

**Universidad Nacional de Ingeniería**

**Facultad de Ingeniería Ambiental**



TESIS

**Biorremediación de metales mediante *Bacillus* sp y  
*Pseudomonas* sp aislados de suelos impactados en Yauli – Junín**

Para obtener el título profesional de Ingeniero Ambiental.

Elaborado por

Javier Edison Ignacio Vilcapoma

 [0009-0001-2467-4849](https://orcid.org/0009-0001-2467-4849)

Asesora

Dra. Nelida Marín Huachaca

 [0000-0003-1328-3196](https://orcid.org/0000-0003-1328-3196)

LIMA – PERÚ

2024

---

Citar/How to cite	Ignacio Vilcapoma [1]
Referencia/Reference	[1] J. Ignacio Vilcapoma, " <i>Biorremediación de metales mediante Bacillus sp y Pseudomonas sp en suelos impactados en Yauli – Junín</i> " [Tesis de pregrado]. Lima (Perú): Universidad Nacional de Ingeniería, 2024.
Estilo/Style: IEEE (2020)	

---

---

Citar/How to cite	(Ignacio, 2022)
Referencia/Reference	Ignacio, J. (2022). <i>Biorremediación de metales mediante Bacillus sp y Pseudomonas sp en suelos impactados en Yauli – Junín</i> . [Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Ingeniería]. Repositorio institucional Cybertesis UNI.
Estilo/Style: APA (7ma ed.)	

---

## ***Dedicatoria***

*A Dios por permitirme lograr las metas planteadas profesionalmente.*

*A mis padres, abuelitos, hermanos, sobrinos y mi novia Vanessa que siempre me han dado su apoyo incondicional y por estar siempre presente en cada logro personal y profesional que he obtenido.*

*A mis abuelitos Domingo y Fortunata que desde el cielo guían mi camino.*

*A mis amistades de la FIA, a mis amigos que fui conociendo en mi desarrollo profesional, en especial a mi amigo Jorge Collado que desde el cielo guía mi camino y agradecerle por todos los consejos que me brindó.*

## **Agradecimientos**

A mis padres por brindarme su apoyo para desarrollar la presente investigación, a Vanessa por ser mi impulso y por apoyarme siempre.

A mi asesora Dra. Nélide Marín por la asesoría brindada para desarrollar la presente investigación.

A Juan Carlos Ramos por ser un apoyo en el desarrollo de la investigación dando las facilidades para el acceso al laboratorio de la Universidad Ricardo Palma.

A todas las empresas que me permitieron desarrollarme profesionalmente donde fui adquiriendo experiencia laboral y a todas mis amistades que hice en todo mi desarrollo profesional.

## Resumen

Con la aplicación de técnicas biológicas de remediación, la investigación fue realizada con la finalidad de evaluar la capacidad de biorremediación de metales aplicando herramientas biotecnológicas como el empleo de bacterias como *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp., aisladas de suelos impactados en Yauli – Junín. Se realizó el análisis fisicoquímico de las muestras de suelo en un laboratorio acreditado, además, utilizando medios de cultivos diferenciales se aislaron las bacterias de *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. Estas cepas fueron cultivadas y la biomasa bacteriana obtenida fue utilizada para el tratamiento de las muestras de suelo. Dicho tratamiento se desarrolló durante 30 días en dos períodos de aplicación de microorganismo, es decir, cada 15 días. Posterior al tratamiento se realizó el análisis fisicoquímico del suelo tratado para evaluar la capacidad de biorremediación de metales mediante *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. En la investigación se realizaron tres tipos de tratamiento uno solamente considerando cepas de *Bacillus* sp., el segundo considerando solamente cepas de *Pseudomonas* sp. y el tercero utilizando la combinación de cepas de *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp.

Se obtuvieron 12 cepas de *Bacillus* sp y *Pseudomonas* sp, y las especies identificadas mediante pruebas bioquímicas son *B. Subtilis*, *B. Megaterium*, *B. Fastidiosus*, *B. Cereus* y *P. Aeruginosa*.

Los tratamientos con *Bacillus* sp. fueron eficientes para la biorremediación de los metales cadmio, cobre y zinc; las eficiencias de remediación fueron desde 12% a 21% de cadmio, de 8% a 19% de cobre y de 9% a 23% de zinc.

Los tratamientos con *Pseudomonas* sp. fueron eficientes para la biorremediación de metales plata, cadmio y zinc; las eficiencias de remediación fueron desde 5% a 15% de plata, de 2% a 17% de cadmio y de 11% a 21% de zinc.

Los tratamientos con *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp., fueron eficientes para la biorremediación de los metales plata, arsénico, cadmio y zinc; las eficiencias de

remediación fueron desde 5% a 15% de plata, de 7% a 13% de arsénico, de 5% a 18% de cadmio y de 9% a 20% de zinc

En conclusión, las bacterias de *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. mostraron capacidad de biorremediación de metales en suelo.

**Palabras claves:** Metales, biorremediación, *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp.

## Abstract

The present research work was developed with the purpose to evaluate the bioremediation capacity of metals by means of *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. isolated from impacted soils in Yauli – Junín. Soil samples were taken for the respective analysis of physicochemical parameters in an accredited laboratory, in addition, using differential culture media, the bacterial strains *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. were isolated. These strains were cultivated and the bacterial biomass obtained was used for the treatment of soil samples. Treatments were developed for 30 days in two periods of microorganism application, that is, every 15 days. After the treatment physicochemical analysis were carried out and the bioremediation capacity of metals by *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. was evaluated. The experimental treatment process in the investigation consisted of three types of treatment, one considering only strains of *Bacillus* sp., the second considering only strains of *Pseudomonas* sp. and in the third treatment, both *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. were used.

Strains 12 of *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. were obtained, and the species identified by biochemical tests are *B. Subtilis*, *B. Megaterium*, *B. Fastidiosus*, *B. Cereus* and *P. Aeruginosa*.

*Bacillus* sp. treatments were efficient for the bioremediation of the following metals cadmium, copper and zinc. Remediation efficiencies were from 12% to 21% for cadmium, 8% to 19% for copper, and 9% to 23% for zinc.

*Pseudomonas* sp. treatments were efficient for the bioremediation of the following metals silver, cadmium and zinc. Remediation efficiencies were from 5% to 15% for silver, 2% to 17% for cadmium and 11% to 21% for zinc.

Treatments using both *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp., were efficient for the bioremediation of silver, arsenic, cadmium and zinc. Remediation efficiencies ranged from

5% to 15% for silver, 7% to 13% for arsenic, 5% to 18% for cadmium, and 9% to 20% for zinc.

In conclusion, the *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. showed capacity for bioremediation of metals in soil.

