

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS



**“CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS HIDROCARBONOCLASTAS
AUTÓCTONOS DE SUELOS DE LA COSTA Y SELVA PERUANA PARA
FORMACIÓN DE BIOBARRERAS DE AGUAS SUBTERRÁNEAS”**

CARRERA: BIOLOGÍA

EJECUTORA:

EVA MILAGROS TRIVEÑO LEON

ASESOR:

BLGO. DIEGO A. SOTOMAYOR MELO

CO-ASESORA:

Ph. D. LISVETH FLORES DEL PINO

La Molina, 2021

INTRODUCCIÓN

En el Perú la industria petrolera generalmente utiliza métodos fisicoquímicos, que resultan contaminantes, como la incineración, para la remediación de derrames de petróleo, que cuando ocurren filtran hacia las aguas subterráneas o se asientan en el medio en el cuál fueron derramados causando la modificación de la ecología del medio, que trae consigo problemas sanitarios y ambientales debido a que estos contaminantes modifican la composición química de los suelos, que no son solo importantes como medio para obtención de alimentos sino que también actúan como un recurso que utiliza el ciclo hidrológico pues se encarga de filtrar y almacenar el agua de las lluvias permitiendo recargar acuíferos y eliminar los posibles contaminantes que el agua, que pasa por estos suelos, pueda contener.

Como parte de los procesos de derrame muchas fracciones de hidrocarburos quedan acumuladas en el suelo, y su acumulación fluctúa dependiendo de la profundidad donde hayan llegado a filtrar siendo necesario su retención antes de la llegada de los contaminantes hacia aguas subterráneas, por ello es importante el tratamiento oportuno, así como el más adecuado para cada tipo de suelo, siendo la biorremediación uno de los tipos de remediaciones más eficientes en materia de gastos y cuidado al medio ambiente. Cuando se habla de contaminación de aguas subterráneas la biorremediación se puede llevar a cabo mediante el uso de biobarreras, que son barreras biológicas in situ colocadas en un medio poroso como carbón activado, que ayuda a la mayor adsorción de contaminantes, permitiendo que la población bacteriana lleve a cabo la biodegradación de los compuestos contaminantes al fluir, con la gradiente hidráulica natural, a través de la biobarrera. Este método que combina procesos biológicos y fisicoquímicos, tiene la capacidad de contener y reducir el flujo de agua contaminada así como inmovilizar los compuestos contaminantes logrando que interactúen con el biofilm de la biobarrera y sean convertidos estos compuestos clorados, compuestos orgánicos, metales, pesticidas, etc. Es por ello la importancia de caracterizar a los microorganismos o consorcios que son capaces de llevar a cabo la degradación de los contaminantes, puesto que, ampliando la gama de microorganismos usados como degradadores, se hallan mejores tasas de degradación, mayor resistencia a la toxicidad de los compuestos, nuevas rutas metabólicas de degradación, etc.

En este estudio se busca caracterizar microorganismos degradadores de hidrocarburos autóctonos de suelos de la costa y selva peruana, lugares en donde se halla la mayor actividad extractiva de hidrocarburos, para que puedan ser usados posteriormente como parte de soluciones remediadoras de aguas y suelos usando tecnologías como las biobarreras para aguas subterráneas o bioestimulación para suelos.

En primer lugar, en este trabajo se llevará a cabo la biodegradación a través de la estimulación selectiva de suelos con hidrocarburos para obtener los microorganismos con el potencial para ser usados en biobarreras de remediación de aguas y suelos. Asimismo, la bioestimulación consiste en el control de los factores abióticos como textura, porcentaje C/N, humedad y aireación del suelo para lograr la proliferación y degradación eficaz por parte de los microorganismos autóctonos presentes en los distintos tipos de suelos a evaluar. En segundo lugar se hará una caracterización de los microorganismos hidrocarbonoclastas que existen en estos suelos, que como se mencionó serán bioestimulados para su proliferación y eficaz degradación de los crudos derramados queriéndose llegar a los ECAs establecidos según Decreto Supremo 002-2013-MINAM Estándar de Calidad Ambiental (ECA) para suelo. La cuantificación de hidrocarburos se medirá mediante hidrocarburos totales del petróleo por kilogramo de suelo seco y se aislarán consorcios de microorganismos hidrocarbonoclastas, para su posterior caracterización morfológica y molecular.

