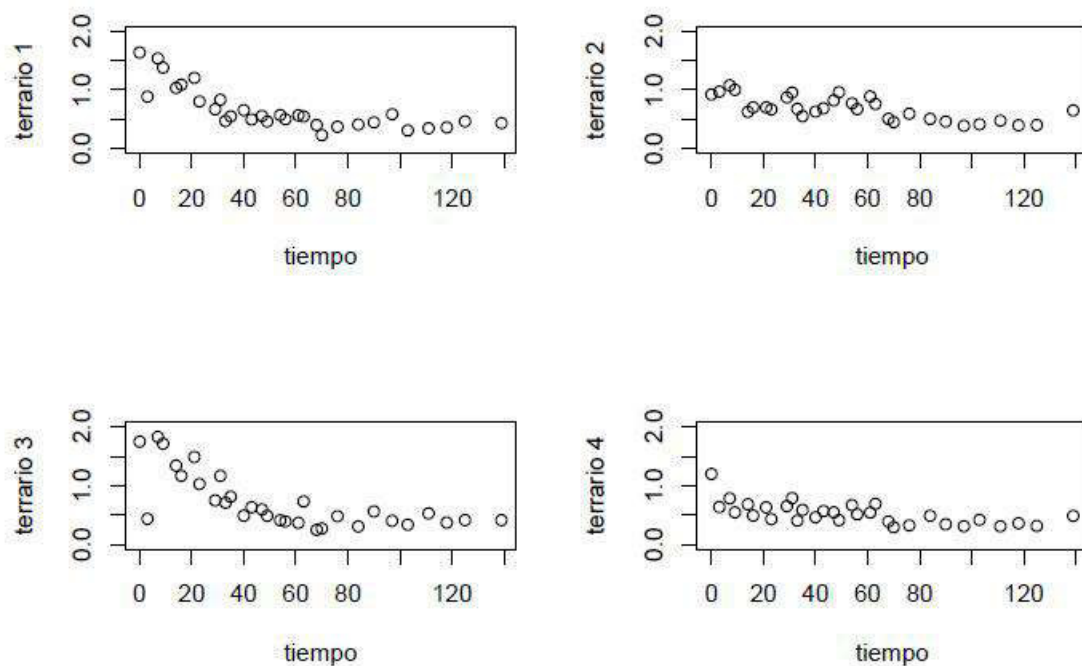
Tiempo vs. terrario

Análisis preliminar

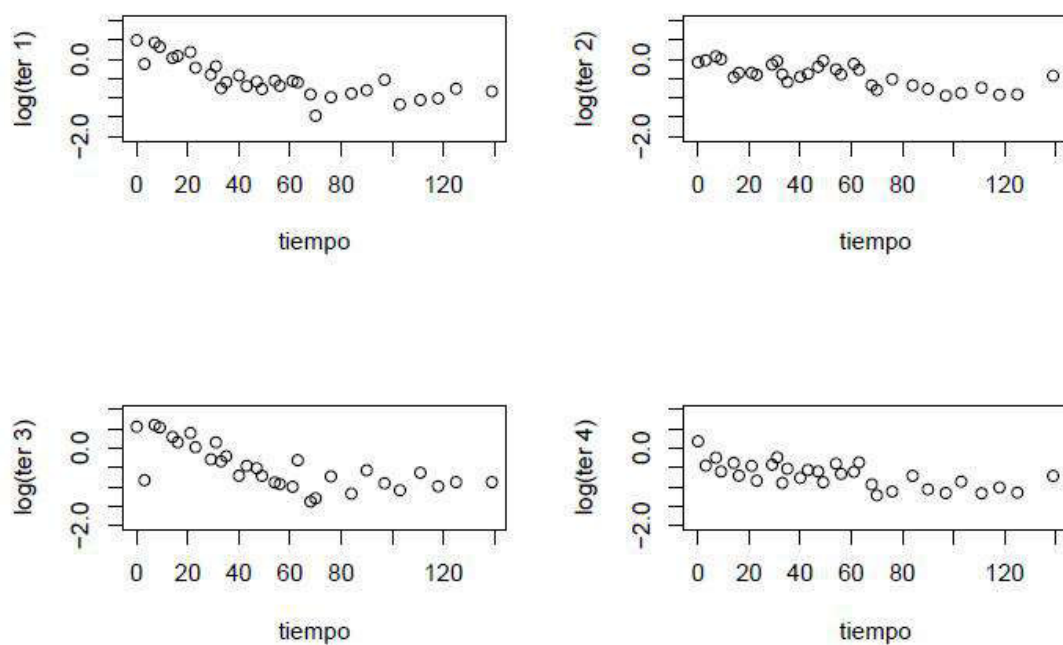
Se dibuja un gráfico de dispersión para evaluar las relaciones preliminares:

```
par(mfrow=c(2,2))
plot(x=base_1$t,y=base_1$ter_1,xlab="tiempo",ylab="terrario 1",ylim=c(0,2))

plot(x=base_1$t,y=base_1$ter_2,xlab="tiempo",ylab="terrario 2",ylim=c(0,2))
plot(x=base_1$t,y=base_1$ter_3,xlab="tiempo",ylab="terrario 3",ylim=c(0,2))
plot(x=base_1$t,y=base_1$ter_4,xlab="tiempo",ylab="terrario 4",ylim=c(0,2))
```



Donde aparentan un comportamiento del tipo exponencial; además, se observan valores atípicos como los siguientes: en el terrario 1 y el 3, el dato 2; mientras que en los demás, el último dato, sacando logaritmo:



Modelamiento

Para el modelamiento, no se consideran los datos atípicos. Se evalúan las correlaciones:

```
base1=cbind(base_1$t,log(base_1[,c(2:5)]))
colnames(base1)=c("t","11","12","13","14")
#matriz de correlacion
cor(base1[-c(1,2,31),])
```

```
##           t           l1           l2           l3           l4
## t      1.0000000 -0.7718446 -0.7847236 -0.7606889 -0.7072799
## l1 -0.7718446  1.0000000  0.6444850  0.8801877  0.6737317
## l2 -0.7847236  0.6444850  1.0000000  0.5987574  0.7438889
## l3 -0.7606889  0.8801877  0.5987574  1.0000000  0.6077756
## l4 -0.7072799  0.6737317  0.7438889  0.6077756  1.0000000
```

Donde se observa que existe una marcada correlación lineal entre el tiempo y cada uno de los logaritmos de los valores medidos en cada terrario (valor absoluto mayor a 0.6).

Se propone:

$$\log(ter_i) = \beta_0 + \beta_1 \times t + \varepsilon$$

Donde $i = 1, 2, 3, 4$ y ter_i indican la medida en el terrario i ; t es el tiempo, mientras que ε es el error aleatorio. Ejecutando las regresiones, se tiene:

```
mod1_1=summary(lm(l1~t,data=base1[-c(2),]))
mod2_1=summary(lm(l2~t,data=base1[-c(31),]))
mod3_1=summary(lm(l3~t,data=base1[-c(2),]))

mod4_1=summary(lm(l4~t,data=base1[-c(1,31),]))
c1 <- c(mod1_1$r.squared,mod2_1$r.squared,mod3_1$r.squared,mod4_1$r.squared)
c2 <- rbind(t(mod1_1$coefficients[1:2,1]),t(mod2_1$coefficients[1:2,1]),
            t(mod3_1$coefficients[1:2,1]),t(mod4_1$coefficients[1:2,1]))
c3 <- rbind(t(mod1_1$coefficients[1:2,4]),t(mod2_1$coefficients[1:2,4]),
            t(mod3_1$coefficients[1:2,4]),t(mod4_1$coefficients[1:2,4]))
c4 <- c(pf(mod1_1$fstatistic[1],1,28,lower.tail = FALSE),
        pf(mod2_1$fstatistic[1],1,28,lower.tail = FALSE),
        pf(mod3_1$fstatistic[1],1,28,lower.tail = FALSE),
        pf(mod4_1$fstatistic[1],1,27,lower.tail = FALSE))
table <- round(data.frame(cbind(c1,c2,c3,c4)),4)
names(table) <- c("R²","beta_0","beta_1","pv-beta_0","pv-beta_1","pv-global")
rownames(table) <- c("Terrario 1","Terrario 2","Terrario 3","Terrario 4")
kable(table, format = "markdown", caption = "Resumen de la regresión",align="c")
```

