



**UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO**

**FACULTAD DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA  
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL**

Influencia del pH y dosis de bacterias halófilas en la degradación de  
hidrocarburos en soluciones acuosas

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

Ingeniero Ambiental

**AUTORES:**

Cuentas Terrones, Cristhian Joseph ([orcid.org/0000-0001-9686-0336](https://orcid.org/0000-0001-9686-0336))

Manuyama Noriega, Dino Mauro ([orcid.org/0000-0001-9216-4181](https://orcid.org/0000-0001-9216-4181))

**ASESOR:**

Dr. Cruz Monzón, José Alfredo ([orcid.org/0000-0001-9146-7615](https://orcid.org/0000-0001-9146-7615))

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:**

Calidad y Gestión de los Recursos Naturales

**LÍNEA DE RESPONSABILIDAD SOCIAL UNIVERSITARIA:**

Desarrollo sostenible y adaptación al cambio climático

TRUJILLO- PERU

2023

## **Dedicatoria**

A mis padres Carmela y Efraín por la motivación y apoyo incondicional constante que me dieron durante mi etapa de estudios, a mis hermanos Angel y Diego por su presencia y aliento que me dieron en los momentos difíciles en mi vida.

**Cristhian Cuentas Terrones**

A mis padres Mauro y Carmen por siempre inculcarme principios y buenos valores, por su apoyo incondicional en cada etapa de mis estudios universitarios, a mi hija Mia Duczel por motivarme cada día a ser mejor para la sociedad.

**Dino Mauro Manuyama Noriega**

## **Agradecimiento**

Gracias a Dios por bendecirnos cada día con la hermosa oportunidad de estar y disfrutar al lado de las personas que más queremos. Agradezco también a nuestro asesor de tesis Dr. José Alfredo Cruz Monzón, a quien le debo gran parte de mis conocimientos, por cada enseñanza transmitida en clase. A la Mg. Magaly de la Cruz Noriega por brindarnos sus conocimientos y experiencia en realización de nuestros experimentos. Al Mg Luis Cabanillas Chirinos por su paciencia, apoyo y sugerencias que nos brindaba para culminar con éxito nuestra investigación y finalmente un eterno agradecimiento a esta prestigiosa universidad, la cual abre sus puertas a jóvenes como nosotros, preparándonos para un futuro competitivo y formándonos como personas de bien.

## Índice de contenidos

Carátula.....	i
Dedicatoria.....	ii
Agradecimiento.....	iii
Índice de contenidos.....	iv
Índice de tablas.....	v
Índice de figuras.....	vi
Resumen.....	vii
Abstract.....	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	4
III. METODOLOGÍA.....	11
3.1. Tipo y diseño de investigación.....	11
3.2. Variables y operacionalización.....	11
3.3. Población, muestra y muestreo.....	11
3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	12
3.5. Procedimiento.....	13
3.6. Métodos de análisis de datos.....	16
3.7. Aspectos éticos.....	16
IV. RESULTADOS.....	17
V. DISCUSIÓN.....	24
VI. CONCLUSIONES.....	28
VII. RECOMENDACIONES.....	29
REFERENCIAS.....	30
ANEXOS.....	36

## Índice de tablas

Tabla 1. <i>Características de crecimiento ideal según la categoría de halófilos.</i> .....	5
Tabla 2. <i>Características de la absorbancia y concentración de la bacteria.</i> .....	13
Tabla 3. <i>Diseño de los tratamientos a distintos valores de pH y dosis constantes.</i>	14
Tabla 4. <i>Diseño de los tratamientos a distintos valores de pH y dosis constantes.</i>	15
Tabla 5. <i>Degradación de TPH (%) en diferentes concentraciones de pH y dosis Bacillus marisflavi.</i> .....	17
Tabla 6. <i>Degradación de octadecano y tetracosano y eicosano a diferentes niveles de pH. Test: LSD Fisher.</i> .....	18
Tabla 7. <i>Degradación de octadecano, tetracosano y eicosano a diferentes dosis de Bacillus marisflavi. Test: LSD Fisher.</i> .....	20
Tabla 8. <i>Degradación de TPH (%) en diferentes tiempos usando el mejor pH y dosis Bacillus marisflavi.</i> .....	21
Tabla 9. <i>Degradación del octadecano, tetracosano y eicosano a diferentes tiempos. Test: LSD Fisher</i> .....	23

## Índice de figuras

Figura 1. Cantidad de mL de mezcla sintética por matraz.....	12
Figura 2. Evaluación a diferentes niveles de pH en la degradación de hidrocarburos .....	18
Figura 3. Evaluación de la mejor dosis de U.F.C de <i>Bacillus marisflavi</i> en la degradación de los hidrocarburos.....	19
Figura 4. Evaluación del mejor tiempo en la degradación de hidrocarburos utilizando <i>Bacillus marisflavi</i> .....	22

## Resumen

La contaminación de aguas marinas por hidrocarburos viene ocurriendo de modo más frecuente, generando graves problemas a nivel mundial, afectando ecosistemas como la flora y fauna del medio marino, debido a esto, se han desarrollado diversas técnicas de recuperación y/o degradación, con diversos grados de eficiencia, por lo cual se hace necesario, desarrollar técnicas sostenibles y de bajo consumo energético. El objetivo de la investigación fue evaluar el efecto del pH y dosis de bacteria halófila en la degradación de hidrocarburos. La metodología utilizada fue un diseño experimental de tipo factorial considerando valores de pH 6, 8, 10 y dosis de  $3.0 \times 10^8$  y  $1.2 \times 10^9$  UFC de *Bacillus marisflavi*, con dos repeticiones para cada tratamiento, para lo cual se utilizó un estándar, conteniendo ocho hidrocarburos en solución mix. Los resultados muestran que las mejores condiciones de degradación de hidrocarburos son a pH 10 y con una dosis  $3.0 \times 10^8$  de bacteria halófila alcanzando valores de degradación del 90.5% 89.5% y 88.8% para el tetracosano, octadecano y eicosano. Así mismo que tras 24, 48 y 72 horas de fermentación no hay diferencia significativa en la degradación de hidrocarburos a las condiciones realizadas. Se concluye que existe influencia del pH en la degradación de hidrocarburos en soluciones acuosas, pero que es independiente de la dosis de *Bacillus marisflavi* utilizada.

Palabras clave: pH, dosis, degradación, hidrocarburos, bacterias halófilas.

## Abstract

The contamination of marine waters by hydrocarbons has been occurring more frequently, generating serious problems worldwide, affecting ecosystems such as the flora and fauna of the marine environment, due to this, various recovery and/or degradation techniques have been developed, with different degrees of efficiency, for which is necessary to develop sustainable techniques and low energy consumption. That is why it was proposed to evaluate the effect of pH and dose of halophilic bacteria on the degradation of hydrocarbons. The methodology used corresponds to an experimental design of factorial type considering values of pH 6, 8,10 and doses of  $3.0 \times 10^8$  and  $1.2 \times 10^9$  CFU of *Bacillus marisflavi*, with two repetitions for each treatment, for which a standard containing eight hydrocarbons in mixed solution was used. The results show that the best hydrocarbon degradation conditions are at pH 10 and with a dose of  $3.0 \times 10^8$  of halophilic bacteria, reaching degradation values of 90.5%, 89.5% and 88.8% for tetracosane, octadecane and eicosane. Likewise, after 24, 48 and 72 hours of fermentation there is no significant difference in the degradation of hydrocarbons under the conditions carried out. It is concluded that there is an influence of pH on the degradation of hydrocarbons in aqueous solutions, but that it is independent of the dose of *Bacillus marisflavi* used.

Keywords: pH, dose, degradation, hydrocarbons, halophilic bacteria.



## I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la contaminación de las aguas marinas por hidrocarburos viene ocurriendo de modo más frecuente generando graves problemas a nivel mundial, debido a su impacto sobre el ambiente, en especial en los cuerpos de aguas marinas, que conllevan a que grandes cantidades de hidrocarburos sean vertidos en su ecosistema (Mesa *et al.*, 2019, p.158). Algunos de los impactos más resaltantes a causa de los derrames por hidrocarburos son las alteraciones histológicas, bioquímicas, y el desarrollo reproductivo de los organismos (Villamizar, 2021, p. 47), además de generar problemas sociales y económicos, entre ellos la paralización del turismo debido al bloqueo y declaración de emergencia de las playas afectadas (Capurro *et al.*, 2022, p. 68).

Debido al impacto generado por derrames de hidrocarburos sobre la biodiversidad marina, muchas especies se ven afectadas de manera directa por ejemplo las algas, aves, tortugas y delfines, de acuerdo a lo mencionado, en los últimos años han incrementado las investigaciones experimentales enfocados en tratamientos biológicos, físicos y químicos para eliminar estos contaminantes orgánicos (Mojiri *et al.*, 2019, p. 2). Dentro de los métodos químicos, la oxidación por Fenton es una de las más aplicadas previo tratamiento primario o físico, logrando remover hasta 92,54 % de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en un tiempo de reacción de 40 minutos (Singa *et al.*, 2020), sin embargo, tal como sugieren los autores es necesario realizar más estudios para obtener condiciones operativas efectivas en la eliminación de HAP de los efluentes mediante procesos de oxidación avanzados, algo que generaría costos de inversión altos. Dentro los métodos físicos la ultrafiltración logra remover hasta 99,95 % de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) pero el sistema de filtros se ensucia muy rápido además que tiene mucha presión externa (Inukai *et al.*, 2016).

Por último, dentro de los métodos biológicos se tiene la remediación microbiana, la fitorremediación y la micorremediación, los cuales permiten la eliminación mediante el método de adsorción de los compuestos nocivos y reducen su concentración logrando remover hasta el 95% de diesel (Khalid *et al.*, 2021, p. 2). Son procesos

lentos y complejos, además que la diversidad y la capacidad metabólica de las bacterias degradadoras de hidrocarburos tienden a disminuir a medida que las condiciones ambientales se vuelven más extremas, ya que los microorganismos convencionales no reaccionan bien en condiciones donde se altera su membrana celular, se desnaturaliza sus proteínas y otros efectos perjudiciales (Marsh *et al.*, 2020).

Por todo ello, a pesar de que los métodos físicos y químicos tienen sus ventajas en tiempo y remoción, la problemática radica en el factor económico, además de los residuos que pueden generar lodos peligrosos debido a los insumos químicos empleados, por lo que un método amigable con el ambiente, resulta los tratamientos biológicos, debido a que logran tener eficiencias altas de degradación de hidrocarburos (Fu *et al.*, 2021), entre los tratamientos biológicos, existen hipótesis en el empleo de bacterias halófilas para la degradación de hidrocarburos ya que ha demostrado buenos resultados, dado que al vivir en hipersalinidad, tienen la capacidad de equilibrar la presión osmótica del medio, presión atmosférica y suprimen el crecimiento de la mayoría de otros microorganismos (Villegas, *et al.*, 2017), además que al crecer en ambientes de pH neutro y alcalino logran soportar altas temperaturas. Sin embargo, la sensibilidad de los microorganismos a la toxicidad y la variación de químicos orgánicos producidos en el agua son factores que limitan su aplicación (Kshirsagar *et al.*, 2020).

Bajos los argumentos antes mencionados, surgió como problema general ¿Cómo influye el pH y la dosis de bacterias halófilas en la degradación de hidrocarburos en soluciones acuosas?

La investigación realizada se justificó, ya que permitió cubrir parte de la brecha de conocimiento existente entre el uso de bacterias halófilas en el tratamiento de aguas contaminadas con hidrocarburos, aporta una alternativa de solución para biorremediar la calidad de los cuerpos de agua subterráneos y superficiales, puesto que demuestra cuan eficiente puede llegar hacer las bacterias halófilas, además de poseer mayor resistencia evitan el mayor consumo en el proceso de purificación y tratamiento, de este modo beneficiaría a las poblaciones aledañas y aportaría en la

prevención de riegos por contaminación de hidrocarburos, mejorando la calidad del agua disponible para diversos usos, lo que generaría una mejor calidad de vida.

El objetivo general de la investigación realizada fue evaluar el efecto del pH y la dosis de bacteria halófila en la degradación de hidrocarburos en soluciones acuosas, como objetivos específicos se evaluó el efecto del pH en la capacidad de degradación de hidrocarburos usando bacterias halófilas; además se evaluó el efecto de la dosis de bacteria halófila en la degradación de hidrocarburos en soluciones acuosas y, por último se evaluó el mejor tiempo de degradación de hidrocarburos en soluciones acuosas usando las mejores condiciones de pH y dosis en el proceso fermentativo usando bacterias halófilas.

Finalmente, en la investigación se planteó como hipótesis general que si existe efecto del pH y dosis de bacterias halofilas en la degradación de hidrocarburos en soluciones acuosas.

## II. MARCO TEÓRICO

Los hidrocarburos se forman a través de la degradación anaeróbica y aeróbica de la materia orgánica por medio de tres etapas: Depósitos de organismos de origen vegetal y animal acumulados en el fondo de mares, a condiciones de alta presión y temperatura, y como compuestos no saturados, en presencia de catalizadores naturales (Servicio Geológico Mexicano, 2017), en su mayoría está formado por átomos de hidrógeno y carbono (Velásquez, 2017, p. 153). Aunque también pueden contener sulfuros, nitrógeno, compuestos de metales pesados y oxígeno, así como los hidrocarburos líquidos del gas natural; se les conoce como hidrocarburos líquidos (Adipah, 2018, p. 2).

El efecto y la persistencia de los hidrocarburos en los ecosistemas se debe a su resistencia a la biodegradación, los altos niveles de bioacumulación y sus efectos adversos para la salud (Rodríguez, 2017, p. 12). La degradación de hidrocarburos es un proceso natural lento, aunque para generarlo dentro de las tecnologías emergentes, se ha encontrado que los microorganismos que viven en zonas contaminadas con hidrocarburos desarrollan habilidades para degradar estos contaminantes (Ordoñez *et al.*, 2018). El mecanismo para generar degradación de hidrocarburos es aerobio y anaerobio, donde el microorganismo ingresa a las moléculas del hidrocarburo, es decir, al interior de su membrana celular mediante diferentes vías, y para lograrlo, puede involucrar acción de exoenzimas o surfactantes sintetizados para hacer biodisponible las moléculas (Arias, 2017), tiene la capacidad de utilizar diversos carbohidratos como fuente de carbono y de tener condiciones extremadamente salinas en las que pueden desarrollarse (Guzmán *et al.*, 2017, p. 110). Asimismo, este tipo de bacterias desarrollan una tolerancia a diversos metales pesados, gracias a su capacidad para adaptarse con varios mecanismos bioquímicos, también llegan a interactuar con algunos metales pesados y los incorpora así a sus vías metabólicas, pero sin tener ningún efecto negativo en su desarrollo (Florez, 2019).

Las bacterias halófilas crecen en ambientes hipersalinos (entre 5% y 30% de sal), como pueden ser lagos, mares, salineras, desiertos, este tipo de bacterias se caracterizan por poseer las enzimas proteasas y las deshidrogenasas, gracias a ello, se pueden utilizar para sintetizar péptidos y biocatálisis en disolventes orgánicos

(Murrieta, 2018, p.15), las principales características que podemos identificar en las bacterias halófilas son que casi todas de ellas son aerobios estrictos y el otro pequeño porcentaje son anaerobias (Suganthi *et al.*, 2018), las podemos encontrar de forma morfológica como bacilos, cocos, además, de otras formas raras (Rodríguez, Higuera y Sanjuanelo, 2019), crecen de forma óptima en pH neutros y alcalinos, además algunas son gram positivas y otras son gram negativas, otra de sus características son que cuentan con una pared celular la cual está compuesta con peptidoglucano, la que permite su supervivencia bajo estrés abiótico y biótico a altas presiones (Hasanzadeh *et al.*, 2020, p. 2)

Las bacterias halófilas se clasifican en cuatro grandes categorías, estas son según la concentración de sal que va a requerir para un óptimo crecimiento.