Tema de investigación

Caracterización de microorganismos hidrocarbonoclastas en suelos de la costa y selva peruana, por su potencial de uso en biobarreras para descontaminación de aguas y suelos afectados con hidrocarburos.

Marco Teórico

Hidrocarburos

Los hidrocarburos son compuestos formados por átomos de carbono tetravalentes y átomos de hidrógeno monovalentes que se encuentran en la naturaleza como petróleo, en estado líquido y como gas natural, en estado gaseoso, siendo las proporciones de hidrocarburos en estas sustancias alrededor del 50 al 90%. Así mismo los hidrocarburos se clasifican según los enlaces entre sus carbonos, siendo aquellos compuestos de enlaces simples denominados

hidrocarburos insaturados y aquellos que contienen enlaces dobles o triples hidrocarburos saturados. También entre estos dos grupos se clasifican según la cadena, siendo los saturados de cadena abierta llamados alifáticos parafínicos, como el metano, propano y butano, y los de cadena cerrada alicíclicos o nafténicos como el ciclopentano y el ciclohexano, a su vez los insaturados de cadena abierta son llamados alifáticos oleofínicos, como el propeno o acetilénicos, como el etino o acetileno, y los de cadena cerrada cicloolefínicos, como el ciclohexeno, cicloolefínicos, como el ciclohexadieno, y aromáticos, como el benceno y el naftaleno. En el petróleo crudo se encuentran concentraciones del 50 al 90 % de hidrocarburos parafínicos y nafténicos (ANIMAS & TORTOLERO, 2017).

Modelos de biodegradación de hidrocarburos

La biodegradación tiene como un paso importante la desorción del contaminante con el medio, para esto se llevan a cabo varios procesos entre ellos la emulsificación de los aceites contenidos en los hidrocarburos, esto es mediado por microorganismos oleofílicos, así como por procesos físicoquímicos, es así como el contaminante se hace más disponible para posteriormente pasar a ser descompuesto por medios aeróbicos, en donde se dan oxidaciones completas y se elimina CO₂ y agua con mucha energía, y por medios anaeróbicos donde se dan oxidaciones incompletas y se libera menor energía.

Para la degradación de compuestos lineales como alcanos entra en acción la monooxigenasa, enzima que transforma el alcano en un alcohol primario o secundario al oxidar el grupo metil correspondiente con una molécula de oxígeno, aunque también se puede seguir en la vía el uso de dioxigenasas para formar hidroxiperóxido en donde se incorporan ambas moléculas de oxígeno, luego las deshidrogenasas son las enzimas que logran transformar el compuesto a un ácido graso que podrá ingresar en la beta oxidación o puede ingresar al ciclo de Krebs.

Caracterización de microorganismos

Siendo el petróleo una fuente de contaminación ambiental, sus efectos no solo tienen repercusiones a nivel macro sino que afectan directamente a las poblaciones microbianas que son sometidas a una presión de selectividad por la toxicidad de los elementos del petróleo, la cual disminuye la diversidad y la población, haciendo que los sobrevivientes a esta situación de estrés desarrollen respuestas fisiológicas especializadas que permiten la utilización de estos compuestos como nutrientes y permitiendo su transformación o

degradación (Rivera-Cruz et al., 2002). Esto produce un cambio en la diversidad de las poblaciones y permite la selección de aquellas que de manera natural degradan el petróleo presente en aguas y suelos.

Hernández-Acosta, (2003) indica la presencia de aislamientos identificados como *Pseudomonas* sp., *Agrobacterium* sp., *Mucor* sp., *Aspergillus* sp. y *Trichoderma* sp., en suelos que han tenido actividad petrolera por años. Así también Pinto & Sánchez, (2018) indica que entre otros de los microorganismos capaces de biodegradar hidrocarburos se encuentran los del género *Bacillus* sp. y *Acinetobacter* sp. (*Acinetobacter junii*), mientras Ijah, ,(1998). Indica que levaduras como *Candida tropicalis* tienen alta actividad degradadora de hidrocarburos. Esto es solo una muestra de la gran diversidad de bacterias degradadoras de hidrocarburos presentes en suelos, y la importancia de que sean caracterizadas, radica en su potencial para ser usadas dentro de una metodología de degradación de hidrocarburos en la industria petrolera, ayudando a la recuperación de aguas subterráneas y suelos.

