



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA Y
PARASITOLOGÍA



**Efecto de la materia orgánica en la biorremediación
de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo en
establecimientos de servicios**

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
BIOLOGÍA - MICROBIOLOGÍA - PARASITOLOGÍA

PRESENTADA POR:

Br. Gianmarco Bustamante Cabrera

Br. Josué Segundo Silva Ora

LAMBAYEQUE, PERÚ

2019

**Efecto de la materia orgánica en la biorremediación de
suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo en
establecimientos de servicios**

TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
BIOLOGÍA - MICROBIOLOGÍA - PARASITOLOGÍA**

PRESENTADA POR:

Dr. Eduardo Tejada Sánchez

JURADO, Presidente

Dra. Gianina Llontop Barandarian

JURADO, Secretaria

Lic. Julio Silva Estela

JURADO, Vocal

Dra. Carmen Carreño Farfán

PATROCINADORA

LAMBAYEQUE, PERÚ

2019

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	Problema.....	1
1.2.	Hipótesis.....	2
1.3.	Objetivo general.....	2
1.4.	Objetivos específicos	3
II.	MARCO TEÓRICO	4
2.1.	Antecedentes de la investigación	4
2.2.	Base teórica.....	5
2.2.1.	Petróleo.....	7
2.2.2.	Biodegradación del petróleo	9
2.2.3.	Biorremediación	10
2.2.4.	Materia orgánica utilizada para la biorremediación	12
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
3.1.	Materiales	14
3.1.1.	Material biológico.....	14
3.1.2.	Población y muestra	14
3.2.	Métodos.....	14
3.2.1.	Variables	14
3.2.2.	Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis	14
3.2.3.	Primera etapa: Muestreo y caracterización de un suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo y los sustratos cachaza, compost y cascarilla de arroz.....	15
3.2.4.	Segunda etapa: Efecto de la materia orgánica en la biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo.....	23
3.3.	Análisis estadístico de los datos	25
IV.	RESULTADOS	26
4.1.	Características del suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo.....	26
4.2.	Características de la materia orgánica utilizada para la biorremediación	27
4.3.	Efecto de la materia orgánica en la biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo	29
V.	DISCUSIÓN.....	36
VI.	CONCLUSIONES.....	40
VII.	RECOMENDACIONES.....	41
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
	ANEXOS.....	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamiento para determinar el efecto de la materia orgánica en la biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo	24
Tabla 2. Características químicas y microbiológicas del suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo, Lambayeque, 2019	27
Tabla 3. Nivel de toxicidad del suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo Lambayeque, 2019	27
Tabla 4. Características fisico-químicas de la materia orgánica utilizada en la biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo, Lambayeque, 2019	28
Tabla 5. Número más probable de microorganismos hidrocarbonoclasticos de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo durante la biorremediación con materia orgánica	30
Tabla 6. Niveles de fitotoxicidad del suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo al momento del establecimiento de los microcosmos	31
Tabla 7. Niveles de fitotoxicidad del suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo después de 30 días en microcosmos	31
Tabla 8. Niveles de fitotoxicidad del suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo después de 60 días en microcosmos	32
Tabla 9. Niveles de fitotoxicidad del suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo después de 90 días en microcosmos	32
Tabla 10. Índice de germinación de <i>Raphanus sativus</i> L. y nivel de fitotoxicidad del suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo durante la biorremediación con materia orgánica	33
Tabla 11. Índice de germinación de <i>Raphanus sativus</i> L. y nivel de fitotoxicidad del suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo durante la biorremediación con materia orgánica	34
Tabla 12. Características del suelo biorremediado con cachaza de <i>Saccharum officinarum</i> L.	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distrito de la región Lambayeque donde se colectó las muestras de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo	16
Figura 2. Recolección de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo en Chiclayo, región Lambayeque 2018	16
Figura 3. Suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo, Lambayeque 2018...17	
Figura 4. Fragmentado de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo.....17	
Figura 5. Tamizado de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo	18
Figura 6. Suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo, fragmentado y Tamizado	18
Figura 7. Número más probable de microorganismos hidrocarbonoclasticos en suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo	20
Figura 8. Prueba de toxicidad del suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo	22
Figura 9. Semillas de <i>Raphanus sativus</i> L. germinadas en suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo	22
Figura 10. Ensayo para determinar el efecto de la materia orgánica en la biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo	24

RESUMEN

Objetivo: Determinar el efecto de la materia orgánica en la biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo en establecimientos de reparación de vehículos terrestres.

Método: El ensayo se realizó bajo un diseño completamente aleatorio con cinco tratamientos: Testigo absoluto (T1), testigo abiótico (T2), cachaza de *Saccharum officinarum* L. “caña de azúcar” (T3), compost (T4) y cascarilla de *Oryza sativa* L. “arroz” (T5). El suelo contaminado con aceite residual automotriz se mezcló en volúmenes iguales (1/1, v/v) de cachaza de caña de azúcar, compost o cascarilla de arroz y se mantuvo en microcosmos, con remoción manual dos veces a la semana y riego con agua de clorada.

Resultado: El suelo contaminado presentó materia orgánica, fósforo, potasio, carbonato de calcio, aceites y grasas ($147\ 340\ \text{mgkg}^{-1}$), fracción ligera F1 ($<19\ \text{mgkg}^{-1}$), media F2 ($14\ 443\ \text{mgkg}^{-1}$), pesada F3 ($15\ 240\ \text{mgkg}^{-1}$) de hidrocarburos, microorganismos hidrocarbonoclasticos y un nivel severo de toxicidad. La cachaza de caña de azúcar, compost y cascarilla de arroz presentaron materia orgánica, carbono, nitrógeno, fósforo y potasio. La cachaza de caña de azúcar y compost aceleraron la biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo alcanzándose un nivel bajo de toxicidad a los 60 días con la cachaza y 90 días con el compost. Con la cachaza la eficiencia de biorremediación fue de 70,48 % a los 90 días.

Conclusión: Se demostró la aceleración de la biorremediación del suelo contaminado por la cachaza de caña de azúcar y compost.

Palabras clave: Hidrocarburos de petróleo, cachaza, cascarilla, compost

ABSTRACT

Objective: To determine the effect of organic matter in the biorremediation of a soil contaminated with petroleum hydrocarbons in the repair of land vehicles

Method: The trial was carried out under a completely randomized design with five treatments: Absolute control (T1), abiotic absolute (T2), cachaza of *Saccharum officinarum* L. "sugar cane" (T3), compost (T4) and husk of *Oryza sativa* L. "rice" (T5). The one contaminated with automotive waste oil was mixed in equal volumes (1/1, v/v) of sugarcane cachaza, compost or rice husk and kept in microcosm, with manual removal twice a week and irrigation with decorated water.

Result: The contaminated soil presented organic matter, phosphorus, potassium, calcium carbonate, oils and fats ($147\ 340\ \text{mgkg}^{-1}$), fraction light F1 ($<19\ \text{mgkg}^{-1}$), average F2 ($14\ 443\ \text{mgkg}^{-1}$), heavy F3 ($15\ 240\ \text{mgkg}^{-1}$) of hydrocarbons, hydrocarbonoclastic microorganisms and a severe level of toxicity. The sugarcane cachaza, compost and rice husk presented organic matter, carbon, nitrogen, phosphorus and potassium. The sugarcane cachaza and compost accelerated the biorremediation of soil contaminated with oil hydrocarbons reaching a low level of toxicity at 60 days with the sugarcane cachaza and 90 days with the compost. With the filter cake, the bioremediation efficiency was 70,48 % after 90 days.

Conclusion: The acceleration of the bioremediation of the soil contaminated by sugarcane cachaza and compost was demonstrated.

Key word: Oil hydrocarbons, cachaza, rice husk, compost

I. INTRODUCCIÓN

En el Perú, el suelo de la mayoría de talleres de reparación de vehículos terrestres es contaminado con residuos peligrosos (DIGESA, 2006; Mena, 2009) como los aceites usados, líquido de frenos, anticongelantes y gasolina utilizada para el lavado de los accesorios. Los aceites usados son aquellos aceites refinados del petróleo crudo o de origen sintético que han sido utilizados en el cárter del motor a gasolina o diésel de vehículos y que durante su uso se mezclaron con tierra, metales y agua (DIGESA, 2006).

Los aceites lubricantes con 75 a 85% de hidrocarburos totales de petróleo (TPH o HTP) y 15 a 25% de aditivos forman una capa gruesa en el suelo, que afecta negativamente sus propiedades y constituye una fuente de contaminación de hidrocarburos aromáticos policíclicos, HAP (Mena, 2009). Los hidrocarburos de petróleo son orgánicos y como tal pueden ser biodegradados hasta compuestos no tóxicos (Alexander, 1994); sin embargo, el proceso es lento, cuando las condiciones físicas, químicas y biológicas son desfavorables (Buendía, 2013; Benites y Flores, 2015).

La biorremediación es una tecnología que utiliza entes biológicos para acelerar los procesos de biodegradación mediante estrategias como la bioestimulación y bioaumentación (Olguín, Hernández y Sánchez, 2007). La bioestimulación es la adición de nutrientes para favorecer el crecimiento y actividad microbiana y la bioaumentación es la inoculación de microorganismos endógenos o exógenos, previamente caracterizados e incrementados (Benites y Flores, 2015).

La materia orgánica residual no procesada como la cachaza de *Saccharum officinarum* L. “caña de azúcar” y cascarilla (pajilla) de *Oryza sativa* L. “arroz”, o previamente procesada como el compost contienen microorganismos y nutrientes (García, Ríos, Martínez, Ramos, Cruz y Cueva, 2011; Vargas, Alvarado, Vega y Porras, 2013) que pueden ser utilizados para la bioaumentación y bioestimulación en los procesos de biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo (García et al., 2011; Vivanco, 2013); sin embargo, la investigación es escasa, en la región Lambayeque, a pesar de la disponibilidad y bajo costo de la materia orgánica.

La utilización de la materia orgánica en la biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo es una técnica de fácil ejecución y bajo costo. Los insumos propuestos para la investigación son de acceso rápido. La cachaza y cascarilla de arroz son residuos del procesamiento de la caña de azúcar y arroz en la región Lambayeque (Saavedra, 2008) y el compost es un mejorador del suelo (Ayasta y Bernable, 2012), cuya obtención a partir de diferentes residuos está siendo ampliamente difundida para reducir la contaminación del ambiente.

Los resultados de la presente investigación constituirán la base para la obtención de un paquete tecnológico muy económico en la biorremediación y recuperación del suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo, dándole valor agregado a los recursos propios, con disminución de las fuentes de contaminación nocivas para los seres vivos.

Por lo tanto se planteó el siguiente problema: ¿Cuál es el efecto de la materia orgánica en la biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo en los establecimientos de servicios?. La hipótesis fue: La adición de materia orgánica acelera la biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo en los establecimientos de servicios.

El objetivo general de la investigación fue: Determinar el efecto de la materia orgánica en la biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo en establecimientos de reparación de vehículos terrestres. Los objetivos fueron: Caracterizar el suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo en un establecimiento de reparación de vehículos terrestres, comparar las características de la materia orgánica utilizada para la biorremediación, comparar el efecto de la cachaza de caña de azúcar, compost y cascarilla de arroz en la biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo proveniente de un establecimiento de servicios y calcular la eficiencia de la biorremediación en el suelo con el menor nivel de toxicidad en el menor tiempo posible.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la investigación

En un suelo contaminado con petróleo crudo se investigó la eficiencia de remoción de TPH y HAP utilizando cachaza y bagazo de caña de azúcar como enmiendas y texturizantes. Se realizaron pruebas en microcosmos con suelo ($14\ 300\ \text{mgkg}^{-1}$ de TPH y $23,14\ \text{mgkg}^{-1}$ de HAP). Las relaciones suelo: residuo fueron (%): 100:0, 98:2, 96:4 y 94:6 y la adición de macronutrientes en la relación (%) 100C:10N:1P. Se determinaron diferencias significativas con la cachaza y bagazo de caña, alcanzándose 51 y 60% de remoción en el TPH. Con la cachaza (96:4) se logró la remoción de 43% de HAP y con el bagazo (98:2) 41%. Los residuos agroindustriales constituyen una alternativa para incrementar la remoción de hidrocarburos de petróleo (García et al., 2011).

El aserrín y el estiércol fueron investigados en la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo, usando como indicador *Zea mays*. En macetas de 1 kg se mezclaron 700 g de suelo contaminado, 150 g de estiércol y 150 g de aserrín. Los tratamientos fueron 12, con tres repeticiones y después de 60 días se midió la altura y el peso foliar y radicular. El TPH inicial fue de $21\ 800\ \text{mgkg}^{-1}$, alcanzándose el mayor porcentaje de reducción (22,5%) con el estiércol de vacuno más aserrín frente a 16,5% con el estiércol y 9,6% con el aserrín. La altura de las plantas, peso foliar y radicular fue mayor en las plantas del suelo biorremediado con estiércol y aserrín, demostrándose que éste es el tratamiento más recomendable para el suelo impactado con hidrocarburos de petróleo (Buendía, 2013).