**Tabla 1.** Características de crecimiento ideal según la categoría de halófilos.

<b>Categorías</b>	<b>Características de crecimiento</b>
Halófilos extremos	En ambientes mayores a 20% p/v NaCl (entre 2.5 a 5.2 M).
Halófilos moderados	NaCl de 10% a 20% p/v (entre 0.5 a 2.5 M).
Halófilos débiles	NaCl entre 1% a 10% p/v (entre 0.2 a 0.5 M).
No halófilos	En concentraciones inferiores a 0.2 M de NaCl (1% p/v).

Fuente: Rosas (2017)

En las bacterias halófilas podemos encontrar un tipo específico llamado *Bacillus flexus*, la cual se caracteriza por ser organismos marinos con pH alcalino generalmente entre los 9 a los 12 y crecen de forma óptima en concentraciones de NaCl de 15%, es por ello que se consideran especies halófilos moderados (Swain, Natarajan y Krishnan, 2017, p. 186). Así mismo, otra de sus características es que crecen en temperaturas promedio de 37°C y, según algunos estudios, han demostrado que son efectivos para la reducción de metales pesados como el cromo en aguas residuales (Ibrahim *et al.*, 2019), otros estudios se ha evidenciado que son muy efectivos para remediar el arsénico en aguas contaminadas (Jebeli *et al.*, 2017, p. 637).

Los métodos que ayudan en la evaluación de microorganismos para obtener resultados más precisos es el estándar de turbidez de McFarland, usado como referencia en suspensiones bacteriológicas para determinar la cantidad de bacterias (Estrada *et al.*, 2022, p 211).

Los autores Ozyurek y Soyuer (2023), evaluaron la eliminación de hidrocarburos con biosurfactantes en la *Bacillus subtilis*, la bacteria presentó mayor degradación en los hidrocarburos alcanos (C10 – C38) en un periodo de 5 a 10 días y con pH 7.0, fue identificada mediante diferentes métodos de detección, como la actividad hemolítica, el colapso de gotas y dispersión de aceite. De acuerdo a los resultados obtenidos en la cromatografía de gases pudieron constatar que la cepa alcanzo promedios de degradación del 92% en hidrocarburos de petróleo. Concluyeron destacando el alto rendimiento de la *Bacillus subtilis* productora de biosurfactantes en la degradación de hidrocarburos de petróleo.

Los autores Masika *et al.* (2021), analizaron la degradación de hidrocarburos utilizando consorcios de *Bacillus sp* en efluentes industriales. Su objetivo fue evaluar la capacidad de la *Bacillus sp* en la degradación de hidrocarburos, se aislaron 115 colonias y se seleccionaron a tres cepas de mejor rendimiento en función a su SE (eficiencia de esporulación), por medio de la secuencia 16s rRNA se identificó a la *Bacillus subtilis*, *Bacillus methylophilus* y *Bacillus amyloliquefaciens*, posterior a ello, se evaluaron a un pH 6.8 en 12, 48 y 72 horas. Para el análisis de los TPH emplearon el cromatógrafo de gases (GC – MS). Los resultados obtenidos indicaron que la mayor parte de los contaminantes se eliminaron durante las primeras 48 horas de cadenas cortas y medianas (C8 – C28) y el porcentaje de degradación no varió significativamente después de las 72 horas. Concluyeron que la *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens* son efectivos para la reducción de hidrocarburos en efluentes industriales.

Los autores Dai *et al.* (2020), en su estudio aislaron tres tipos de cepas bacterianas degradadoras para la degradación de hidrocarburos de petróleo con adición de lacasa, se identificaron como *Brevibacillus*, *Bacillus sp* y *Acinetobacter schindleri*, en un el periodo de evaluación de 10 días a un pH 7, el análisis realizado en la cromatografía de gases (GC – MS) presentaron promedios de degradación del octadecano, eicosano y tetracosano con valores de 81.7%, 72% y 64.9%.

Concluyeron que la combinación de lacasa y las cepas bacterianas es una tecnología para la degradación efectiva de hidrocarburos de petróleo.

Los autores, Gao *et al.* (2020), en su investigación caracterizaron una bacteria degradadora en la bahía Jiaozhou, China. El objetivo propuesto fue optimizar las condiciones de la bacteria para su potencial aplicación en derrames de hidrocarburos en aguas marinas. La muestra estuvo conformada con 12 cepas en agua de mar contaminada de hidrocarburos de petróleo, con un pH (6.25-9.5) a temperaturas entre 16 a 32°C en un periodo de 5 días, la secuencia 16Sr RNA identificó a la cepa *Bacillus megaterium*, en los análisis de degradación del cromatógrafo de gases (GC – MS) indicaron que con un pH 8.8 y una temperatura de 28°C, la *Bacillus megaterium* obtiene valores de degradación del 92% y 90% para el octadecano y eicosano. Concluyeron que la cepa es una candidata para la degradación de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) en aguas marinas.

Los autores Khanpuor *et al.* (2020), aplicaron *Bacillus licheniformisen* en la eliminación de hidrocarburos de petróleo, el estudio tuvo como objetivo evaluar las influencias efectivas en la degradación de los hidrocarburos por *Bacillus licheniformisen*, se tomaron como factores influyentes a niveles de pH (4-10), concentración de NaCl (0 – 10g/L) y como concentración de aceites se tomaron (500 – 4500 ppm), luego evaluaron la capacidad bacteriana en agua de mar artificial, simulando el derrame de petróleo con una salinidad de 35 g/L. Los resultados obtenidos evidenciaron que la *Bacillus licheniformisen* en un periodo de 14 días, las condiciones óptimas son a concentración de 3500 ppm, 2.5 g/L de NaCl y a un pH 8.5, el tetradecano y hexacosano presentó valores de 68% y 40%. Concluyeron que la *Bacillus licheniformisen* tienen la capacidad de degradar hidrocarburos de (C9-C17) con efectividad y adaptarse en condiciones alcalinas y/o hipersalinas. Por su parte, Liu *et al.* (2020), utilizaron tres tipos de cepas bacterianas productoras de biosurfactantes, identificadas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* y *Acinetobacter lwoffii* en la degradación de hidrocarburos de petróleo, simularon la biodegradación aeróbica de los hidrocarburos durante 90 días ajustando a un pH 6.5, para esto tomaron una muestra de petróleo del campo petrolífico de Changqing, China, de acuerdo a los datos obtenidos en el cromatógrafo de gases (GC- MS) pudieron constatar que las tres cepas degradaron en diferentes proporciones y

velocidades a los hidrocarburos alcanos (C14 – C35) , las cepas *P. aeruginosa* y *Bacillus cereus* demostraron mayor eficiencia de degradación para los alcanos (C18 – C34) obteniendo promedios del 95.4% y 99.7%, y la cepa *A. lwoffii* presentó menor promedio, con valores de (9,05%–73,0%) de degradación, para hidrocarburos de cadenas largas (C33-C35), las tres cepas mostraron promedios relativamente altas con medias de 60.2% y 86.4%. Concluyeron que las tres cepas bacterianas presentan un alto potencial para la degradación de hidrocarburos de petróleo en los alcanos.

Los autores Purnomo, Rizqi y Rafi (2020), aplicaron la cepa *Bacillus subtilis* en la degradación de hidrocarburos de petróleo en agua de mar, el periodo de evaluación se realizó durante los 7 y 14 días a una temperatura de 30°C con un pH 8.36, posterior a ello se analizó en el cromatógrafo (GC – MS). Los resultados obtenidos muestran que en 7 días los porcentajes óptimos del octadecano y tetracosano tienen valores de degradación 29.33% y 40.29%, mientras los de cadena larga C26 tuvieron valores de 1.03% y 5.53% durante el periodo de evaluación. Se concluye que la *Bacillus subtilis* tiene la capacidad de degradar hidrocarburos de petróleo en agua de alta salinidad en cadenas corta y media.

Por su parte, Tanzadeh *et al.* (2020), en su investigación aplicaron cepas nativas de las costas del mar Caspio en la degradación de hidrocarburos de petróleo. Se aislaron 115 cepas bacterianas en diferentes estaciones de la costa de Caspio, posteriormente se seleccionaron a 15 cepas para su análisis, tres cepas mostraron eficiencia en la degradación de (HTP), fueron nombrados (J3, J5 y J12) con la secuencia 16S rRNA, se identificaron como, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus haemolyticus* y *Pseudomonas aeruginosa*, el tiempo de evaluación tuvo un periodo de 22 días con un pH. 7.0 y una temperatura de 30°C. Los resultados mostraron que la *Bacillus cereus* tiene la capacidad de degradar eficientemente alcanos de longitud corta y media en comparación a los de longitud larga, el tetracosano, eicosano y octadecano tuvieron valores de 25%, 31 % y 37%. Concluyeron que la *Bacillus cereus* tienen la capacidad de degradar eficientemente alcanos de longitud corta y media. Por otro lado, Yusoff *et al.* (2020), realizaron un estudio en la degradación de hidrocarburos de petróleo aplicando bacterias, identificaron y caracterizaron a las tres mejores cepas por el medio del análisis secuencial de ARNr 16S como



*Geobacillus sp*, *Geobacillus sp* y *Anoxybacillus*, las bacterias fueron ajustadas a un pH inicial de 7.5, de acuerdo al análisis realizado en cromatografía de gases, las tres cepas pudieron reducir compuestos como el petróleo crudo, alcano e hidrocarburos poliaromáticos (PAH), la bacteria *Geobacillus sp* obtuvo un mayor promedio de degradación en alcanos seguido de *A. geothermalis* y *Geobacillus sp* con valores de 17,3%, 13,1% y 12,1%, concluyeron que las bacterias termófilos pueden obtener un mejor degradación de sitios contaminados por hidrocarburos de petróleo.

Los autores, Pereira *et al.* (2019), evaluaron la capacidad de degradación de los microorganismos autóctonos en hidrocarburos policíclicos aromáticos y alifáticos en agua estéril de mar, estos microorganismos fueron aislados del parque nacional de “Lagoa do peixe” lugar donde ocurren derrames frecuentes de petróleo, en la metodología se enriqueció las bacterias capaces de degradar hidrocarburos de petróleo, obteniendo dos bacterias capaces de metabolizar fuentes de carbonos complejas en un medio sólido, *Bacillus methylotrophicus* y *Pseudomonas sihuiensis*. Los resultados obtenidos mostraron que ambas cepas pueden degradar el 92.1% y 42.4% de hidrocarburos. Concluyeron que ambas bacterias presentan capacidad de degradación de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) en condiciones ambientales marinas salinidad, pH y condiciones nutricionales.

Los autores, Fan *et al.* (2019), aislaron a la bacteria *Bacillus licheniformis* (DM-1) de un yacimiento petrolífero de Dagang en China para utilizar hidrocarburos de petróleo y subproductos agroindustriales (melaza) en la producción de exopolisacáridos (EPS) en condiciones de recuperación de petróleo. Se demostró que el DM-1 EPS mostró propiedades de altas salinidades y temperaturas elevadas. La cepa DM-1 podría degradar n-alcanos de cadena larga hasta C36. Las pruebas de reducción de la viscosidad han demostrado que la viscosidad del petróleo crudo se redujo en un 40 % en comparación al de antes del tratamiento con DM-1. Los resultados de las pruebas de alimentación del paquete de arena en condiciones de yacimiento simuladas han demostrado que la eficiencia mejorada de recuperación de petróleo fue del 19,2 %, después de 7 días de bioaumento in situ con *B. licheniformis*. Los resultados obtenidos indican que la cepa DM-1 es una candidata prometedora para la recuperación microbiana mejorada de petróleo (MEOR) in situ.

Los autores Chen *et al.* (2017), en su estudio aplicaron la cepa *Dietzia* en la degradación de hidrocarburos de petróleo alcanos (C14 – C31), la cepa bacteriana fue ajustada a rangos de pH (5 – 10), dosis de  $2.15 \times 10^9$  y una temperatura de 30°C en un periodo de evaluación de 12 días, en los resultados la bacteria obtuvo promedio de degradación mayor al 80%, hidrocarburos como el octadecano y eicosano y tetracosano, presentaron valores del 94.83%, 99.2% y 97.85%. Aplicando diferentes tipos de sustratos y optimizando condiciones favorables se logra obtener un mejor potencial de la cepa bacteriana para la recuperación de ambientes contaminados con hidrocarburos de petróleo.

Por otra parte, Nkem *et al.* (2016), emplearon bacterias autóctonas consideradas degradadoras de hidrocarburos de alquitrán con cultivos puros, tomaron muestras de la playa Rhu Sepuluh, Terengganu, Malasia, las cepas fueron identificadas por medio del análisis de 16S rRNA, de acuerdo a las características fisiológica mostraron un 99% de similitud con *Cellulosimicrobium cellulans* y *Acinetobacter baumannii*, en los análisis realizados en cromatografía de gases (GC – MS) pudieron constatar que los hidrocarburos alcanos (C10-C29) obtuvieron promedios de degradación de 64,4 % y 58,1 % en *C. cellulans* y *A. baumannii* a una temperatura de 32°C en un periodo de 10 días. Concluyeron que las dos cepas autóctonas con cultivos puros tienen potencial para la degradación de hidrocarburos y biorremediación del medio ambiente marino.

Los autores, Zhang *et al.* (2016), en su estudio desarrollaron una estrategia para degradar hidrocarburos de petróleo de alcanos y aromáticos policíclicos (HAP) con una bacteria tolerante a la sal, en el análisis de secuencia de 16S rRNA se identificó a la cepa *Corynebacterium*, utilizaron al biocarbón como portador de la bacteria, a un pH 7, en una evaluación de 7 días y una temperatura de 30°C. Los resultados mostraron que la cepa con biocarbón fueron efectivas para (C16, C18, C19, C26, C28) y aromáticos policíclicos para naftaleno (NAP) y pireno (PYR), el hexadecano y octadecano, tuvo valores de degradación del 94.75% y 82.29%. Finalmente, concluyeron que la cepa combinada con biocarbón demostró con éxito la tasa de eliminación en la degradación de (TPH) en alcanos y aromáticos.

### **III. METODOLOGÍA**

#### **3.1. Tipo y diseño de investigación**

La investigación realizada fue de tipo básica, debido a que pretende aportar nuevos conocimientos sobre el efecto que tiene la variable independiente, bacterias halófilas en el estudio.

Se aplicó un diseño experimental de acuerdo los objetivos mencionados, debido a que se han modificado los rangos de pH en la mezcla sintética de medio mínimo de sales, además de utilizar dos diferentes dosis de bacterias halófilas, en las que se identificó las mejores condiciones para la degradación de hidrocarburos medido por medio del análisis inicial y final de los hidrocarburos totales de petróleo (TPH).

#### **3.2. Variables y operacionalización**

En la investigación se ha considerado el uso de dos variables tanto independiente como dependiente. Como variables independientes se tiene: pH y dosis de bacteria halófila. Los indicadores para el pH son: 6, 8 y 10; mientras que para la dosis de *Bacillus marisflavi*:  $3 \times 10^8$ ,  $1.2 \times 10^9$  UFC.

La variable dependiente fue la degradación de hidrocarburos con dos dimensiones: degradación de THP y tiempo. Como indicadores se tuvo la degradación de hidrocarburos inicial y final, y para el tiempo se consideró las 24, 48 y 72 horas. El anexo 1 muestra la matriz de operacionalización de las variables.

#### **3.3. Población, muestra y muestreo**

##### **3.3.1. Población**

La población de la investigación estuvo conformada por una mezcla sintética de 8 tipos de hidrocarburos en concentraciones nominales de 100 ppm.

##### **3.3.2. Muestra**

La muestra estuvo conformada por 10 mL de solución sintética conteniendo dodecano, tetradecano, hexadecano, octadecano, eicosano, docosano, tetracosano y hexacosano, todos a una concentración nominal de 100 ppm, donde se realizó dos repeticiones de los tratamientos.