Keywords: Metals, bioremediation, *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp.

## Introducción

El Perú es un país minero ancestralmente, actualmente ocupa el segundo lugar en producción de cobre en Latinoamérica y el mundo, el tercero en producción de plata en el mundo y el segundo en Latinoamérica, el segundo en productor de zinc en el mundo y el primero en Latinoamérica, la cuarta posición en producción de plomo en el mundo y el primero en Latinoamérica (Servicios Geológico de Estados Unidos [USGS], 2022).

En el Perú la minería se desarrolla por más de 100 años particularmente en la zona central del Perú, el desarrollo de la minería fue dejando diferentes pasivos ambientales y que actualmente vienen ocasionando contaminación de los diferentes componentes ambientales (suelo, aire y agua).

El túnel Kingsmill fue construido entre 1929 y 1934 por la empresa Cerro de Pasco Corporation, para drenar las aguas de las labores mineras subterráneas; posteriormente pasando a ser administrado por el estado peruano mediante la denominación de CENTROMIN PERÚ S.A., teniendo a la Mina Morococha bajo su administración. El túnel Kingsmill tiene 11 km de longitud hasta su descarga en el río Yauli. A través de este túnel se descargaba efluentes mineros sin tratamiento a razón de 1100 litros por segundo aproximadamente.

En el 2008 se inició la construcción de la planta de tratamiento de aguas acidas del túnel Kingsmill como parte de un compromiso social de la empresa minera Chinalco, la cual tiene como finalidad captar y tratar las aguas del túnel Kingsmill, el 2010 inicio el funcionamiento de la planta de tratamiento, logrando un tratamiento que cumple el D.S. 010-2010-MINAM en su vertimiento autorizado.

Durante todos los años de vertido de efluentes mineros sin tratamiento se generó diversos pasivos ambientales mineros en el distrito de Yauli, región Junín.

El Ministerio de Energía y Minas actualiza anualmente el inventario de pasivos ambientales mineros, mediante la Resolución Ministerial N° 335 - 2022 - MINEM/DM, siendo que para la región Junín se determinaron 607 pasivos ambientales mineros lo cual es menor al recuento del 2020 en el cual se contaba con 669 pasivos ambientales. De acuerdo a la información actualizada la provincia de Yauli cuenta con 200 pasivos ambientales y el distrito de Yauli cuenta con 13 pasivos ambientales dentro del inventario se pueden identificar a los generadores de los 13 pasivos ambientales mineros, tales como la ex – Unidad Minera (EUM) San Cristóbal, EUM Condenados, EUM Dos Naciones y EUM Arapa X, dentro de los cuales están los residuos mineros y el desmonte de mina.

Actualmente la región Junín cuenta con 33 unidades mineras en producción según el Ministerio de Energía y Minas (Minem, 2022), en la cual 11 unidades mineras se ubican en la provincia de Yauli, y solo 2 vienen desarrollándose en el distrito de Yauli que vienen a ser Unidad Minera San Cristóbal cuyo titular es Volcán Compañía Minera S.A.A., y Unidad Tunshuruco cuyo titular es Minera Chinalco Perú S.A, ambos son productores de Cu, Pb, Zn y Ag.

Las técnicas de remediación de suelo varían según su tipo de tratamiento como vienen a ser los tratamientos biológicos, tratamientos térmicos y tratamientos físico-químicos (Fundación Chile, 2015).

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<i>Dedicatoria</i> .....	ii
Agradecimientos .....	iii
Resumen .....	iv
Abstract .....	vi
Introducción .....	viii
Capítulo I. Parte introductoria del trabajo .....	1
1.1. Descripción del problema de investigación .....	1
1.2. Descripción del problema de investigación .....	1
1.3. Objetivos del estudio .....	2
1.3.1. <i>Objetivo general</i> .....	2
1.3.2. <i>Objetivos específicos</i> .....	2
1.4. Hipótesis .....	2
1.4.1. <i>Hipótesis general</i> .....	2
1.5. Justificación .....	2
1.5.1. <i>Justificación legal</i> .....	2
1.5.2. <i>Justificación ambiental</i> .....	3
1.5.3. <i>Justificación social</i> .....	3
1.6. Antecedentes .....	3
1.6.1. <i>A nivel nacional</i> .....	3
1.6.2. <i>A nivel internacional</i> .....	6
Capítulo II. Marco Teórico .....	9
2.1. Suelo .....	9
2.2. Calidad del suelo .....	10
2.3. Área de potencial interés .....	12
2.4. Sitio contaminado .....	12
2.5. Contaminante .....	12
2.6. Impacto .....	12
2.7. Fuentes antropogénicas de contaminación .....	12
2.8. Actividades industriales mineras .....	13
2.9. Principales contaminantes en el suelo .....	14
2.10. Metales pesados .....	15
2.11. Metales en el suelo .....	17
2.12. Diversidad microbiana en el suelo .....	17
2.13. Género <i>Bacillus</i> sp. ....	18
2.14. Género <i>Pseudomonas</i> sp. ....	20

2.15. Movilidad y biodisponibilidad de metales en el suelo .....	20
2.16. Parámetros del suelo y movilidad de metales.....	21
2.17. Medios de cultivo.....	21
2.18. Microorganismos resistentes y tolerantes a metales pesados .....	23
2.19. Tecnologías de remediación.....	24
2.20. Tratamiento biológico .....	24
2.21. Biotransformación de metales .....	25
2.22 Estándar de Calidad Ambiental (ECA).....	26
2.23. Normativa nacional e internacional para calidad de suelo .....	26
Capítulo III. Desarrollo del trabajo de investigación .....	29
3.1. Ubicación geográfica del área de estudio .....	29
3.2. Toma de muestras de suelo .....	29
3.3. Lugar de ejecución .....	30
3.4. Tipo de investigación.....	30
3.5. Variables .....	31
3.5.1. <i>Variable dependiente</i> : Capacidad de biorremediación de metales pesados... 31	
3.5.2. <i>Variable independiente</i> : Presencia de <i>Bacillus sp.</i> y <i>Pseudomonas sp.</i> ..... 31	
3.5.3. <i>Variables ambientales</i> : Humedad, Conductividad eléctrica, Temperatura y pH. ..... 31	
3.6. Muestreo .....	31
3.7. Método de presencia/ausencia de bacterias en el suelo .....	31
3.8. Preparación de medios de cultivo .....	32
3.9. Preparación de diluciones.....	32
3.10. Siembra de muestras.....	33
3.11. Aislamiento de microorganismos .....	34
3.12. Siembra de <i>Bacillus sp.</i> y <i>Pseudomonas sp.</i> de las colonias de cepas..... 35	
3.13. Observación macroscópica de <i>Bacillus sp.</i> y <i>Pseudomonas sp.</i> .....	36
3.14. Observación microscópica de <i>Bacillus sp.</i> y <i>Pseudomonas sp.</i> .....	36
3.15. Pruebas bioquímicas para <i>Bacillus sp.</i> .....	37
3.15.1. Hidrólisis de almidón en placa.....	37
3.15.2. Prueba de lecitinasa .....	37
3.15.3. Hidrólisis de gelatina.....	38
3.15.4. Prueba del citrato .....	39
3.15.5. Crecimiento a diferente concentración de NaCl.....	39
3.15.6. Crecimiento de cepas a diferentes pH.....	40
3.16. Pruebas bioquímicas para <i>Pseudomonas sp.</i> .....	40
3.16.1. Prueba de oxidasa .....	40
3.17. Diseño experimental de tratamiento .....	41