La caracterización de los microorganismos puede darse de varias formas, ya sea por métodos morfológicos, bioquímicos y moleculares. Siendo el método molecular aquel que ha podido clasificar en menor tiempo y con mayor precisión a los microorganismos.

El desarrollo de técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos como la secuenciación de Sanger y la secuenciación de nueva generación, ha permitido la identificación de genes microbianos específicos, que son comunes en un género. Para ello se debe hacer la extracción de los ácidos nucleicos del ADN del microorganismo seleccionado para lo cual se lisa la célula y se separan y purifican estos del resto de componentes como proteínas, lípidos, glúcidos. De ahí se utiliza una técnica de amplificación de un fragmento de ADN, en el caso de caracterización de un gen específico para el género y especie de la cual la secuencia que se obtenga será la etiqueta que caracterizará al microorganismo de otros. Posteriormente se da la secuenciación del fragmento ADN, en el cual se determinará un orden para las bases, según la secuencia del gen, para posteriormente usando programas como BLAST se haga el alineamiento y comparación de una secuencia nucleotídica con una base de datos de secuencias de especies microbianas conocidas o secuencia con funciones definidas.

Objetivos general y específicos

Caracterizar a los microorganismos degradadores de hidrocarburos autóctonos presentes en suelos, contaminados con hidrocarburos, arenosos de la costa del Perú y arcillosos de la selva de Perú.

Objetivos Específicos

- Conocer y cuantificar las tasas de biodegradación de diferentes crudos peruanos por microorganismos autóctonos.
- Determinar la actividad biológica del suelo mediante pruebas de determinación de CO₂.
- Evaluar la secuencia de la región V4 del gen 16S de los microorganismos autóctonos aislados en suelos de la costa y selva contaminados con hidrocarburos del petróleo crudo.

METODOLOGÍA OPERACIONAL

Muestreo de suelos

Se obtendrán un total de 4 muestras de 1 Kgr de suelo cada una, a partir de camas de compostaje con suelo bioestimulado, procedente de la costa peruana y de la selva peruana y contaminado con petróleo según diseño del experimento. A partir de estas muestras, se evaluará:

- Análisis físico-químico de cada uno de los suelos.
- Hidrocarburos totales.
- Actividad microbiana
- Microorganismos hidrocarbonoclastas por dilución en placa.

Análisis fisicoquímico

Para un correcto desarrollo de los microorganismos del suelo es importante hacer un análisis de parámetros como el pH, humedad, temperatura.

pH

Si se va a determinar el pH se colectará 1 gr de muestra de suelo en 10 ml de agua destilada, y se utilizará el potenciómetro para medir el valor de pH que deberá estar entre 6 y 8 unidades para que los microorganismos desarrollen adecuadamente.

Humedad

Para la medida de la humedad se usa el método gravimétrico, que determina la cantidad de agua en suelos y se calcula mediante la diferencia en peso de una muestra húmeda y una muestra seca.

Para hallar el porcentaje de humedad en suelo se tomará una muestra de 1gr de suelo y se hará el respectivo pesado, de ahí se llevará a estufa a 80°C por 24 horas, una vez secado el suelo se comprueba que su peso sea constante y se apunta el peso final, luego se calcula el porcentaje de humedad siguiendo la fórmula:

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

Temperatura

La temperatura se determinó utilizando un termómetro digital en el suelo contenido en cada pila de biorremediación.

Conductividad eléctrica

Mediante la conductividad eléctrica se determina la capacidad de transportar corriente eléctrica y tiene relación con los iones y su concentración, mediante la conductividad eléctrica se puede medir la salinidad de manera indirecta.

Para la medida de la conductividad eléctrica se necesita obtener un extracto de suelo, para el cual se pesará de 40 a 600 gramos de suelo, dependiendo del suelo y necesitándose más para suelos arenosos, se saturará de agua el suelo obteniéndose una pasta de suelo la cual posteriormente será filtrada al vacío obteniéndose un extracto, con el cual se procederá a medir con el conductímetro.