El efecto de los estiércoles de cuy, porcino y vacuno con y sin fertilizante químico se investigó en la biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos de diésel (HTD). El suelo previamente mezclado con arena de río y pajilla (20:10:1) se contaminó con 20 000 ppm de diésel y luego se incorporó el estiércol (6:1), los fertilizantes urea (46% N) y fosfato diamónico (18% N – 46% P) y el consorcio bacteriano (5%). El proceso se monitoreó por 90 días. El suelo presentó un HTD de $22\ 987\ \text{mgkg}^{-1}$, microorganismos totales ($4,6 \times 10^6\ \text{NMP g}^{-1}$), hidrocarbonoclasticos ($3,5 \times 10^4\ \text{NMP g}^{-1}$) y un nivel severo

de toxicidad. Los estiércoles incrementaron la biorremediación del suelo contaminado, destacando el estiércol de cuy más NP, con 81,7% de eficiencia en la remoción del HTD (Benites y Flores, 2015).

La influencia de *Eisenia foetida* y de sustratos orgánicos como agentes bioestimulantes se investigó en la biodegradación de un suelo impactado con petróleo extrapesado. En recipientes de polietileno se depositó el suelo contaminado (testigo), suelo con estiércol equino (T1), suelo con humus líquido (T2) y suelo con estiércol equino más 15 ejemplares de *E. foetida* (T3). Los HTP disminuyeron 0,48% (testigo), 16% (T2), 37% (T1) y 54% (T3). Se demostró la superioridad del tratamiento con *E. foetida* en la descontaminación del suelo impactado (Fernández, Llobregat y Sien, 2015).

La bioestimulación con lombricompost y composta bovina se investigó en la biorremediación de un suelo impactado con 45 000 ppm de aceite residual automotriz, ARA. El suelo se mezcló con la materia orgánica según el tratamiento correspondiente: sin bioestimulación (T1), lombricompost 3% (T2), composta bovina (T3) y lombricompost + composta bovina 3% (T4). La variable respuesta fue la concentración de ARA. Después de 7 semanas, el ARA se redujo a 21 000 ppm con T4; 31 000 con T3 y 33 100 con T2, demostrándose el beneficio de la bioestimulación (Saucedo, Montaña, Márquez y Sánchez, 2016).

2.2 Base teórica

Los residuos peligrosos son elementos, sustancias, compuestos o mezclas que al finalizar su vida útil adquieren la condición de residuos y que independiente de su estado físico representan un riesgo para la salud o el ambiente, por sus características corrosivas, reactivas, explosivas, tóxicas, inflamables o biológicas- infecciosas (Balkau et al., 2002 mencionados por DIGESA, 2006). Los residuos peligrosos pueden ser líquidos o pastosos, sólidos y gaseosos. Las características de peligrosidad se resumen en las siglas CRETIB: corrosividad, reactividad, explosividad, toxicidad, inflamabilidad, radioactividad y patogenicidad o biocontaminación (DIGESA, 2006).

Los residuos peligrosos más voluminosos son los químicos que provienen de los

establecimientos industriales comerciales y de servicios. Los talleres de reparación de vehículos terrestres acumulan, aceites usados, anticongelantes, líquido de frenos, filtros y baterías, que pueden producir reacciones químicas violentas irritantes y nocivas por sus aditivos. Los anexos 4 y 6 del Reglamento de la Ley General de Residuos Sólidos (DS N° 057-2004/PCM) consideran peligrosos a los residuos de aceites minerales no aptos para el uso al que estaban destinados (A3.2), residuos contaminados con mezclas y emulsiones de aceites y agua o de hidrocarburos y agua (A4.6) y residuos con carácter explosivo (A4.8). Estos residuos son explosivos, inflamables y susceptibles de combustión espontánea.

La comunidad microbiana desempeña un papel importante en el flujo de energía, transformación de nutrientes y reciclaje de elementos en el ambiente (Filip, 2002). La teoría de la Infalibilidad Microbiana, sostiene que todo compuesto orgánico biológicamente sintetizado puede ser descompuesto por los microorganismos (Alexander, 1994). En este contexto, los contaminantes como los hidrocarburos de petróleo, pueden ser degradados por los entes biológicos hasta dióxido de carbono y agua (Coyne, 2000).

El petróleo, compuesto por 50-98% de hidrocarburos (Olguín et al., 2007) es biodegradado en aerobiosis con mayor eficiencia (Pérez, Viguera, Gómez y Calva, 2015), pero también en anaerobiosis (Villarreal, Balagurusamy, Rodríguez, Aguilar y Morlett, 2014). Los contaminantes, que pueden ser degradados o transformados por los seres vivos son susceptibles de ser eliminados mediante procesos de biorremediación (Buendía, 2013), que usa las técnicas de bioestimulación y bioaumentación. La bioestimulación de la población microbiana autóctona, puede acelerar la biodegradación de los contaminantes no recalcitrantes, en cuyo caso se requiere la bioaumentación o inoculación de microorganismos con capacidad degradativa especializada, propios del sitio contaminado e incrementados en el laboratorio (Viñas, 2005; Ortega, 2012).

La materia orgánica constituye una fuente de nutrientes y microorganismos, pudiendo ser utilizada para la bioestimulación y bioaumentación en procesos de biorremediación de ambientes contaminados (Benites y Flores, 2015). Las enmiendas como el compost y cachaza de caña son mejoradores de las características físicas,

químicas y biológicas. Los texturizantes como la cáscara de naranja, bagazo de caña, paja, aserrín y corteza mejoran la aireación y la porosidad y disminuyen los niveles de humedad (García et al., 2011).

2.2.1 Petróleo

El crudo de petróleo está constituido por fracciones: saturada (57%), aromática (29%), resinas y asfaltenos (14%) denominados compuestos NSO (Soler, 2012). Los hidrocarburos de un crudo de petróleo, también son agrupados en: parafinas volátiles susceptibles de volatilización (alcanos no ramificados y ramificados o isoprenoides hasta C10), parafinas no volátiles (alcanos lineales y ramificados entre C11 - C40), naftenos (cicloalcanos o cicloparafinas), olefinas (alquenos) y aromáticos (Cando, 2011).

Las parafinas no volátiles, incluyen n-alcanos e isoprenoides, es decir, alcanos no ramificados e isoprenoides entre C11 - C40. Los isoprenoides no volátiles varían de C12 - C22 y los de interés en la biorremediación son el pristano (C19), fitano (C20), farneseno (C15) y norpristano (C18). El pristano y fitano se han utilizado como marcadores internos del grado de degradación de un crudo, no obstante, actualmente se usan los hopanos (Ramírez, 2014). En los naftenos, se incluye a los hopanos. Las olefinas son compuestos traza en el crudo de petróleo, pero se generan durante el proceso de cracking, constituyendo hasta 30% en las gasolinas y 1% en los fueles (Buendía, 2013).

Los hidrocarburos aromáticos tienen estructuras basadas en moléculas de benceno donde algunos hidrógenos pueden ser remplazados por grupos alquilo. Los monoaromáticos son el benceno, su monoalquilado tolueno y dialquilado xileno, (BTEX). Los diaromáticos mayoritarios son el naftaleno y sus alquilados, los aromáticos de tres anillos son el fenantreno, antraceno, fluoreno y sus derivados alquilados y entre los poliaromáticos de más de tres anillos, están el fluoranteno (tres anillos bencénicos y uno no bencénico), pireno y criseno (cuatro anillos), pireno y benzo (a) pireno (cinco anillos aromáticos) y coroneno con seis anillos (Soler, 2012).

El petróleo se extrae mediante la perforación de un pozo sobre el yacimiento y se traslada hacia su tratamiento primario, donde se deshidrata y estabiliza, eliminando

los compuestos más volátiles. Posteriormente, se lleva a las refinerías o plantas de mejoramiento. El conjunto de operaciones que se realizan en estas plantas son denominadas “procesos de refino” (destilación, conversión y tratamiento) que tienen por finalidad obtener del petróleo la mayor cantidad posible de productos que van desde los gases líquidos como el propano y butano hasta las fracciones más pesadas fuelóleo y asfaltos, pasando por los intermediarios gasolinas, gasoil y aceites lubricantes (Viñas, 2005).

La destilación es atmosférica y al vacío. La destilación atmosférica separa los componentes de una mezcla según su temperatura de ebullición. En la columna de destilación atmosférica o “topping” se obtiene el gas de refinería (fuel gas), gas licuado de petróleo (GLP), naftas liviana y pesada, kerosene, gases oil liviano y pesado y un residuo o fondo de “topping”. Este residuo es la fracción más pesada y se lleva a la unidad de destilación al vacío, donde se produce una vaporización, obteniéndose el gasoil liviano (GOL) y pesado (GOP) de vacío, gas oil parafinoso y el producto de fondo. Éste, denominado también asfalto o residuo de vacío es la materia prima para producir asfaltos o para obtener “fuel oil” o aceites lubricantes (Benini, Cortés, Monsalvo, Paladino, Spinelli, Tambussi y Trubiano, 2011).

Para hacer más rentable el proceso de refino, es necesario transformar los productos mediante los procesos de conversión: cracking y reformado. Los productos obtenidos en la destilación y conversión no pueden ser comercializados y deben ser sometidos a tratamientos como la alquilación e isomerización, para eliminar o transformar los componentes no deseados, principalmente los derivados del azufre. Un barril de crudo produce 79,5 L de gasolina; 11,5 L de combustibles para reactores; 34 L de gasoil; 15 L de lubricantes y 11,5 L de residuos más pesados (Benini et al., 2011).

Los aceites lubricantes se utilizan como base para la elaboración de lubricantes terminados. Según su composición química pueden ser naftémicos y parafínicos, que se diferencian entre sí por su menor y alto índice de viscosidad, respectivamente. Las grasas lubricantes sólidas o semisólidas se fabrican con un aceite lubricante y un agente que les da mayor densidad y consistencia. El aceite utilizado es refinado, de alto índice de viscosidad y los agentes espesantes son jabones de aluminio, bario, litio, sodio y

estroncio, además de arcilla, sílice, glicerol, aditivos antioxidantes, inhibidores de corrosión y pigmentos (INECC, s.f).

Los hidrocarburos totales de petróleo (TPH o HTP) o fracción TPH se define como aquellos hidrocarburos del extracto orgánico total (EOT) pertenecientes a las fracciones saturada (F1) y aromática (F2) según el método 3611b de la EPA (US Environmental Protection Agency, 1996). En el proceso se fracciona el EOT por cromatografía en columna de alúmina. Las fracciones F1 y F2 se concentran mediante rotavapor, obteniéndose la fracción TPH analizable por gravimetría y la fracción para determinar la concentración de TPH mediante cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización de llama GC - FID o cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, GC - MS (Viñas, 2005).

2.2.2 Biodegradación del petróleo

La biodegradación es el proceso por el cual bacterias, hongos y otros organismos utilizan los compuestos como fuente de carbono y energía, con formación de dióxido de carbono y agua. Los alcanos lineales son los hidrocarburos del petróleo más biodegradables; sin embargo, altas concentraciones de alcanos con 5-10 carbonos inhiben la degradación de muchos hidrocarburos, porque como solventes rompen la membrana lipídica de los microorganismos. Los alcanos con 20 - 40 carbonos tienen muy baja solubilidad en agua, lo cual interfiere en la biodegradación (Cando, 2011).

En los alcanos las monooxigenasas incorporan un átomo de oxígeno en el extremo terminal metilo y se forma un hiperóxido. El NADPH₂ dona sus electrones y reduce el átomo de oxígeno que quedó libre, formándose agua más un alcohol primario, que posteriormente es oxidado hasta acetaldehído y a su vez éste es oxidado hasta ácido graso, que finalmente es degradado por β -oxidación sucesiva (Loya, 2013; Ramírez, 2014).

La degradación de hidrocarburos aromáticos, se lleva a cabo mediante la activación del anillo y su ruptura. La activación es la incorporación de oxígeno en el anillo, o la dihidroxilación del núcleo aromático por mono o dioxigenasas. Después, los dihidrodioles son oxidados para formar derivados dihidroxilados como el catecol. La

escisión puede ocurrir intradiol u orto para originar ácido mucónico y extradiol o meta para formar el derivado de hidroxí–muconaldehídico del ácido. Los sustitutos alifáticos de los compuestos aromáticos, posteriormente son oxidados para formar ácidos grasos que son utilizados por microorganismos en la síntesis celular y producción de energía (Carreño, Mendoza, Villanueva, 2009).