3.18. Realización de tratamientos .....	42
3.19. Obtención de biomasa bacteriana .....	44
3.20. Cálculo del Factor de contaminación .....	44
3.21. Determinación de riesgo ecológico.....	45
Capítulo IV. Análisis y discusión de resultados .....	47
4.1. Caracterización fisicoquímica del suelo .....	47
4.2. Determinación del Factor de contaminación.....	48
4.3. Rangos del riesgo ecológico potencial .....	50
4.4. Interpretación de los resultados.....	51
4.5. Tratamiento con <i>Bacillus</i> sp.....	64
4.6. Tratamiento con <i>Pseudomonas</i> sp. ....	71
4.7. Tratamiento con <i>Bacillus</i> sp. y <i>Pseudomonas</i> sp.....	78
4.7. Características macroscópicas y microscópicas de las cepas.....	86
4.8. Recuento de <i>Bacillus</i> sp. y <i>Pseudomonas</i> sp. ....	88
4.9. Resultados de pruebas bioquímicas <i>Bacillus</i> sp.....	89
4.10. Resultados de pruebas bioquímicas <i>Pseudomonas</i> sp.....	90
4.11 Discusión de resultados .....	91
Capítulo V. Conclusiones.....	95
Capítulo VI. Recomendaciones.....	96
Capítulo VII. Referencias bibliográficas .....	97

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> .....	23
Especies de Bacillus y Pseudomonas utilizados para la biorremediación. ....	23
<b>Tabla 2</b> .....	27
Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para suelo. ....	27
<b>Tabla 3</b> .....	27
Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para suelo. ....	27
<b>Tabla 4</b> .....	28
Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para suelo .....	28
<b>Tabla 5</b> .....	29
Coordenadas Geográficas del Área de Estudio .....	29
<b>Tabla 6</b> .....	30
Número mínimo de puntos de muestreo para el Muestreo de Identificación. ....	30
<b>Tabla 7</b> .....	31
Coordenadas Geográficas de Los Puntos de Muestreo .....	31
<b>Tabla 8</b> .....	41
Bacillus sp. y Pseudomonas sp. utilizados en la biorremediación. ....	41
<b>Tabla 9</b> .....	45
Clasificación de niveles de contaminación de suelos de acuerdo al cálculo del Cfi. ....	45
<b>Tabla 10</b> .....	46
Niveles de riesgo ecológico. ....	46
<b>Tabla 11</b> .....	47
Características fisicoquímicas de las muestras de suelo de nuestra área de estudio.....	47
<b>Tabla 12</b> .....	49
Grado de Factor de contaminación .....	49
<b>Tabla 13</b> .....	50
Niveles de contaminación del suelo por metales.....	50
<b>Tabla 14</b> .....	51
Determinación del riesgo ecológico potencial. ....	51
<b>Tabla 15</b> .....	86
Características macroscópicas y microscópicas de las colonias .....	86
<b>Tabla 16</b> .....	88
Recuento de Bacillus sp. y Pseudomonas sp. ....	88
<b>Tabla 17</b> .....	89
Resultados de pruebas bioquímicas Bacillus sp. ....	89
<b>Tabla 18</b> .....	90

Resultados de especies pruebas bioquímicas Bacillus sp y Pseudomonas sp. ....	90
---	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.....	11
<i>Principales componentes de la calidad del suelo. ....</i>	11
Figura 2.....	13
<i>Rutas potenciales interrelacionadas para la contaminación química subsuperficial. ....</i>	13
Figura 3.....	15
<i>Categorización sistemática de los principales contaminantes en el suelo. ....</i>	15
Figura 4.....	22
<i>Tipos de medios de cultivo. ....</i>	22
Figura 5.....	26
<i>Esquema de operación de los microorganismos. ....</i>	26
Figura 6.....	52
<i>Niveles de pH en las muestras de suelo.....</i>	52
Figura 7.....	52
<i>Conductividad en las muestras de suelo. ....</i>	52
Figura 8.....	53
<i>Humedad de las muestras de suelo.....</i>	53
Figura 9.....	54
<i>Concentración de Plata en las muestras de suelo. ....</i>	54
Figura 10.....	54
<i>Concentración de Arsénico en las muestras de suelo.....</i>	54
Figura 11.....	55
<i>Concentración de Bario en las muestras de suelo. ....</i>	55
Figura 12.....	56
<i>Concentración de Berilio en las muestras de suelo. ....</i>	56
Figura 13.....	56
<i>Concentración de Cadmio en las muestras de suelo. ....</i>	56
Figura 14.....	57
<i>Concentración de Cobalto en las muestras de suelo. ....</i>	57
Figura 15.....	58
<i>Concentración de Cromo en las muestras de suelo.....</i>	58
Figura 16.....	58

<i>Concentración de Cobre en las muestras de suelo.</i> .....	58
Figura 17.....	59
<i>Concentración de Molibdeno en las muestras de suelo.</i> .....	59
Figura 18.....	60
<i>Concentración de Níquel en las muestras de suelo.</i> .....	60
Figura 19.....	60
<i>Concentración de Plomo en las muestras de suelo.</i> .....	60
Figura 20.....	61
<i>Concentración de Antimonio en las muestras de suelo.</i> .....	61
Figura 21.....	62
<i>Concentración de Selenio en las muestras de suelo.</i> .....	62
Figura 22.....	62
<i>Concentración de Talio en las muestras de suelo.</i> .....	62
Figura 23.....	63
<i>Concentración de Vanadio en las muestras de suelo.</i> .....	63
Figura 24.....	64
<i>Concentración de Zinc en las muestras de suelo.</i> .....	64
Figura 25.....	65
<i>Niveles de pH en las muestras de suelo.</i> .....	65
Figura 26.....	66
<i>Concentración de Ag en las muestras de suelo.</i> .....	66
Figura 27.....	67
<i>Concentración de As en las muestras de suelo.</i> .....	67
Figura 28.....	68
<i>Concentración de Cd en las muestras de suelo.</i> .....	68
Figura 29.....	69
<i>Concentración de Cu en las muestras de suelo.</i> .....	69
Figura 30.....	70
<i>Concentración de Pb en las muestras de suelo.</i> .....	70
Figura 31.....	71
<i>Concentración de Zn en las muestras de suelo.</i> .....	71
Figura 32.....	72
<i>Niveles de pH en las muestras de suelo.</i> .....	72
Figura 33 .....	73
<i>Concentración de Ag en las muestras de suelo.</i> .....	73
Figura 34.....	74