Análisis de hidrocarburos (HTPs)

Para el análisis de hidrocarburos totales de petróleo se realizará la toma de muestra de 500 gr de suelo de los tratamientos contaminados con petróleo crudo. La extracción y análisis

mediante cromatografía de gases se hará como indica Fernández Linares et al., (2006) , o se llevará a cabo en un laboratorio externo, obteniendo los resultados en mgr por kilogramo de suelo seco.

Cuantificación de la actividad microbiana mediante la producción de CO₂.

Para la determinación de la respiración de suelo como medida de la actividad microbiana se seguirá con el procedimiento descrito por Celis et al., (2009). Para el proceso de incubación se utilizará muestras de 20 g de suelo que se colocarán dentro de frascos de vidrio de 1 L de capacidad los tratamientos de bioestimulación, el control y las réplicas. En cada uno de ellos se ubicará un biker con 15 mL de solución 0.2 N de NaOH para absorber el CO₂ desprendido por los microorganismos, y otro con agua destilada para mantener la atmósfera húmeda. Cada frasco se sellará herméticamente con parafilm y se incubarán durante 7 días. Se realizarán las mediciones de la cantidad de NaOH remanente (no neutralizado) a través del tiempo de incubación, mediante titulación con 0,2 N de HCl. Para la titulación de la solución se utilizarán 1 BaCl₂ para precipitar el C inorgánico como BaCO₃ insoluble. Se adicionarán gotas de fenolftaleína como indicador de ácido base y se titulará el NaOH no neutralizado directamente con HCl. La cantidad de CO₂ desprendido desde las mezclas incubadas fue calculada mediante la fórmula:

$$\text{HCl ml (Blanco - Muestra)} \times 4,4 = \text{mg CO}_2 / 7 \text{ días} / \text{g de suelo peso del suelo}$$

Aislamiento de bacterias degradadoras de hidrocarburos

Se obtendrán 5 muestras de aproximadamente 50 gr de suelo del tratamiento con mayor tasa de biodegradación de hidrocarburos del crudo de petróleo en suelos de la costa peruana y Selva Peruana, estas serán transportadas al laboratorio en bolsas de polietileno de primer uso debidamente etiquetadas en el menor tiempo posible para su procesamiento inmediato. Luego se realizará la homogeneización de la muestra y se procederá a realizar las diluciones sucesivas de la siguiente manera: se toma 10 g de la homogenización del suelo (como muestra representativa) y se llevan a 90 ml de agua peptona (AP) se agita (dilución 10⁻¹), después se toma 1 ml de la dilución 10⁻¹ y se lleva a 9 ml de AP se agita (dilución 10⁻²), por último se toma 1 ml de la dilución 10⁻² y se lleva a 9 ml de AP se agita (dilución 10⁻³); después, de cada dilución (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, hasta la dilución 10⁻¹⁰) se toma 0,1 ml y se siembra por triplicado cada dilución en cada medio mineral adicionado con solución mineral,

con petróleo como única fuente de carbono y pH 7, dejando por medio de cultivo un blanco negativo.

Identificación taxonómica

Para la caracterización se hará un análisis macroscópico y microscópico de los aislamientos, para ello será observado luego de 24 horas de incubación en el caso de bacterias y 168 horas en el caso de hongos. Se tomará apuntes de la forma de las colonias, elevación, margen, color.

Mediante la tinción Gram se revelará la forma y agrupación bacteriana. Para lo cual se tomarán láminas portaobjetos donde en agua destilada se colora el asa de Khole con el microorganismo aislado, se fijará la muestra al mechero en un corto tiempo. Seguidamente se adicionará 2 gotas de cristal violeta que se fijará con lugol y se procederá a la decoloración con alcohol, luego se hará la diferenciación con safranina, se espera y se hace el lavado. Así mismo se hará la caracterización morfológica de los hongos aislados mediante microscopía se sembrará las colonias en cámara húmeda durante cinco días, y se tiñen las estructuras fúngicas con azul de metileno.