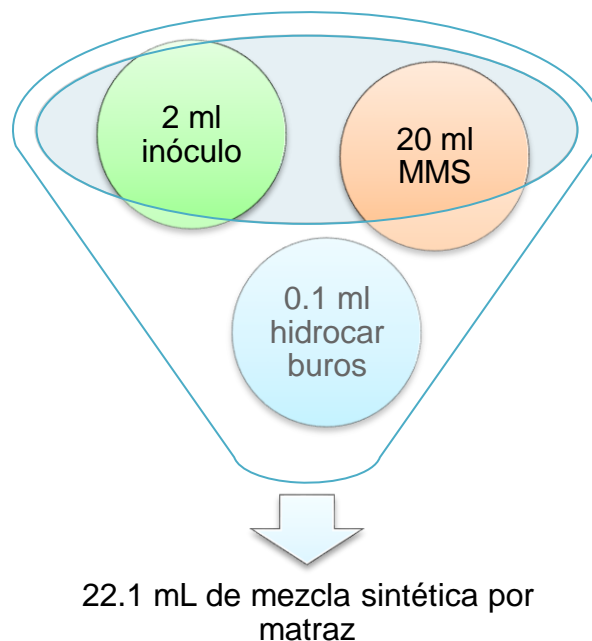
### 3.3.3. Muestreo

El tipo de muestreo fue no probabilístico y por conveniencia, debido a que la muestras se ha seleccionado según su disponibilidad sin imponer requisitos específicos de selección para facilitar el trabajo de investigación.

### 3.3.4. Unidad de análisis

La unidad de análisis estuvo conformada por 20 ml de medio mínimo de sales (MMS), 2 ml de inóculo, en dos niveles de concentraciones y 100  $\mu$ L de solución sintética de hidrocarburos en concentraciones de 100 ppm.

**Figura 1.** Cantidad de mL de mezcla sintética por matraz.



### 3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

La técnica empleada fue la observación experimental, puesto que se ha realizado un seguimiento de las condiciones controladas a las cuales se desarrolló la investigación.

El instrumento utilizado fue la ficha de recolección de datos, entre los cuales tenemos la ficha de obtención de las concentraciones de U.F.C de la *Bacillus marisflavi*, la ficha monitoreo de TPH inicial y final para poder verificar el porcentaje de degradación de hidrocarburos por cada tratamiento, y la ficha de monitoreo de TPH en relación al tiempo de las 24, 48 y 72 horas (Anexo17).

### 3.5. Procedimiento

**Preparado del medio mínimo de sales (MMS).** Para el preparado del medio se utilizó: 1.2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Fosfato de disódico), 0.400  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Fosfato monopotásico), 0,200  $\text{NaCl}$  (Cloruro de sodio), 0,400 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Sulfato de magnesio), 0,01 g  $\text{CaCl}_2$  (Cloruro de calcio) y 0,02 g de glucosa, para 400 mL de agua destilada.

**Obtención de la cepa *Bacillus marisflavi*.** La cepa de *B. marisflavi* fue donada por el Instituto de Investigación en Ciencia y Tecnología de la Universidad César Vallejo, la identificación molecular fue realizada por el laboratorio Ecobiotech. Las regiones secuenciadas y analizadas en el programa BLAST obtuvo un porcentaje de identidad del 100.00 % la cual corresponde a la especie *Bacillus marisflavi* (Anexo 5).

**Reactivación de la cepa *B. marisflavi*.** Se tomó un inóculo del cultivo puro de *B. marisflavi* y se sembró en caldo BHI (Brain Heart Infusión), luego se incubó a  $37^\circ\text{C}$  durante 24 horas en agitación magnética de 150 rpm. Pasado el tiempo de incubación, se sembró una asada por la técnica de agotamiento por estrías, en medio Agar Nutritivo y se incubó a  $37^\circ\text{C}$  durante 24 horas. Trascurrido el tiempo se observó colonias aisladas la cual se realizó una coloración Gram para verificar la pureza de la cepa.

**Preparación de los inóculos.** De un cultivo puro de *B. marisflavi* se realizaron suspensiones en solución salina fisiológica estéril (s.s.f.e) a concentraciones de  $3.0 \times 10^8$  y  $1.2 \times 10^9$  UFC/mL, luego cada concentración se inoculó en los tratamientos respectivos que fueron evaluados durante 72 horas.

Para obtener la concentración de la dosis de la *Bacillus marisflavi* se empleó el estándar de turbidez de McFarland.

**Tabla 2.** Características de la absorbancia y concentración de la bacteria.

Tubo	Absorbancia (600nm)	Concentración (U.F.C/mL)
2	0.262	$3.0 \times 10^8$
4	0.963	$1.2 \times 10^9$

Fuente: Estrada *et al* (2022)

## Preparado de las muestras y tratamientos.

Para el preparado de la mezcla sintética se utilizó 240 mL de medio mínimo de sales vertiendo 0.1 ml de hidrocarburos en cada matraz, luego se modificó el pH (6, 8 y 10). Para ello se empleó HCl de para acidificar y NaOH para alcalinizar.

Utilizando las diferentes dosis de bacterias y los diferentes pH se obtuvieron los siguientes bloques de tratamientos:

- Muestra Control: Medio Mínimo de sales, hidrocarburos sin dosis de bacteria, sin modificación de pH (para observar y comparar el porcentaje de biodegradación).
- **Primer bloque**

**Tabla 3.** *Diseño de los tratamientos a distintos valores de pH y dosis constantes.*

Tratamiento	Dosis (UFC/mL)	pH	MMS (mL)	Vol. estándar de Hidrocarburos (µL)
T1	$3 \times 10^8$	6	20	100
T2	$3 \times 10^8$	8	20	100
T3	$3 \times 10^8$	10	20	100

**Nota:** Los matraces con cada tratamiento estuvieron en constante agitación en incubadora shaker en las condiciones de 150 rpm a 37°C.

- **Segundo bloque**

**Tabla 4.** *Diseño de los tratamientos a distintos valores de pH y dosis constantes.*

Tratamiento	Dosis (UFC/mL)	pH	MMS (mL)	Vol. estándar de Hidrocarburos (µL)
T1	1.2x10 <sup>9</sup>	6	20	100
T2	1.2x10 <sup>9</sup>	8	20	100
T3	1.2x10 <sup>9</sup>	10	20	100

**Nota:** Los matraces con cada tratamiento estuvieron en constante agitación en incubadora shaker en las condiciones de 150 rpm a 37°C.

Se tomó una muestra de cada tratamiento, sacando 3 mL de cada matraz, seguidamente se realizó la codificación con sus datos respectivos, para de esta manera evitar contaminación y/o confusiones al momento de su traslado al laboratorio, donde se realizó el análisis en cromatógrafo de gases (GC) para identificar los hidrocarburos totales de petróleo (TPH).

### **Monitoreo de los tratamientos.**

#### **Fase 1**

Después de 72 horas se tomaron muestras simples de cada tratamiento, luego se cuantifico la cantidad de hidrocarburos totales (TPH) cuyos resultados se muestra la tabla 5. Los cuales fueron comparados con los resultados de la muestra control.

#### **Fase 2**

En la segunda fase de la investigación se utilizaron las mejores condiciones de pH y dosis de bacterias halófilas seleccionadas en la fase anterior y se calculó el % de degradación a las (24,48 y 72 horas) realizando la siguiente fórmula:

$$\text{Degradación (\%)} = \frac{(\text{Concentración entrada} - \text{Concentración salida})}{\text{Concentración entrada}} \times 100$$

### **3.6. Métodos de análisis de datos**

Los datos recolectados de los monitoreos por cada tratamiento, fueron procesados en el Software Microsoft Excel, el cual permitió organizar y agrupar información para cada objetivo, donde se calculó la media aritmética de los resultados de las dos réplicas realizadas por cada análisis, para posteriormente realizar un análisis de varianza (ANOVA), en el software infoStat para determinar si existen diferencias significativas en la reducción de hidrocarburos entre los tratamientos. De igual forma, se llevó a cabo la prueba LSD Fischer para determinar las mejores condiciones de pH, dosis y tiempo.

### **3.7. Aspectos éticos**

La investigación realizada, ha respetado la integridad de los datos recopilados, de tal manera que aporte a la investigación científica y poder comparar la eficiencia que presentan las bacterias halófilas, en las cuales no se realizó alteraciones en la flora natural y entorno ambiental de esta bacteria. Por otro lado, se respetó la autoría de las investigaciones consultadas en esta tesis, además se ha tomado como base el respeto a los principios éticos establecidos por Universidad César Vallejo (UCV).



#### IV. RESULTADOS

##### 4.1 Evaluación de la influencia de pH y U.F.C de *Bacillus marisflavi* en la degradación de hidrocarburos.

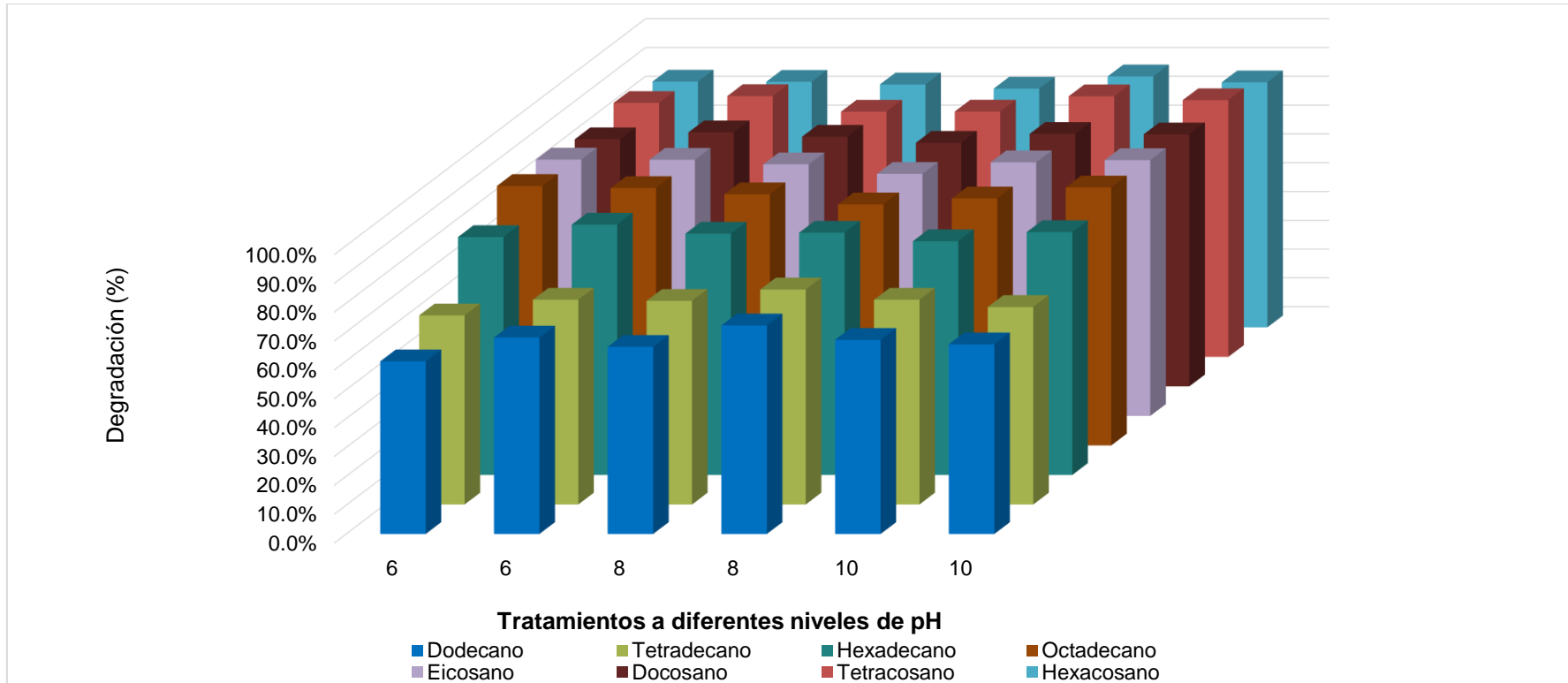
**Tabla 5.** Degradación de TPH (%) en diferentes concentraciones de pH y dosis *Bacillus marisflavi*.

			Degradación de los TPH (%)							
Tratamiento	pH	Dosis	Dodecano	Tetradecano	Hexadecano	Octadecano	Eicosano	Docosano	Tetracosano	Hexacosano
		(UFC/mL)								
1	6	$3.0 \times 10^8$	59.4	65.5	82.5	90.0	89.0	85.8	88.1	85.3
2	8	$3.0 \times 10^8$	66.2	70.6	83.7	87.1	87.3	86.7	85.1	84.3
3	10	$3.0 \times 10^8$	67.3	71.0	81.1	85.7	88.0	87.6	90.5	87.1
4	6	$1.2 \times 10^9$	68.1	71.0	86.8	89.3	88.9	88.2	90.5	85.3
5	8	$1.2 \times 10^9$	72.3	74.5	84.0	83.6	84.0	84.5	85.2	82.9
6	10	$1.2 \times 10^9$	65.8	68.5	84.2	89.5	88.8	87.5	89.1	85.1

Fuente: elaboración propia

En los la tabla 5, se puede observar los 6 tratamientos aplicados para la degradación de los hidrocarburos, cada uno de los tratamientos de acuerdo al pH y la concentración U.F.C presentan diferentes preferencias por cada hidrocarburo, el tratamiento 1, 2 y 3 presentaron mayor degradación en el octadecano, eicosano y tetracosano con valores de 90.0%, 87.3% y 90.5% de degradación, así mismo el tratamiento 4,5 alcanzo valores de degradación para el tetracosano con diferente dosis y pH de 90.5 y 85.2 de degradación, el tratamiento 6 presento el 89.5 % de degradación para el octadecano. La *Bacillus marisflavi* presento una mayor degradación en los hidrocarburos octadecano, tetracosano y eicosano.

#### 4.2. Evaluación del efecto del pH en la degradación de hidrocarburos usando *Bacillus marisflavi*



**Figura 2.** Evaluación a diferentes niveles de pH en la degradación de hidrocarburos

En la figura 2, se puede observar el efecto que presenta los diferentes niveles de pH constantes en la degradación de los hidrocarburos, en los cuales, el pH 6 presenta un valor de degradación de 90.0% en el octadecano, pH 8 con un valor de 87.3 % de degradación en el eicosano y pH 10 con un valor de 90.5 % de degradación en el tetracosano.

Para evaluar el efecto del pH en la degradación de hidrocarburos, se realizó la prueba estadística de LSD Fisher con el propósito de comparar las medias de degradación, obtenidas a diferentes pH del medio. Para este análisis solo se tomó en cuenta los hidrocarburos a los cuales presentaron mayor influencia los niveles de pH en la degradación, a continuación, se muestra las tablas de análisis de varianza y prueba de LSD Fisher para la degradación de octadecano, eicosano y tetracosano a diferentes pH.

### **Degradación de octadecano, tetracosano y eicosano a diferentes pH.**

**H<sub>0</sub>:** No existe una degradación significativa para el octadecano, tetracosano y eicosano a diferentes niveles de pH.

**H<sub>1</sub>:** Existe una degradación significativa para el octadecano tetracosano y eicosano a diferentes niveles de pH.