Tabla: Resumen de la regresión terrario vs. tiempo

	R ²	beta_0	beta_1	pv-beta_0	pv-beta_1	pv-global
Terrario 1	0.5896	0.0304	-0.0099	0.7760	0	0
Terrario 2	0.6554	-0.0573	-0.0070	0.3530	0	0
Terrario 3	0.5820	0.1985	-0.0117	0.1322	0	0
Terrario 4	0.5154	-0.3935	-0.0061	0.0000	0	0

Donde el valor de p , valor 0, indica que este es muy pequeño: menor a 0.005. Se observa que la regresión es significativa en todos los casos; sin embargo, en algunos, el término independiente no es significativo, por lo cual se vuelve a calcular las regresiones.

```

mod1_1=summary(lm(l1~0+t,data=base1[-c(2),]))
mod2_1=summary(lm(l2~0+t,data=base1[-c(31),]))
mod3_1=summary(lm(l3~0+t,data=base1[-c(2),]))
mod4_1=summary(lm(l4~t,data=base1[-c(1,31),]))
c1 <- c(mod1_1$r.squared,mod2_1$r.squared,mod3_1$r.squared,mod4_1$r.squared)
c2 <- rbind(c(NA,mod1_1$coefficients[1,1]),c(NA,mod2_1$coefficients[1,1]),
            c(NA,mod3_1$coefficients[1,1]),t(mod4_1$coefficients[1:2,1]))
c3 <- rbind(c(NA,mod1_1$coefficients[1,4]),c(NA,mod2_1$coefficients[1,4]),
            c(NA,mod3_1$coefficients[1,4]),t(mod4_1$coefficients[1:2,4]))
c4 <- c(pf(mod1_1$fstatistic[1],1,29,lower.tail = FALSE),
        pf(mod2_1$fstatistic[1],1,29,lower.tail = FALSE),
        pf(mod3_1$fstatistic[1],1,29,lower.tail = FALSE),
        pf(mod4_1$fstatistic[1],1,27,lower.tail = FALSE))
table <- round(data.frame(cbind(c1,c2,c3,c4)),4)
names(table) <- c("R²","beta_0","beta_1","pv-beta_0","pv-beta_1","pv-global")
rownames(table) <- c("Terrario 1","Terrario 2","Terrario 3","Terrario 4")
kable(table, format = "markdown", caption = "Resumen de la regresión",align="c")

```

Tabla: Resumen de regresión terrario vs. tiempo

	R ²	beta_0	beta_1	pv-beta_0	pv-beta_1	pv-global
Terrario 1	0.8166	NA	-0.0095	NA	0	0
Terrario 2	0.8798	NA	-0.0078	NA	0	0

	R ²	beta_0	beta_1	pv-beta_0	pv-beta_1	pv-global
Terrario 3	0.7297	NA	-0.0093	NA	0	0
Terrario 4	0.5154	-0.3935	-0.0061	0	0	0

Donde el valor de p, valor 0, indica que este es muy pequeño: menor a 0.005. Se observa mejoras en R². Se analiza también si se verifica la normalidad a través de una prueba paramétrica (Shapiro-Wilks) y una prueba no paramétrica (Lilliefors) en los residuos, a través de su p-valor:

```

#Prueba paramétrica
tab_norm_31 <- data.frame(rbind(c("Terrario 1","Terrario 2","Terrario 3","Terrario 4"),
  round(c(shapiro.test(resid(mod1_1))$p.value,shapiro.test(resid(mod2_1))$p.value,
    shapiro.test(resid(mod3_1))$p.value,shapiro.test(resid(mod4_1))$p.value),3)))
colnames(tab_norm_31) <- c("", "", "", "")
print(tab_norm_31)

##
## 1 Terrario 1 Terrario 2 Terrario 3 Terrario 4
## 2      0.205      0.906      0.387      0.659

```

Donde se observa que todos los valores son mayores a 0.05, con lo que no se rechaza la hipótesis nula de normalidad, cumpliendo así este supuesto.

```

#Prueba no paramétrica
tab_norm_32 <- data.frame(rbind(c("Terrario 1","Terrario 2","Terrario 3","Terrario 4"),
  round(c(lillie.test(resid(mod1_1))$p.value,lillie.test(resid(mod2_1))$p.value,
    lillie.test(resid(mod3_1))$p.value,lillie.test(resid(mod4_1))$p.value),3)))
colnames(tab_norm_32) <- c("", "", "", "")
print(tab_norm_32)

```

```
##
## 1 Terrario 1 Terrario 2 Terrario 3 Terrario 4
## 2      0.332      0.937      0.388      0.148
```

Donde se observa que todos los valores son mayores a 0.05, con lo que no se rechaza la hipótesis nula de normalidad, cumpliendo así este supuesto.

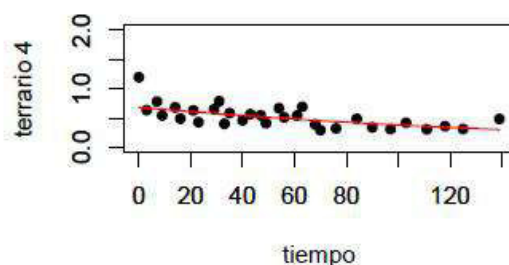
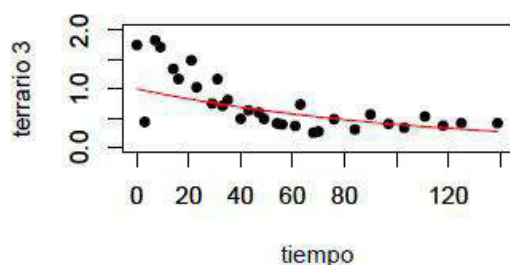
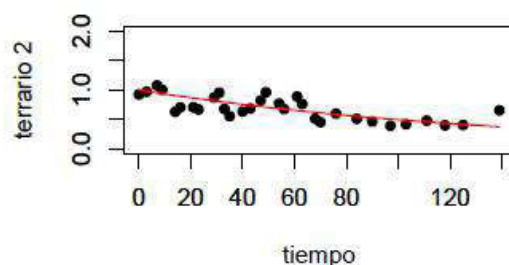
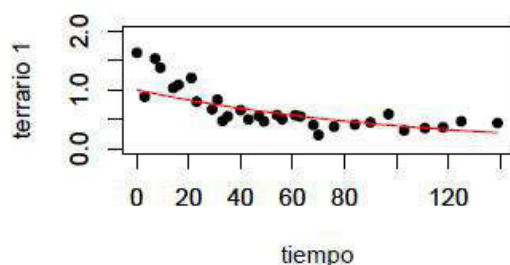
Visualización de resultados