Para la identificación molecular se deberá contar con cultivos axénicos, la verificación de que se trata de un cultivo puro se llevará a cabo mediante microscopía, a partir de aislamientos de bacterias o levaduras y en el caso de hongos aislamientos de esporas de la punta de una hifa. A partir de ese material se llevará a cabo la extracción de ADN de cada microorganismo para su identificación siguiendo el protocolo propuesto por Ausubel Frederick (2002), posteriormente se realizará la amplificación del gen RNAr16S para bacterias mediante la técnica de PCR, usando los primers comerciales 515F – 806R que se dirigen a la región V4 del rRNA 16S, con tamaño de banda esperado de 300–350 bp, usando el kit Phusion high fidelity PCR kit de thermo scientific. Una vez comprobado los tubos fueron etiquetados y enviados para su secuenciación, en donde serán secuenciados y corridos en un secuenciador.

Posteriormente se obtendrán las secuencias que serán procesadas para su alineamiento en la base de datos NCBI usando el algoritmo BLAST.

Presupuesto:

Descripción	Unidad	Cantidad	Precio Unitario	Precio parcial
I. Bienes:				
Reactivos:				
ADN Puriprep B-kit para bacterias x 50u. A partir de bacterias Gram positivas y Gram negativas	Global	1	1000	1000
TAS Master Mix 2X 100 reacciones, 1,5 ml (Sin Colorante/ Con MgCl2). Master Mix para PCR Punto Final	Global	1	200	200
Material muestreo	Global			
Materiales de laboratorio	Global			
Equipos de laboratorio	Global			
II. Servicios:				
-Transporte de muestra	Global	4	40	80
- Análisis de muestra de suelo (incluye materiales)	Global	12	380	4560
III. Imprevistos		10% del monto acumulado =		580
Total				S/. 6420

Cronograma:

Actividades/Meses	Mes 1		Mes 2		Mes 3		Mes 4		Mes 5		Mes 6		Mes 7		Mes 8		Mes 9		Mes 10		Mes 11		Mes 12					
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1. Antecedentes y revisión bibliográfica																												
2. Planificación de muestreo de suelos	X																											
3. Análisis fisicoquímico de suelos		X																										
4. Acondicionamiento del terreno			X																									
5. Preparación de las muestras de suelos contaminados con crudos			X																									
5.1 primera toma de muestra y envío para su análisis de HTP				X																								
5.2 Segunda toma de muestra y envío para su análisis de HTP							X																					
5.3 Medición de la actividad microbiana en suelos							X																					
5.4 Tercera toma de muestra y envío para su análisis de HTP								X																				
5.5 Medición de la actividad microbiana en suelos										X																		
6. Cultivo																												
6.1. Siembra y aislamiento de microorganismos.							X			X																		
6.2. Caracterización morfológica											X	X																
6.3. Caracterización molecular												X	X	X	X	X	X	X	X	X								
7. Procesamiento de datos																												
8. Análisis de datos																		X	X	X								
9. Redacción de tesis																												
9.1. Redacción y conclusiones																												
9.2. Revisión por el asesor																										X	X	X
9.4. Revisión por los miembros del jurado																												
																										X	X	X

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

Acosta, C. (2007). El suelo agrícola, un ser vivo. In *Inventio, la génesis de la cultura universitaria en Morelos* (Vol. 0, Issue 5, pp. 55–60).

ANIMAS, Y., & TORTOLERO, L. (2017). *Fundamentos de Química Orgánica y Aplicaciones en Ciencias de la Tierra*.

[http://www.ptolomeo.unam.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/132.248.52.100/13731/Fundamentos de química orgánica y aplicaciones en ciencias de la tierra.pdf?sequence=3](http://www.ptolomeo.unam.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/132.248.52.100/13731/Fundamentos%20de%20química%20orgánica%20y%20aplicaciones%20en%20ciencias%20de%20la%20tierra.pdf?sequence=3)

Arrieta Ramirez, M. O., Patricia, A., Rivera, R., Marin, L. A., Rojano, B. A., & Ruiz, O. (2012). Biorremediación De Un Suelo Con Diesel Mediante El Uso De Microorganismos Autóctonos. *Gestión y Ambiente*, 15(1), 27–40.

Benavides López de Mesa, J., Quintero, G., Guevara Vizcaíno, A. L., Jaimes Cáceres, D. C., Gutiérrez Riaño, S. M., & Miranda García, J. (2006). Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova*, 4(5), 82.

<https://doi.org/10.22490/24629448.351>

Boulter, J. I., Trevors, J. T., & Boland, G. J. (2002). Microbial studies of compost: Bacterial identification, and their potential for turfgrass pathogen suppression. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(7), 661–671.