**Tabla 6.** *Degradación de octadecano y tetracosano y eicosano a diferentes niveles de pH. Test: LSD Fisher.*

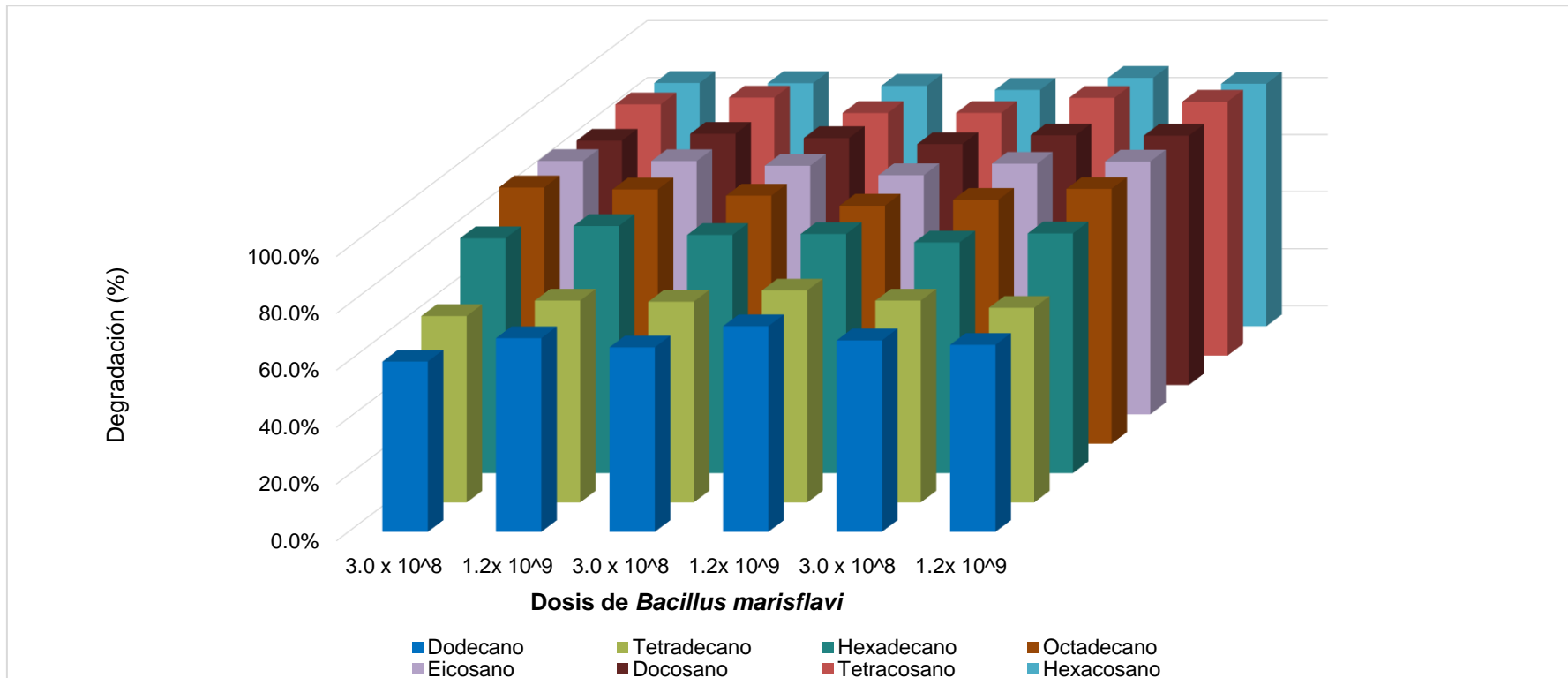
<b>Hidrocarburo</b>	<b>pH</b>	<b>Medias</b>	<b>n</b>	<b>E.E.</b>	
Octadecano	pH 8	0.85	4	0.02	A
	pH10	0.88	4	0.02	A
	pH 6	0.90	4	0.02	A
Tetracosano	pH 8	0.85	4	0.01	A
	pH10	0.90	4	0.01	B
	pH6	0.89	4	0.01	B
Eicosano	pH 8	0.86	4	0.01	A
	pH 10	0.88	4	0.01	B
	pH 6	0.89	4	0.01	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

Fuente: elaboración propia, infoStat.

En la tabla 6, se evidencia que los niveles pH no presentan influencia en la degradación del octadecano, de manera similar el tetracosano y eicosano con pH 8 no presenta significancia, mientras que los niveles de pH 6 y 10, presentan una significancia de  $p=0.0096$ , aceptando la hipótesis alternativa, lo cual indica que para la degradación del tetracosano y eicosano si hubo influencia de los niveles de pH.

**4.3. Evaluación del efecto de la dosis de la *Bacillus marisflavi* en la degradación de los hidrocarburos en soluciones acuosas.**



**Figura 3.** Evaluación de la mejor dosis de U.F.C de *Bacillus marisflavi* en la degradación de los hidrocarburos.

En la figura 3, se puede observar el efecto que presentan las diferentes dosis de U.F.C de *Bacillus marisflavi* en la degradación de los hidrocarburos, la dosis de  $1.2 \times 10^9$ , presentan un mayor efecto en la degradación del octadecano, eicosano y tetracosano, por otro lado, las dosis de  $3.0 \times 10^8$ , presentan menor efecto en la degradación de los hidrocarburos.

Del mismo modo, para evaluar la mejor dosis de U.F.C de *Bacillus marisflavi* en la degradación de hidrocarburos, se realizó la prueba estadística LSD Fisher con el propósito de comparar las medias de remoción, obtenidas a diferentes concentraciones de U.F.C del medio. Para este análisis solo se tomó en cuenta los hidrocarburos a los cuales presentaron mayor degradación (Octadecano, eicosano y tetracosano). A continuación, se muestra las tablas de análisis de varianza y la prueba LSD Fisher para la degradación de octadecano a diferentes dosis.

**Degradación de octadecano, tetracosano y eicosano a diferentes concentraciones U.F.C.**

**H<sub>0</sub>:** No existe degradación significativa para el octadecano, tetracosano y eicosano a diferentes concentraciones de U.F.C de *Bacillus marisflavi*.

**H<sub>1</sub>:** Existe degradación significativa para el octadecano, tetracosano y eicosano a diferentes concentraciones de U.F.C de *Bacillus marisflavi*.

**Tabla 7.** Degradación de octadecano, tetracosano y eicosano a diferentes dosis de *Bacillus marisflavi*. Test: LSD Fisher.

Hydrocarburo	UFC_ <i>Bacillus marisflavi</i>	Medias	n	E.E.	
Octadecano	3.0 x 10 <sup>8</sup>	0.88	6	0.01	A
	1.2 x 10 <sup>9</sup>	0.87	6	0.01	A
Tetracosano	3.0 x 10 <sup>8</sup>	0.88	6	0.01	A
	1.2 x 10 <sup>9</sup>	0.88	6	0.01	A
Eicosano	3.0 x 10 <sup>8</sup>	0.87	6	0.01	A
	1.2 x 10 <sup>9</sup>	0.88	6	0.01	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

Fuente: elaboración propia, infoStat.

En la tabla 7, se puede constatar que la dosis no presenta efecto en la degradación del octadecano, eicosano y tetracosano, debido a su valor de significancia que es superior a 0.05 por lo que se acepta la hipótesis nula y se rechaza la hipótesis alternativa.

**4.4. Evaluación del mejor tiempo en la degradación de hidrocarburos usando las mejores condiciones de pH y dosis utilizando *Bacillus marisflavi*.**

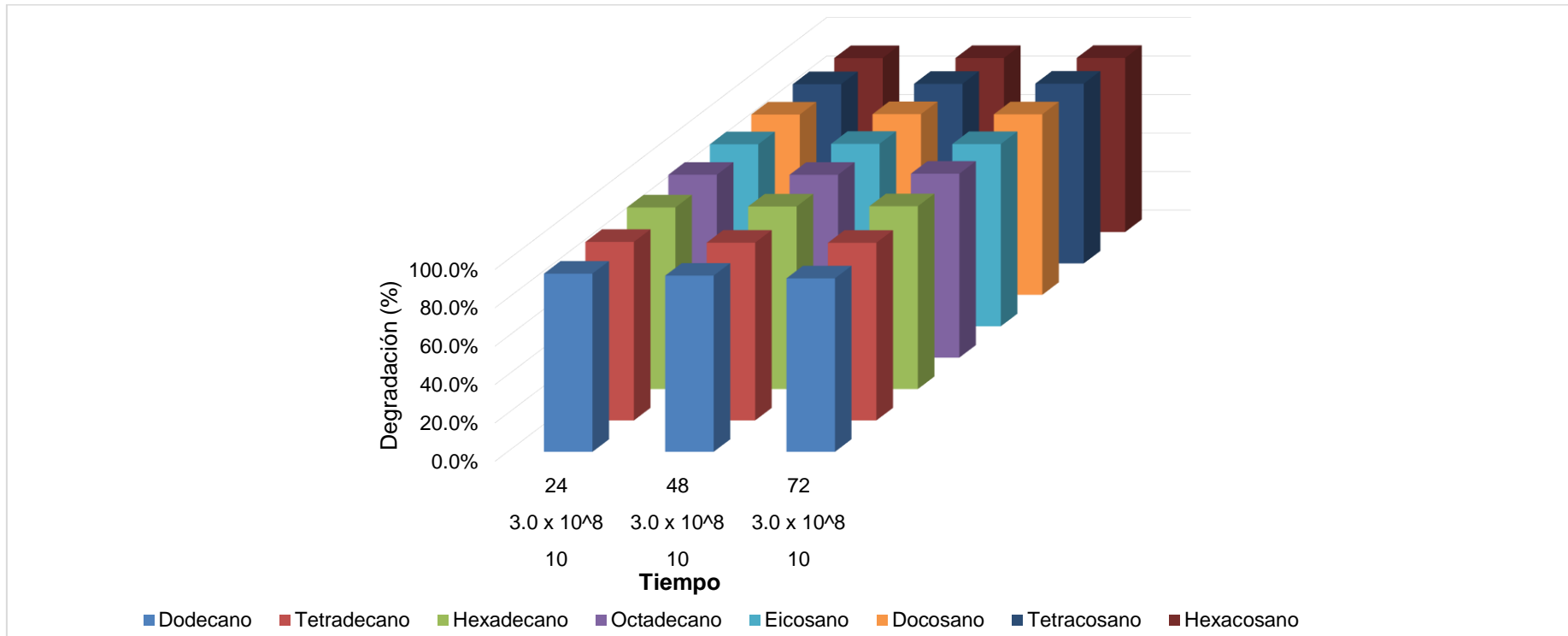
**Tabla 8.** Degradación de TPH (%) en diferentes tiempos usando el mejor pH y dosis *Bacillus marisflavi*.

Tratamiento	pH	Dosis (UFC/mL)	Tiempo (H)	Degradación de los TPH (%)							
				Dodecano	Tetradecano	Hexadecano	Octadecano	Eicosano	Docosano	Tetracosano	Hexacosano
1	10	3.0 x 10 <sup>8</sup>	24	92.8	93.0	94.6	95.2	94.6	93.7	93.1	90.3
2	10	3.0 x 10 <sup>8</sup>	48	91.8	92.6	95.0	95.1	94.9	93.9	93.3	90.3
3	10	3.0 x 10 <sup>8</sup>	72	90.4	92.6	95.2	95.7	94.8	93.8	93.4	90.4

Fuente: elaboración propia

En la tabla 8, se observa la degradación de los hidrocarburos en diferentes tiempos, con un nivel de pH 10 y una dosis 3.0 x 10<sup>8</sup>, en donde se obtuvieron porcentajes de degradación similares en los tres tiempos para los 8 hidrocarburos, tal es el caso del octadecano que presentó una degradación del 95% en los tres diferentes tiempos de manera similar el eicosano presentó una degradación del 94%, por otro lado, el tetracosano presentó una degradación del 93% en las 72 h de evaluación.

**4.5. Evaluación del mejor tiempo en la degradación de hidrocarburos usando las mejores condiciones de pH y dosis utilizando *Bacillus marisflavi*.**



**Figura 4.** Evaluación del mejor tiempo en la degradación de hidrocarburos utilizando *Bacillus marisflavi*

En la figura 4, se puede observar la variación que presenta la degradación de los hidrocarburos en los diferentes tiempos, en las cuales los hidrocarburos octadecanos eicosano y tetracosano presentan degradación similar en los tres tiempos.

### Degradación de octadecano, tetracosano y eicosano en diferentes tiempos

**H<sub>0</sub>:** No existe degradación significativa para el octadecano, tetracosano y eicosano en diferentes tiempos.

**H<sub>1</sub>:** Existe degradación significativa para el octadecano, tetracosano y eicosano en diferentes tiempos.

**Tabla 9.** *Degradación del octadecano, tetracosano y eicosano a diferentes tiempos.*  
*Test: LSD Fisher*

<b>Hidrocarburo</b>	<b>Tiempo(h)</b>	<b>Medias</b>	<b>n</b>	<b>E.E.</b>	
Octadecano	24	95.1	2	0.20	A
	48	95.1	2	0.20	A
	72	95.7	2	0.20	A
Tetracosano	24	91.7	2	0.84	A
	48	93.3	2	0.84	A
	72	93.3	2	0.84	A
Eicosano	24	94.6	2	0.18	A
	48	94.8	2	0.18	A
	72	94.7	2	0.18	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

Fuente: elaboración propia, infoStat.

En la tabla 9, se puede observar que, en un periodo de evaluación de 24, 48 y 72 horas no presenta efecto en la degradación de los hidrocarburos octadecano eicosano y tetracosano, debido a su valor de significancia mayor a 0.05, por lo que se acepta la hipótesis nula y se rechaza la hipótesis alternativa.



## V. DISCUSIÓN

En la tabla 5 y figura 2, se puede observar que, en un periodo de evaluación de 72 horas, optimizando las condiciones de temperatura y diferentes niveles de pH para lograr una mejor degradación, se pudo constatar que a niveles constantes de pH 6 se degrada con mayor eficiencia el octadecano y eicosano obteniendo valores de degradación del 90.0 % y 89.0%, de manera similar el pH 10 presentó mayor degradación para el tetracosano el cual obtuvo un valor de 90.5%. Estos resultados se contrastan con lo reportado por Gao *et al.* (2020), quienes usando la bacteria *Bacillus megaterium* a una temperatura de 28°C a un pH de 8.8 y a un tiempo de evaluación de 22 días lograron mayor eficiencia de degradación de hidrocarburos de petróleo, obteniendo valores del 92%, 90% y 86% para el octadecano, eicosano y tetracosano, respectivamente. Sin embargo, los resultados son distintos para los autores Tanzadeh *et al.* (2020), en su estudio lograron degradar hidrocarburos con menor porcentaje utilizando la bacteria *Bacillus cereus* a una temperatura de 30°C, con un pH 7 y en un periodo de 22 días cuyos valores fueron de 25%, 31% y 37% para el octadecano, eicosano y tetracosano, la bacteria tiene mejor capacidad de degradación en longitudes cortas (C9-C13) y medianas (C13-C25). Cuyos resultados son distintos a estudios como el de Zhang *et al.* (2016), en el cual utilizaron la bacteria *Corynebacterium*, al cual aplicaron biochar con el fin de mejorar el proceso de degradación de los hidrocarburos totales de petróleo en un periodo de evaluación de 7 días, con un nivel de pH 7.0, de acuerdo a la técnica aplicada lograron degradar al hexadecano y octadecano, con valores altos de porcentajes de 95.75% y 82.29%. Por otro lado, estudios como Pereira *et al.* (2019), emplearon un nivel de pH 8.1 aplicando *Bacillus methylotrophus* en agua de mar con hidrocarburos de petróleo, logrando degradar a los alcanos de cadena en los rangos (C13 – C18) obteniendo medias de degradación del (35.4% – 91.0%). El proceso de degradación es diferente de acuerdo a las condiciones óptimas empleadas para lograr una mayor degradación como la temperatura, pH y tiempo de evaluación. La *Bacillus marisflavi* presenta una mayor degradación condiciones de pH 10, temperatura de 37°C y una dosis de  $3.0 \times 10^8$ .

En la tabla 6, se realizó el análisis de significancia de los tres hidrocarburos con mayor degradación, para constatar estadísticamente si hay efecto en la degradación de los hidrocarburos a diferentes niveles de pH, se pudo evidenciar que el octadecano no presentó efecto en la influencia de los niveles de pH con significancia de ( $p > 0.1863$ ), de manera similar el tetracosano y eicosano no presentaron influencia a niveles de pH 8, sin embargo, los niveles de pH 6 y 10 presentaron efecto en la degradación de estos hidrocarburos con una significancia ( $p < 0.0329$ ). Por otro lado, estos resultados contrastan con los autores Liu *et al.* (2020), sostienen que para un pH 6.5, la bacteria *Bacillus cereus*, obtiene altos valores de degradación para el octadecano, eicosano y tetradecano obteniendo porcentajes del 98.9%, 99.5% y 99.7% para la eliminación de los hidrocarburos de petróleo. Asimismo, estos resultados son distintos a los autores Nkem *et al.* (2016), donde aplicaron la bacteria *Cellulosimicrobium*, a un pH 7.5 a una temperatura de 32°C en la degradación de hidrocarburos como octadecano, eicosano y tetracosano en un tiempo de evaluación de diez días, obteniendo promedio de degradación mayor para el octadecano con un valor de 93.3 %, sin embargo, el eicosano y tetracosano presentaron valores desfavorables de degradación del 11.28% y 17.9%. de degradación. Estos hallazgos difieren con los autores Yusoff *et al.* (2020), utilizaron la bacteria *Geobacillus sp* con presencia de lipasa, a un nivel de un pH 8, en la degradación del octadecano, eicosano y tetracosano, cuyos valores fueron 4.8%, 3.5% y 16% en un periodo de evaluación de tres días, la cepa no presenta altos porcentajes de degradación en alcanos.