Se puede realizar gráfico de la curva exponencial correspondiente en cada caso:

```
par(mfrow=c(2,2))
plot(x=base_1$t,y=base_1$ter_1,xlab="tiempo",ylab="terrario 1",ylim=c(0,2),pch=16)
par(new=TRUE)
plot(x=base_1$t,y=exp(mod1_1$coefficients[1,1]*base_1$t),
     xlab="",ylab="",ylim=c(0,2),type="l",col="red")

plot(x=base_1$t,y=base_1$ter_2,xlab="tiempo",ylab="terrario 2",ylim=c(0,2),pch=16)
par(new=TRUE)
plot(x=base_1$t,y=exp(mod2_2$coefficients[1,1]*base_1$t),
     xlab="",ylab="",ylim=c(0,2),type="l",col="red")

plot(x=base_1$t,y=base_1$ter_3,xlab="tiempo",ylab="terrario 3",ylim=c(0,2),pch=16)
par(new=TRUE)
plot(x=base_1$t,y=exp(mod3_3$coefficients[1,1]*base_1$t),
     xlab="",ylab="",ylim=c(0,2),type="l",col="red")
plot(x=base_1$t,y=base_1$ter_4,xlab="tiempo",ylab="terrario 4",ylim=c(0,2),pch=16)
par(new=TRUE)
plot(x=base_1$t,y=exp(mod4_4$coefficients[1,1]*exp(mod4_4$coefficients[2,1]*base_1$t),
     xlab="",ylab="",ylim=c(0,2),type="l",col="red")
```



Asimismo, se puede observar las curvas exponenciales estimadas:

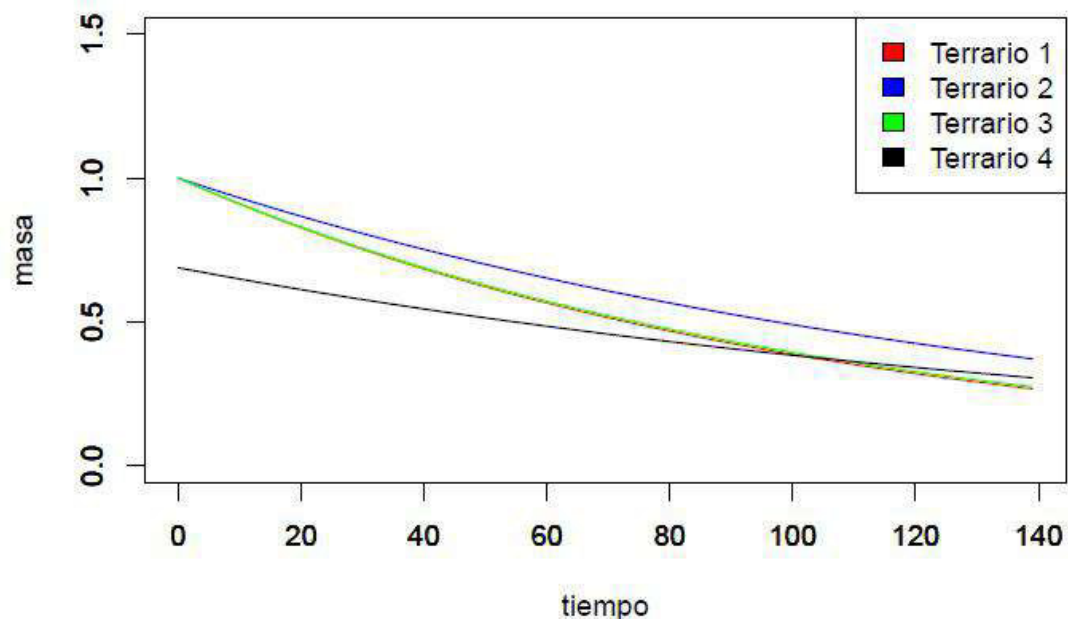
```

plot(x=base_1$t,y=exp(mod1$coefficients[1,1]*base_1$t),
     xlab="tiempo",ylab="masa",ylim=c(0,1.5),type="l",col="red",
     main="Aproximación exponencial")

par(new=TRUE)
plot(x=base_1$t,y=exp(mod2$coefficients[1,1]*base_1$t),
     xlab="",ylab="",ylim=c(0,1.5),type="l",col="blue")
par(new=TRUE)
plot(x=base_1$t,y=exp(mod3$coefficients[1,1]*base_1$t),
     xlab="",ylab="",ylim=c(0,1.5),type="l",col="green")
par(new=TRUE)
plot(x=base_1$t,y=exp(mod4$coefficients[1,1])*exp(mod4$coefficients[2,1]*base_1$t),
     xlab="",ylab="",ylim=c(0,1.5),type="l",col="black")
legend(x = "topright", legend = c("Terrario 1", "Terrario 2","Terrario 3",
    "Terrario 4"),
      fill = c("red", "blue","green","black"))