2.2.3 Biorremediación

Las técnicas de remediación más importantes son la degradación natural y la biorremediación *in situ* y *ex situ*. En la biorremediación *in situ* se incluye la bioaumentación, bioestimulación y bioventing. En la biorremediación *ex situ* se consideran landfarming, biopilas y compostaje (Cando, 2011). En la degradación natural o atenuación, las fracciones volátiles se evaporan con rapidez, quedando los componentes alifáticos y aromáticos de cadena más larga que son oxidados por los microorganismos autóctonos del suelo hasta dióxido de carbono (Olguín et al., 2007; Cando, 2011).

La bioaumentación consiste en la adición controlada de microorganismos de acción dirigida, especialmente formulados y de ocurrencia natural para ayudar a los que se encuentran naturalmente y promover la biodegradación. La bioestimulación es la activación de los microorganismos autóctonos degradadores de hidrocarburos, mediante la adición de nutrientes y aceptores de electrones al entorno contaminado, en función de las deficiencias (Olguín et al., 2007). En el bioventing, bioventeo o bioaireación se suministra aire al terreno, para promover la actividad de los microorganismos presentes y degradar los hidrocarburos (Ñustez, 2012).

La técnica *ex situ* de landfarming consiste en tratar el suelo contaminado previamente excavado y trasladado a grandes superficies abiertas, protegido con una base impermeable, donde se voltea y airea para favorecer la actividad de las bacterias nativas. Con las biopilas o bioceldas se forman montones de dimensiones variables con una mezcla de suelo contaminado y materia orgánica y se airean de forma activa o pasiva. En el compostaje el suelo contaminado se mezcla con paja, astillas de madera u otro agente que proporcione porosidad, para un mayor flujo de aire y el material es degradado en aerobiosis bajo condiciones controladas de humedad y temperatura

(Cando, 2011; Loya, 2013).

Las etapas en la implementación de una tecnología de biorremediación son: i) caracterización físico-química del suelo, estudio geotécnico e hidrogeológico y análisis de riesgos, ii) desarrollo de ensayos de tratabilidad a escala de laboratorio, iii) desarrollo de ensayos a escala piloto e iv) implementación de la tecnología de biorremediación seleccionada (Ponce, 2014).

Los ensayos de tratabilidad determinan si un tratamiento es apropiado para la descontaminación. En la fase I se realiza la caracterización físico-química y microbiológica, se cuantifica la población microbiana degradadora y su proporción respecto a la heterótrofa del suelo contaminado y se investiga si la población microbiana es metabólicamente activa o es activable con bioestimulación. En la fase II se investigan los factores físicos-químicos y biológicos que afectan la biodegradación en ensayos de microcosmos (Ponce, 2014; Benites y Flores, 2015).

Los estándares de calidad ambiental (ECA) para suelo, aprobados con el Decreto Supremo N°011-2017-MINAM publicado el 2 de diciembre de 2017 (Ministerio del Ambiente, 2017) establecen como límite 200 a 500 mgkg⁻¹ (Fracción de hidrocarburos F1 o ligera), 1200 a 5000 mgkg⁻¹ (F2 o media) y 3000 a 6000 mgkg⁻¹ (F3 o pesada). Para los aromáticos volátiles los límites son: 0,03 mgkg⁻¹ (benceno), 0,37 mgkg⁻¹ (tolueno), 0,082 mgkg⁻¹ (etilbenceno) y 1 mgkg⁻¹ (xileno). Para los hidrocarburos poliaromáticos los límites son: 0,1 a 22 mgkg⁻¹ (naftaleno) y 0,1 a 0,7 mgkg⁻¹ (benzopireno).

2.2.4 Materia orgánica utilizada para la biorremediación

La materia orgánica favorece la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo, habiéndose reportado el efecto benéfico de la cachaza de caña de azúcar (Rodríguez y Geldres, 2017), compost (Alvaro, Martínez y Arocena, 2014; Saucedo et al., 2016), cascarilla de arroz (Hernández, Navas e Infante, 2017), lodo residual estabilizado (Cárdenas, Araujo, Gómez, Bohórquez, Gómez, Angulo, Saules y Morillo, 2010), bagazo de caña de azúcar (García et al., 2011; Ordaz, Martínez, Ramos, Sánchez, Martínez, Tenorio y Cuevas, 2011), estiércol

(Buendía, 2013) y humus (Fernández et al., 2015).

La cachaza o torta de cachaza es un residuo de la agroindustria de la caña de azúcar. Por cada tonelada de caña procesada se obtienen 30-50 kg de cachaza (Pérez, Sánchez, Palma y Salgado, 2011). Procede de la clarificación del jugo o de la filtración y lavado de los lodos sedimentados (tierra, ceras y raíces) durante este proceso (Arreola, Palma, Salgado, Camacho, Obrador, Juárez y Pastrana, 2003). Es utilizada como enmienda, que mejora las propiedades físicas y químicas del suelo, pero también aporta microorganismos y nutrientes como el fósforo (García et al., 2011). Este subproducto es un abono orgánico con alto contenido nutricional (Arreola et al., 2003).

El compostaje es el proceso biológico aerobio más utilizado para la transformación de los residuos orgánicos en condiciones controladas a un material húmico estable denominado compost (Isaza, Pérez, Laínes y Castañón, 2009). Este proceso es una alternativa para que los residuos sean transformados en materiales útiles que pueden ser reincorporados al sistema de producción de donde se originan (Pérez y Martínez, 2011). Cualquier producto orgánico puede ser compostado, mencionándose los residuos urbanos o municipales, agroindustriales, agrícolas, pecuarios y forestales (Salazar, 2014).

El compost es una enmienda orgánica (Pierre, Rossel, Quiroz y Granda, 2008). En la agricultura se usa como acondicionar del suelo; no obstante, también se aplica para la remoción de contaminantes orgánicos como los hidrocarburos (Salazar, 2014). El compost mejora las propiedades físicas (estructura y estabilidad, porosidad, permeabilidad y retención de agua), químicas (capacidad tampón, intercambio catiónico, materia orgánica, niveles de macro y micronutrientes) y propiedades biológicas del suelo al favorecer la coexistencia de los microorganismos, incrementar la microbiota y mesofauna, estimular la actividad microbiana y reducir la población de patógenos (Puerta, 2004).

La cascarilla o pajilla de arroz es residuo lignocelulósico, subproducto de la agroindustria (Córdoba, Rodríguez y Uribe, 2015). En el procesado del grano de arroz se

origina la granza, constituida por el arroz pilado (65,33%), semolina (9%), puntilla del arroz (2,5%) y cascarilla (23,17%). La semolina corresponde a las capas aleurónicas del grano, es decir, el pericarpio localizado entre la cáscara y el endospermo. Las puntillas de arroz son los granos quebrados del arroz pulido. La cascarilla es la parte exterior del grano maduro, compuesto por las glumas polea y lemma, unidas por dos estructuras con forma de gancho (Vargas et al., 2013).

La cascarilla de arroz contiene proteína cruda (1,9 – 3,0%), fibra cruda (34,5 – 45,9%), carbohidratos disponibles (26,5 – 29,8%), sílice (18,8 – 22,3%), calcio (0,6 – 1,3 mg g⁻¹), fósforo (0,3 – 0,7 mg g⁻¹), lignina (9 – 20%), celulosa (28 – 36%), hemicelulosa (12%) y 9,3 a 95% de nutrientes digeribles totales (Vargas et al., 2013).

La cascarilla de arroz es leñosa y abrasiva, con 19,3 – 20.3% de SiO₂ (Abril, Navarro y Abril, 2009), contenido por el cual no es apta para el consumo humano. Tiene una baja densidad aparente (0,1 – 0,16 g/cm³) que facilita su manejo, alta dureza (6 Mohs), capacidad calorífica de 3300 – 3600 cal kg y un rango de temperatura de incineración de 800 a 1000 °C. La baja conductividad térmica le confiere capacidad aislante y resistencia al fuego (Vargas et al., 2013).

El bajo costo y alta disponibilidad del recurso renovable cascarilla, favorece su investigación en diversos procesos como absorbente de iones metálicos (Córdoba et al., 2015), en la obtención de nuevos productos como los poliuretanos (Vargas et al., 2013), en la agricultura (Rodríguez, 2007) o en la biorremediación de suelos contaminados con petróleo (Hernández et al., 2017).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Material biológico

Suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo, cachaza de caña de azúcar, compost, cascarilla de arroz y semillas de *Raphanus sativus* L. “rabanito”.

3.1.2 Población y muestra

La población y muestra de estudio estuvo constituida por 15 unidades experimentales de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo, correspondientes a un diseño completamente aleatorio (DCA) con cinco tratamientos y tres repeticiones.

3.2 Métodos

3.2.1 Variables

a. Variables de la fase descriptiva

Características del suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo y de los sustratos utilizados para la biorremediación.

b. Variables de la fase explicativa

✓ Variable independiente

Materia orgánica (cachaza de caña de azúcar, compost y cascarilla de arroz)

✓ Variable dependiente

Biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo

3.2.2 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis

La investigación se realizó en dos fases. En la primera fase descriptiva se determinaron las características químicas, microbiológicas y toxicidad del suelo experimental contaminado con hidrocarburos de petróleo, así como también las características fisico-químicas de los sustratos utilizados para la biorremediación. En la segunda fase explicativa se determinó el efecto de la cachaza de caña de azúcar, compost y cascarilla de arroz en la biorremediación de suelo contaminado con

hidrocarburos de petróleo.

La hipótesis en la primera fase se contrastó con el diseño de una sola casilla de Goode y Hatt y en la segunda fase con el diseño experimental completamente aleatorio, DCA (Hernández, Fernández y Baptista, 2014). Los tratamientos fueron cinco, correspondientes a T1: Testigo absoluto (agua), T2: Testigo abiótico (formaldehído), T3: cachaza de caña de azúcar, T4: compost, T5: cascarilla de arroz.

3.2.3 Primera etapa

En la primera etapa de la investigación se caracterizó un suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo y los sustratos cachaza, compost y cascarilla de arroz.

a. Muestreo y caracterización de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo

En un taller de reparación de vehículos terrestres de la provincia de Chiclayo (Figura 1), región Lambayeque, se colectaron 200 kg de suelo contaminado con HTP provenientes de aceite residual automotriz, (ARA) (Figura 2). En el suelo del taller se seleccionó el área contaminada, se delimitaron cinco puntos de 1 m² y con un pico se fragmentó la capa superficial (15 cm). El suelo contaminado (Figura 3) se depositó con ayuda de una palana en cinco sacos de polietileno y se transportó al invernadero, en Lambayeque. En este lugar, el contenido de los cinco sacos se depositó sobre una manta de polietileno y se fragmentó (martillo), hasta su pulverización (Figura 4).

El suelo pulverizado se pasó a través de una malla (2 mm) de hilo de nylon poliéster (Figuras 5, 6), el tamizado se homogeneizó mediante el método del “cuarteo” (León, 2016), que consistió en formar un cono o “montón”, aplanarlo lo más homogéneo posible, dividirlo en cuatro cuadrantes iguales y aleatoriamente de uno de ellos extraer 2 kg de suelo para la caracterización correspondiente. La muestra de 2 kg previamente obtenida se utilizó para el análisis químico y microbiológico y para determinar la toxicidad de los contaminantes del suelo.

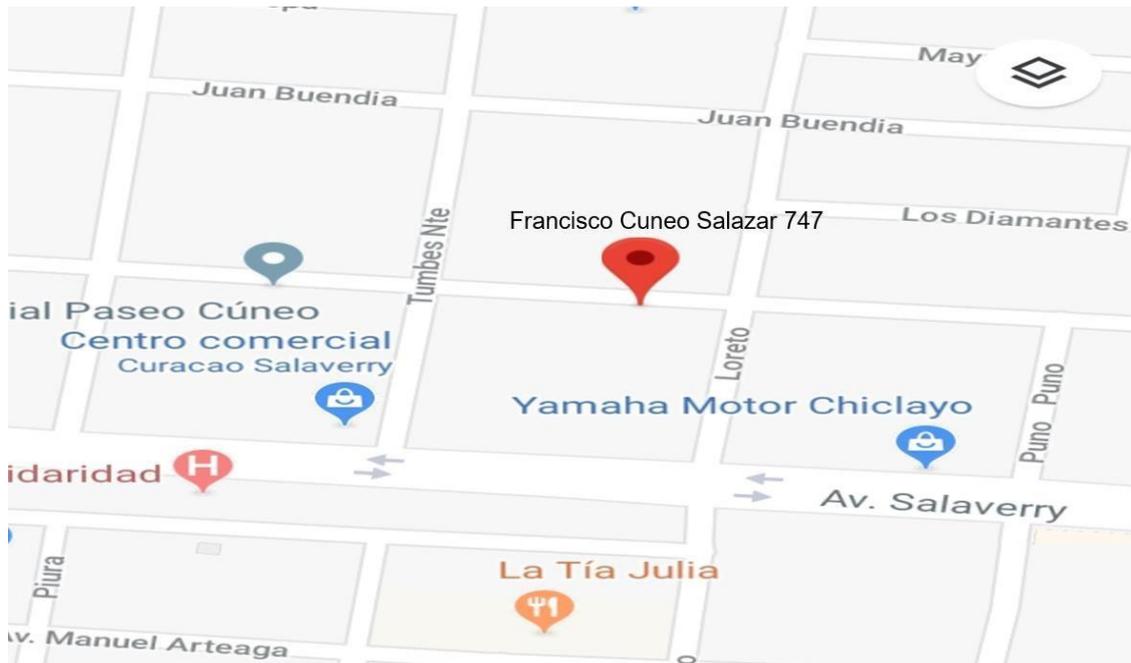


Figura 1. Distrito de la región Lambayeque donde se colectó las muestras de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo. (<https://goo.gl/maps/Nvtesu5rCw3WDEj9>).