En tabla 7 se realizó el análisis de significancia para los hidrocarburos con mayor degradación, se pudo constatar que la dosis no presentó efecto en la degradación del octadecano, eicosano y tetracosano con una significancia de ( $p > 0.9509$ ), para la dosis del  $3.0 \times 10^8$  UFC/mL el octadecano y tetracosano presentan medias similares a 0,88 mientras que con la dosis de  $1.2 \times 10^9$  UFC/mL el eicosano y tetracosano tienen medias iguales a 0.88 %, de acuerdo a lo mencionado se pudo evidenciar que la dosis de *Bacillus marisflavi* no es un factor influyente en la degradación de los hidrocarburos. Sin embargo, Chen *et al.* (2017), realizaron una investigación aplicando la bacteria Dietzia con un pH 7.0 y una dosis de  $2.15 \times 10^9$  UFC/mL, logrando degradar hidrocarburos como el octadecano y eicosano, con

valores 94.83%, 99.2% y tetracosano 97.85%. Por otro lado, estos resultados son distintos a lo obtenido por los autores Fan *et al.* (2020), en su investigación utilizaron la bacteria *Bacillus licheniformis*, logró remover hasta un 80% de octadecano y 70% de hexadecano en un periodo de 10 días a una concentración de  $1,2 \times 10^4$ .

En la Tabla 8 y figura 4, se observa que el mejor tiempo de degradación fue de 24 horas, tomando las mejores condiciones de pH y dosis evaluadas, los valores máximos de degradación fueron de 94.6%, 95.2%, 94.6% y 93.7% para el hexadecano, octadecano, eicosano y docosano, siendo el octadecano con mayor porcentaje de degradación en 24, 48 y 72 horas con valores de 95.2%, 95.1%, 95.7%, respectivamente. Asimismo, el hexacosano fue el que presentó un menor promedio de degradación en el proceso fermentativo con un 90.4 %. Por su parte los resultados son distintos en el estudio de Masika *et al* (2021), donde aplicó tres consorcios diferentes de *Bacillus sp* (*Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacilo metilotrófica*), con un pH 6.8 a 72 horas de evaluación, en la eliminación del (C8 – C28), donde las primeras 12 horas de evaluación obtuvieron un 64.5 %, después de las 48 y 72 horas el porcentaje de degradación decreció a un 53.6 % y 52.7 % respectivamente, con lo cual el porcentaje de la degradación de hidrocarburos no aumento significativamente. En otro estudio, Khanpuor *et al* (2020), los resultados mostraron que la *Bacillus licheniformisen* en 14 días presentó valores de 68% y 40% para el tetradecano y hexacosano con un pH de 8.5, en la degradación de hidrocarburos de petróleo en agua de mar artificial, por lo tanto, esta cepa tiene altos valores de degradación en cadenas cortas. Asimismo, Purnomo, Rizqi y Rafi (2020), constato *en* su investigación que la bacteria *Bacillus subtilis*, a un pH 8.36 tuvo mejor evaluación en 7 días para la degradación del octadecano y tetracosano con valores del 29.33% y 40.29% respectivamente.

En la Tabla 9, se analizó el nivel de significancia en la degradación de los hidrocarburos obtenidos en el periodo de evaluación de 24, 48 y 72 horas, tomando las mejores condiciones a un nivel pH 10 y una dosis de  $3.0 \times 10^8$  UFC de *Bacillus marisflavi*, obteniendo como promedio en el octadecano, eicosano y tetracosano, logrando degradar a un 95.3%, 94.7% y 92.7% de hidrocarburos, siendo el octadecano el que tuvo el mayor porcentaje de degradación. Sin embargo, estos resultados se contrasta con los autores Dai *et al.* (2021), quienes obtuvieron

promedios de degradación significativos aplicando la *Brevibacillus sp* y *Bacillus sp*, los consorcios fueron optimizadas a un nivel de pH 7 y en un periodo de evaluación de 10 días, donde el octadecano, eicosano y tetracosano, presentaron promedios de degradación del 81.7%, 72% y 64.9%, Por otro parte, estos resultados son diferentes a los autores Ozyurek y Soyuer (2023), quienes aplicando la bacteria *Bacillus subtilis* potente productora de biosurfactantes a condiciones de un pH 7 en un periodo de evaluación de 7 días, obtuvo una alta resistencia a los efectos tóxicos y eficiencia en la eliminación de los hidrocarburos de petróleo, degradando cadenas cortas y medias con valores del 24.9%, 28.5% y 78.5% en el octadecano, eicosano y tetracosano respectivamente.

## VI. CONCLUSIONES

Existe efecto del pH en la degradación de hidrocarburos, siendo el pH 10 donde se observa la más alta degradación del eicosano y tetracosano en soluciones acuosas utilizando *Bacillus marisflavi*.

No existe efecto de la dosis de *Bacillus marisflavi* en la capacidad de degradación de hidrocarburos.

El mejor tiempo de degradación de hidrocarburos a las mejores condiciones de pH y dosis de *Bacillus marisflavi* es a las 24 horas de fermentación.

Existe efecto del pH en la degradación de hidrocarburos en soluciones acuosas, pero que es independiente de la dosis de *Bacillus marisflavi*.

## VII. RECOMENDACIONES

Investigar el comportamiento de la *Bacillus marisflavi* en condiciones ambientales y en diferentes rangos de pH (7– 9), puesto a que presentan un grado de degradación considerable a niveles de pH 6 y 10.

Investigar el proceso de degradación de los hidrocarburos aumentando la dosis de la *Bacillus marisflavi*, ya que se pudo evidenciar que las diferentes dosis aplicadas no presentaron niveles de significancia y efecto en la degradación de los hidrocarburos.

Optimizar las condiciones de degradación evaluando a rangos de menor tiempo como 6 h y 12 h, ya que en la investigación se pudo constatar que a las 72 h el promedio de degradación es similar para los hidrocarburos aplicando condiciones óptimas como pH 10 y dosis de  $3.0 \times 10^8$ .

## REFERENCIAS

- ADIPAHA, Sylvia. Introduction of petroleum hydrocarbons contaminants and its human effects. *Journal of Environmental Science and Public Health*, 2019, vol. 3, no 1, p. 1-9. Disponible en: <https://doi.org/10.26502/jesph.96120043>
- ARIAS, Johana. Contaminación de suelos y aguas por hidrocarburos en Colombia. Análisis de la fitorremediación como estrategia biotecnológica de recuperación. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 2017, vol. 8, no 1, p. 151-167. Disponible en: <https://doi.org/10.22490/21456453.1846>
- CAPURRO, Víctor, et al. Daño ambiental en el litoral marino peruano causado por el derrame de petróleo en la refinería La Pampilla. *Manglar*, 2022, vol. 19, no 1, p. 67-75. Disponible en: <https://doi.org/10.17268/manglar.2022.009>
- CHEN, Weiwei, et al. High efficiency degradation of alkanes and crude oil by a salt-tolerant bacterium *Dietzia* species CN-3. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2017, vol. 118, p. 110-118. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.01.029>
- DAI, Xiaoli, et al. Bioremediation of intertidal zones polluted by heavy oil spilling using immobilized laccase-bacteria consortium. *Bioresource Technology*, 2020, vol. 309, p. 123305. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123305>
- ESTRADA, Perla, et al. Contribuciones en el tratamiento de agua residual usando un consorcio sinérgico microalga-bacteria. 2022. Disponible en: <http://hdl.handle.net/11191/9551>
- FAN, Yanhui, et al. A novel exopolysaccharide-producing and long-chain n-alkane degrading bacterium *Bacillus licheniformis* strain DM-1 with potential application for in-situ enhanced oil recovery. *Scientific reports*, 2020, vol. 10, no 1, p. 1-10. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65432-z>

- LOREZ, Rabelo. Bacterias y hongos utilizados en la biodegradación de hidrocarburos: Una Revisión de literatura y Análisis Bibliométrico. Revista EIA, 2023, vol. 20, no 39, p. 13. Disponible en: <https://doi.org/10.24050/reia.v20i39.1622>
- FU, Xin-Ge, et al. Systematic adsorption process of petroleum hydrocarbon by immobilised petroleum-degradation bacteria system in degradation pathways. Petroleum Science, 2021, vol. 18, no 5, p. 1543-1550. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.petsci.2021.09.009>
- GAO, Jin, et al. Isolation and characterization of a high-efficiency marine diesel oil-degrading bacterium. Petroleum Science, 2021, vol. 18, p. 641-653. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s12182-020-00540-z>
- GUZMÁN, César, et al. Producción de polihidroxicanoatos por bacterias halófilas nativas utilizando almidón de cáscaras de Solanum tuberosum L. Scientia Agropecuaria, 2017, vol. 8, no 2, p. 109-118. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2017.02.03>
- HASANZADEH, Reyhaneh, et al. Application of isolated halophilic microorganisms suspended and immobilized on walnut shell as biocarrier for treatment of oilfield produced water. Journal of hazardous materials, 2020, vol. 400, p. 123197. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123197>
- IBRAHIM, Ibrahim, et al. Bioremediation potential of a halophilic Halobacillus sp. strain, EG1HP4QL: Exopolysaccharide production, crude oil degradation, and heavy metal tolerance. Extremophiles, 2020, vol. 24, p. 157-166. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00792-019-01143-2>
- INUKAI, Shigeki, et al. High-performance multi-functional reverse osmosis membranes obtained by carbon nanotube-polyamide nanocomposite. Scientific reports, 2016, Vol. 5, N°1, p. 1-10. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/srep13562>



- JEBELI, Mohammad Ahmadi, et al. *Bacillus flexus* strain As-12, a new arsenic transformer bacterium isolated from contaminated water resources. *Chemosphere*, 2017, vol. 169, p. 636-641. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.129>
- KHALID, Farah, et al. Bioremediation of diesel contaminated marine water by bacteria: A review and bibliometric analysis. *Journal of Marine Science and Engineering*, 2021, vol. 9, no 2, p. 155. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/jmse9020155>
- KHANPOUR, Elham, et al. Investigation of *Bacillus licheniformis* in the biodegradation of Iranian heavy crude oil: A two-stage sequential approach containing factor-screening and optimization. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020, vol. 205, p. 111103. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111103>
- KSHIRSAGAR, Dnyandev, et al. Heavy hydrocarbons as selective substrates for isolation of asphaltene degraders: A substrate-based bacterial isolation strategy for petroleum hydrocarbon biodegradation. *Environmental Technology & Innovation*, 2020, vol. 19, p. 100832. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100832>
- LIU, Yuan, et al. Biodegradation of n-alkanes in crude oil by three identified bacterial strains. *Fuel*, 2020, vol. 275, p. 117897. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.117897>
- MARSH, William, et al. Isolation and characterization of a halophilic *Modicisalibacter* sp. strain Wilcox from produced water. *Scientific Reports*, 2021, vol. 11, no 1, p. 1-14. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86196-0>
- MASIKA, Wendy, et al. Biodegradation of petroleum hydrocarbon waste using consortia of *Bacillus* sp. *Bioremediation Journal*, 2020, vol. 25, no 1, p. 72-79. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/10889868.2020.1842322>

- MESA, Liliana, et al. Monitoring of water pollution by hydrocarbons in the mirror of bay of santiago de cuba. *Revista Boliviana de Química*, 2019, vol. 36, no 4, p. 157-172. Disponible en: <https://doi.org/10.34098/2078-3949.36.4.2>
- MOJIRI, Amin, et al. Comprehensive review of polycyclic aromatic hydrocarbons in water sources, their effects and treatments. *Science of the total environment*, 2019, vol. 696, p. 133971. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133971>
- MURRIETA, María. Actividad proteolítica en bacterias halófilas aisladas de camas de salado de curtiduría de pieles de ganado. 2018. Disponible en: <http://hdl.handle.net/20.500.12984/2180>
- NKEM, Martins, et al. Isolation, identification and diesel-oil biodegradation capacities of indigenous hydrocarbon-degrading strains of *Cellulosimicrobium cellulans* and *Acinetobacter baumannii* from tarball at Terengganu beach, Malaysia. *Marine pollution bulletin*, 2016, vol. 107, no 1, p. 261-268. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.03.060>
- ORDOÑEZ, Didier, et al. Biodegradación de hidrocarburos alifáticos saturados por microorganismos aislados de suelo contaminado con derivados del petróleo. *Revista de Ciencias*, 2018, vol. 22, no 2, p. 33-44. Disponible en: <https://doi.org/10.25100/rc.v22i2.7917>
- OZYUREK, Bilen; SOYUER, Kaan. Enhanced Petroleum Removal by Potent Biosurfactant Producer *Bacillus Subtilis* CC9 Strain Isolated from an Oil Field. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, vol. 51, no 2, p. 1-12. Disponible en: <https://doi.org/10.15671/hjbc.1187546>
- PEREIRA, Evandro, et al. Biodegradation of aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in seawater by autochthonous microorganisms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2019, vol. 145, p. 104789. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.104789>


- PURNOMO, Adi; RIZQI, Hamdan; RAFI, Lia. Culture of bacterium *Bacillus subtilis* as degradation agent for sea water remediation contaminated by petroleum, 2020, vol. 3, no 1, p. 53-58. DOI: [10.34311/jics.2020.03.1.53](https://doi.org/10.34311/jics.2020.03.1.53)
- RODRÍGUEZ, Mónica; HIGUERA, Nubia; SANJUANELO, Danny. Halophilic bacteria with potential for the recovery of salinated soils in Sáchica-Boyacá, Colombia. *Revista de Biología Tropical*, 2019, vol. 67, no 3, p. 621-632. DOI: [10.15517/RBT.V67I3.32942](https://doi.org/10.15517/RBT.V67I3.32942)
- ROSAS, Ricardo. Identificación de bacterias halófilas tolerantes a metales pesados. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma del Estado de México. Disponible en: <http://hdl.handle.net/20.500.11799/79794>
- SERVICIO GEOLOGICO MEXICANO. Origen y formación. In: Museo Virtual, Aplicaciones de la Geología. 2017. Disponible en: [https://www.sgm.gob.mx/Web/MuseoVirtual/Aplicaciones\\_geologicas/Origen-y-formacion.html#](https://www.sgm.gob.mx/Web/MuseoVirtual/Aplicaciones_geologicas/Origen-y-formacion.html#)
- SINGA, P, et al. Photo-Fenton process for removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from hazardous waste landfill leachate. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 2021, vol. 18, p. 3515-3526. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s13762-020-03010-6>
- SUGANTHI, Hepzibah, et al. Enhanced biodegradation of hydrocarbons in petroleum tank bottom oil sludge and characterization of biocatalysts and biosurfactants. *Journal of environmental management*, 2018, vol. 220, p. 87-95. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.04.120>
- SWAIN, M.; NATARAJAN, V.; KRISHNAN, C. Marine enzymes and microorganisms for bioethanol production. En *Advances in food and nutrition research*. Academic Press, 2017. p. 181-197. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.12.003>

- TANZADEH, Jina, et al. Biological removal of crude oil with the use of native bacterial consortia isolated from the shorelines of the Caspian Sea. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2020, vol. 34, no 1, p. 361-374. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/13102818.2020.1756408>
- VILLAMIZAR, Estrella. Impactos de los derrames de petróleo sobre los arrecifes coralinos y sus bienes y servicios ecosistémicos impacts of the oil spills over the coral reefs and their ecosystems goods and services, 2020, vol. 45. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/352361744>
- VILLEGAS, Juan, et al. Remoción de hidrocarburos de aguas de producción de la industria petrolera utilizando nanointermedios compuestos por SiO<sub>2</sub> funcionalizados con nanopartículas magnéticas. *Dyna*, 2017, vol. 84, no 202, p. 65-74. Disponible en: <https://doi.org/10.15446/dyna.v84n202.63686>
- YUSOFF, Fatini, et al. Newly isolated alkane hydroxylase and lipase producing *Geobacillus* and *Anoxybacillus* species involved in crude oil degradation. *Catalysts*, 2020, vol. 10, no 8, p. 851. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/catal10080851>
- ZHANG, Hairong, et al. A novel bioremediation strategy for petroleum hydrocarbon pollutants using salt tolerant *Corynebacterium variabile* HRJ4 and biochar. *Journal of Environmental Sciences*, 2016, vol. 47, p. 7-13. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jes.2015.12.023>