```

Aproximación exponencial



Tiempo vs. Ufc

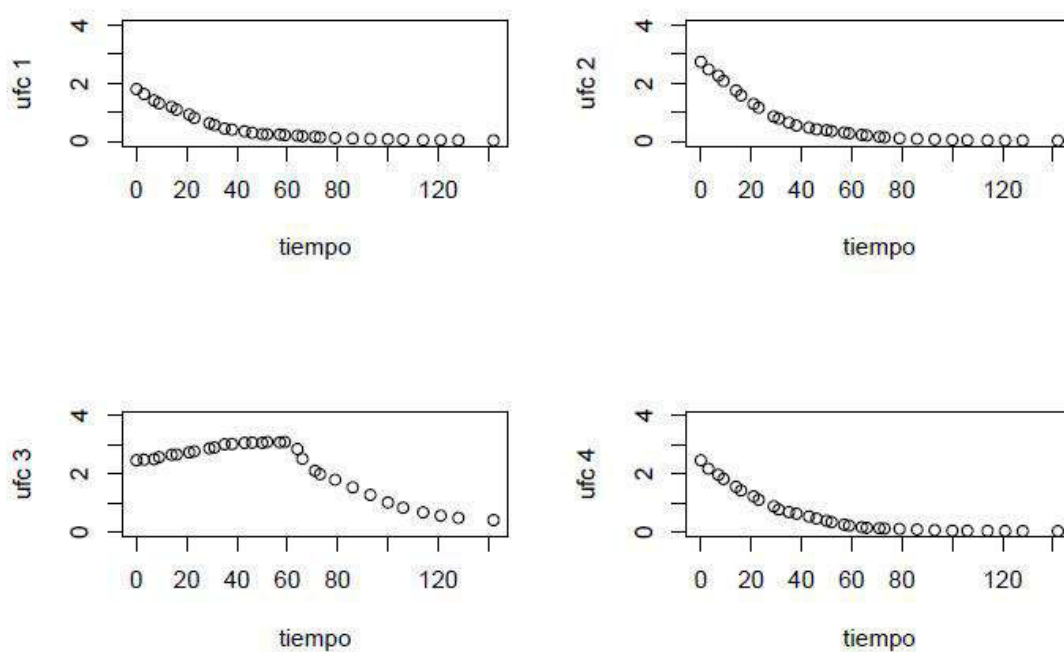
Análisis preliminar

Se dibujan unas gráficas de dispersión para evaluar relaciones preliminares:

```

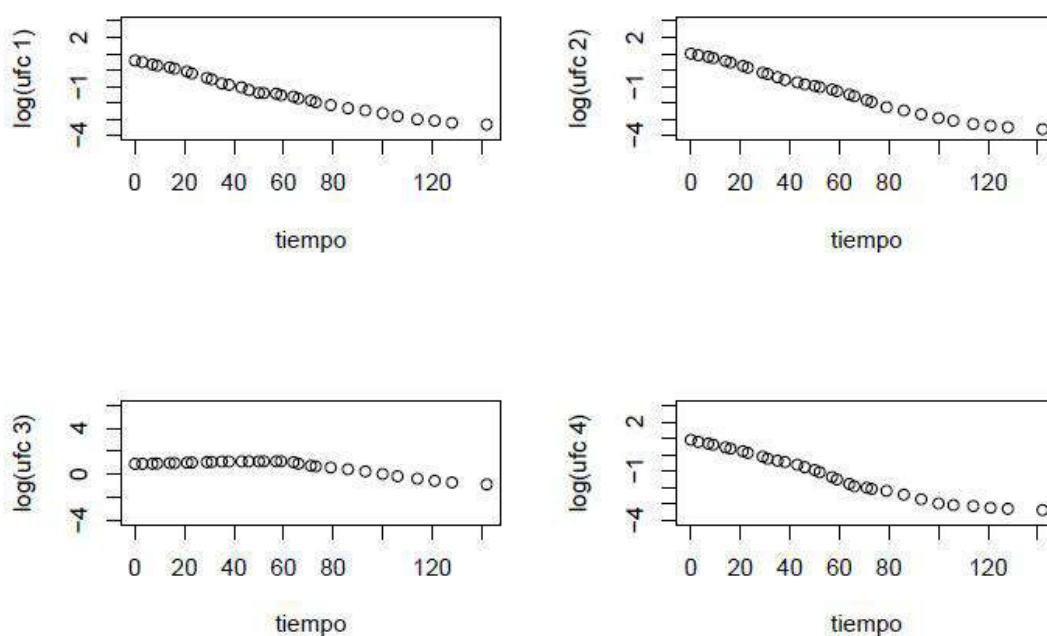
par(mfrow=c(2,2))
plot(x=base_2$t,y=base_2$ufc_1,xlab="tiempo",ylab="ufc 1",ylim=c(0,4))
plot(x=base_2$t,y=base_2$ufc_2,xlab="tiempo",ylab="ufc 2",ylim=c(0,4))
plot(x=base_2$t,y=base_2$ufc_3,xlab="tiempo",ylab="ufc 3",ylim=c(0,4))
plot(x=base_2$t,y=base_2$ufc_4,xlab="tiempo",ylab="ufc 4",ylim=c(0,4))

```



Donde aparentan un comportamiento del tipo exponencial, sacando logaritmo:

```
par(mfrow=c(2,2))
plot(x=base_2$t,y=log(base_2$ufc_1),xlab="tiempo",ylab="log(ufc 1)",ylim=c(-4,3))
plot(x=base_2$t,y=log(base_2$ufc_2),xlab="tiempo",ylab="log(ufc 2)",ylim=c(-4,3))
plot(x=base_2$t,y=log(base_2$ufc_3),xlab="tiempo",ylab="log(ufc 3)",ylim=c(-4,6))
plot(x=base_2$t,y=log(base_2$ufc_4),xlab="tiempo",ylab="log(ufc 4)",ylim=c(-4,3))
```



Donde no se observa un dato atípico en Ufc.

Modelamiento

Para el modelamiento, no se consideran los datos atípicos. Se evalúan las correlaciones:

```
base2=cbind(base_2$t,log(base_2[,c(2:5)]))
colnames(base2)=c("t","11","12","13","14")
#matriz de correlacion
cor(base2[-c(15),])
```

```
##           t           11           12           13           14
## t      1.0000000 -0.9889751 -0.9919796 -0.8530984 -0.9842182
## 11 -0.9889751  1.0000000  0.9976957  0.7773926  0.9935731
## 12 -0.9919796  0.9976957  1.0000000  0.8042289  0.9956872
## 13 -0.8530984  0.7773926  0.8042289  1.0000000  0.7781462
## 14 -0.9842182  0.9935731  0.9956872  0.7781462  1.0000000
```

Donde se observa que existe una marcada correlación lineal entre el tiempo y cada uno de los logaritmos de los valores medidos en cada Ufc (valor absoluto mayor a 0.6).

Se propone:

$$\log(ufc_i) = \beta_0 + \beta_1 \times t + \varepsilon$$

Donde $i = 1, 2, 3, 4$ y ufc_i indican la medida en el ufc_i ; t es el tiempo, mientras que ε es el error aleatorio. Ejecutando las regresiones, se tiene:

```
mod11_1=summary(lm(11~t,data=base2))
mod21_1=summary(lm(12~t,data=base2))
mod31_1=summary(lm(13~t,data=base2))
mod41_1=summary(lm(14~t,data=base2))
c1 <- c(mod11_1$r.squared,mod21_1$r.squared,mod31_1$r.squared,mod41_1$r.squared)
c2 <- rbind(t(mod11_1$coefficients[1:2,1]),t(mod21_1$coefficients[1:2,1]),
            t(mod31_1$coefficients[1:2,1]),t(mod41_1$coefficients[1:2,1]))
c3 <- rbind(t(mod11_1$coefficients[1:2,4]),t(mod21_1$coefficients[1:2,4]),
            t(mod31_1$coefficients[1:2,4]),t(mod41_1$coefficients[1:2,4]))
c4 <- c(pf(mod11_1$fstatistic[1],1,29,lower.tail = FALSE),
        pf(mod21_1$fstatistic[1],1,29,lower.tail = FALSE),
        pf(mod31_1$fstatistic[1],1,28,lower.tail = FALSE),
        pf(mod41_1$fstatistic[1],1,29,lower.tail = FALSE))
table <- round(data.frame(cbind(c1,c2,c3,c4)),4)
names(table) <- c("R²","beta_0","beta_1","pv-beta_0","pv-beta_1","pv-global")
rownames(table) <- c("Ufc 1","Ufc 2","Ufc 3","Ufc 4")
kable(table, format = "markdown", caption = "Resumen de la regresión",align="c")
```

Tabla: Resumen de la regresión Ufc vs. tiempo

	R ²	beta_0	beta_1	pv-beta_0	pv-beta_1	pv-global
Ufc 1	0.9762	0.3763	-0.0299	0	0	0
Ufc 2	0.9840	0.9064	-0.0366	0	0	0
Ufc 3	0.7212	1.4229	-0.0132	0	0	0
Ufc 4	0.9687	0.7889	-0.0351	0	0	0

Donde el valor de p, valor 0, indica que este es muy pequeño: menor a 0.005; además el R^2 es elevado en todos los casos. Se observa que la regresión es significativa en todos los casos. Se analiza también si se verifica la normalidad a través de una prueba paramétrica (Shapiro-Wilks) y una prueba no paramétrica (Lilliefors) en los residuos, a través de su p-valor:

```
#Prueba paramétrica
tab_norm_41 <- data.frame(rbind(c("Ufc 1","Ufc 2","Ufc 3","Ufc 4"),
  round(c(shapiro.test(resid(mod11_1))$p.value,shapiro.test(resid(mod21_1))$p.value,
    shapiro.test(resid(mod31_1))$p.value,shapiro.test(resid(mod41_1))$p.value),3)))
colnames(tab_norm_41) <- c("", "", "", "")
print(tab_norm_41)
```

```
##
## 1 Ufc 1 Ufc 2 Ufc 3 Ufc 4
## 2 0.018 0.004 0.052 0.006
```

Donde se observa que todos los valores son menores o casi iguales a 0.05, con lo que se rechaza la hipótesis nula de normalidad no cumpliendo así este supuesto.

```
#Prueba no paramétrica
tab_norm_42 <- data.frame(rbind(c("Ufc 1","Ufc 2","Ufc 3","Ufc 4"),
  round(c(lillie.test(resid(mod11_1))$p.value,lillie.test(resid(mod21_1))$p.value,
    lillie.test(resid(mod31_1))$p.value,lillie.test(resid(mod41_1))$p.value),3)))
colnames(tab_norm_42) <- c("", "", "", "")
print(tab_norm_42)
```

```
##
## 1 Ufc 1 Ufc 2 Ufc 3 Ufc 4
## 2 0.104 0.076 0.306 0.023
```

Donde se observa que en un solo caso se rechaza la hipótesis de normalidad.