<i>Concentración de As en las muestras de suelo.....</i>	74
Figura 35.....	75
<i>Concentración de Cd en las muestras de suelo. ....</i>	75
Figura 36.....	76
<i>Concentración de Cu en las muestras de suelo. ....</i>	76
Figura 37 .....	77
<i>Concentración de Pb en las muestras de suelo. ....</i>	77
Figura 38.....	78
<i>Concentración de Zn en las muestras de suelo. ....</i>	78
Figura 39.....	79
<i>Niveles de pH en las muestras de suelo.....</i>	79
Figura 40.....	80
<i>Concentración de Ag en las muestras de suelo. ....</i>	80
Figura 41.....	81
<i>Concentración de As en las muestras de suelo.....</i>	81
Figura 42.....	82
<i>Concentración de Cd en las muestras de suelo. ....</i>	82
Figura 43.....	83
<i>Concentración de Cu en las muestras de suelo. ....</i>	83
Figura 44.....	84
<i>Concentración de Pb en las muestras de suelo. ....</i>	84
Figura 45.....	85
<i>Concentración de Zn en las muestras de suelo. ....</i>	85

## **Capítulo I. Parte introductoria del trabajo**

### **1.1. Descripción del problema de investigación**

Actualmente las empresas globales están creando grandes proyectos de exploración en Perú, continuando un legado que se remonta desde la antigüedad. A partir del siglo XX, las operaciones mineras se expandieron por la región central del país, particularmente en las zonas de Yauli, Ticlio, Morococha y La Oroya. Las labores mineras subterráneas en el distrito de Morococha se inundaron en 1934, lo que llevó a Cerro de Pasco Copper Corporation a construir el túnel Kingsmill. A través de este túnel, que tiene unos 11 kilómetros de largo y 500 metros de profundidad, el efluente minero desembocaba en el río Yauli, lo cual generaba contaminación de diversos componentes ambientales como vienen a ser el suelo, agua y aire.

Los efluentes mineros eran aguas ácidas provenientes de las operaciones mineras subterráneas y llegaban al río Yauli. La interacción de los efluentes industriales mineros con otros componentes ambientales como son el agua y el suelo, pueden tener graves consecuencias para el ecosistema. La Resolución Ministerial N° 335-2022-MINEM/DM actualiza el inventario de Pasivos Ambientales Mineros.

Una amplia gama de características y repercusiones ambientales se han producido a lo largo de la evolución de las actividades antropogénicas para satisfacer las necesidades humanas, como por ejemplo podemos rescatar los aspectos ambientales como son drenaje ácido de minas, relaves mineros y como impactos ambientales podemos describir la alteración a la calidad de suelo y agua. Actualmente se puede observar diversas áreas de potencial interés que fueron impactados por las actividades mineras del distrito de Yauli.

### **1.2. Descripción del problema de investigación**

¿*Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. aislados de los suelos impactados en Yauli – Junín tendrán la capacidad de biorremediación de metales pesados?

### **1.3. Objetivos del estudio**

#### **1.3.1. Objetivo general**

Evaluar la capacidad de biorremediación de metales mediante *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. aislados de los suelos impactados en Yauli – Junín.

#### **1.3.2. Objetivos específicos**

- Aislar en medios de cultivos selectivos y diferenciales a *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. de los suelos impactados en Yauli – Junín.
- Identificar mediante pruebas de coloración y bioquímicas a *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. aislados de los suelos impactados en Yauli - Junín.
- Determinar los parámetros físicos (pH, humedad y conductividad) de las muestras de suelo.
- Determinar los niveles de concentración de metales de los suelos impactados en Yauli – Junín.

### **1.4. Hipótesis**

#### **1.4.1. Hipótesis general**

*Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. aislados de los suelos impactados en Yauli – Junín tienen la capacidad de biorremediación de metales.

### **1.5. Justificación**

#### **1.5.1. Justificación legal**

Los Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Suelo fueron determinados mediante el Decreto Supremo N° 011 – 2017 – MINAM, la regulación ambiental peruana se refiere a la vigilancia de múltiples parámetros en la implementación de diversas actividades industriales, extractivas, productivas o de servicios. El citado decreto aborda específicamente las concentraciones de parámetros establecidos en los Estándares de Calidad Ambiental (ECA) asociados a actividades industriales, productivas, extractivas o

de servicios que no causan un efecto a la salud de las personas ni al ambiente. Las entidades involucradas en un contexto determinado pueden clasificarse en dos categorías amplias: personas naturales y personas jurídicas quienes requieren evaluar áreas de potencial interés y, de ser necesario, realizar operaciones de recuperación o remediación para salvaguardar la salud humana y la calidad ambiental.

### **1.5.2. Justificación ambiental**

Existen diversos pasivos ambientales generados por diversas actividades antropogénicas desarrolladas ancestralmente ya que anteriormente no existía normativa ambiental que regule las actividades industriales, se tiene la necesidad de buscar técnicas de remediación para la recuperación de suelos contaminados con metales. Existen evidencias científicas que usando microorganismos se pueden recuperar suelos impactados por actividades antropogénicas y serían de gran utilidad para poder aplicarlos a diversos pasivos ambientales mineros existentes en el Perú.

El estudio se enfoca en determinar el porcentaje de eficiencia de remoción de metales en suelos impactados utilizando bacterias aisladas propias del suelo; lo cual constituye un gran aporte a la investigación científica.

### **1.5.3. Justificación social**

La aplicación de diversas técnicas de remediación permitirá recuperar sitios contaminados para el desarrollo de servicios ecosistémicos o diversas actividades sociales ya sean turísticas, agrícolas o comerciales, es por ello de la necesidad social de cerrar brechas ambientales en el tratamiento de sitios impactados y contaminados.