ANEXO 1. Operacionalización de las variables


Variables	Definición Conceptual	Definición Operacional	Dimensión	Indicadores	Ecala de medición
<b>Bacterias Halófilas</b>	Las bacterias halófilas son microorganismos los cuales crecen en ambientes hipersalinos (entre 5% y 30% de sal), como pueden ser lagos, mares, salineras, desiertos (Murrieta, 2018, p.15).	Se modificará el pH según las dosis de bacterias Halófilas que serán utilizadas en el tratamiento para degradar hidrocarburos.	pH	pH 1: 6 pH 2: 8 pH 3: 10	Razón
			Dosis de <i>Bacillus marisflavi</i>	Dosis 1: 3.0x10 <sup>8</sup> UFC Dosis 2: 1.2x10 <sup>9</sup> UFC	Intervalo
<b>Degradación de hidrocarburos</b>	La degradación de hidrocarburos y sus derivados es un proceso natural lento, aunque para generarlo dentro de las tecnologías emergentes, aprovechan las capacidades metabólicas de los microorganismos, plantas y enzimas para transformar el petróleo en subproductos que sean de menor toxicidad (Ordoñez <i>et al.</i> , 2018).	La cantidad de hidrocarburos que se encuentra en la solución acuosa (después del tratamiento) comparada con la muestra control	Concentración TPH	Concentración inicial de TPH	Intervalo
				Concentración final de TPH	Intervalo
			Tiempo	Tiempo 1: 24h Tiempo 2: 48h Tiempo 3: 72h	Razón

**Anexo 2.** Obtención de la dosis de *Bacillus marisflavi*.

 <b>Universidad César Vallejo</b>		INSTRUMENTO N°1
TITULO	Influencia del pH y dosis de bacteria halófila en la degradación de hidrocarburos en soluciones acuosas	
LINEA DE INVESTIGACIÓN	Calidad y gestión de los recursos naturales	
AUTOR	Cuentas Terrones Cristhian Joseph Manuyama Noriega Dino Mauro	
ASESOR	Dr. Cruz Monzón, José Alfredo	
OBTENCIÓN DE LA DOSIS DE <i>BACILLUS MARISFLAVI</i>		
Tubo	Absorbancia/ 600nm	Concentración U.F.C


Fuente: elaboración propia

**Anexo 3. Monitoreo de TPH inicial y final por tratamiento.**

 <b>Universidad César Vallejo</b>				INSTRUMENTO N°1	
TÍTULO	Influencia del pH y dosis de bacteria halófila en la degradación de hidrocarburos en soluciones acuosas				
LINEA DE INVESTIGACIÓN	Calidad y gestión de los recursos naturales				
AUTOR	Cuentas Terrones, Cristhian Joseph Manuyama Noriega, Dino Mauro				
ASESOR	Dr. Cruz Monzón, José Alfredo				
Concentración de TPH					
Código de la muestra	Fecha	TPH inicial		TPH final	
		1	2	1	2
T0					
T1					
T2					
T3					
T4					
T5					
T6					

Fuente: elaboración propia

**Anexo 4.** Monitoreo de TPH a las 24, 48 y 72 horas.

 <b>Universidad César Vallejo</b>						INSTRUMENTO N°2			
TÍTULO		Influencia del pH y dosis de bacteria halófila en la degradación de hidrocarburos en soluciones acuosas							
LINEA DE INVESTIGACIÓN		Calidad y gestión de los recursos naturales							
AUTOR		Cuentas Terrones, Cristhian Joseph Manuyama Noriega, Dino Mauro							
ASESOR		Dr. Cruz Monzón, José Alfredo							
TRATAMIENTO		<b>CONCENTRACIÓN DE TPH</b>							
		<b>0 HORAS</b>		<b>24 HORAS</b>		<b>48 HORAS</b>		<b>72 HORAS</b>	
		<b>pH 10</b>							
		<b>3.0x10<sup>8</sup> UFC</b>		<b>3.0x10<sup>8</sup> UFC</b>		<b>3.0x10<sup>8</sup> UFC</b>		<b>3.0x10<sup>8</sup> UFC</b>	
<b>T0</b>									
<b>T1</b>									
<b>T2</b>									
<b>T3</b>									
<b>T4</b>									
<b>T5</b>									
<b>T6</b>									

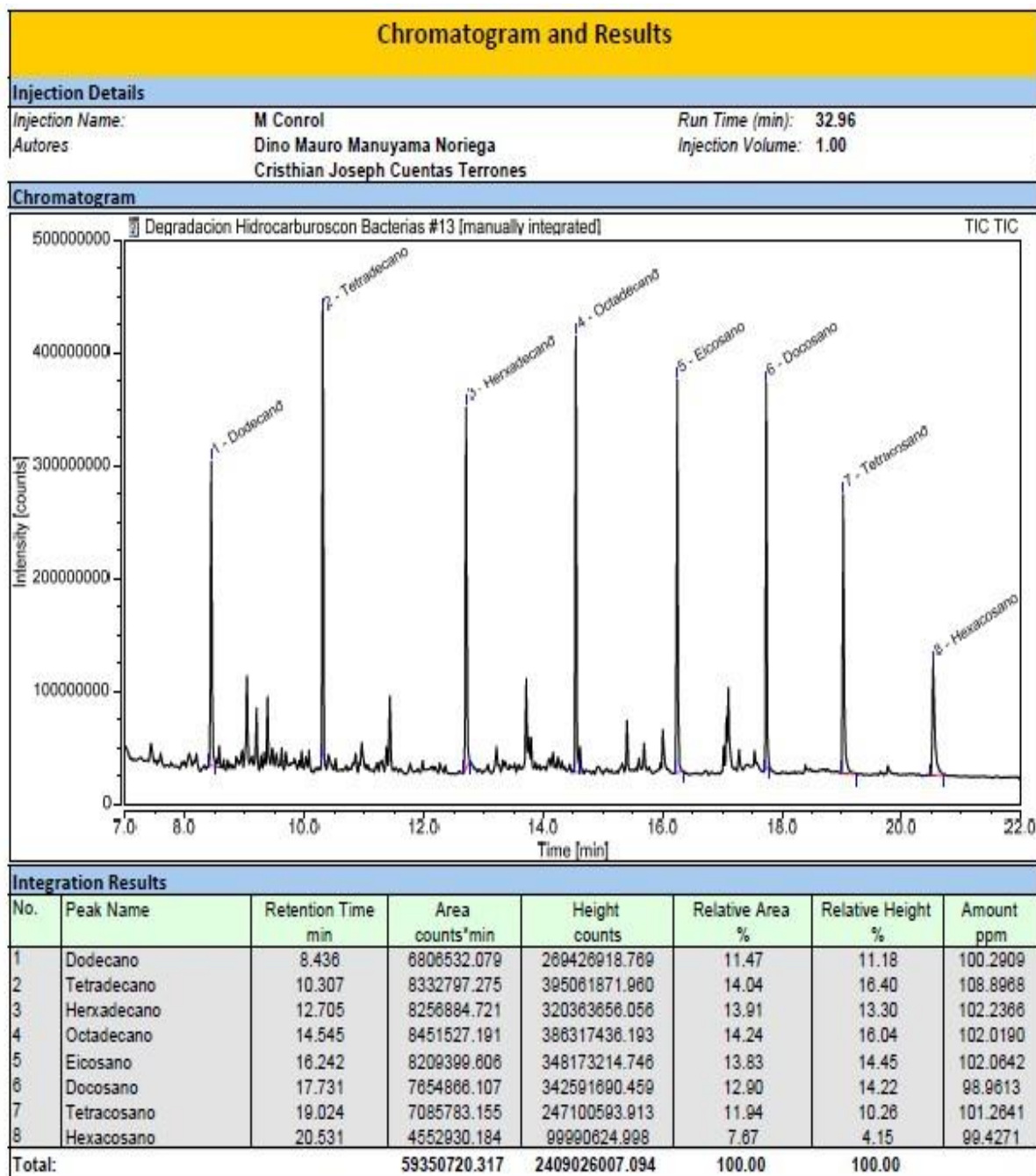
Fuente: elaboración propia



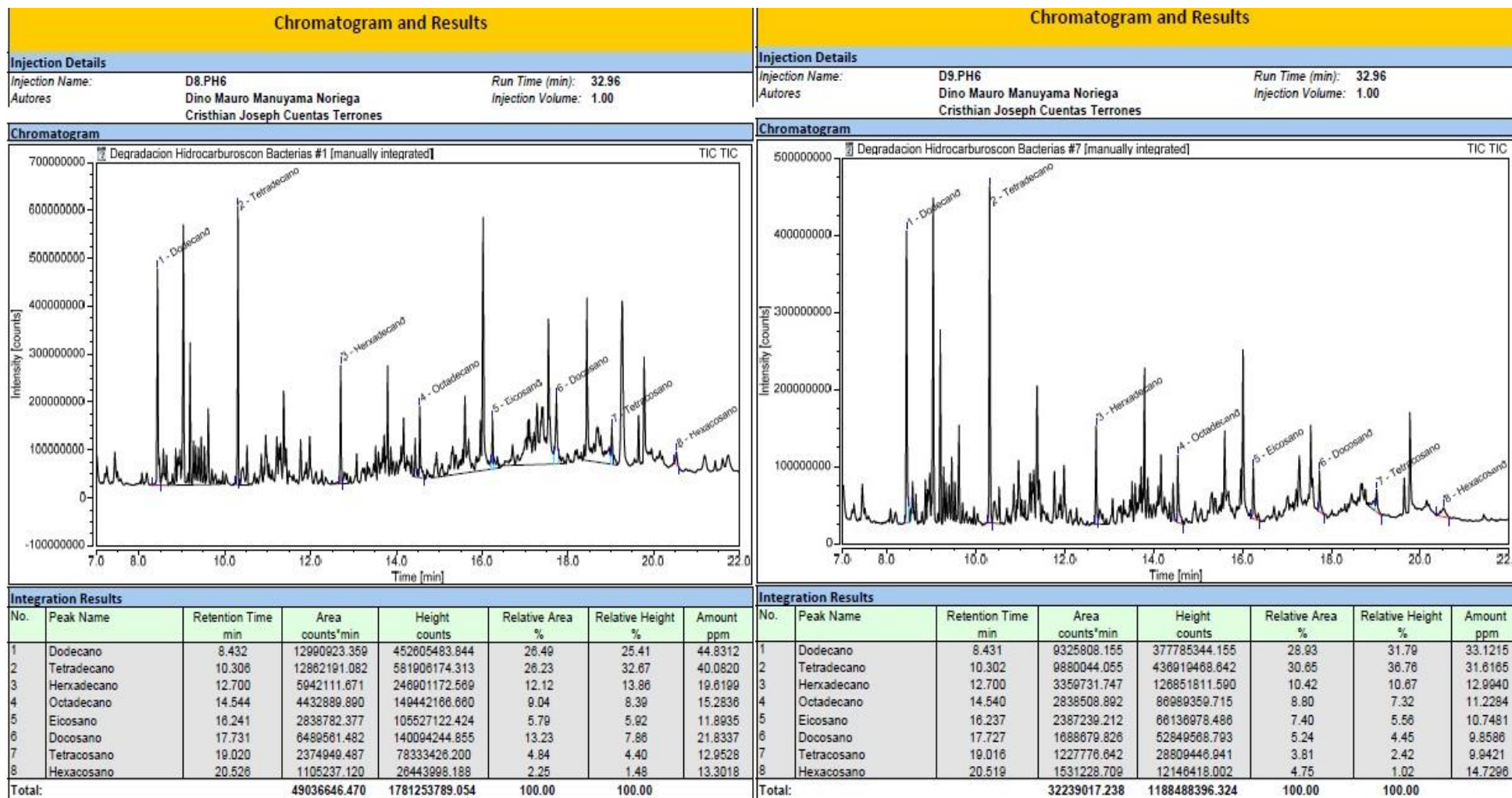
### Anexo 5. Identificación de la *Bacillus marisflavi*.

Identificación de la muestra	BLAST Characterization	Length of Consensus Sequence (nt)	% Maximum Identidad	Accession Number	Phylogeny
SEDIMENTO MARINC	<i>Bacillus marisflavi</i>	1482	100.00	NR_025240.1	Cellular organisms; Bacteria; Terrabacteria group; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus

### Anexo 6. Análisis de cromatografía de gases (GS- MS) de la muestra control.

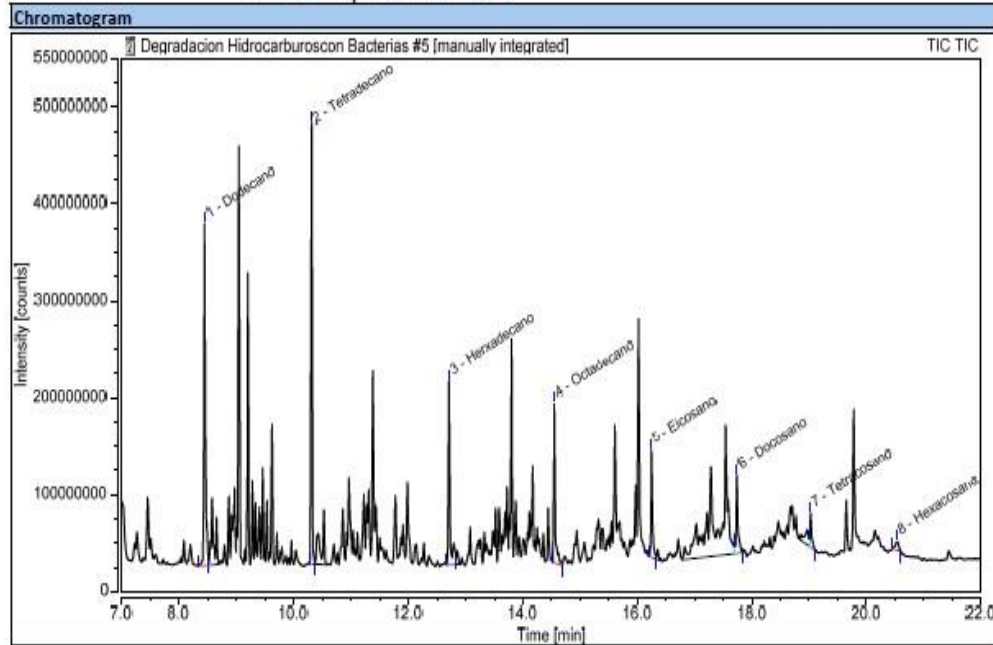


**Anexo 7. Cromatografía de gases (GS- MS) Dosis 3.0x10<sup>8</sup> – pH 6 y Dosis 1.2x10<sup>9</sup> – pH 6.**



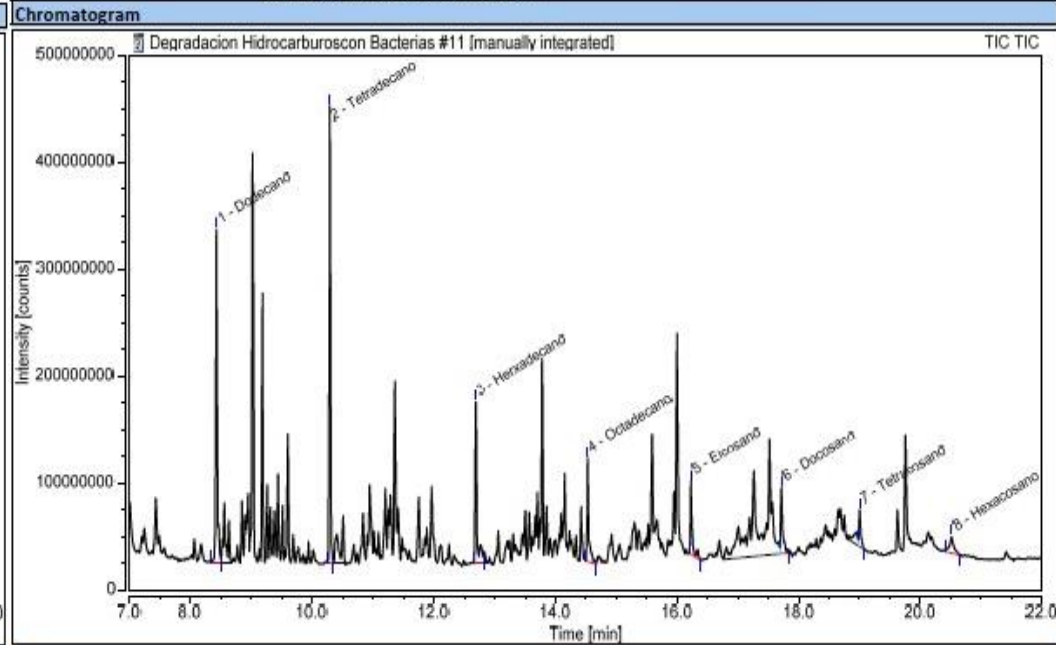
**Anexo 8. Cromatografía de gases (GS- MS) Dosis 3.0x10<sup>8</sup> – pH 10 y Dosis 1.2x10<sup>9</sup> – pH 10**