Autoría propia



Figura 2. Recolección de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo en Chiclayo, región Lambayeque 2018.

Autoría propia



Figura 3. *Suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo, Lambayeque 2018*
Autoría propia



Figura 4. *Fragmentado de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo.*
Autoría propia



Figura 5. *Tamizado de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo.*
Autoría propia



Figura 6. *Suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo, fragmentado y Tamizado.*
Autoría propia

El análisis químico del suelo contaminado se realizó en una submuestra de 1 kg, en el Laboratorio NSF INASSA S.A.C. en Lima, determinándose el contenido de materia orgánica (%), fósforo (ppm), potasio (ppm), carbonato de calcio (%), la concentración de aceites y grasas, hidrocarburos F1 o fracción ligera (C6 – C10), F2 o fracción media (>C10 – C28) y F3 o fracción pesada (>C28 – C40).

El análisis microbiológico por triplicado de submuestras de 10 g consistió en determinar el número más probable (NMP/100g) de los microorganismos hidrocarbonoclasticos (Contreras y Carreño, 2018). Las submuestras se depositaron en matraces con 90 mL de solución salina, NaCl 0,85% (p/v) obteniéndose suspensiones del suelo, con las que se realizaron diluciones decimales hasta 10^{-9} . De estas diluciones se tomaron 1 mL y se inocularon por triplicado en tubos con 10 mL de caldo Bushnell Haas (Anexo 1), e inmediatamente después en cada tubo se vertieron 0,025 mL (25uL) de petróleo como fuente de carbono (Figura 7). Los tubos se incubaron a 30°C hasta por 10 días y la turbidez del medio de cultivo se consideró positivo a la presencia de microorganismos hidrocarbonoclasticos, realizándose el cálculo correspondiente según el método estándar (Huapaya, 2011).

La toxicidad de los contaminantes del suelo contaminado se investigó por triplicado en submuestras de 10 g (Salas y Meza, 2011), utilizando semillas de rabanito, a las que previamente se les determinó el porcentaje de germinación (Benites y Flores, 2015). En cuatro placas Petri con papel filtro esterilizado y humedecido con agua destilada se depositaron 25 semillas por placa, se taparon y se mantuvieron a temperatura ambiente (28°C), humedeciéndolas según el requerimiento, hasta obtener el máximo de germinación después de 120 horas.



Figura 7. Número más probable de microorganismos hidrocarbonoclasticos en suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo.
Autoría propia

Para el ensayo de toxicidad, en la base de placas de Petri, se colocaron tres capas de papel filtro y encima las submuestras de 10 g de suelo, se agregaron 12 mL de agua destilada y en cada placa, con una pinza se depositaron 25 semillas de rabanito (Figura 8). Todas las placas de Petri se cubrieron con papel metálico, a temperatura ambiente (28°C) y después de 48 horas se vertieron 5 mL de agua destilada, para mantener la humedad requerida. Cada 48 horas hasta las 192 horas se contaron las semillas germinadas (Figura 9) y se midió la longitud de las radículas emergidas, retirándose en cada evaluación las semillas germinadas. Asimismo, se calculó (Llanos, 2012) el porcentaje relativo de germinación (PGR), crecimiento relativo de la radícula (CRR) e índice de germinación (IG):

$$PGR = \frac{\text{Número de semillas germinadas en el suelo contaminado}}{\text{Número de semillas germinadas en el testigo}} \times 100$$

$$CRR = \frac{\text{Longitud promedio de radículas en el suelo contaminado}}{\text{Longitud promedio de radículas en el testigo}} \times 100$$

$$IG = \frac{PGR \times CRR}{100}$$

La fitotoxicidad se determinó con el criterio de interpretación (Rodríguez, 2012): IG ≥ 80% indica que no hay sustancias fitotóxicas o están en muy baja concentración: 80% > IG > 50% se interpreta como presencia moderada de estas sustancias y un IG ≤ 50% indica fuerte presencia de sustancias fitotóxicas, criterios correspondientes a niveles de fitotoxicidad bajo, moderado y severo (Contreras y Carreño, 2018).

b. Características de los sustratos orgánicos utilizados en la biorremediación

Los sustratos orgánicos utilizados durante la investigación correspondieron a cachaza, compost y cascarilla de arroz. La cachaza (un saco) se colectó en el área de almacenamiento de la empresa Agro - Pucalá S. A. A. El compost (dos sacos) se adquirió en una unidad Agropecuaria en Mochumí - Lambayeque. La cascarilla de arroz (un saco) se colectó en los alrededores de un molino de grano ubicado en el km 4 de la carretera a Lambayeque.



Figura 8. Prueba de toxicidad del suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo.
Autoría propia

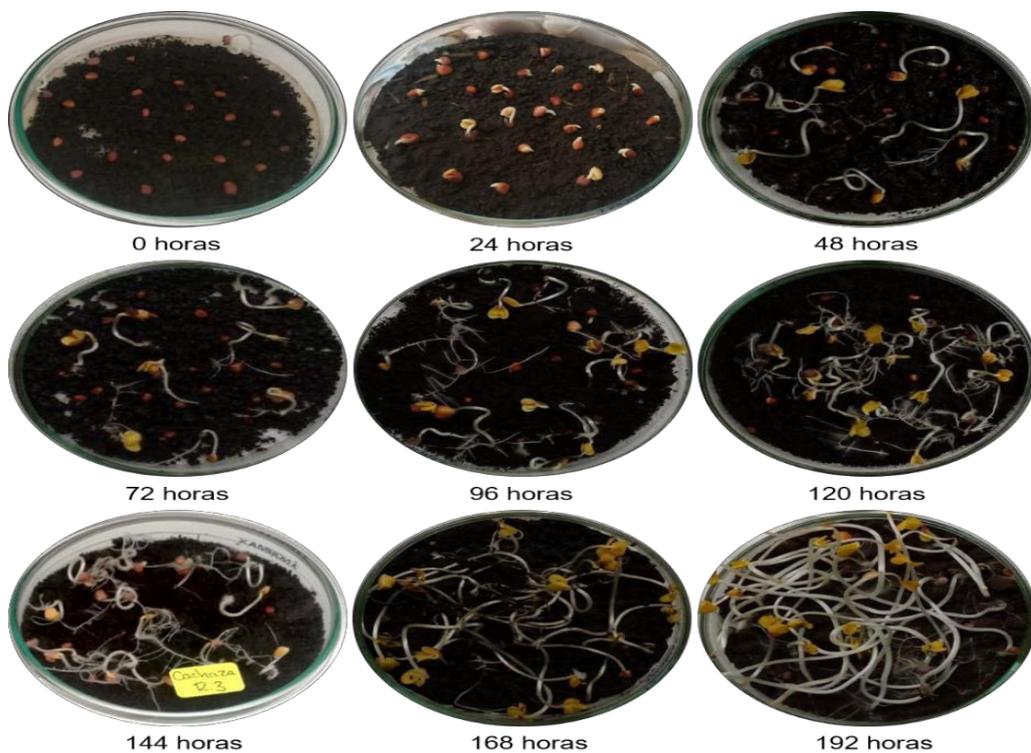


Figura 9. Semillas de *Raphanus sativus* L. germinadas en suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo.
Autoría propia

Los sustratos para biorremediación se llevaron al invernadero de la Facultad de Ciencias Biológicas. La cachaza de caña de azúcar previamente se deshidrató a temperatura ambiente durante 5 días, se trituró y tamizó con una malla de nylon. Los sustratos se homogenizaron mediante el método del "cuarteo" (León, 2016), obteniéndose una muestra representativa de 1 kg de cada sustrato, para el análisis físico-químico en el laboratorio de Instituto de Innovación Agraria, Estación Experimental Agraria Vista Florida en Chiclayo.

3.2.4 Segunda etapa: Efecto de la materia orgánica en la biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo

El efecto de la materia orgánica en la biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos se determinó en un ensayo conducido bajo un diseño experimental completamente aleatorio (DCA) con cinco tratamientos, tres repeticiones por tratamiento y un total de 15 unidades experimentales (Tabla 1).

El proceso de biorremediación se realizó en condiciones de invernadero, en microcosmos constituidos por macetas de arcilla de 20 cm de diámetro por 25 cm de altura (Figura 10), en las que previamente se depositaron 1,5 kg de grava para facilitar el drenaje. En 15 bolsas de polietileno de 10 kg de capacidad se mezclaron durante 5 minutos volúmenes iguales (1:1, v/v) de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo (3,5 kg) y cachaza (0,9 kg), compost (3,5 kg) o cascarilla de arroz (0,9 kg), según el tratamiento (4:1; 1:1 y 4:1, correspondiente).

Las mezclas de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo se depositaron sobre la grava de cada maceta. En el testigo absoluto solo se depositó el suelo y en el testigo abiótico se aplicó formaldehído 5% y las macetas se cubrieron con bolsas de polietileno negro durante 3 días. Para facilitar la aireación, el suelo de todos los microcosmos se removió con una palanita de mano durante 5 minutos dos veces por semana y luego se regó con agua de clorada (24 horas).

Tabla 1.

Tratamientos para determinar el efecto de la materia orgánica en la biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo

Tratamientos	r ₁	r ₂	r ₃
T1: Testigo absoluto	X	X	X
T2: Testigo abiótico (formaldehído)	X	X	X
T3: Cachaza de caña de azúcar	X	X	X
T4: Compost	X	X	X
T5: Cascarilla de arroz	X	X	X



Figura 10. *Ensayo para determinar el efecto de la materia orgánica en la biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo*
 Autoría propia

Durante la biorremediación se registraron las temperaturas máximas (30°C), mínima (20°C) y media (25°C), datos obtenidos por la estación meteorológica de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, ubicada en el fundo “El Ciénago” en Lambayeque. El proceso de biorremediación fue monitoreado durante 90 días, investigándose cada 30 días el número de microorganismos hidrocarbonoclasticos y la toxicidad de los contaminantes, según la metodología descrita en el ítem 3.2.3a.

La eficiencia (%) de la biorremediación del suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo del tratamiento con el que se alcanzó el mejor índice de germinación y menor nivel de toxicidad, calculó mediante la fórmula utilizada por Contreras y Carreño (2018):

$$\text{Eficiencia (\%)} = \frac{\text{Aceites y grasas final} - \text{Aceites y grasas inicial}}{\text{Aceites y grasas inicial}} \times 100$$

3.3 Análisis estadístico de los datos

Los valores obtenidos en la investigación fueron ordenados en tablas y figuras. Se realizó el análisis de varianza de los valores del índice de germinación para determinar las diferencias entre los tratamientos y la superioridad entre ellos se estableció mediante la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, con un nivel de significancia de 0,05 (Hernández et al., 2014), utilizando los programas Microsoft Office Word y Excel versión 2013.

IV. RESULTADOS

4.1 Características del suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo

En el suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo provenientes del aceite residual automotriz se cuantificaron (Tabla 2, anexo 3), aceites y grasas ($147\ 340\ \text{mgkg}^{-1}$), las fracciones ligera F1 ($<19\ \text{mgkg}^{-1}$), media F2 ($14\ 443\ \text{mgkg}^{-1}$) y pesada F3 ($15\ 240\ \text{mgkg}^{-1}$) de hidrocarburos y microorganismos hidrocarbonoclasticos ($1,4 \times 10^3$). El índice de germinación de las semillas de rabanito en el suelo contaminado fue de 2,60, correspondiente a un nivel severo de fitotoxicidad (Tabla 3). La fertilidad del suelo presentó buen tenor de materia orgánica, niveles altos de fósforo (15,2 ppm) y potasio (437 ppm) y niveles medios de carbonato de calcio (1,42%).