## **1.6. Antecedentes**

### **1.6.1. A nivel nacional**

Asunción y Rondo (2021) realizaron su investigación con el objetivo de comparar y analizar las diversas estrategias para remediar suelos contaminados con metales pesados utilizando técnicas biológicas según lo documentado en revistas científicas de acceso

abierto. Este estudio empleó un enfoque de revisión sistemática no experimental sin metaanálisis. Se usó Scielo, Redalyc, Sciencedirect, Eric y Research Gate para encontrar artículos relevantes, después de aplicar las palabras claves y los criterios de inclusión, se eligieron 35 artículos para su posterior análisis. De acuerdo con los hallazgos, la micorremediación fue la técnica más eficiente para la biorremediación de Cd, Cu, Zn, Pb y As con porcentajes de 28%, 52.7%, 53.5%, 72.3% y 85% respectivamente. En términos de eliminación de metales pesados, se demostró que las siguientes familias microbianas se encuentran entre las más efectivas: 85% de arsénico en *Trichocomaceae*, 88% de cadmio en *Mucoraceae*, 70% de cromo en *Trichocomaceae*, 75% de cobre en *Mucoraceae*, 80% de zinc en *Bacillaceae*, 80% de zinc en *Flavobacteriaceae* y 90% de plomo en *Mucoraceas*, 90% de mercurio en *Flavobacteriaceae*, 90% de mercurio en *Pseudomonas*, 90% de mercurio en *Staphylococcaceae* y 90% de níquel en *Enterobacteriaceae*. Las concentraciones de metales pesados en suelos contaminados se pueden reducir con la ayuda de microorganismos, aunque la cantidad exacta reducida dependerá del enfoque de biorremediación y del tipo de suelo que se esté tratando.

Muñoz et al. (2019) investigaron el potencial de hongos y bacterias del suelo con y sin rizosfera para su uso en la biorremediación mediante la medición de su tolerancia a los metales pesados. Se preparó un medio salino enriquecido con 1 mM de cobre (II), plomo (II), zinc (II) o níquel (II) y 0.1 mM de cromo (VI), plata (I) o cadmio (II) para determinar el nivel de tolerancia a los metales pesados.

Hubo un total de 23 aislamientos fúngicos y 18 aislados bacterianos. Las cepas de hongos con los índices de tolerancia fueron: *Fusarium temperatum* CTLM08 ( $Zn^{+2}$ ), *Fusarium oxysporum* CTLM18 ( $Ni^{+2}$  y  $Cd^{+2}$ ), *Fusarium temperatum* CTLM05 ( $Pb^{+2}$ ), *Fusarium oxysporum* CTLM12 ( $Ag^{+1}$ ), *Fusarium inflexum* CTLM22 ( $Cu^{+2}$ ) y *Penicillium vanluykii* CTLM11 ( $Cr^{+6}$ ). Estas bacterias tienen mayor índice de tolerancia: *Serratia* sp. SSR15 ( $Cu^{+2}$ ), *Bacillus cereus* SSR01 ( $Cr^{+6}$ ), *Bacillus subtilis* SSR3 ( $Pb^{+2}$ ) y *Bacillus* sp. SSR13 ( $Ag^{+1}$ ) y *Bacillus licheniformis* SSR18 ( $Cd^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$  y  $Zn^{+2}$ ). Se observó un mayor

índice de tolerancia para los hongos en comparación con las bacterias. Por último, pero no menos importante, los suelos de responsabilidad ambiental minera de Santa Rosa de Jangas contienen una microflora importante que puede resultar útil en el avance de los procesos biotecnológicos y de biorremediación debido a los mecanismos de adaptación, crecimiento y desarrollo de estos organismos en presencia de metales pesados.

Otiniano (2018) determinó que los efluentes del procesamiento de minerales suelen poseer un alto contenido de metales pesados tóxicos como cadmio, mercurio, hierro, cromo, arsénico, cianuro y plomo debido a los compuestos químicos utilizados en el proceso. Estos metales pueden causar una amplia variedad de inconvenientes de salud, algunos de los cuales incluso pueden provocar cáncer al ingresar al cuerpo a través de múltiples rutas de absorción y luego acumularse en diferentes órganos y en el tejido adiposo. Se pueden usar varios tipos de microorganismos para la biorremediación de metales; al usar un proceso llamado biosorción, los materiales orgánicos de diferentes orígenes pueden inmovilizar pasivamente los metales. Los fundamentos biológicos de este enfoque residen en la interacción entre los grupos funcionales y los metales presentes en las membranas celulares de muchos organismos, incluidos algas, hongos, bacterias y polisacáridos como la celulosa y el quitosano. Hasta el 95 % de los metales, incluidos Cu, Pb, Cr, As, Zn, etc., se han eliminado con este método, lo que lo convierte en un método extremadamente eficaz. Además, existe la bioacumulación, por la que los metales entran en el citoplasma y se acumulan hasta el punto de que ya no son accesibles. Los metales pueden sufrir biotransformación a través de procesos de oxidación-reducción, lo que puede hacerlos menos solubles y precipitar, reduciendo su absorción por los organismos vivos, o hacerlos más solubles y eliminables a través de la permeabilidad. De manera similar, la volatilización atómica puede resultar de la biomineralización, un proceso en el que el metabolismo celular juega un papel clave. La mayor parte de la biorremediación es que no produce sustancias químicas secundarias peligrosas y tiene muchos otros beneficios, como la capacidad de reutilizar el material de biosorción y costos operativos mínimos.

Como resultado, se promociona como una tecnología limpia prometedora para descontaminar áreas contaminadas con metales.

Mena y Rafael (2017) realizaron un estudio en Hualgayoc de la región Cajamarca del Perú, para investigar la eficiencia de los microorganismos para biorremediar metales pesados del agua y pasivos ambientales mineros. Su objetivo era demostrar que las áreas contaminadas se podían limpiar usando microbios. Se recolectaron 20 muestras de agua de río y desechos de mina para mejorar las bacterias resistentes a Pb, Cu y Zn, luego, entre las diversas concentraciones de metales pesados ensayadas, se seleccionaron cepas bacterianas que podían producir más biomasa y al mismo tiempo soportar las mayores concentraciones de su entorno, posteriormente después de calcular la eficacia de la biorremediación, se descubrió que se había eliminado una cantidad significativa de los metales antes mencionados, el plomo mostró resultados particularmente impresionantes en 88.8 %, zinc 49.2% y cobre 79.7%. Las cepas que se identificaron fueron *Pseudomonas* sp, *Corynebacterium* sp y *Bacillus* sp.