Chromatogram and Results			
<b>Injection Details</b>			
Injection Name:	D8.PH10	Run Time (min):	32.96
Autores	Dino Mauro Manuyama Noriega Cristhian Joseph Cuentas Terrones	Injection Volume:	1.00



Integration Results							
No.	Peak Name	Retention Time min	Area counts*min	Height counts	Relative Area %	Relative Height %	Amount ppm
1	Dodecano	8.442	10174977.824	352516658.057	25.89	25.23	35.8345
2	Tetradecano	10.309	10390173.815	455455307.991	26.44	32.80	33.0646
3	Hexadecano	12.710	6234664.874	189835911.505	15.87	13.59	20.3705
4	Octadecano	14.550	4588491.832	163840269.374	11.68	11.73	15.6794
5	Eicosano	16.247	3237810.716	110668173.228	8.24	7.92	12.9056
6	Docosano	17.737	2801230.473	80368266.063	7.13	5.75	12.6337
7	Tetracosano	19.026	1240901.599	34926861.012	3.16	2.50	9.9766
8	Hexacosano	20.540	627878.272	9638077.819	1.80	0.89	11.7020
<b>Total:</b>			<b>39296129.405</b>	<b>1397249525.048</b>	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>	

Chromatogram and Results			
<b>Injection Details</b>			
Injection Name:	D9.PH10	Run Time (min):	32.96
Autores	Dino Mauro Manuyama Noriega Cristhian Joseph Cuentas Terrones	Injection Volume:	1.00



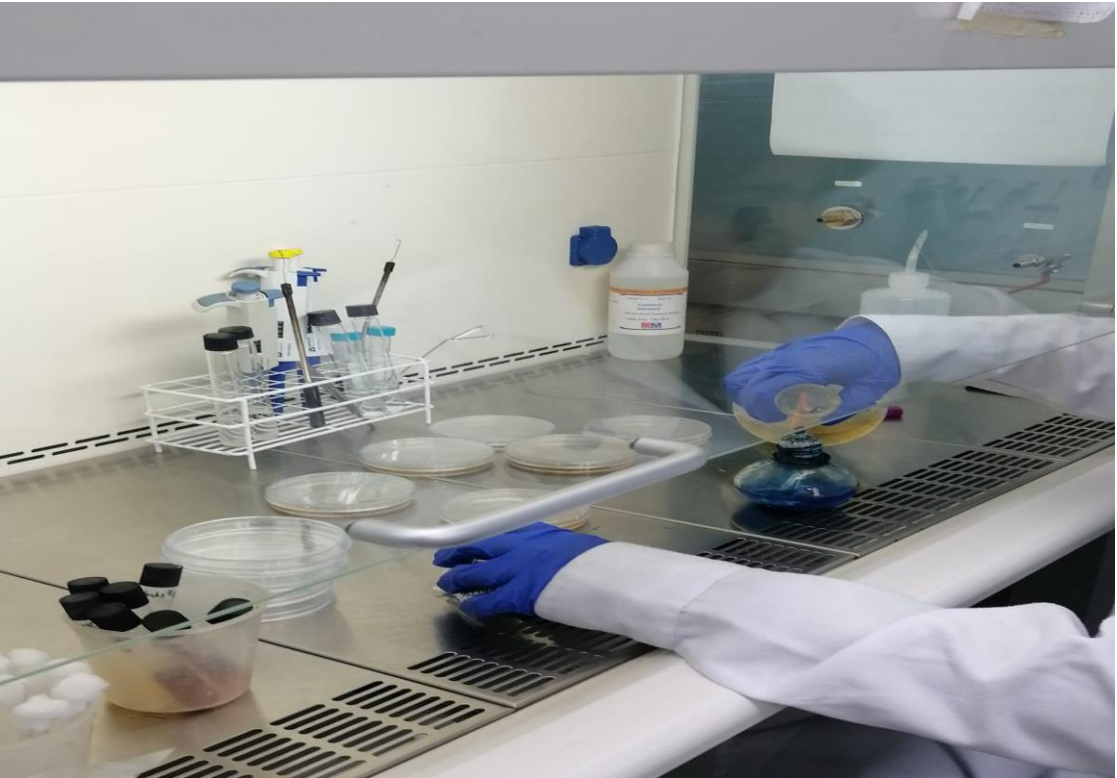
Integration Results							
No.	Peak Name	Retention Time min	Area counts*min	Height counts	Relative Area %	Relative Height %	Amount ppm
1	Dodecano	8.421	8807358.304	310728391.866	26.60	26.71	31.4651
2	Tetradecano	10.288	9647565.806	427163084.223	29.14	36.71	30.9586
3	Hexadecano	12.690	4979568.236	150685387.837	15.04	12.95	17.1502
4	Octadecano	14.530	2900590.807	96435014.204	8.78	8.29	11.3863
5	Eicosano	16.227	2113221.107	67997814.780	6.38	5.84	10.0531
6	Docosano	17.713	2256895.501	61193172.572	6.81	5.26	11.2734
7	Tetracosano	19.002	1165419.274	34109674.859	3.52	2.93	9.7785
8	Hexacosano	20.516	1240568.898	15230913.733	3.75	1.31	13.7554
<b>Total:</b>			<b>33110187.932</b>	<b>1163543454.073</b>	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>	



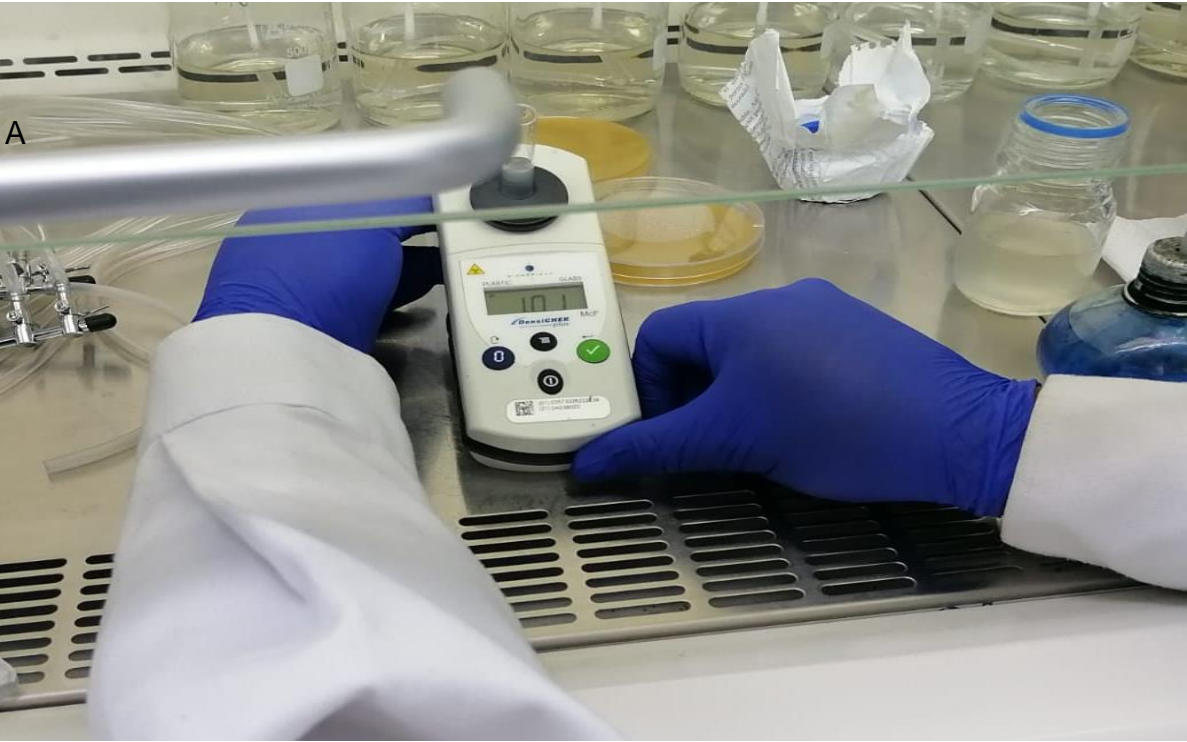
**Anexo 9.** Esterilización del MMS en el autoclave



**Anexo 10.** Sembrado de las placas en agar glucosa.



**Anexo 11.** Prueba de turbidez mediante el método de McFarland.



**Anexo 12.** Incubación de la bacteria halófila.

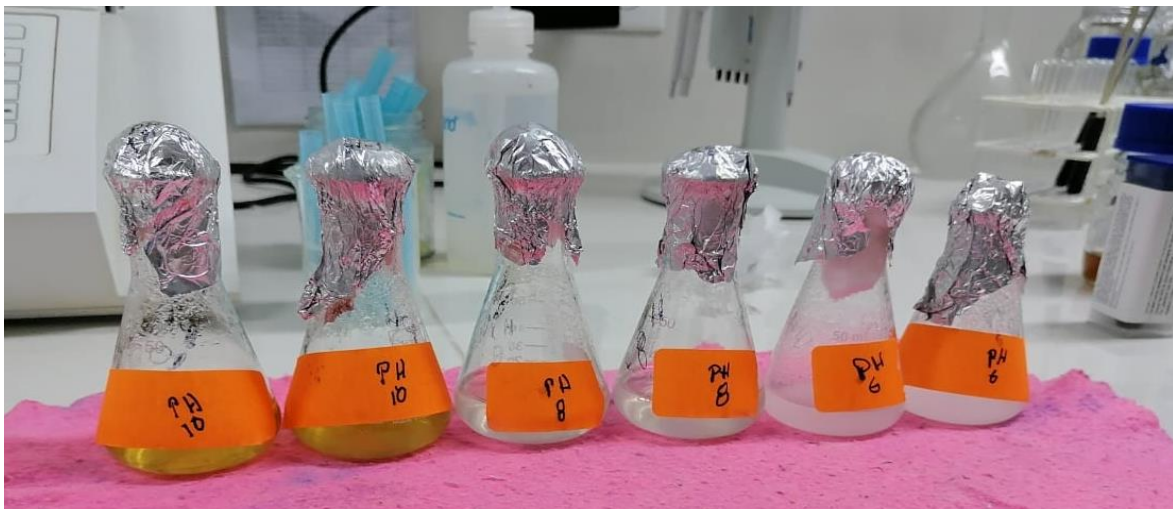


Anexo 13. Medición de absorbancia.





**Anexo 14.** Aplicación de la bacteria halófila al medio a diferentes niveles de pH y dosis.



**Anexo 15.** Muestras en incubadora shaker



Anexo 16. Extracción de los hidrocarburos.





## Anexo 17. Validación de instrumentos



### VALIDACIÓN DE INSTRUMENTO N° 1

#### I. DATOS GENERALES

- 1.1. Apellidos y Nombres: Rojas Villacorta Walter
- 1.2. Cargo e institución donde labora: Docente en la Universidad Cesar Vallejo - Trujillo
- 1.3. Especialidad o línea de investigación: Calidad y Gestión de los Recursos Naturales
- 1.4. Nombre del instrumento: Ficha de investigación
- 1.5. Autores de Instrumento: Cuentas Terrones Cristhian Joseph- Manuyama Noriega Dino Mauro

#### II. ASPECTOS DE VALIDACIÓN

CRITERIOS	INDICADORES	INACEPTABLE			MÍNIMAMENTE ACEPTABLE				ACEPTABLE		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. CLARIDAD	Está formulado con lenguaje comprensible.									X	
2. OBJETIVIDAD	Está adecuado a las leyes y principios científicos.									X	
3. ACTUALIDAD	Está adecuado a los objetivos y las necesidades reales de la investigación.									X	
4. ORGANIZACIÓN	Existe una organización lógica.										X
5. SUFICIENCIA	Toma en cuenta los aspectos metodológicos esenciales									X	
6. INTENCIONALIDAD	Está adecuado para valorar las variables de la Hipótesis.									X	
7. CONSISTENCIA	Se respalda en fundamentos técnicos y/o científicos.									X	
8. COHERENCIA	Existe coherencia entre los problemas objetivos, hipótesis, variables e indicadores.									X	
9. METODOLOGÍA	La estrategia responde a una metodología y diseño aplicados para lograr probar las hipótesis.									X	
10. PERTINENCIA	El instrumento muestra la relación entre los componentes de la investigación y su adecuación al Método Científico.									X	

#### III. OPINIÓN DE APLICABILIDAD

- El Instrumento cumple con los Requisitos para su aplicación
- El Instrumento no cumple con Los requisitos para su aplicación

Si

#### IV. PROMEDIO DE VALORACIÓN:

91
----

 CBB 12048  
Firma del especialista

Trujillo, 26 de mayo del 2023

**VALIDACIÓN DE INSTRUMENTO N° 2**

**V. DATOS GENERALES**

- 1.6. Apellidos y Nombres: Rojas Villacorta Walter
- 1.7. Cargo e institución donde labora: Docente en la Universidad Cesar Vallejo - Trujillo
- 1.8. Especialidad o línea de investigación: Calidad y Gestión de los Recursos Naturales
- 1.9. Nombre del instrumento: Ficha de investigación
- 1.10. Autores de Instrumento: Cuentas Terrones Cristhian Joseph- Manuyama Noriega Dino

Mauro

**VI. ASPECTOS DE VALIDACIÓN**

CRITERIOS	INDICADORES	INACEPTABLE			MÍNIMAMENTE ACEPTABLE				ACEPTABLE			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1. CLARIDAD	Está formulado con lenguaje comprensible.									X		
2. OBJETIVIDAD	Está adecuado a las leyes y principios científicos.									X		
3. ACTUALIDAD	Está adecuado a los objetivos y las necesidades reales de la investigación.									X		
4. ORGANIZACIÓN	Existe una organización lógica.										X	
5. SUFICIENCIA	Toma en cuenta los aspectos metodológicos esenciales									X		
6. INTENCIONALIDAD	Está adecuado para valorar las variables de la Hipótesis.									X		
7. CONSISTENCIA	Se respalda en fundamentos técnicos y/o científicos.									X		
8. COHERENCIA	Existe coherencia entre los problemas objetivos, hipótesis, variables e indicadores.									X		
9. METODOLOGÍA	La estrategia responde a una metodología y diseño aplicados para lograr probar las hipótesis.									X		
10. PERTINENCIA	El instrumento muestra la relación entre los componentes de la investigación y su adecuación al Método Científico.									X		

**VII. OPINIÓN DE APLICABILIDAD**

- El Instrumento cumple con los Requisitos para su aplicación
- El Instrumento no cumple con Los requisitos para su aplicación