<https://doi.org/10.1023/A:1016827929432>

Castro F, G. F. (2020). Conformación de colecciones de cultivos microbiano. *Boletín INIA - Instituto de Investigaciones Agropecuarias*. No. 428., 428, 155–182.

Cedron, M., & Lecaros, M. (2018). *Aislamiento y evaluación de microorganismos nativos como biorremediadores de suelos contaminados con chlorpyrifos en la Universidad Nacional Agraria la Molina*.

<http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/3977/cedron-maria-pia-y-lecaros-maria.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Fernández Linares, L. C., Rojas Avelizapa, N. G., Roldán Carrillo, T. G., Ramírez Islas, M. E., Zegarra Martínez, H. G., Uribe Hernández, R., Reytez Ávila, R. J., Flores Hernández, D., & Arce Ortega, J. M. (2006). Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la

remediación. In *Biblioteca Digital (CIGA) de la SEMARNAT*.

<https://es.scribd.com/doc/121876082/Manual-de-Analisis-de-Suelos>

Ferrera, R., & Alarcón, A. (2001). The Microbial Activity in the Agroecosystem. *Ciencia Ergo Sum*, 8(2), 175–183. <https://www.redalyc.org/pdf/104/10402108.pdf>

García, C. (2015). *Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos aromáticos policíclicos mediante aplicación de sustrato post - cultivo de champiñón (Agaricus bisporus)*.

https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/674757/garcia_delgado_carlos.pdf?sequence=1

Hernández-Acosta, E. (2003). Bacterias y hongos hidrocarbonoclastas de rizósfera frijol y maíz, en un suelo contaminado con petróleo. *Terra Latinoamericana*, 21(4), 493–502.

Orjuela, H. B. (2016). El suelo y su relación con los servicios ecosistémicos y la seguridad alimentaria. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 33(2), 117–124.

Orozco Corral, A. L., Valverde Flores, M. I., Téllez, R. M., Bustillos, C. C., & Hernández, R. B. (2016). Physical, chemical and biological soil properties with biofertilization in apple orchards. *Terra Latinoamericana*, 34(4), 441–456.

Pereira, C., Maycotte, C., Restrepo, B., Mauro, F., Montes, A., & Velarde, M. J. (2011). Edafología. In *Edafologia 1*.

<https://www.uaeh.edu.mx/investigacion/productos/4776/edafologia.pdf>

Pinto, D., & Sánchez, V. (2018). Biorremediación de Suelos Contaminados por Hidrocarburos Mediante la Utilización de Diferentes Cepas Bacterianas a Escala de Laboratorio. In *Universidad Libre de Colombia*.

[https://repository.unilibre.edu.co/bitstream/handle/10901/15451/Proyecto de investigación Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos mediante la ut.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repository.unilibre.edu.co/bitstream/handle/10901/15451/Proyecto%20de%20investigaci%C3%B3n%20Biorremediaci%C3%B3n%20de%20suelos%20contaminados%20por%20hidrocarburos%20mediante%20la%20utilizaci%C3%B3n%20de%20diferentes%20cepas%20bacterianas%20a%20escala%20de%20laboratorio.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Rivera-Cruz, M. del C., Ferrera- Cerrato, R., Volke Haller, V., Rodríguez Vazqu ez, R., & Fern andez Linares, L. (2002). Adaptación y selección de microorganismos autóctonos en

medios de cultivos enriquecidos con petróleo crudo. *Terra Latinoamericana*, 20(4), 423–434.

Rynk, R. (1992). On-Farm Composting Handbook. In *Monographs of the Society for Research in Child Development*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22983772>

Vasquez, E. M. (2016). Producción de inóculo de *Pleurotus ostreatus* para uso en biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo. In *Universidad Nacional Agraria La Molina* (Vol. 15).

http://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/UCV/8935/bardales_ej.pdf?sequence=1&isAllowed=y%0Ahttp://repositorio.unasam.edu.pe/handle/UNASAM/1774

Walton, B. T., Guthrie, E. A., & Hoylman, A. M. (1994). *Toxicant Degradation in the Rhizosphere*. 11–26. <https://doi.org/10.1021/bk-1994-0563.ch002>