### **1.6.2. A nivel internacional**

Anusha y Natarajan (2020) estudiaron qué también las bacterias locales pueden remover los metales específicamente se utilizó *Bacillus cereus* para tal fin. El aislado mostró una concentración inhibitoria muy baja para los iones de plomo y para todos los demás metales probados; también mostró una concentración inhibitoria muy alta para varios antibióticos. Se conoció el pH óptimo (pH = 7) y condiciones óptimas de crecimiento (alrededor de 35 °C). Los investigadores determinaron que el método de cultivo por lotes de cepa, es más efectivo para la biorremediación 97.17 % para plomo, 91.98 % para cobre, 81.6% para hierro, 79.9 % para cromo, 77.44 % para zinc, 62.8% para manganeso y 60.92% para magnesio. En este estudio, los investigadores descubrieron un método sencillo para usar bacterias tolerantes a múltiples metales para disminuir el nivel de contaminación del suelo en las minas de bauxita. Con sus impresionantes capacidades de remediación para todos los metales, especialmente el plomo, *B. cereus* se muestra

prometedora como una cepa de biorremediación basada en el campo que puede emplearse para futuras recuperaciones, conforme lo muestran los hallazgos de este estudio.

Njoku et al. (2020) analizaron el potencial de los microorganismos para biorremediar metales pesados. Se utilizaron *Bacillus megaterium* y *Rhizopus stolonifer*, se aislaron e identificaron cepas tolerantes a plomo, cadmio y níquel. Las concentraciones de  $\text{PbCl}_2$ ,  $\text{NiSO}_4$  y  $\text{CdCl}_2$  se incrementaron todas a 3200 mg/l, y se dio tiempo a *Bacillus megaterium* para crecer en cada una. El *Rhizopus stolonifer* se sometió a 800 mg/l de  $\text{CdCl}_2$  y 3200 mg/l de  $\text{PbCl}_2$ ,  $\text{NiSO}_4$ . Finalmente, ambos microorganismos fueron expuestos a un total de 1500 mg/l de los tres metales (cada metal pesado a 500 mg/l) durante 96 horas adicionales a 30°C, después de terminar la investigación, el crecimiento sinérgico de *Bacillus megaterium* y *Rhizopus stolonifer* absorbió la mayor cantidad de plomo (541.50 mg). La absorción de níquel (501.05 mg) y cadmio (479.10 mg) fue máxima en *B. megaterium* y *R. stolonifer* cuando se cultivaron por separado. *B. megaterium* tuvo la mayor absorción del total de metales pesados. El crecimiento microbiano sinérgico condujo a la mayor pérdida de Pb (25.24 %), entre los metales contaminados, y la menor pérdida de Ni (40.41 %). Con la combinación de metales, el crecimiento microbiano sinérgico anuló por completo el rendimiento de la biorremediación de *B. megaterium* mientras aumentaba el de *R. stolonifer*. Los hallazgos demostraron que los organismos eran eficientes en la biorremediación de metales pesados, lo que indica que podrían usarse como agentes de biorremediación en contextos de crecimiento tanto aislados como sinérgicos, siendo esta última la forma preferida de biorremediación debido a su dependencia de la bioacumulación.

Ojuederie y Babalola (2017) analizaron las consecuencias tóxicas de la contaminación de metales pesados en los procesos utilizados por microorganismos y plantas para la limpieza ambiental. Además, destacó la importancia de los métodos y estrategias biotecnológicos actuales para mejorar la eficiencia de las enzimas microbianas

en la remoción de metales pesados, mostrando además las posibles aplicaciones futuras y las limitaciones actuales de la biorremediación microbiana y la fitorremediación para la eliminación de metales pesados. Sin embargo, las reglas de bioseguridad deben cumplirse estrictamente al utilizar procedimientos biotecnológicos para garantizar la seguridad en el medio ambiente.

## Capítulo II. Marco Teórico

### 2.1. Suelo

El suelo es producto de la transformación mediante procesos de erosión, procesos físico – químicos y biológicos de la capa superior para la corteza terrestre. Está compuesto de partículas minerales, materia orgánica, agua, aire organismos vivientes organizados en horizontes genéticos de suelo (Organización Internacional de Normalización [ISO], 2015).

Hay sólidos, líquidos y gases, todos entremezclados en la composición del suelo. Tanto las sustancias orgánicas como las inorgánicas pueden descomponerse y desintegrarse. Los compuestos orgánicos a menudo se derivan de materia descompuesta (Jhonson, 2009).

La fase líquida, también llamada solución del suelo, es una matriz increíblemente importante cuya composición es necesaria en la actividad biológica ya que muchos microorganismos solo pueden existir en suelos con un alto contenido de agua (Maier et. al, 2009).

En ausencia de agua, los intersticios entre las partículas se llenan de una mezcla gaseosa que incluye diferentes gases como son el dióxido de carbono, oxígeno, metano, nitrógeno, entre otros. La cantidad de gases presentes en el suelo es inversamente proporcional a la cantidad de agua presente (Conklin, 2005).

Cabe destacar que el más relevante de estos componentes del suelo es la materia orgánica, que mantiene la salud de este ecosistema. El fósforo, el nitrógeno y el azufre son solo algunos de los ingredientes esenciales que lo hacen tan útil (Paul, 2007).

El carbono está presente en todas las especies vivas, organismos muertos y compuestos húmicos (que se encuentran en la materia orgánica en descomposición) (Maier et. al, 2009). Estos últimos son mezclas heterogéneas de elementos orgánicos naturales generados a través de la humificación que consiste en la descomposición de los

seres vivos (Nieder y Benbi, 2008). Su cantidad va a depender del equilibrio entre la productividad primaria y la descomposición (Paul, 2007).

Tanto las capas superiores como las inferiores del suelo contienen grandes cantidades de carbono orgánico. Los primeros se han definido arbitrariamente como todo, desde la superficie hasta los 25 centímetros, y los segundos como algo más profundo que eso. Los horizontes subsuperficiales normalmente tienen cantidades más bajas de carbono orgánico que los horizontes superficiales, pero los horizontes subsuperficiales contienen un mayor volumen de suelo en general. Por lo tanto, en los perfiles de suelo hasta una profundidad de un metro, las capas del subsuelo representan más del 50% del contenido de carbono orgánico (Fierer et al., 2003).

Es importante preservar la población microbiana del suelo debido al papel crucial que desempeña en el ciclo de nutrientes del suelo y al hecho de que es el principal impulsor de los cambios en la estructura y composición química del suelo (Rousk et al, 2009).

## **2.2. Calidad del suelo**

Las actividades ecológicas, agrícolas, económicas, culturales, arqueológicas y recreativas están todas dentro de las capacidades del suelo. La calidad del suelo es caracterizada por sus propiedades biológicas, químicas y físicas, que hacen que el suelo tenga un potencial ecosistémico natural y antropogénico (Ministerio del Ambiente [Minam], 2014).