Si

**VIII. PROMEDIO DE VALORACIÓN:**

 06812048

91
----

Trujillo, 26 de mayo del 2023

**VALIDACIÓN DE INSTRUMENTO N° 3**

**IX. DATOS GENERALES**

- 1.11. Apellidos y Nombres: Rojas Villacorta Walter
- 1.12. Cargo e institución donde labora: Docente en la Universidad Cesar Vallejo - Trujillo
- 1.13. Especialidad o línea de investigación: Calidad y Gestión de los Recursos Naturales
- 1.14. Nombre del instrumento: Ficha de investigación
- 1.15. Autores de Instrumento: Cuentas Terrones Cristhian Joseph- Manuyama Noriega Dino Mauro

**X. ASPECTOS DE VALIDACIÓN**

CRITERIOS	INDICADORES	INACEPTABLE			MINIMAMENTE ACEPTABLE				ACEPTABLE		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. CLARIDAD	Está formulado con lenguaje comprensible.									X	
2. OBJETIVIDAD	Está adecuado a las leyes y principios científicos.									X	
3. ACTUALIDAD	Está adecuado a los objetivos y las necesidades reales de la investigación.									X	
4. ORGANIZACIÓN	Existe una organización lógica.										X
5. SUFICIENCIA	Toma en cuenta los aspectos metodológicos esenciales									X	
6. INTENCIONALIDAD	Está adecuado para valorar las variables de la Hipótesis.									X	
7. CONSISTENCIA	Se respalda en fundamentos técnicos y/o científicos.									X	
8. COHERENCIA	Existe coherencia entre los problemas objetivos, hipótesis, variables e indicadores.									X	
9. METODOLOGÍA	La estrategia responde a una metodología y diseño aplicados para lograr probar las hipótesis.									X	
10. PERTINENCIA	El instrumento muestra la relación entre los componentes de la investigación y su adecuación al Método Científico.									X	

**XI. OPINIÓN DE APLICABILIDAD**

- El Instrumento cumple con los Requisitos para su aplicación
- El Instrumento no cumple con Los requisitos para su aplicación

Si

**XII. PROMEDIO DE VALORACIÓN:**

91
----

  
 Firma del especialista

Trujillo, 26 de mayo del 2023

**VALIDACIÓN DE INSTRUMENTO N° 1**

**I. DATOS GENERALES**

- 1.1. Apellidos y Nombres: Otiniano García Milly
- 1.2. Cargo e institución donde labora: Docente en la Universidad Cesar Vallejo - Trujillo
- 1.3. Especialidad o línea de investigación: Calidad y Gestión de los Recursos Naturales
- 1.4. Nombre del instrumento: Ficha de Investigación
- 1.5. Autores de Instrumento: Cuentas Terrones Cristhian Joseph- Manuyama Noriega Dino Mauro

**II. ASPECTOS DE VALIDACIÓN**

CRITERIOS	INDICADORES	INACEPTABLE			MÍNIMAMENTE ACEPTABLE				ACEPTABLE			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1. CLARIDAD	Está formulado con lenguaje comprensible.											X
2. OBJETIVIDAD	Está adecuado a las leyes y principios científicos.											X
3. ACTUALIDAD	Está adecuado a los objetivos y las necesidades reales de la investigación.									X		
4. ORGANIZACIÓN	Existe una organización lógica.									X		
5. SUFICIENCIA	Toma en cuenta los aspectos metodológicos esenciales											X
6. INTENCIONALIDAD	Está adecuado para valorar las variables de la Hipótesis.									X		
7. CONSISTENCIA	Se respalda en fundamentos técnicos y/o científicos.									X		
8. COHERENCIA	Existe coherencia entre los problemas objetivos, hipótesis, variables e indicadores.											X
9. METODOLOGÍA	La estrategia responde a una metodología y diseño aplicados para lograr probar las hipótesis.											X
10. PERTINENCIA	El instrumento muestra la relación entre los componentes de la investigación y su adecuación al Método Científico.											X

**III. OPINIÓN DE APLICABILIDAD**

- El Instrumento cumple con los Requisitos para su aplicación
- El Instrumento no cumple con Los requisitos para su aplicación

51

**IV. PROMEDIO DE VALORACIÓN:**

96
----

Trujillo, 26 de mayo del 2023

  
Firma del especialista



**VALIDACIÓN DE INSTRUMENTO N° 2**

**V. DATOS GENERALES**

- 1.6. Apellidos y Nombres: Otiniano García Milly
- 1.7. Cargo e institución donde labora: Docente en la Universidad Cesar Vallejo - Trujillo
- 1.8. Especialidad o línea de investigación: Calidad y Gestión de los Recursos Naturales
- 1.9. Nombre del instrumento: Ficha de investigación
- 1.10. Autores de Instrumento: Cuentas Terrones Cristhian Joseph- Manuyama Noriega Dino Mauro

**VI. ASPECTOS DE VALIDACIÓN**

CRITERIOS	INDICADORES	INACEPTABLE			MÍNIMAMENTE ACEPTABLE				ACEPTABLE		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. CLARIDAD	Está formulado con lenguaje comprensible.										X
2. OBJETIVIDAD	Está adecuado a las leyes y principios científicos.										X
3. ACTUALIDAD	Está adecuado a los objetivos y las necesidades reales de la investigación.										X
4. ORGANIZACIÓN	Existe una organización lógica.								X		
5. SUFICIENCIA	Toma en cuenta los aspectos metodológicos esenciales										X
6. INTENCIONALIDAD	Está adecuado para valorar las variables de la Hipótesis.										X
7. CONSISTENCIA	Se respalda en fundamentos técnicos y/o científicos.										X
8. COHERENCIA	Existe coherencia entre los problemas objetivos, hipótesis, variables e indicadores.										X
9. METODOLOGÍA	La estrategia responde a una metodología y diseño aplicados para lograr probar las hipótesis.								X		
10. PERTINENCIA	El instrumento muestra la relación entre los componentes de la investigación y su adecuación al Método Científico.								X		

**VII. OPINIÓN DE APLICABILIDAD**

- El Instrumento cumple con los Requisitos para su aplicación
- El Instrumento no cumple con Los requisitos para su aplicación

SI

**VIII. PROMEDIO DE VALORACIÓN:**

9.7
-----

Trujillo, 26 de mayo del 2023



**IX. VALIDACIÓN DE INSTRUMENTO N° 1  
DATOS GENERALES**

- 1.11. Apellidos y Nombres: Otiniano García Milly  
 1.12. Cargo e institución donde labora: Docente en la Universidad Cesar Vallejo - Trujillo  
 1.13. Especialidad o línea de investigación: Calidad y Gestión de los Recursos Naturales  
 1.14. Nombre del instrumento: Ficha de investigación  
 1.15. Autores de Instrumento: Cuentas Terrones Cristhian Joseph- Manuyama Noriega Dino Mauro

X. **ASPECTOS DE VALIDACIÓN**

CRITERIOS	INDICADORES	INACEPTABLE			MÍNIMAMENTE ACEPTABLE				ACEPTABLE		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. CLARIDAD	Está formulado con lenguaje comprensible.									X	
2. OBJETIVIDAD	Está adecuado a las leyes y principios científicos.										X
3. ACTUALIDAD	Está adecuado a los objetivos y las necesidades reales de la investigación.										X
4. ORGANIZACIÓN	Existe una organización lógica.										X
5. SUFICIENCIA	Toma en cuenta los aspectos metodológicos esenciales								X		
6. INTENCIONALIDAD	Está adecuado para valorar las variables de la Hipótesis.										X
7. CONSISTENCIA	Se respalda en fundamentos técnicos y/o científicos.										X
8. COHERENCIA	Existe coherencia entre los problemas objetivos, hipótesis, variables e indicadores.										X
9. METODOLOGÍA	La estrategia responde a una metodología y diseño aplicados para lograr probar las hipótesis.										X
10. PERTINENCIA	El instrumento muestra la relación entre los componentes de la investigación y su adecuación al Método Científico.										X


XI. **OPINIÓN DE APLICABILIDAD**

- El Instrumento cumple con los Requisitos para su aplicación
- El Instrumento no cumple con Los requisitos para su aplicación

51

XII. **PROMEDIO DE VALORACIÓN:**

98
----



Firma del especialista

Trujillo, 26 de mayo del 2023

**VALIDACIÓN DE INSTRUMENTO N°1**

**XIII. DATOS GENERALES**

- 1.16. Apellidos y Nombres: Cabanillas Chirinos Luis Alberto
- 1.17. Cargo e institución donde labora: Instituto de Investigación UCV
- 1.18. Especialidad o línea de investigación: Calidad y Gestión de los Recursos Naturales
- 1.19. Nombre del instrumento: Ficha de investigación
- 1.20. Autores de Instrumento: Cuentas Terrones Cristhian Joseph- Manuyama Noriega Dino Mauro

**XIV. ASPECTOS DE VALIDACIÓN**

CRITERIOS	INDICADORES	INACEPTABLE			MÍNIMAMENTE ACEPTABLE				ACEPTABLE			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1. CLARIDAD	Está formulado con lenguaje comprensible.											X
2. OBJETIVIDAD	Está adecuado a las leyes y principios científicos.									X		
3. ACTUALIDAD	Está adecuado a los objetivos y las necesidades reales de la investigación.											X
4. ORGANIZACIÓN	Existe una organización lógica.											X
5. SUFICIENCIA	Toma en cuenta los aspectos metodológicos esenciales											X
6. INTENCIONALIDAD	Está adecuado para valorar las variables de la Hipótesis.									X		
7. CONSISTENCIA	Se respalda en fundamentos técnicos y/o científicos.											X
8. COHERENCIA	Existe coherencia entre los problemas objetivos, hipótesis, variables e indicadores.											X
9. METODOLOGÍA	La estrategia responde a una metodología y diseño aplicados para lograr probar las hipótesis.											X
10. PERTINENCIA	El instrumento muestra la relación entre los componentes de la investigación y su adecuación al Método Científico.										X	

**XV. OPINIÓN DE APLICABILIDAD**

- El Instrumento cumple con los Requisitos para su aplicación
- El Instrumento no cumple con Los requisitos para su aplicación

SI
----

**XVI. PROMEDIO DE VALORACIÓN:**

9.7
-----

  
Firma del especialista

Luis A. Cabanillas Chirinos  
BIOLOGO - MICROBIOLOGO  
C.B.P. N° 8282

Trujillo, 26 de mayo del 2023



**VALIDACIÓN DE INSTRUMENTO N°2**

**XVII. DATOS GENERALES**

- 1.21. Apellidos y Nombres: Cabanillas Chirinos Luis Alberto
- 1.22. Cargo e institución donde labora: Instituto de Investigación UCV
- 1.23. Especialidad o línea de investigación: Calidad y Gestión de los Recursos Naturales
- 1.24. Nombre del instrumento: Ficha de investigación
- 1.25. Autores de Instrumento: Cuentas Terrones Cristhian Joseph- Manuyama Noriega Dino Mauro

**XVIII. ASPECTOS DE VALIDACIÓN**

CRITERIOS	INDICADORES	INACEPTABLE			MÍNIMAMENTE ACEPTABLE				ACEPTABLE		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. CLARIDAD	Está formulado con lenguaje comprensible.									X	
2. OBJETIVIDAD	Está adecuado a las leyes y principios científicos.									X	
3. ACTUALIDAD	Está adecuado a los objetivos y las necesidades reales de la investigación.									X	
4. ORGANIZACIÓN	Existe una organización lógica.										X
5. SUFICIENCIA	Toma en cuenta los aspectos metodológicos esenciales										X
6. INTENCIONALIDAD	Está adecuado para valorar las variables de la Hipótesis.									X	
7. CONSISTENCIA	Se respalda en fundamentos técnicos y/o científicos.									X	
8. COHERENCIA	Existe coherencia entre los problemas objetivos, hipótesis, variables e indicadores.									X	
9. METODOLOGÍA	La estrategia responde a una metodología y diseño aplicados para lograr probar las hipótesis.									X	
10. PERTINENCIA	El instrumento muestra la relación entre los componentes de la investigación y su adecuación al Método Científico.										X

**XIX. OPINIÓN DE APLICABILIDAD**

- El Instrumento cumple con los Requisitos para su aplicación
- El Instrumento no cumple con Los requisitos para su aplicación

SI

**XX. PROMEDIO DE VALORACIÓN:**

93
----

  
Firma del especialista

.....  
Luis A. Cabanillas Chirinos  
BIOLOGO - MICROBIOLOGO  
C.B.P. N° 8282

Trujillo, 26 de mayo del 2023



**VALIDACIÓN DE INSTRUMENTO N° 3**

**XXI. DATOS GENERALES**

- 1.26. Apellidos y Nombres: Cabanillas Chirinos Luis Alberto
- 1.27. Cargo e institución donde labora: Instituto de Investigación UCV
- 1.28. Especialidad o línea de investigación: Calidad y Gestión de los Recursos Naturales
- 1.29. Nombre del instrumento: Ficha de investigación
- 1.30. Autores de Instrumento: Cuentas Terrones Cristhian Joseph- Manuyama Noriega Dino

Mauro

**XXII. ASPECTOS DE VALIDACIÓN**

CRITERIOS	INDICADORES	INACEPTABLE			MÍNIMAMENTE ACEPTABLE				ACEPTABLE			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1. CLARIDAD	Está formulado con lenguaje comprensible.								X			
2. OBJETIVIDAD	Está adecuado a las leyes y principios científicos.									X		
3. ACTUALIDAD	Está adecuado a los objetivos y las necesidades reales de la investigación.									X		
4. ORGANIZACIÓN	Existe una organización lógica.										X	
5. SUFICIENCIA	Toma en cuenta los aspectos metodológicos esenciales									X		
6. INTENCIONALIDAD	Está adecuado para valorar las variables de la Hipótesis.									X		
7. CONSISTENCIA	Se respalda en fundamentos técnicos y/o científicos.									X		
8. COHERENCIA	Existe coherencia entre los problemas objetivos, hipótesis, variables e indicadores.									X		
9. METODOLOGÍA	La estrategia responde a una metodología y diseño aplicados para lograr probar las hipótesis.									X		
10. PERTINENCIA	El instrumento muestra la relación entre los componentes de la investigación y su adecuación al Método Científico.								X			

**XXIII. OPINIÓN DE APLICABILIDAD**

- El Instrumento cumple con los Requisitos para su aplicación
- El Instrumento no cumple con Los requisitos para su aplicación

SI

**XXIV. PROMEDIO DE VALORACIÓN:**

89
----



Firma del especialista

Luis A. Cabanillas Chirinos  
 BIÓLOGO - MICROBIÓLOGO  
 C.B.P. N° 8282

Trujillo, 26 de mayo del 2023



**UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO**

**FACULTAD DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA  
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL**

### **Declaratoria de Autenticidad del Asesor**

Yo, CRUZ MONZON JOSE ALFREDO, docente de la FACULTAD DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA de la escuela profesional de INGENIERÍA AMBIENTAL de la UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO SAC - TRUJILLO, asesor de Tesis titulada: "Influencia del pH y dosis de bacterias halófilas en la degradación de hidrocarburos en soluciones acuosas", cuyos autores son CUENTAS TERRONES CRISTHIAN JOSEPH, MANUYAMA NORIEGA DINO MAURO, constato que la investigación tiene un índice de similitud de 11.00%, verificable en el reporte de originalidad del programa Turnitin, el cual ha sido realizado sin filtros, ni exclusiones.

He revisado dicho reporte y concluyo que cada una de las coincidencias detectadas no constituyen plagio. A mi leal saber y entender la Tesis cumple con todas las normas para el uso de citas y referencias establecidas por la Universidad César Vallejo.

En tal sentido, asumo la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión tanto de los documentos como de información aportada, por lo cual me someto a lo dispuesto en las normas académicas vigentes de la Universidad César Vallejo.

TRUJILLO, 26 de Junio del 2023

<b>Apellidos y Nombres del Asesor:</b>	<b>Firma</b>
CRUZ MONZON JOSE ALFREDO <b>DNI:</b> 18887838 <b>ORCID:</b> 0000-0001-9146-7615	Firmado electrónicamente por: JACRUZM el 04-07- 2023 22:47:56

Código documento Trilce: TRI - 0552604