4.2 Características de la materia orgánica utilizada para la biorremediación

Los sustratos utilizados para la biorremediación presentaron 7,80 a 9,74% de humedad; reacción ligeramente ácida (pH 6,9) a moderadamente alcalino (pH 7,6); 90,26 a 92,20% de materia seca y 10,15 a 13,12% de cenizas (Tabla 4). El contenido de sales solubles fue bajo, con valores en la conductividad eléctrica de $2,95\ \text{dSm}^{-1}$ (cachaza) a $3,40\ \text{dSm}^{-1}$ (cascarilla de arroz), a excepción del compost con $9,06\ \text{dSm}^{-1}$.

En la cachaza y compost el contenido de materia orgánica fue de 25,97 a 29,35%; el carbono de 15,06 a 17,02% y la relación C/N de 11,41 a 11,58. En la cascarilla de arroz los valores fueron de 60,35%; 35% y 18,42, respectivamente. En todos los sustratos se registró un buen tenor de materia orgánica y una relación C/N que evidenció una rápida descomposición y mineralización en la cachaza y compost. Por el contrario, en la cascarilla de arroz la relación C/N indicó una descomposición lenta.

Los nutrientes fueron muy aceptables en la cachaza (nitrógeno, fósforo, potasio, calcio y cenizas), en el compost (nitrógeno, potasio y cenizas) y en la cascarilla (nitrógeno, potasio y cenizas); no obstante, en la cascarilla y compost los niveles de fósforo, calcio y magnesio fueron muy bajos.

Tabla 2.

Características químicas y microbiológicas del suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo, Lambayeque, 2019

Características	Valores	Métodos
Materia orgánica (%)	7,80	
Fósforo (ppm)	15,20	
Potasio (ppm)	437,00	
Carbonato de calcio (%)	1,42	
Aceites y grasas (mg kg ⁻¹)	147 340	SMEWW-APHA-AWWA-WEF
Hidrocarburos F1 o fracción ligera C6 – C10 (mg kg ⁻¹)	<19	EPA 8015C
Hidrocarburos F2 o fracción media >C10 – C28 (mg kg ⁻¹)	14 443	EPA 8015C
Hidrocarburos F3 o fracción pesada >C28 – C40 (mg kg ⁻¹)	15 240	EPA 8015C
Microorganismos hidrocarbonoclasticos (NMP 100g ⁻¹)	1,4 x 10 ³	Número más probable

Tabla 3.

Nivel de toxicidad del suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo Lambayeque, 2019

Características	Valores
Promedio elongación radicular (mm)	4,67
Porcentaje relativo de germinación (PGR)	15,38
Crecimiento relativo de la radícula (CRR)	16,90
Índice de germinación (%IG)	2,60
Nivel de fitotoxicidad	Severo

Autoría propia

Tabla 4.

Características físico-químicas de la materia orgánica utilizada en la biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo, Lambayeque, 2019

Parámetros	Unidades	Cachaza de <i>Saccharum officinarum</i> L.	Compost	Cascarilla de <i>Oryza sativa</i>
Humedad	%	8,53	9,74	7,80
pH	—	7,60	6,90	7,00
Materia seca	%	91,47	90,26	92,20
Cenizas	%	11,08	13,32	10,15
Cec	dSm ⁻¹	2,95	9,06	3,40
Materia orgánica	%	29,35	25,97	60,35
Carbono	%	17,02	15,06	35,00
Relación C/N	—	11,58	11,41	18,42
Nitrógeno	%	1,47	1,32	1,90
Fosforo (P ₂ O ₅)	%	2,80	0,64	0,00
Potasio (K ₂ O)	%	1,46	2,20	3,20
Calcio (CaO)	%	1,77	0,87	7,80
Magnesio (MgO)	%	0,75	0,37	7,00

4.3 Efecto de la materia orgánica en la biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo

El rango en el NMP de microorganismos hidrocarbonoclasticos al momento del establecimiento de los microcosmos (Tabla 5, anexo 4) fue de $1,3 \times 10^3$ en T2 (testigo abiótico) a $3,5 \times 10^3$ en T3 (cachaza). El NMP de microorganismos se incrementó hasta los 60 días en todos los tratamientos, a excepción de T1 (testigo absoluto) con 30 días. El mayor valor en el NMP ($4,0 \times 10^3$) se alcanzó con T3 (cachaza) y el menor valor con T1 (testigo absoluto). A los 90 días el NMP de microorganismos disminuyó en todos los tratamientos, a excepción de T1 (testigo absoluto) en el que disminuyó a los 60 días. El mayor valor en el NMP a los 90 días correspondió a T3 (cachaza) y el menor valor a T1 (testigo absoluto).

Los niveles de fitotoxicidad del suelo contaminado con HTP se monitoreó a los 0, 30, 60 y 90 días (Tablas 6 - 9). El índice de germinación (IG) de las semillas de rabanito al momento del establecimiento de los microcosmos osciló entre 5,05 en T1 (testigo absoluto) a 38,47 en T4 (compost) (Tabla 10), valores correspondientes a un nivel de toxicidad severo. El IG aumentó en todos los tratamientos con materia orgánica (T3, T4, T5) a partir de los 30 días hasta los 90 días. En los testigos absoluto y abiótico el IG disminuyó a los 30 días y luego se incrementó hasta los 90 días.

El nivel de toxicidad fue severo en el suelo de todos los tratamientos a los 0 días y moderado en T3 (cachaza) a los 30 días y T4 (compost) a los 60 días. El nivel de toxicidad fue bajo en T3 (cachaza) a los 60 días y T4 (compost) a los 90 días. En los testigos absoluto y abiótico el nivel de toxicidad fue severo a los 90 días, con IG de 5,07 y 1,16%, respectivamente. En T5 (cascarilla de arroz) el nivel de toxicidad también fue severo; no obstante, el IG fue de 47,42%.

A los 90 días de la biorremediación del suelo contaminado, la prueba F del análisis de varianza del índice de germinación de rabanito demostró alta significancia (Anexos 5 a 8) y según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey los mayores valores correspondieron a T3 (cachaza) y T4 (compost), diferenciándose significativamente de los demás tratamientos (Tabla 11). El suelo biorremediado con cachaza, a los 90 días, presento un nivel de toxicidad bajo, con una concentración de aceites y grasas que disminuyó de $30\,743 \text{ mgkg}^{-1}$ a $9\,076 \text{ mgkg}^{-1}$, correspondiente a una eficiencia de 70,48 % en la biorremediación (Tabla 12).

Tabla 5.

Número más probable de microorganismos hidrocarbonoclasticos de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo durante la biorremediación con materia orgánica

Tratamientos	NMP/100mL			
	0 días	30 días	60 días	90 días
Testigo absoluto (T1)	2,1x10 ³	3,5x10 ³	2,1x10 ³	1,4x10 ³
Testigo abiótico (T2)	1,3x10 ³	1,9x10 ³	2,2x10 ³	2,1x10 ³
Cachaza de caña de azúcar (T3)	3,5x10 ³	3,8x10 ³	4,0x10 ³	3,7x10 ³
Compost (T4)	2,4x10 ³	2,6x10 ³	2,7x10 ³	2,6x10 ³
Cascarilla de arroz (T5)	2,5x10 ³	2,8x10 ³	2,9x10 ³	2,6x10 ³

*Promedio de tres repeticiones

Autoría propia

Tabla 6.

Niveles de fitotoxicidad del suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo al momento del establecimiento de los microcosmos

Tratamientos	Toxicidad en <i>Raphanus sativus</i> L. "rabanito"					
	r1		r2		r3	
	Índice de germinación (%)	Fitotoxicidad (Nivel)	Índice de germinación (%)	Fitotoxicidad (%)	Índice de germinación (%)	Fitotoxicidad (nivel)
Testigo absoluto (T1)	2,60	Severo	5,22	Severo	7,34	Severo
Testigo abiótico (T2)	11,94	Severo	8,25	Severo	8,10	Severo
Cachaza de caña de azúcar (T3)	28,07	Severo	27,48	Severo	29,35	Severo
Compost (T4)	37,47	Severo	41,59	Severo	36,36	Severo
Cascarilla de arroz (T5)	15,44	Severo	17,43	Severo	12,60	Severo

Autoría propia

Tabla 7.

Niveles de fitotoxicidad del suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo después de 30 días en microcosmos

Tratamientos	Toxicidad en <i>Raphanus sativus</i> L. "rabanito"					
	r1		r2		r3	
	Índice de germinación (%)	Fitotoxicidad (Nivel)	Índice de germinación (%)	Fitotoxicidad (%)	Índice de germinación (%)	Fitotoxicidad (nivel)
Testigo absoluto (T1)	2,04	Severo	3,50	Severo	4,00	Severo
Testigo abiótico (T2)	0,00	Severo	5,28	Severo	1,11	Severo
Cachaza de caña de azúcar (T3)	51,42	Severo	51,98	Severo	58,90	Severo
Compost (T4)	39,72	Severo	44,76	Severo	38,82	Severo
Cascarilla de arroz (T5)	16,92	Severo	12,10	Severo	17,16	Severo

Autoría propia

Tabla 8.

Niveles de fitotoxicidad del suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo después de 60 días en microcosmos

Tratamientos	Toxicidad en <i>Raphanus sativus</i> L. "rabanito"					
	r1		r2		r3	
	Índice de germinación (%)	Fitotoxicidad (Nivel)	Índice de germinación (%)	Fitotoxicidad (%)	Índice de germinación (%)	Fitotoxicidad (nivel)
Testigo absoluto (T1)	4,20	Severo	6,59	Severo	2,02	Severo
Testigo abiótico (T2)	0,22	Severo	1,73	Severo	1,44	Severo
Cachaza de caña de azúcar (T3)	85,62	Bajo	86,93	Bajo	80,25	Bajo
Compost (T4)	65,37	Moderado	47,82	Severo	51,52	Moderado
Cascarilla de arroz (T5)	28,86	Severo	25,88	Severo	22,84	Severo

Autoría propia

Tabla 9.

Niveles de fitotoxicidad del suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo después de 90 días en microcosmos

Tratamientos	Toxicidad en <i>Raphanus sativus</i> L. "rabanito"					
	r1		r2		r3	
	Índice de germinación (%)	Fitotoxicidad (Nivel)	Índice de germinación (%)	Fitotoxicidad (%)	Índice de germinación (%)	Fitotoxicidad (nivel)
Testigo absoluto (T1)	5,20	Severo	5,83	Severo	4,17	Severo
Testigo abiótico (T2)	0,00	Severo	1,02	Severo	2,45	Severo
Cachaza de caña de azúcar (T3)	98,12	Bajo	92,93	Bajo	86,83	Bajo
Compost (T4)	97,17	Bajo	81,92	Bajo	78,30	Moderado
Cascarilla de arroz (T5)	44,58	Severo	41,54	Severo	56,14	Moderado

Autoría propia

Tabla 10.

Índice de germinación de Raphanus sativus L. y nivel de fitotoxicidad del suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo durante la biorremediación con materia orgánica

Tratamientos	0 días		30 días		60 días		90 días	
	IG (%)	Fitotoxicidad	IG (%)	Fitotoxicidad	IG (%)	Fitotoxicidad	IG (%)	Fitotoxicidad
Testigo absoluto (T1)	5,05	Severo	3,18	Severo	4,27	Severo	5,07	Severo
Testigo abiótico (T2)	9,43	Severo	2,13	Severo	1,13	Severo	1,16	Severo
Cachaza de caña de azúcar (T3)	28,30	Severo	54,10	Moderado	84,27	Bajo	92,63	Bajo
Compost (T4)	38,47	Severo	41,10	Severo	54,90	Moderado	85,76	Bajo
Cascarilla de arroz (T5)	15,16	Severo	15,39	Severo	25,86	Severo	47,42	Severo

*Promedio de tres repeticiones

Autoría propia

Tabla 11.

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de las medias del índice de germinación de Raphanus sativus L. durante la biorremediación de suelo con materia orgánica

Tratamientos	Índice de germinación (%)							
	0 días	Sign. *	30 días	Sign. *	60 días	Sign. *	90 días	Sign. *
Testigo absoluto (T1)	5,05	d	3,18	d	4,27	d	5,07	c
Testigo abiótico (T2)	9,43	cd	2,13	d	1,13	d	1,16	c
Cachaza de caña de azúcar (T3)	28,30	b	54,10	a	84,27	a	92,63	a
Compost (T4)	38,47	a	41,10	b	54,90	b	85,76	a
Cascarilla de arroz (T5)	15,16	c	15,39	c	25,86	c	47,42	b

*p < 0,05

Tabla 12.

Características del suelo biorremediado con cachaza de Saccharum officinarum L.