Existen varios indicadores de la calidad del suelo, y uno de ellos es la cantidad de materia orgánica presente (carbono orgánico). La capacidad en el suelo para almacenar humedad, crear nutrientes, liberar gases, transformar sustancias químicas contaminantes y resistir la degradación física está profundamente influenciada por la cantidad y calidad de su materia orgánica (Rees et al., 2001).

Esta idea se ha enfatizado en la capacidad de operación del suelo. Abarca características que incluyen fertilidad, calidad del ambiente, sostenibilidad y productividad

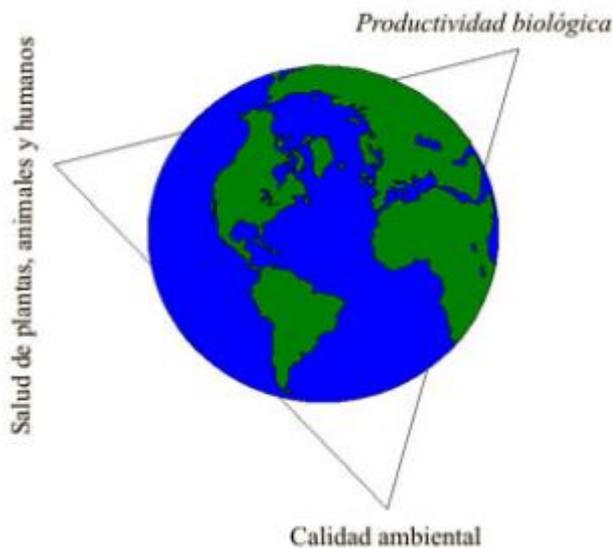
potencial. El estado del suelo puede proporcionar una gran cantidad de información sobre el entorno que lo circunda.

La comprensión de las funciones del suelo ha llevado al desarrollo de una definición de calidad del suelo: (1) mejorar la producción del sistema sin comprometer la integridad física, química o biológica (productividad biológica sostenible); (2) disminuir la concentración de contaminantes y enfermedades en el ambiente (mejorar la calidad ambiental); y (3) mejorar la salud vegetal, animal y humana (Doran y Parkin, 1994) (Ver Figura 1).

En consecuencia, este concepto refleja la capacidad del suelo para funcionar dentro de los límites del ecosistema del cual forma parte y con el que interactúa (Parr et al., 1992).

### Figura 1

*Principales componentes de la calidad del suelo.*



**Nota:** Fuente Doran y Parkin, 1994.

### **2.3. Área de potencial interés**

Son áreas seleccionadas en la fase de identificación en la cual existe alguna evidencia e indicio para creer que el suelo podría estar contaminado, en esta región se realizan trabajos de muestreo para evaluar la calidad del suelo (Ministerio del Ambiente, 2021).

### **2.4. Sitio contaminado**

Es el lugar donde la contaminación del suelo causada por el hombre supera tanto el nivel de fondo como los requisitos de calidad ambiental (ECA) para suelos, así como los requisitos internacionales establecidos por el Ministerio del Ambiente (MINAM). Las aguas subterráneas, los sedimentos y otros componentes ambientales del subsuelo debajo de un sitio contaminado también pueden verse afectados por la contaminación del suelo (Ministerio del Ambiente, 2021).

### **2.5. Contaminante**

Cualquier sustancia química creada por el hombre que represente una amenaza para la salud humana o ambiental (Ministerio del Ambiente, 2021).

También se define como sustancia o agente presente en el suelo como resultado de la actividad humana (ISO, 2015).

### **2.6. Impacto**

Cualquier alteración del estado natural del medio ambiente. No hace diferencia alguna si son favorables o perjudiciales, significativos o no significativos. Lo que importa es que sean producidos por los productos, servicios o actividad de la empresa (ISO, 2015).

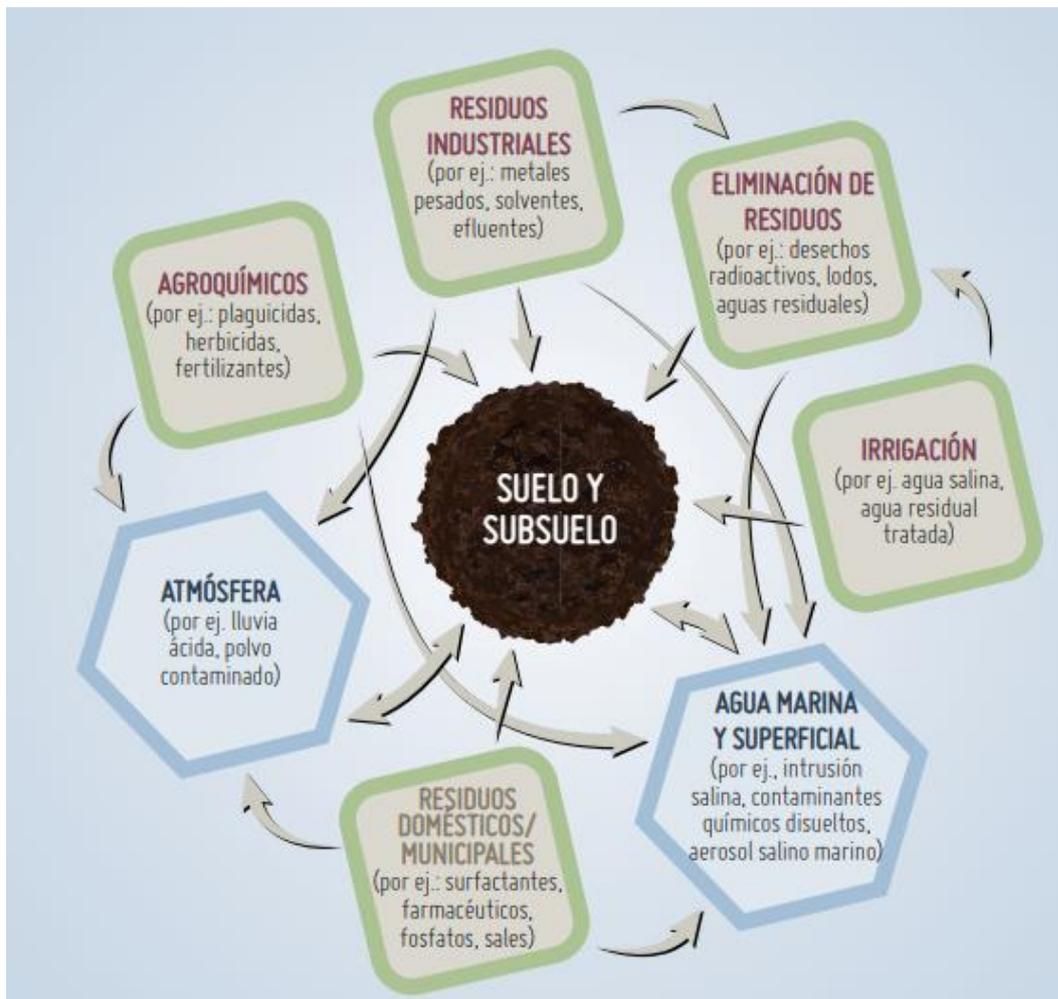
### **2.7. Fuentes antropogénicas de contaminación**