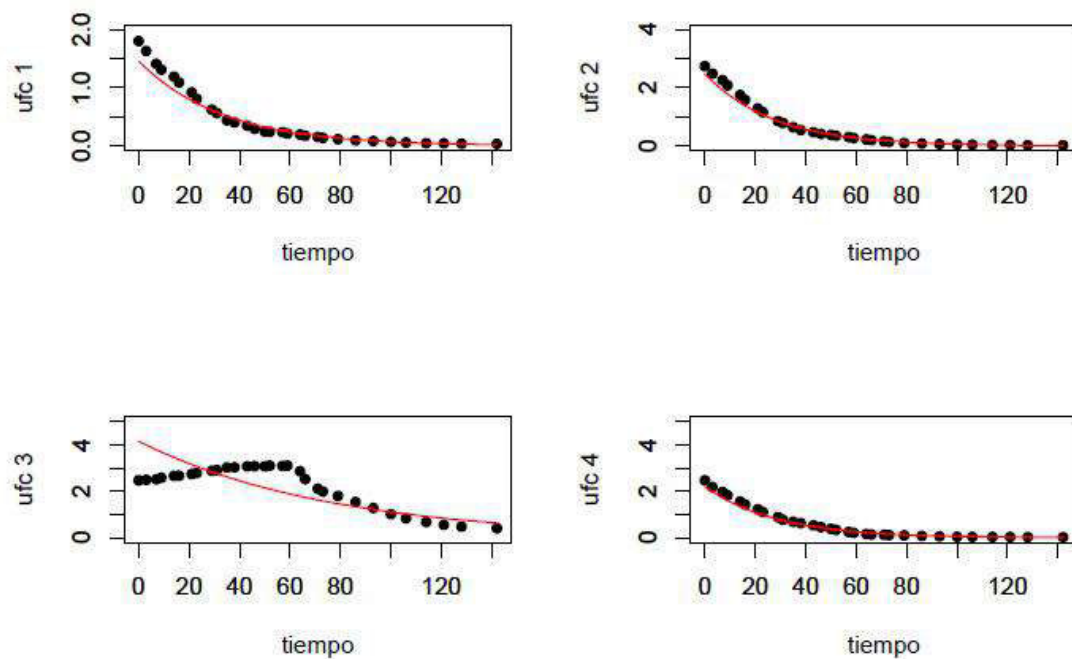
Visualización de resultados

Se puede realizar el gráfico de la curva exponencial correspondiente en cada caso.

```
par(mfrow=c(2,2))
plot(x=base_2$t,y=base_2$ufc_1,xlab="tiempo",ylab="ufc 1",ylim=c(0,2),pch=16)
par(new=TRUE)
plot(x=base_2$t,y=exp(mod11_1$coefficients[1,1])*exp(mod11_1$coefficients[2,1]*base_2$t)
  xlab="",ylab="",ylim=c(0,2),type="l",col="red")

plot(x=base_2$t,y=base_2$ufc_2,xlab="tiempo",ylab="ufc 2",ylim=c(0,4),pch=16)
par(new=TRUE)
plot(x=base_2$t,y=exp(mod21_1$coefficients[1,1])*exp(mod21_1$coefficients[2,1]*base_2$t)
  xlab="",ylab="",ylim=c(0,4),type="l",col="red")
plot(x=base_2$t,y=base_2$ufc_3,xlab="tiempo",ylab="ufc 3",ylim=c(0,5),pch=16)
par(new=TRUE)
plot(x=base_2$t,y=exp(mod31_1$coefficients[1,1])*exp(mod31_1$coefficients[2,1]*base_2$t)
  xlab="",ylab="",ylim=c(0,5),type="l",col="red")
plot(x=base_2$t,y=base_2$ufc_4,xlab="tiempo",ylab="ufc 4",ylim=c(0,5),pch=16)

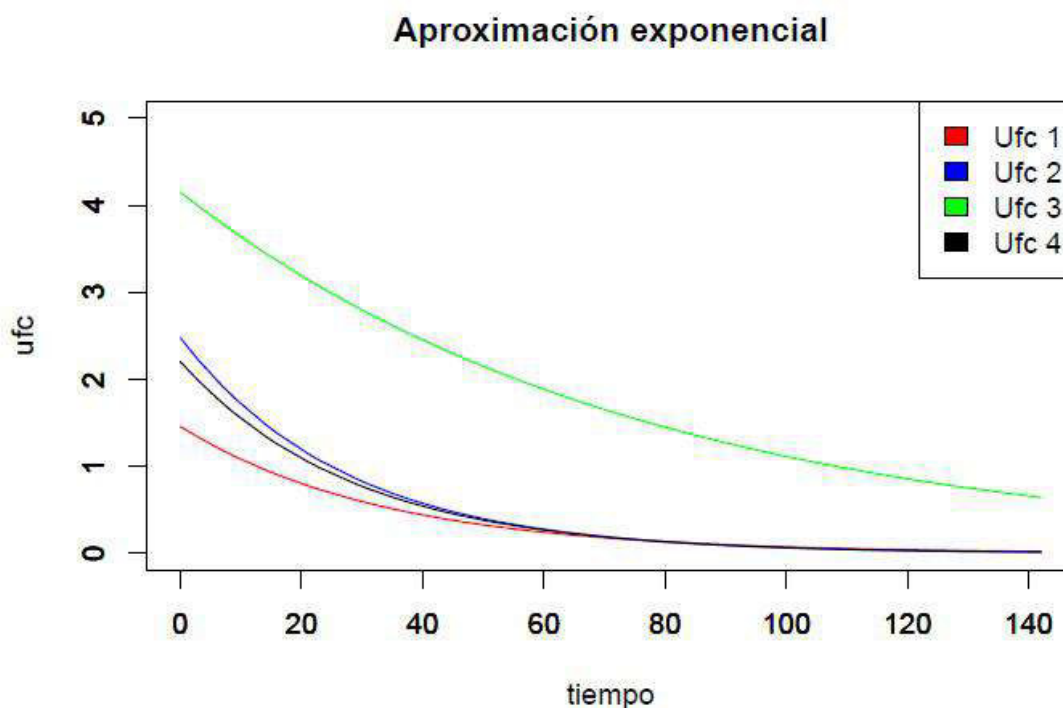
par(new=TRUE)
plot(x=base_2$t,y=exp(mod41_1$coefficients[1,1])*exp(mod41_1$coefficients[2,1]*base_2$t)
  xlab="",ylab="",ylim=c(0,5),type="l",col="red")
```



Asimismo, se puede observar las curvas exponenciales estimadas:

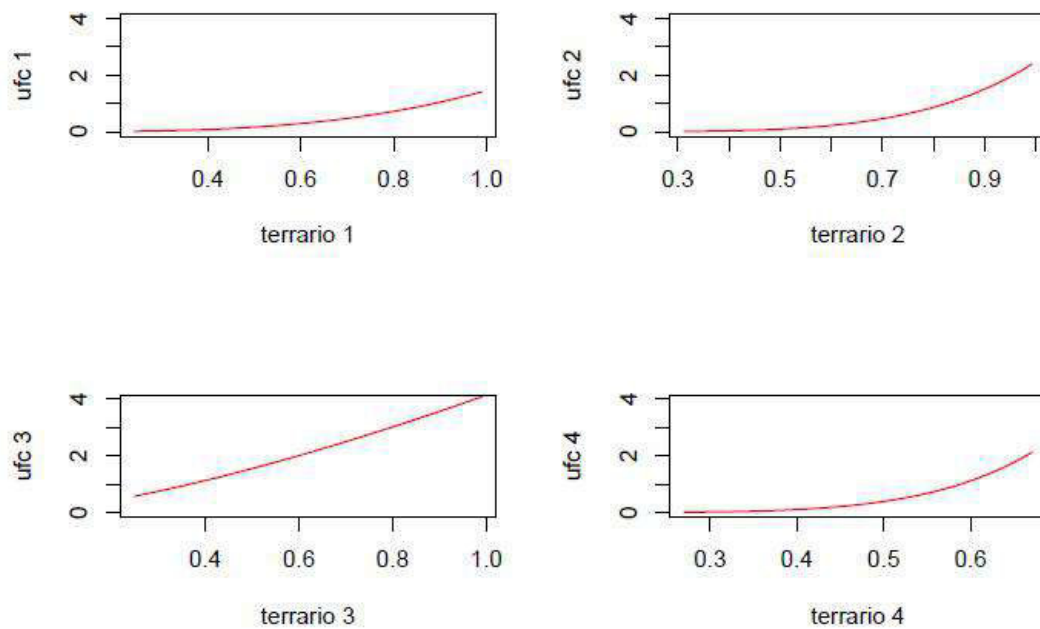
```
plot(x=base_2$t,y=exp(mod11_1$coefficients[1,1])*exp(mod11_1$coefficients[2,1]*base_2$t),
     xlab="tiempo",ylab="ufc",ylim=c(0,5),type="l",col="red",main="Aproximación exponencial")

par(new=TRUE)
plot(x=base_2$t,y=exp(mod21_1$coefficients[1,1])*exp(mod21_1$coefficients[2,1]*base_2$t),
     xlab="",ylab="",ylim=c(0,5),type="l",col="blue")
par(new=TRUE)
plot(x=base_2$t,y=exp(mod31_1$coefficients[1,1])*exp(mod31_1$coefficients[2,1]*base_2$t),
     xlab="",ylab="",ylim=c(0,5),type="l",col="green")
par(new=TRUE)
plot(x=base_2$t,y=exp(mod41_1$coefficients[1,1])*exp(mod41_1$coefficients[2,1]*base_2$t),
     xlab="",ylab="",ylim=c(0,5),type="l",col="black")
legend(x = "topright", legend = c("Ufc 1", "Ufc 2","Ufc 3","Ufc 4"),
      fill = c("red", "blue","green","black"))
```



Se grafica la relación ufc_i vs. terrario *i* usando sus aproximaciones debido a que se cuenta con los datos para diferentes períodos de tiempo, lo que impide una regresión:

```
par(mfrow=c(2,2))
plot(x=exp(mod1_1$coefficients[1,1]*seq(1,150,1)),
     y=exp(mod1_1$coefficients[1,1])*exp(mod1_1$coefficients[2,1]*seq(1,150,1)),
     xlab="terrario 1",ylab="ufc 1",ylim=c(0,4),type="l",col="red")
plot(x=exp(mod2_1$coefficients[1,1]*seq(1,150,1)),
     y=exp(mod2_1$coefficients[1,1])*exp(mod2_1$coefficients[2,1]*seq(1,150,1)),
     xlab="terrario 2",ylab="ufc 2",ylim=c(0,4),type="l",col="red")
plot(x=exp(mod3_1$coefficients[1,1]*seq(1,150,1)),
     y=exp(mod3_1$coefficients[1,1])*exp(mod3_1$coefficients[2,1]*seq(1,150,1)),
     xlab="terrario 3",ylab="ufc 3",ylim=c(0,4),type="l",col="red")
plot(x=exp(mod4_1$coefficients[1,1])*exp(mod4_1$coefficients[2,1]*seq(1,150,1)),
     y=exp(mod4_1$coefficients[1,1])*exp(mod4_1$coefficients[2,1]*seq(1,150,1)),
     xlab="terrario 4",ylab="ufc 4",ylim=c(0,4),type="l",col="red")
```



Ufc vs. terrario

Se puede plantear regresiones no tan precisas haciendo uso de las predicciones:

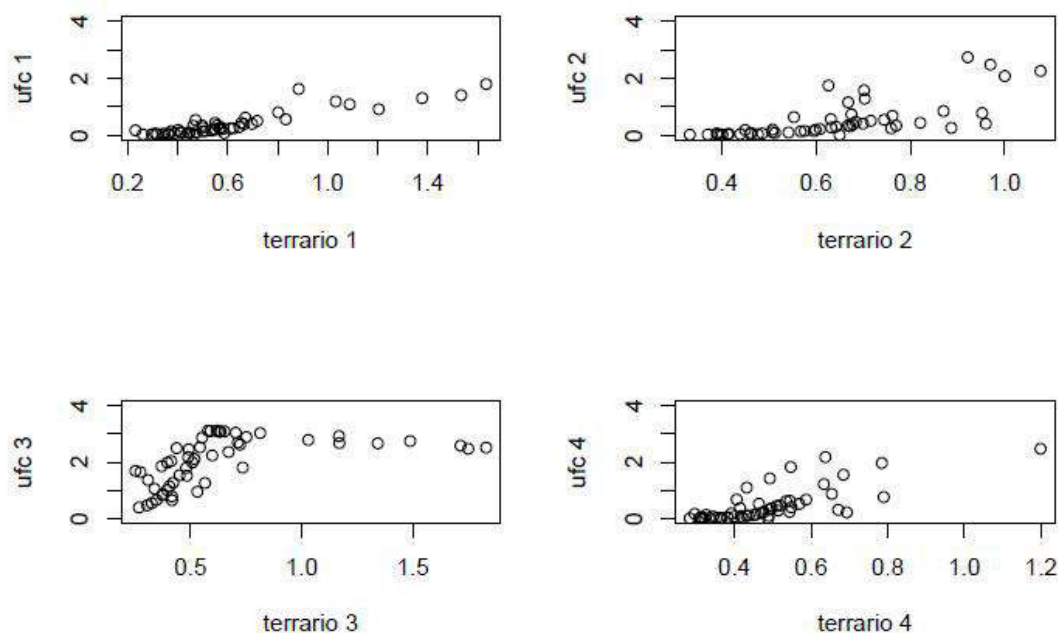
```
t1_1 <- base_1[!base_1$t==base_2$t,1]
t2_1 <- base_2[!base_1$t==base_2$t,1]
p1_1 <- data.frame( t=t2_1,ter_1=exp(mod1_1$coefficients[1,1]*t2_1),
  ter_2=exp(mod2_1$coefficients[1,1]*t2_1),
  ter_3=exp(mod3_1$coefficients[1,1]*t2_1),
  ter_4=exp(mod4_1$coefficients[1,1])*exp(mod4_1$coefficients[2,1]*t2_1))
p2_1 <- data.frame(t=t1_1,
  ufc_1=exp(mod11_1$coefficients[1,1])*exp(mod11_1$coefficients[2,1]*t1_1),
  ufc_2=exp(mod21_1$coefficients[1,1])*exp(mod21_1$coefficients[2,1]*t1_1),
  ufc_3=exp(mod31_1$coefficients[1,1])*exp(mod31_1$coefficients[2,1]*t1_1),
  ufc_4=exp(mod41_1$coefficients[1,1])*exp(mod41_1$coefficients[2,1]*t1_1))
names(p1_1)=c("t","ter_1","ter_2","ter_3","ter_4")
names(p2_1)=c("t","ufc_1","ufc_2","ufc_3","ufc_4")
b1_1 <- rbind(base_1,p1_1)%>%arrange(t)
b2_1 <- rbind(base_2,p2_1)%>%arrange(t)
bf_1 <- cbind(b1_1[,2:5],b2_1[,2:5])
```

Análisis preliminar

Se evalúa gráficos de dispersión terrario vs. Ufc y se obtiene:

```
par(mfrow=c(2,2))
plot(x=bf_1$ter_1,y=bf_1$ufc_1,xlab="terrario 1",ylab="ufc 1",ylim=c(0,4))
plot(x=bf_1$ter_2,y=bf_1$ufc_2,xlab="terrario 2",ylab="ufc 2",ylim=c(0,4))

plot(x=bf_1$ter_3,y=bf_1$ufc_3,xlab="terrario 3",ylab="ufc 3",ylim=c(0,4))
plot(x=bf_1$ter_4,y=bf_1$ufc_4,xlab="terrario 4",ylab="ufc 4",ylim=c(0,4))
```