Características	Días			
	0	30	60	90
Microorganismos hidrocarbonoclasticos (NMP/100g)	3,5 x 10 ³	3,8 x 10 ³	4,0 x 10 ³	3,7 x 10 ³
Índice de germinación (%)	28,30	54,10	84,27	92,63
Nivel de toxicidad	Severo	Moderado	Bajo	Bajo
Aceites y grasas (mgkg ⁻¹)	30 743			9 076
Eficiencia de la biorremediación (%)	-----	-----	-----	70,48

V. DISCUSIÓN

La concentración ($147\ 340\ \text{mgkg}^{-1}$) de aceites y grasas en el suelo contaminado con ARA fue mayor a $15\ 318\ \text{mgkg}^{-1}$ (TPH= $14\ 921\ \text{mgkg}^{-1}$), cuantificados por León (2016) en el suelo aledaño a un establecimiento de lavado y lubricación de carros, con un vertimiento promedio diario de 5 galones de ARA. La concentración inicial de HTP debe ser considerada (Maldonado, Rivera, Izquierdo y Palma, 2010) porque en el proceso de biorremediación, ésta mantiene una relación inversa con la biodegradación por la inhibición del metabolismo celular (Ferreira, Santos y Pessoa, 2013) y consecuente disminución de las poblaciones microbianas, que son los elementos más importantes en la degradación de los HTP (Maldonado et al., 2010).

Balderas y Sánchez (2015) concluyeron que en un suelo con más de $35\ 000\ \text{mgkg}^{-1}$ de ARA son mínimas las probabilidades de éxito en la biorremediación, por lo que estos investigadores plantearon el uso de una solución mineral para la bioestimulación, que inicie la mineralización de la fracción alifática del ARA y posteriormente la biorremediación con bacterias o la fitorremediación. Al respecto, Saucedo et al. (2016) para la biorremediación de un suelo con $45\ 000\ \text{mgkg}^{-1}$ de ARA plantearon en una primera etapa la bioestimulación con lombricompost y composta bovina y en la segunda etapa la fitorremediación con *Zea mays*, potenciada con *Burkholderia cepacia* y *Rhizobium etli*.

La bioestimulación favorece la degradación de los HTP por los microorganismos autóctonos, lo que indica que esta estrategia, así como el monitoreo de la atenuación natural son las mejores opciones para remediar suelos impactados con HTP (Olguín et al., 2007). La materia orgánica como bioestimulante fue utilizada previamente como elemento en la biorremediación de suelos impactados, mencionándose la cachaza de caña de azúcar (Rodríguez y Geldres, 2017), compost de aserrín (Buendía, 2013), compost de biosólidos (Alvaro et al., 2014), lombricompost y composta bovina (Saucedo et al., 2016) y cascarilla de arroz (Hernández et al., 2017).

La materia orgánica puede constituir enmiendas o texturizantes en la biorremediación de suelos (García et al., 2011). El bagazo de caña de azúcar, paja, aserrín y corteza son utilizados como texturizantes que mejoran la aireación,

porosidad y disminuyen la humedad durante el proceso del composteo para la degradación de HTP (Scelza, Rao y Gianfreda, 2007), el lodo residual estabilizado como esponjante y fertilizante (Cárdenas et al., 2010), la cachaza como enmienda y abono orgánico (Arreola et al., 2003), el estiércol y humus líquido como agentes bioestimulantes (Fernández et al., 2015) y la cascarilla como agente estructurante con capacidad para retener y mejorar la actividad microbiana (Hernández et al., 2017).

Las características químicas de los sustratos orgánicos, evidenciaron sus cualidades como fertilizantes y promotores del crecimiento microbiano (Cárdenas et al., 2010); sin embargo, los valores no fueron los requeridos en todos los casos. La cascarilla de arroz presentó el mayor valor en la relación C/N, característica que no es deseable en la biorremediación, porque los hidrocarburos incrementan esta relación, disminuyendo la disponibilidad de nitrógeno, elemento limitante en el proceso (Ferrera, Alarcón, Mendoza, Sangabriel, Trejo, Cruz, López y Delgadillo, 2007). Asimismo, la relación C/N correspondió a una degradación muy lenta de la materia orgánica, característica que afecta en forma negativa la biodegradación (Pérez y Martínez, 2011).

El compost presentó una CE de $9,06 \text{ dSm}^{-1}$; no obstante, a un producto calificado de clase A le corresponde un CE a 3 dSm^{-1} . Es necesario remarcar que el compost puede alcanzar niveles considerables de salinidad, debido a la presencia de sales en los materiales originales y a su concentración relativa durante la mineralización (Isaza et al., 2009)

El calcio y fósforo de la cachaza se encuentran en la caña de azúcar, pero se incrementan durante el proceso de clarificación del jugo, en el que los iones calcio de la lechada de cal adicionada unen las impurezas coloidales y el contenido de P_2O_5 . Esta masa coloidal Ca-P se precipita y es removida en los filtros, en forma de cachaza (Saavedra, 2008). La cachaza con 8,53% de humedad por su deshidratación previa durante 5 días presentó 29,35% de materia orgánica, valor inferior a 68% registrado por Saavedra (2008) y Arreola et al. (2003) en cachaza con 78 % de humedad.

El incremento de los microorganismos hidrocarbonoclasticos en todos los tratamientos con materia orgánica evidenció la reactivación de los microorganismos autóctonos del suelo contaminado por los nutrientes incorporados, aseveración confirmada por el análisis físico-químico. Este proceso se denomina bioestimulación

o tecnología de biorremediación que consiste en la adición de nutrientes o aceptores de electrones para activar a los microorganismos hidrocarbonoclasticos propios del suelo contaminado (Olguín et al., 2007).

La disminución de los microorganismos hidrocarbonoclasticos después de un periodo de incremento en todos los tratamientos, coincide con las observaciones de Ferreira et al. (2013) a los 15-30 días y Ordaz et al. (2011) a los 20 días. Esta disminución es explicada por el consumo de los hidrocarburos biodegradables como fuente de carbono y energía, quedando los sustratos más recalcitrantes conforme transcurre el tiempo (Hernández et al., 2017). Los compuestos del petróleo no se biodegradan con la misma facilidad. El proceso será más lento conforme la cadena sea más insaturada o presente mayor longitud o ramificaciones y en los aromáticos el tiempo dependerá del número de anillos, requiriéndose inclusive de cometabolismo (Silva, 2011).

Los microorganismos hidrocarbonoclasticos son aquellos heterótrofos que utilizan los HTP como fuente de carbono y energía (Contreras y Carreño, 2018). Cárdenas et al. (2010) aplicaron lodos residuales para la biorremediación de suelo contaminado con HTP y observaron incremento de los microorganismos heterótrofos entre los 30 y 60 días y disminución a los 90 días, como consecuencia del consumo parcial de la materia orgánica, consumo rápido de nitrógeno (30 días) y progresivo del fósforo (90 días). A su vez, Hernández et al. (2017) investigaron los indicadores de la actividad microbiológica en la fitorremediación de suelo impactado con petróleo extrapesado y determinaron incremento de la respiración basal y actividad deshidrogenasa los primeros 20-30 días y disminución progresiva hasta los 120 días, en similar comportamiento al de las fracciones biodegradables de los hidrocarburos.

La materia orgánica aceleró la disminución de la toxicidad del suelo biorremediado, en comparación con los testigos, coincidiendo con los reportes de García et al. (2011), Alvaro et al. (2014) y Hernández et al. (2017), investigadores que determinaron diferencias significativas en la degradación de los HTP con la aplicación de la cachaza, compost y cascarilla de arroz en comparación con los testigos.

El nivel de toxicidad fue bajo en los tratamientos con cachaza de caña de azúcar (60 días) y compost a los (90 días). Ambos son utilizados como enmiendas (Ordaz et al., 2011), con valores en la relación C/N que corresponden a una rápida

descomposición de la materia orgánica (Pérez y Martínez, 2011); no obstante, la superioridad en la velocidad de remoción de la toxicidad del suelo se puede atribuir a los niveles muy aceptables de fósforo y calcio en la cachaza y muy bajos en el compost. Según Ordaz et al. (2011) el fósforo es el nutriente que más favorece la activación de los microorganismos autóctonos del suelo y los del residuo orgánico con capacidad hidrocarbonoclástica.

La cachaza fue el residuo orgánico con el que se alcanzó la disminución de la toxicidad del suelo en el menor tiempo. De igual manera, García et al. (2011) aplicaron el residuo agroindustrial en un suelo con $14\ 300\ \text{mgkg}^{-1}$ de HTP y después de 15 días reportaron 51,4% de disminución de los contaminantes.

VI. CONCLUSIONES

- ✓ El suelo contaminado en un establecimiento de reparación de vehículos terrestres presentó materia orgánica, fósforo, potasio, carbonato de calcio, aceites y grasas ($147\ 340\ \text{mgkg}^{-1}$), fracción F1 ($<19\ \text{mgkg}^{-1}$), media F2 ($14\ 443\ \text{mgkg}^{-1}$), pesada F3 ($15\ 240\ \text{mgkg}^{-1}$) de hidrocarburos, microorganismos hidrocarbonoclasticos y un nivel severo de toxicidad.
- ✓ La cachaza de caña de azúcar, compost y cascarilla de arroz presentaron materia orgánica, carbono, nitrógeno, fósforo y potasio.
- ✓ La cachaza de caña de azúcar y compost aceleraron la biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo alcanzándose un nivel bajo de toxicidad a los 60 días con la cachaza y 90 días con el compost.
- ✓ La eficiencia de biorremediación en el suelo con cachaza fue de 70,48 %.

VII. RECOMENDACIONES

- ✓ Determinar el efecto de la cachaza de caña de azúcar y compost en la biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo a nivel de planta piloto.
- ✓ Cuantificar las fracciones F1 ligera, F2 media y F3 pesada y aromáticos en el suelo biorremediado con cachaza de caña de azúcar y compost.
- ✓ Determinar el efecto de diferentes dosis de cachaza de caña de azúcar y compost en la biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexander, M. (1994). *Introducción a la Microbiología del Suelo*. México: Editorial AGT SA.
- Alvaro, C., Martínez, M. y Arocena, L. (2014). Estudio comparativo del agregado de enmiendas orgánicas e inorgánicas en procesos de biorremediación de suelos norpatagónicos contaminados con petróleo. *Revista Sociedad Química Perú*, 80(4), 251-261. Recuperado de: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810634X2014000400004&lng=es&nrm=iso
- Abril, D., Navarro, E. y Abril, A. (2009). La paja de arroz, consecuencia de su manejo y alternativas de aprovechamiento. *Agronomía*, 17(2), 69-79. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/268872442_La_paja_de_arroz_Consecuencias_de_su_manejo_y_alternativas_de_aprovechamiento
- Arreola, J., Palma, D., Salgado, S., Camacho, W., Obrador, J., Juárez, F. y Pastrana, L. (2003). Evaluación de abono organo-mineral de cachaza en la producción y calidad de la caña de azúcar. *Terra Latinoamericana*, 22(3), 351-357. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57322312>
- Ayasta, J. y Bernable, C. (2012). *Mejoramiento del proceso de compostaje de residuos sólidos urbanos biodegradables del distrito de Ciudad Eten, en Lambayeque. Julio a diciembre de 2011*. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Balderas, I. y Sánchez, J. (2015). Biorremediación de suelo contaminado con 75000 ppm de aceite residual automotriz por bioestimulación y fitorremediación con *Sorghum vulgare* y *Bacillus cereus* y/o *Burkholderia cepacia*. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 6(1), 23-32. Recuperado de: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2072-92942015000100004&lng=es&nrm=iso
- Benini, R., Cortés, M., Monsalvo, M., Paladino, J., Spinelli, L., Tambussi, M. y Trubiano, G. (2011). *Programas de fortalecimiento de Escuelas Técnicas: Una escuela hacia el futuro*. Buenos Aires, Argentina: Verne Producciones S.R.L.