Modelamiento

Se aplica regresión lineal obviando los atípicos en 3 y 2, y se obtiene:

```
mod12_1=summary(lm(ufc_1~ter_1,data=bf_1))
mod22_1=summary(lm(ufc_2~ter_2,data=bf_1[-c(1,8),]))
mod32_1=summary(lm(ufc_3~ter_3,data=bf_1[-c(1:8,28),]))
mod42_1=summary(lm(ufc_4~ter_4,data=bf_1))
c1 <- c(mod12_1$r.squared,mod22_1$r.squared,mod32_1$r.squared,mod42_1$r.squared)
c2 <- rbind(t(mod12_1$coefficients[1:2,1]),t(mod22_1$coefficients[1:2,1]),
            t(mod32_1$coefficients[1:2,1]),t(mod42_1$coefficients[1:2,1]))
c3 <- rbind(t(mod12_1$coefficients[1:2,4]),t(mod22_1$coefficients[1:2,4]),
            t(mod32_1$coefficients[1:2,4]),t(mod42_1$coefficients[1:2,4]))
c4 <- c(pf(mod12_1$fstatistic[1],1,50,lower.tail = FALSE),
        pf(mod22_1$fstatistic[1],1,50,lower.tail = FALSE),
        pf(mod32_1$fstatistic[1],1,50,lower.tail = FALSE),
        pf(mod42_1$fstatistic[1],1,50,lower.tail = FALSE))
table <- round(data.frame(cbind(c1,c2,c3,c4)),4)
names(table) <- c("R^2","beta_0","beta_1","pv-beta_0","pv-beta_1","pv-global")
rownames(table) <- c("Ufc 1","Ufc 2","Ufc 3","Ufc 4")
kable(table, format = "markdown", caption = "Resumen de la regresión",align="c")
```

Tabla: Resumen de la regresión de Ufc vs. Tiempo

	R ²	beta_0	beta_1	pv-beta_0	pv-beta_1	pv-global
Ufc 1	0.8288	-0.3983	1.2905	0.0000	0	0
Ufc 2	0.4854	-0.9691	2.2824	0.0001	0	0
Ufc 3	0.5437	0.0286	3.6965	0.9203	0	0
Ufc 4	0.5547	-0.8694	2.7881	0.0000	0	0

En cuyo caso todos los coeficientes son significativos, menos el independiente del terrario 3; ejecutando la regresión, se obtiene:

```

mod12_1=summary(lm(ufc_1~ter_1,data=bf_1))
mod22_1=summary(lm(ufc_2~ter_2,data=bf_1[-c(1,8),]))
mod32_1=summary(lm(ufc_3~0+ter_3,data=bf_1[-c(1:8,28),]))
mod42_1=summary(lm(ufc_4~ter_4,data=bf_1))
c1 <- c(mod12_1$r.squared,mod22_1$r.squared,mod32_1$r.squared,mod42_1$r.squared)
c2 <- rbind(t(mod12_1$coefficients[1:2,1]),t(mod22_1$coefficients[1:2,1]),
            c(NA,mod32_1$coefficients[1,1]),t(mod42_1$coefficients[1:2,1]))
c3 <- rbind(t(mod12_1$coefficients[1:2,4]),t(mod22_1$coefficients[1:2,4]),
            c(NA,mod32_1$coefficients[1,4]),t(mod42_1$coefficients[1:2,4]))
c4 <- c(pf(mod12_1$fstatistic[1],1,50,lower.tail = FALSE),
        pf(mod22_1$fstatistic[1],1,50,lower.tail = FALSE),
        pf(mod32_1$fstatistic[1],1,49,lower.tail = FALSE),
        pf(mod42_1$fstatistic[1],1,50,lower.tail = FALSE))
table <- round(data.frame(cbind(c1,c2,c3,c4)),4)
names(table) <- c("R²","beta_0","beta_1","pv-beta_0","pv-beta_1","pv-global")
rownames(table) <- c("Ufc 1","Ufc 2","Ufc 3","Ufc 4")
kable(table, format = "markdown", caption = "Resumen de la regresión",align="c")

```

Tabla: Resumen de la regresión Ufc vs. tiempo

	R ²	beta_0	beta_1	pv-beta_0	pv-beta_1	pv-global
Ufc 1	0.8288	-0.3983	1.2905	0e+00	0	0
Ufc 2	0.4854	-0.9691	2.2824	1e-04	0	0
Ufc 3	0.9206	NA	3.7469	NA	0	0
Ufc 4	0.5547	-0.8694	2.7881	0e+00	0	0

En este caso, todos los coeficientes son significativos; sin embargo, como se usaron aproximaciones, es notable que tengan R^2 bajo algunos modelos, lo cual indica que es inadecuado considerarlos en este caso. Se analiza también si se verifica la normalidad a través de una prueba paramétrica (Shapiro-Wilks) y una prueba no paramétrica (Lilliefors) en los residuos de su p.valor:

```

#Prueba paramétrica
tab_norm_4_11 <- data.frame(rbind(c("Terrario 1","Terrario 2","Terrario 3","Terrario 4"),
  round(c(shapiro.test(resid(mod12_1))$p.value,shapiro.test(resid(mod22_1))$p.value,
    shapiro.test(resid(mod32_1))$p.value,shapiro.test(resid(mod42_1))$p.value),3)))
colnames(tab_norm_4_11) <- c("", "", "", "")
print(tab_norm_4_11)

## 1 Terrario 1 Terrario 2 Terrario 3 Terrario 4
## 2          0          0      0.193          0

```

Donde se observa que todos los valores son menores a 0.05 (excepto en terrario 3), con lo que se rechaza la hipótesis nula de normalidad, incumpliendo así este supuesto en 3 de los 4 terrarios.

```

#Prueba no paramétrica
tab_norm_4_12 <- data.frame(rbind(c("Terrario 1","Terrario 2","Terrario 3","Terrario 4"),
  round(c(lillie.test(resid(mod12_1))$p.value,lillie.test(resid(mod22_1))$p.value,
    lillie.test(resid(mod32_1))$p.value,lillie.test(resid(mod42_1))$p.value),3)))
colnames(tab_norm_4_12) <- c("", "", "", "")
print(tab_norm_4_12)

```

```
##
## 1 Terrario 1 Terrario 2 Terrario 3 Terrario 4
## 2      0.028      0      0.201      0
```

Donde se observa que solo en un caso no se rechaza la hipótesis de normalidad.