- Benites, J. y Flores, S. (2015). *Efecto del estiércol de cuy, porcino y vacuno en la biorremediación de suelos contaminado con hidrocarburos de diésel en terrarios* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Buendía, H. (2013). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos mediante compost de aserrín y estiércol. *Revista del Instituto de Investigación de la Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica*, 15(30), 123-130. Recuperado de: http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/iigeo/article/download/4101/3268&ved=2ahUKEwibpJbhzu_hAhUsvFkKHVcWB_cQFjABegQICBAK&usg=AOvVaw3YIFQd_x33LodbrafB9Phb
- Cando, M. (2011). *Determinación y análisis de un proceso de biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos*. (Tesis de Pregrado). Universidad Politécnica Salesiana, Cuenca, Ecuador.
- Coyne, M. (2000). *Microbiología del Suelo: Un enfoque exploratorio*, Madrid, España: Editorial Paraninfo.
- Cárdenas, C., Araujo, I., Gómez, K., Bohórquez, M., Gómez, A., Angulo, N., Saules, L. y Morillo, G. (2010). Compostaje y fertilización en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Centro de Investigaciones Biológicas*, 44(2), 129-142.
- Contreras, H. y Carreño, C. (2018). *Eficiencia de la biodegradación de hidrocarburos de petróleo por hongos filamentosos aislados de suelo contaminado*. *Revista de Investigación Científica UNTRM: Ciencias Naturales e Ingeniería*, 1(1), 27-33. doi: 10.25127/ucni.v1i1.269.
- Carreño, C., Mendoza, G. y Villanueva, C. (2009). *Microbiología en el Tratamiento de desechos*. Lambayeque, Perú: Oficina Impresiones y Publicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

- Córdoba, A., Hoyos, M., Rodríguez, L. y Uribe, R. (2015). Remoción de cadmio (II) y níquel (II) sobre cascarilla de arroz tratada química y térmicamente, como alternativa de descontaminación. *Revista de Investigación Universitaria*, 1(1), 1-7. Recuperado de: http://fcbi.unillanos.edu.co/cici/Articulos/CICI_2016_paper_128.pdf
- Dirección General de Salud y Ambiente, DIGESA. (2006). Manual de Difusión Técnica N° 01: Gestión de los Residuos Peligrosos en el Perú. Recuperado de: <http://www.digesa.minsa.gob.pe/publicaciones/descargas/MANUAL%2520TECNICO%2520RESIDUOS.pdf>
- Fernández, C., Llobregat, M. y Sien, B. (2015). Influencia de la *Eisenia foetida* y de sustratos orgánicos como agentes bioestimulantes en la biodegradación de un suelo contaminado con petróleo pesado. *Información Tecnológica*, 20(5), 19-30. doi: 10.1612/inf.tecnol.4088it.08.
- Ferreira, T., Santos, F. y Pessoa, F. (2013). Biorremediación de un suelo tropical contaminado con residuos aceitosos intemperizados. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental.*, 29(1), 21-28. Recuperado de: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S018849992013000100002&Ing=es&nrm=iso
- Ferrera, R., Alarcón, A., Mendoza, M., Sangabriel, W., Trejo, D., Cruz, S., López, C. y Delgadillo, J. (2007). Fitorremediación de un suelo contaminado con combustóleo utilizando *Phaseolus coccineus* y fertilización orgánica e inorgánica. *Agrociencia*, 41(8), 817-836. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30220203001>
- Filip, J. (2002). International approach to assessing soil quality by ecologically related biological parameters. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 88(2), 175-181. doi: 10.1016/S0167-8809(01)00254-7.
- García, R., Ríos, E., Martínez, A., Ramos, F., Cruz, J. y Cuevas, M. (2011). Uso de cachaza y bagazo de caña de azúcar en la remoción de hidrocarburos en suelo contaminado. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 27(1), 31-39. doi: 10.13140/RG.2.1.3080.7441.

- Hernández, I., Navas, G. e Infante, C. (2017). Fitorremediación de un suelo contaminado con petróleo extra pesado con *Megathyrus maximus*. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33(3), 495-503. doi: 10.20937/RICA.2017.33.03.12.
- Hernández, R., Fernández, C. y Baptista, P. (2014). *Metodología de la Investigación* (6ta ed.). México: Mc Graw, Hill Interamericana Editores S.A.
- Huapaya, R. (Diciembre de 2011). *Métodos estándares de análisis microbiológicos de aguas*. Curso de Capacitación. 10 y 11 de diciembre 2011, Chiclayo, Perú.
- Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático, INECC. (s.f). Recuperado de: http://repositorio.inecc.gob.mx/ae3/AE_004458/ae_004458.pdf
- Isaza, G., Pérez, M., Laínes, J. y Castañón, G. (2009). Comparación de dos técnicas de aireación en la degradación de la materia orgánica. *Universidad y Ciencia Trópico Húmedo*, 25(3), 233-243. Recuperado de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S018629792009000300005&lng=es&nrm=iso.pdf
- León, S. (2016). *Evaluación del potencial biorremediadores de dos especies vegetales Paspalum millegrana L. y Bidens pilosa L. para remediar suelos contaminados por hidrocarburos provenientes de la lavadora y lubricadora Marifer, Cantón, Zamora*. (Tesis de pregrado). Universidad nacional de Loja, Zamora, Ecuador.
- Llanos, C. (2012). *Eficiencia de la biorremediación de suelos contaminados con petróleo por bacterias nativas en el distrito de Pimentel, departamento de Lambayeque, 2011*. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Loya, D. (2013). *Tecnologías para la restauración de suelos contaminados por hidrocarburos*. (Tesis de Pregrado). Universidad Veracruzana, Tuxpan, México.

- Maldonado, E., Rivera, M., Izquierdo, F. y Palma, D. (2010). Efectos de rizósfera, microorganismos y fertilización en la biorremediación y fitorremediación de suelos con petróleos crudo nuevo e intemperizado. *Universidad y Ciencia Trópico Húmedo*, 26(2), 121-136. Recuperado de: <http://www.ujat.mx/publicaciones/uciencia>
- Mena, M. (2009). *Estándares de gestión medio ambiental en talleres de mecánica automotriz*. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Ministerio del Ambiente, (2017). Decreto Supremo N° 011 - 2017 – MINAM del 2 de diciembre de 2017 por el cual se aprueban los estándares de calidad ambiental (ECA) para suelo. Lima: Ministerio del Ambiente de Perú.
- Ñustez, D. (2012). *Biorremediación para la degradación de hidrocarburos totales presentes en los sedimentos de una estación de servicio de combustible*. (Tesis de Maestría). Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia.
- Olgún, E., Hernández, M. y Sánchez, G. (2007). Contaminación de manglares por hidrocarburos y estrategias de biorremediación, fitorremediación y restauración. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 23(3), 139-154. Recuperado de: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992007000300004&lng=es&nrm=iso
- Ordaz, J., Martínez, A., Ramos, F., Sánchez, F., Martínez, A., Tenorio, J. y Cuevas, M. (2011). Biorremediación de un suelo contaminado con petróleo mediante el empleo de bagazo de caña de azúcar con diferentes tamaños de partícula. *Multiciencias*, 11 (2), 136-145. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=90419195004>
- Ortega, M. (2012). *Modelización de un proceso de biorremediación de suelos contaminados con gasoil*. (Tesis de Doctorado). Universidad de Granada, España.

- Pérez, J., Viguera, S., Gómez, O. y Calva, G. (2015). Degradación microbiana con BFNA de hidrocarburos aromáticos por bioaumentación en biopilas. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 46(4), 416-423. https://revista.cnic.edu.cu/revistaCB/articulos/degradaci%25C3%25B3n-microbiana-con-bfna-de-hidrocarburos-arom%25C3%25A1ticos-por-bioaumentaci%25C3%25B3nen&ved=2ahUKEwjm5vTExO_hAhUCyFkKH WwjCKgQFjAAegQICBAB&usg=AOvVaw25gsc-CUJ5RTmdhfgFkGZd
- Pérez, M. y Martínez, M. (2011). Manejo alternativo de los residuos de jardinería. *KUXULKAB*, XIV (26), 5-111. Recuperado de: <https://www.google.com.pe/url?sa=t&source=web&rct=j&url=http://ri.ujat.mx/bitstream/20.500.12107/2439/1/-874-735-A.pdf>
- Pierre, F., Rossel, M., Quiroz, A. y Granda, J. (2009). Evaluación química y biológica de compost de pulpa de café en Caspito Municipio Andrés Eloy Blanco, Estado Lara, Venezuela. *Bioagro*, 21(2), 105-110. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85714162004>
- Ponce, D. (2014). *Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos*. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Puerta, S. (2014). Los residuos sólidos municipales como acondicionadores de suelo. *Revista Lasallista de Investigación*, 1(1), 56-65. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69511009>
- Ramírez, M. (2014). *Microorganismos degradadores de hidrocarburos de petróleo aislados de la rizósfera de manglar del estado de Campeche y su potencial en la biorremediación*. (Tesis de Doctorado). Colegio de Postgraduados, Montecillo, México.

- Rodríguez, C. (2012). *Producción de biogás a partir de bagazo cervecero* (Tesis de pregrado). Universidad de Chile, Santiago, Chile. Recuperado de:
<http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/114955/Memoria%2520de%2520T%25C3%25ADtulo%2520Carlos%2520Rodr%25C3%25ADguez%2520final.pdf>
- Rodríguez, G. (2007). Efecto de la cobertura del suelo con cascarilla de arroz en el crecimiento y rendimiento del tomate de ramillete. *Ciencia e Investigación Agraria*, 34(3), 225-230. Recuperado de:
<https://scielo.conicyt.cl/pdf/ciagr/v34n3/art06.pdf>
- Rodríguez, M. y Geldres E. (2017). Remoción de hidrocarburos totales en suelos contaminados con petróleo mediante residuos de Cachaza y Bagazo de caña de azúcar. *Ciencia*, 9(1), 59-66. doi: 10.18050/RevUcv- Scientia.v9n1a6.
- Salas, T. y Meza, V. (2011). *Compost de etiquetas de cerveza. Evaluación de la fitotoxicidad en semillas*. Segundo Simposium de Residuos Sólidos en el Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.
- Salazar, T. (2014). Actividad microbiana en el proceso de compostaje aerobio de residuos sólidos orgánicos. *Revista de Investigación Universitaria*, 3(2), 74-84. doi: 10.17162/riu.v3i2.524.
- Saucedo, B., Montañón, N., Márquez, L. y Sánchez, J. (2016). Biorremediación de suelo impactado con 45000 ppm de aceite residual automotriz y fitorremediación con *Zea mays* y *Burkholderia cepacia* y/o *Rhizobium etli*. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 7(2), 86-94. Recuperado de:
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=361346796006>
- Saavedra, D. (2008). *Producción y caracterización de compost de torta de cachaza y ceniza de caldera de la empresa Azucarera del Norte S.A.C., Ferreñafe. Febrero – Setiembre, 2007*. (Tesis de posgrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.

- Scelza, R., Roa, M. y Gianfreda, I. (2007). Effect of compost and of bacterial cells on the descontamination and the chemical and biological properties of an agricultural soil artificieally contaminated with phenanthrene. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(6), 1303-1317. doi: 10.1016/j.soilbio.2006.12.006.
- Silva, G. (2011). *Biorremediación en hábitats contaminados con hidrocarburos. Estudio de los parámetros indicadores de la viabilidad de los procesos de biorremediación*. (Tesis de Doctorado). Universidad de Granada, España
- Soler, A. (2012). *Biodiversidad de actinomicetos aislados de plantas degradadores de aguas residuales. Estudio de la capacidad de biodegradación de compuestos tóxicos*. (Tesis de Doctorado). Universidad Politécnica de Valencia, España.
- Vargas, J., Alvarado, P., Vega, J. y Porras, M. (2013). Caracterización del subproducto cascarillas de arroz en búsqueda de posibles aplicaciones como materia prima en procesos. *Revista Científica*, 23(1), 87-102. Recuperado de: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5069938.pdf>
- Villareal, S., Balagurusamy, N., Rodríguez, R., Aguilar, C. y Morlett, J. (2014). Biodegradación anaerobia de hidrocarburos aromáticos contaminantes del medio ambiente y alimentos. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 6(11), 28-39. Recuperado de: <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/No.%252011/5.pdf>
- Viñas, M. (2005). *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica*. (Tesis de Doctorado). Universidad de Barcelona, España. Recuperado de: https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2396/TESIS_MVINAS_CANAL_S.pdf
- Vivanco, C. (2013). *Degradación de petróleo en suelos contaminados con borras de la Refinería Talara, utilizando microorganismos autóctonos y compost*. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional de Trujillo, Perú. Recuperado de: <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/4233>

ANEXO 1

Medios de cultivo (en Contreras y Carreño, 2018)

Caldo Bushnell Hass (gL⁻¹)

KH ₂ PO ₄	1,0
K ₂ HPO ₄	1,0
(NH ₄) ₂ SO ₂	1,0
MgSO ₄	0,20
Cl ₂ Ca.....	0,02
FeCl ₃	0,005
Agua destilada	1000mL
pH	7,0

ANEXO 2

Temperaturas mínima, media y máxima durante la biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo

Fecha	Temperatura mínima (°C)	Temperatura media (°C)	Temperatura máxima (°C)
27/09/2018	16	22	24
28/09/2018	16	21	23
29/09/2018	16	20	22
30/09/2018	16	20	22
01/10/2018	15	20	22
02/10/2018	16	20	22
03/10/2018	16	21	23
04/10/2018	16	20	21
05/10/2018	16	21	23
06/10/2018	16	21	23
07/10/2018	16	21	23
08/10/2018	16	20	22
09/10/2018	15	19	21
10/10/2018	15	19	21
11/10/2018	15	20	22
12/10/2018	16	21	23
13/10/2018	16	22	24
14/10/2018	16	21	23
15/10/2018	16	22	24
16/10/2018	15	22	24
17/10/2018	16	21	23
18/10/2018	15	19	22
19/10/2018	16	21	23
20/10/2018	16	18	20
21/10/2018	15	18	22
22/10/2018	15	18	22
23/10/2018	16	19	22
24/10/2018	16	21	23
25/10/2018	16	21	24
26/10/2018	16	21	24
27/10/2018	16	21	24
28/10/2018	15	21	24
29/10/2018	16	21	24
30/10/2018	16	21	24
31/10/2018	16	21	24