Visualización de resultados

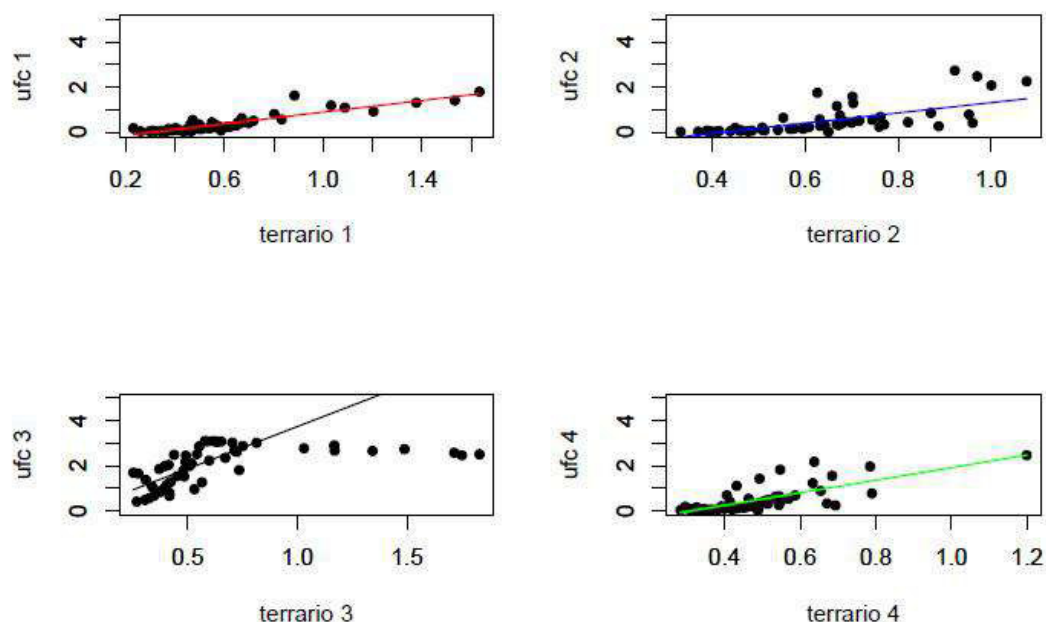
Se observa ahora una aproximación lineal de cada caso:

```
par(mfrow=c(2,2))
plot(x=bf_1$ter_1,y=bf_1$ufc_1,xlab="terrario 1",ylab="ufc 1",ylim=c(0,5),pch=16)
par(new=TRUE)
plot(x=bf_1$ter_1,y=mod12_1$coefficients[1,1]+mod12_1$coefficients[2,1]*bf_1$ter_1,
     xlab="",ylab="",ylim=c(0,5),type="l",col="red")

plot(x=bf_1$ter_2,y=bf_1$ufc_2,xlab="terrario 2",ylab="ufc 2",ylim=c(0,5),pch=16)
par(new=TRUE)
plot(x=bf_1$ter_2,y=mod22_1$coefficients[1,1]+mod22_1$coefficients[2,1]*bf_1$ter_2,
     xlab="",ylab="",ylim=c(0,5),type="l",col="blue")

plot(x=bf_1$ter_3,y=bf_1$ufc_3,xlab="terrario 3",ylab="ufc 3",ylim=c(0,5),pch=16)
par(new=TRUE)
plot(x=bf_1$ter_3,y=mod32_1$coefficients[1,1]*bf_1$ter_3,
     xlab="",ylab="",ylim=c(0,5),type="l",col="black")

plot(x=bf_1$ter_4,y=bf_1$ufc_4,xlab="terrario 4",ylab="ufc 4",ylim=c(0,5),pch=16)
par(new=TRUE)
plot(x=bf_1$ter_4,y=mod42_1$coefficients[1,1]+mod42_1$coefficients[2,1]*bf_1$ter_4,
     xlab="",ylab="",ylim=c(0,5),type="l",col="green")
```



Finalmente, se muestra un gráfico de curvas de nivel sobre el terrario vs. tiempo (ver anexo):

```

z1=0.1
z2=0.05
# Crear un gráfico 3D con las funciones a diferentes alturas
open3d()

## glX
## 2

plot3d(seq(1,150,1), exp(mod1_1$coefficients[1,1]*seq(1,150,1)), z1, type = "l",
       col = "blue", xlab = "Tiempo", ylab = "Masa",
       zlab = "Consortio bacteriano")
lines3d(seq(1,150,1), exp(mod2_1$coefficients[1,1]*seq(1,150,1)), z1, col = "green")
lines3d(seq(1,150,1), exp(mod3_1$coefficients[1,1]*seq(1,150,1)), 0, col = "red")
lines3d(seq(1,150,1), exp(mod4_1$coefficients[1,1])*exp(mod4_1$coefficients[2,1]*seq(1,150,1)), z2, col = "orange")
legend3d(x = "topright", legend = c("Tr 1", "Tr 2", "Tr 3", "Tr 4"), fill = c("blue", "green", "red", "orange"))

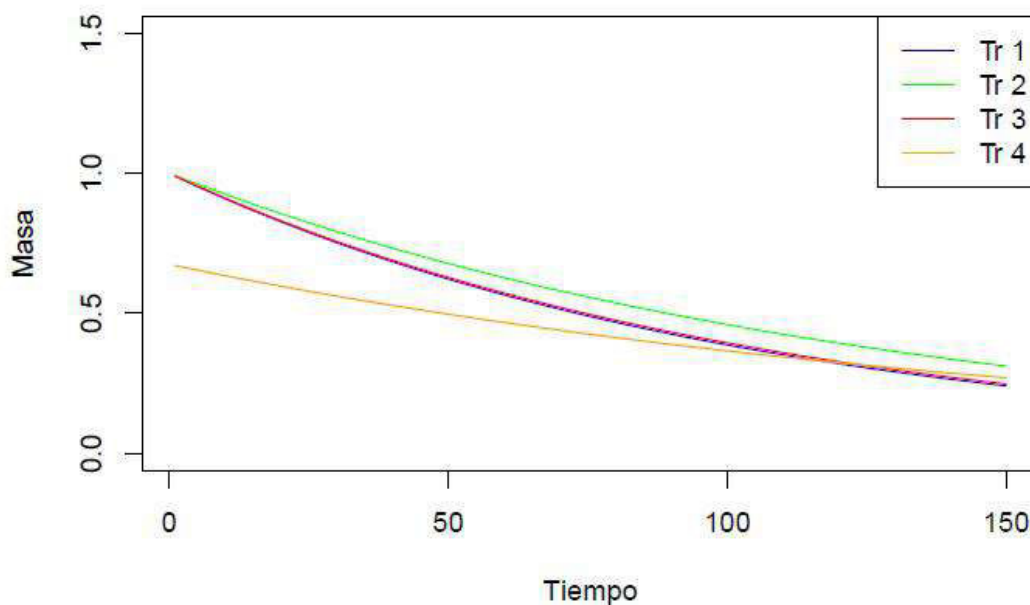
# Proyectando 2D
plot(seq(1, 150, 1), exp(mod1_1$coefficients[1,1] * seq(1, 150, 1)),
     type = "l", col = "blue", xlab = "Tiempo", ylab = "Masa",
     main = "Proyeccion curvas de nivel", ylim = c(0, 1.5))

lines(seq(1, 150, 1), exp(mod2_1$coefficients[1,1] * seq(1, 150, 1)), col = "green")
lines(seq(1, 150, 1), exp(mod3_1$coefficients[1,1] * seq(1, 150, 1)), col = "red")
lines(seq(1, 150, 1), exp(mod4_1$coefficients[1,1] * exp(mod4_1$coefficients[2,1] * seq(1, 150, 1))), col = "orange")
legend("topright", legend = c("Tr 1", "Tr 2", "Tr 3", "Tr 4"),
      col = c("blue", "green", "red", "orange"), lty = 1)

```

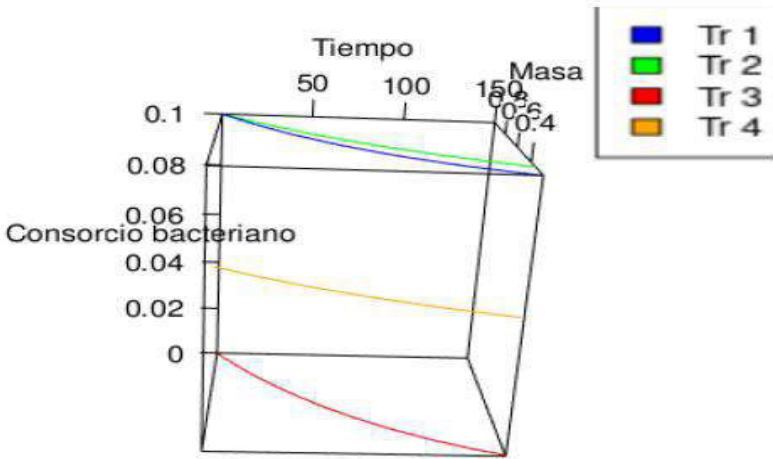
Activar Windo

Proyeccion curvas de nivel



Anexo

Con outliers



Sin outliers