01/11/2018	18	21	24
02/11/2018	17	21	24
03/11/2018	17	19	20
04/11/2018	17	20	22
05/11/2018	17	21	23
06/11/2018	16	21	23
07/11/2018	16	20	21
08/11/2018	16	21	23
09/11/2018	17	22	24
10/11/2018	18	22	25
11/11/2018	17	21	24
12/11/2018	16	22	24
13/11/2018	16	18	22
14/11/2018	17	19	22
15/11/2018	16	20	23
16/11/2018	16	21	23
17/11/2018	16	21	22
18/11/2018	16	20	21
19/11/2018	16	21	23
20/11/2018	16	20	21
21/11/2018	17	20	21
22/11/2018	17	22	24
23/11/2018	17	20	21
24/11/2018	17	21	23
25/11/2018	17	21	23
26/11/2018	17	22	24
27/11/2018	16	21	23
28/11/2018	16	21	23
29/11/2018	16	21	24
30/11/2018	16	20	23
31/11/2018	16	22	24
01/12/2018	16	21	23
02/12/2018	16	22	24
03/12/2018	16	22	24
04/12/2018	16	21	23
05/12/2018	16	21	23
06/12/2018	16	21	23
07/12/2018	16	22	24
08/12/2018	17	22	24
09/12/2018	17	22	24
10/12/2018	16	21	23
11/12/2018	17	22	23

12/12/2018	16	21	23
13/12/2018	16	21	23
14/12/2018	16	22	24
15/12/2018	16	20	23
16/12/2018	16	20	23
17/12/2018	16	21	24
18/12/2018	16	23	25
19/12/2018	16	21	23
20/12/2018	16	18	20
21/12/2018	15	18	22
22/12/2018	15	18	22
23/12/2018	16	19	22
24/12/2018	16	21	23
25/12/2018	16	21	24
26/12/2018	16	21	23
27/12/2018	16	22	24

ANEXO 3 Análisis del suelo



Registro N° LE - 001

Información General

Matriz: Suelo
Solicitud de Análisis: Cotización N° 39172 (Nov-395)
Muestreado por: Cliente
Procedencia: Taller de Reparación Automotriz

Identificación de Laboratorio: S-0001547740
Tipo de Muestra: Suelo
Identificación de Muestra: Suelo
Fecha y Hora de Muestreo: 2018-11-18 11:00
Fecha de Recepción de la Muestra: 2018-11-21
Fecha de Inicio de análisis: 2018-11-27

Análisis	Resultado	Unidad
Química		
*Aceites y Grasas. Suelo, Sedimento y Lodo. SMEWW-APHA-AWWA-WEF Part 5520 E, 22nd Ed 2012. Extraction Method for Sludge Samples		
Aceites Y Grasas	147 340	mg/Kg
*PAH's. Suelo. EPA Method 8270 E, Revised 6, February 2017. Semivolatile Organic Compounds by Gas Chromatography /Mass Spectrometry (GC/MS)		
Naphthalene	N.C.(<0,049)	mg/Kg
Acenaphthylene	N.C.(<0,053)	mg/Kg
Acenaphthene	N.C.(<0,052)	mg/Kg
Fluorene	0,11	mg/Kg
Phenanthrene	1,2	mg/Kg
Anthracene	N.C.(<0,049)	mg/Kg
Fluoranthene	0,12	mg/Kg
Pyrene	0,53	mg/Kg
Benzo(a)Anthracene	N.C.(<0,051)	mg/Kg
Chrysene	0,43	mg/Kg
Benzo(b)Fluoranthene	N.C.(<0,051)	mg/Kg
Benzo(k)Fluoranthene	0,052	mg/Kg
Benzo(a)Pyrene	N.C.(<0,050)	mg/Kg
Indeno(1,2,3-cd)Pyrene	N.C.(<0,052)	mg/Kg
Dibenzo(a,h)Anthracene	N.C.(<0,053)	mg/Kg
Benzo(ghi)Perylene	0,055	mg/Kg
Hidrocarburos (C10-C28). Suelo, Sedimento y Lodo EPA Method 8015C, Revision 3, February 2007. Nonhalogenated Organics by Gas Chromatography		
Hidrocarburos (C10-C28)	14 443	mg/Kg
Hidrocarburos (C28-C40). Suelo, Sedimento y Lodo EPA Method 8015C, Revision 3, February 2007. Nonhalogenated Organics by Gas Chromatography		
Hidrocarburos (C28-C40)	15 240	mg/Kg
Hidrocarburos, Fracción 1 (C6-C10). Suelo. EPA Method 8015 C, Revision 3, February 2007 Nonhalogenated Organics by Gas Chromatography		
Hidrocarburos (C6-C10)	N.C.(<19)	mg/Kg

Notas de Ensayo:

N.C.: Significa que el resultado es No Cuantificable y es menor al Límite de Cuantificación indicado en el paréntesis.

ANEXO 4

Número más probable de microorganismos hidrocarbonoclasticos de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo al momento del establecimiento de los microcosmos

Tratamientos	r1		r2		r3	
	Lectura**	NMP g ^{-1**}	Lectura	NPM g ⁻¹	Lectura	NMP g ⁻¹
Testigo absoluto (T1)	111	1,1 x 10 ³	220	2,1 x 10 ³	211	2,0 x 10 ³
Testigo abiótico (T2)	112	1,5 x 10 ³	022	1,2 x 10 ³	111	1,1 x 10 ³
Cachaza de caña de azúcar (T3)	212	2,7 x 10 ³	231	3,6 x 10 ³	223	4,2 x 10 ³
Compost (T4)	203	2,6 x 10 ³	212	2,7 x 10 ³	211	2,0 x 10 ³
Cascarilla de arroz (T5)	222	3,5 x 10 ³	111	1,1 x 10 ³	221	2,8 x 10 ³

* Diluciones 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴

** 10 días Autoría propia

Número más probable de microorganismos hidrocarbonoclasticos de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo después de 30 días en microcosmos

Tratamientos	r1		r2		r3	
	Lectura**	NMP g ^{-1**}	Lectura	NPM g ⁻¹	Lectura	NMP g ⁻¹
Testigo absoluto (T1)	222	3,5 x 10 ³	231	3,6 x 10 ³	213	3,4 x 10 ³
Testigo abiótico (T2)	222	3,5 x 10 ³	101	0,7 x 10 ³	121	1,5 x 10 ³
Cachaza de caña de azúcar (T3)	221	2,8 x 10 ³	310	4,3 x 10 ³	232	4,4 x 10 ³
Compost (T4)	211	2,0 x 10 ³	121	1,5 x 10 ³	223	4,2 x 10 ³
Cascarilla de arroz (T5)	121	1,5 x 10 ³	231	3,6 x 10 ³	213	3,4 x 10 ³

* Diluciones 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴

** 10 días Autoría propia

Número más probable de microorganismos hidrocarbonoclasticos de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo después de 60 días en microcosmos

Tratamientos	r1		r2		r3	
	Lectura**	NMP g ^{-1**}	Lectura	NPM g ⁻¹	Lectura	NMP g ⁻¹
Testigo absoluto (T1)	233	5,3 x 10 ³	002	0,6 x 10 ³	010	0,3 x 10 ³
Testigo abiótico (T2)	113	1,9 x 10 ³	113	1,9x10 ³	133	2,9 x 10 ³
Cachaza de caña de azúcar (T3)	223	4,2 x 10 ³	231	3,6 x 10 ³	223	4,2 x 10 ³
Compost (T4)	123	2,4 x 10 ³	300	2,3 x 10 ³	213	3,4 x 10 ³
Cascarilla de arroz (T5)	122	2,0 x 10 ³	123	2,4 x 10 ³	310	4,3 x 10 ³

* Diluciones 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴

** 10 días Autoría propia

Número más probable de microorganismos hidrocarbonoclasticos de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo después de 90 días en microcosmos

Tratamientos	r1		r2		r3	
	Lectura**	NMP g ^{-1**}	Lectura	NPM g ⁻¹	Lectura	NMP g ⁻¹
Testigo absoluto (T1)	111	1,1 x 10 ³	121	1,5 x 10 ³	112	1,5 x 10 ³
Testigo abiótico (T2)	221	2,8 x 10 ³	111	1,1 x 10 ³	132	2,4 x 10 ³
Cachaza de caña de azúcar (T3)	231	3,6 x 10 ³	213	3,4 x 10 ³	223	4,2 x 10 ³
Compost (T4)	122	2,0 x 10 ³	222	,3,5 x 10 ³	132	2,4 x 10 ³
Cascarilla de arroz (T5)	231	3,6 x 10 ³	212	2,7 x 10 ³	033	1,6 x 10 ³

* Diluciones 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴

** 10 días Autoría propia

ANEXO 5

Pruebas de normalidad, homogeneidad de varianza y análisis de varianza del índice de germinación de *Raphanus sativus* L. a los 0 días

Prueba de normalidad

INDICE DE GERMINACIÓN A LOS 0 DÍAS

Tratamientos	Shapiro - Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Testigo absoluto (T1)	0,996	3	0,884
Testigo abiótico (T2)	0,779	3	0,066
Cachaza de caña de azúcar (T3)	0,957	3	0,599
Compost (T4)	0,901	3	0,387
Cascarilla de arroz (T5)	0,990	3	0,807

Prueba de homogeneidad de varianzas

INDICE DE GERMINACIÓN A LOS 0 DÍAS

Estadístico de Levene	gl1	gl2	gl3
0,787	4	10	0,559

Anova de un Factor

INDICE DE GERMINACIÓN A LOS 0 DÍAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	2298,500	4	574,625	116,002	0,000
Dentro de grupos	49,536	10	4,954		
Total	2348,036	14			

ANEXO 6

Pruebas de normalidad, homogeneidad de varianza y análisis de varianza del índice de germinación de *Raphanus sativus* L. a los 30 días

Prueba de normalidad

INDICE DE GERMINACIÓN A LOS 30 DÍAS

Tratamientos	Shapiro - Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Testigo absoluto (T1)	0,926	3	0,474
Testigo abiótico (T2)	0,899	3	0,383
Cachaza de caña de azúcar (T3)	0,806	3	0,128
Compost (T4)	0,861	3	0,269
Cascarilla de arroz (T5)	0,785	3	0,080

Prueba de homogeneidad de varianzas

INDICE DE GERMINACIÓN A LOS 30 DÍAS

Estadístico de Levene	gl1	gl2	gl3
2,113	4	10	0,154

Anova de un Factor

INDICE DE GERMINACIÓN A LOS 30 DÍAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	6542,772	4	1635,681	183,604	0,000
Dentro de grupos	89,087	10	8,909		
Total	6631,810	14			

ANEXO 7

Pruebas de normalidad, homogeneidad de varianza y análisis de varianza del índice de germinación de *Raphanus sativus* L. a los 60 días

Prueba de normalidad

INDICE DE GERMINACIÓN A LOS 60 DÍAS

Tratamientos	Shapiro - Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Testigo absoluto (T1)	0,999	3	0,949
Testigo abiótico (T2)	0,888	3	0,348
Cachaza de caña de azúcar (T3)	0,890	3	0,355
Compost (T4)	0,900	3	0,385
Cascarilla de arroz (T5)	1,000	3	0,989

Prueba de homogeneidad de varianzas

INDICE DE GERMINACIÓN A LOS 60 DÍAS

Estadístico de Levene	gl1	gl2	gl3
4,820	4	10	0,020

Anova de un factor

INDICE DE GERMINACIÓN A LOS 60 DÍAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	14982,659	4	3745,665	165,675	0,000
Dentro de grupos	226,085	10	22,608		
Total	15208,774	14			

ANEXO 8

Pruebas de normalidad, homogeneidad de varianza y análisis de varianza del índice de germinación de *Raphanus sativus* L. a los 90 días

Prueba de normalidad

INDICE DE GERMINACIÓN A LOS 90 DÍAS

Tratamientos	Shapiro - Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Testigo absoluto (T1)	0,981	3	0,736
Testigo abiótico (T2)	0,991	3	0,816
Cachaza de caña de azúcar (T3)	0,998	3	0,911
Compost (T4)	0,888	3	0,347
Cascarilla de arroz (T5)	0,898	3	0,379

Prueba de homogeneidad de varianzas

INDICE DE GERMINACIÓN A LOS 90 DÍAS

Estadístico de Levene	gl1	gl2	gl3
4,256	4	10	0,029

Anova de un Factor

INDICE DE GERMINACIÓN A LOS 90 DÍAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	22336,336	4	5584,084	144,082	0,000
Dentro de grupos	387,563	10	38,756		
Total	22723,899	14			