Siglos de actividades antropogénicas han resultado en un problema generalizado de contaminación del suelo en todo el mundo. Las principales fuentes antropogénicas de contaminación del suelo son los productos químicos usados o producidos como derivados de actividades industriales, desechos domésticos y municipales, incluyendo las aguas

residuales, los agroquímicos y los productos derivados del petróleo (Figura2). La liberación de sustancias químicas al medio ambiente puede ser deliberada, como en el caso de fertilizantes y pesticidas, o no intencionada, como en el caso de accidentes con materiales peligrosos o el uso de aguas residuales no tratadas en operaciones agrícolas o la eliminación final inadecuada de lodos de depuradora (Luo et al., 2017).

**Figura 2**

*Rutas potenciales interrelacionadas en la contaminación química subsuperficial.*



**Nota:**

Fuente. Fao, 2019.

## 2.8. Actividades industriales mineras

La minería ha tenido un gran impacto en el suelo, el agua y la biota desde la antigüedad. Pueden encontrarse muchos ejemplos documentados de suelos fuertemente contaminados por las actividades mineras en todo el mundo (Alloway, 2013). Muchos

contaminantes se han introducido en el suelo como resultado de la fundición de metales en la separación de minerales. Las instalaciones mineras y de fundición liberan enormes cantidades de metales pesados y otros elementos tóxicos al medio ambiente; éstos persisten durante períodos prolongados, mucho después del término de estas actividades (Ogundele et al., 2017). Los relaves son un depósito de desechos mineros tóxicos, que en su mayoría consisten en pequeñas partículas que pueden contener cantidades variables de metales pesados. La erosión del agua y el viento puede esparcir estas partículas contaminadas e introducirlas en suelos agrícolas. Por ejemplo, Mileusnić et al. (2014), encontraron altos niveles de plomo y cobre en campos agrícolas ubicados cerca de una presa de relaves en Namibia. Las concentraciones tóxicas de cromo y níquel también fueron encontradas en suelos agrícolas cerca de los residuos de una mina abandonada de cromita y asbesto en la India y en las cosechas cultivadas en esos suelos, lo que resultó en un alto riesgo para la salud de humanos y ganado (Kumar y Maiti, 2015).

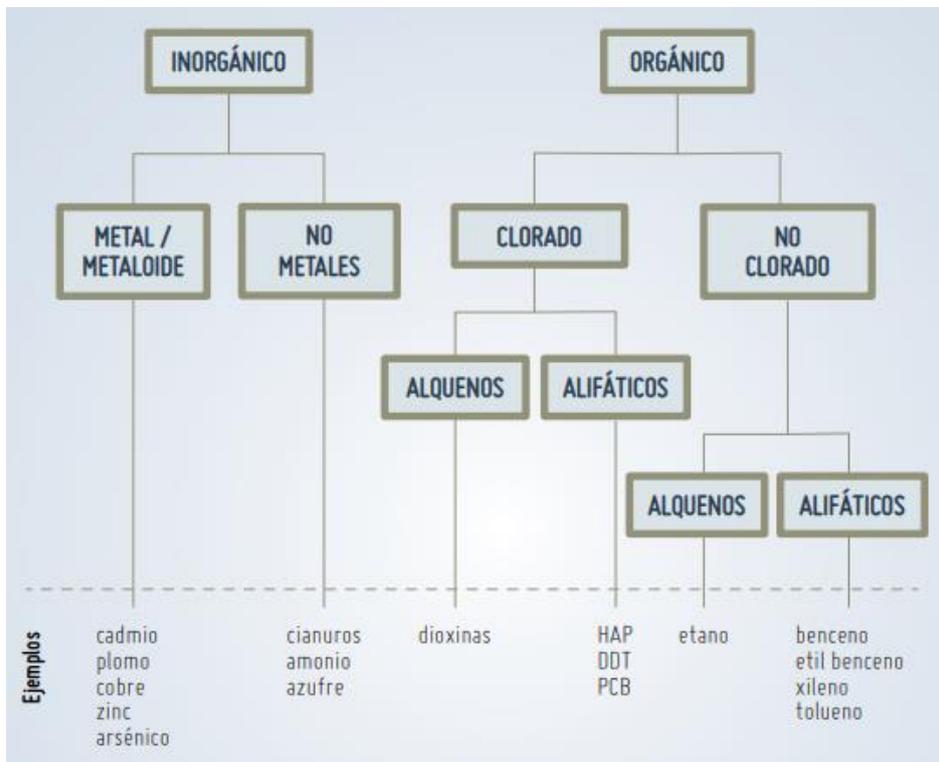
## **2.9. Principales contaminantes en el suelo**

La contaminación de los componentes ambientales suele ser causada por procesos antropogénicos. Aunque algunos elementos y productos químicos se encuentran naturalmente en los suelos, la contaminación por actividades humanas es mucho más común. Los contaminantes se han clasificado de acuerdo con sus propiedades químicas, pero algunas de las categorías que se presentan a continuación se superponen (Swartjes, 2011).

Swartjes (2011) propuso una categorización sistemática de los contaminantes (Ver Figura 3) que puede ser útil para una mejor comprensión.

**Figura 3**

*Categorización sistemática de los principales contaminantes en el suelo.*



**Nota:** Fuente Swartjes, 2011.

## 2.10. Metales pesados

La terminología "metales pesados" hace referencia a metaloides y metales con una masa relativamente alta ( $> 4.5 \frac{g}{cm^3}$ ), como Cd, Cu, Pb, Sn, Zn y Hg, pueden conducir a problemas de toxicidad. El antimonio (Sb) y el selenio (Se) son otros no metales que se estudian con frecuencia junto con los metales pesados (Kemp, 1998). Los suelos contienen trazas de estos elementos. La exposición a grandes cantidades de varios micronutrientes puede causar fitotoxicidad y representar una amenaza para la salud humana, a pesar de que estos nutrientes son esenciales para la supervivencia de personas, plantas y animales, debido a que no se pueden descomponer en el medio ambiente y da como resultado una rápida acumulación en los tejidos y los seres vivos.

Los metales pesados, causados por actividades antropogénicas, se encuentran en los relaves de minas, en desechos con alto contenido de metales, en la gasolina, en pinturas con plomo, en ciertos fertilizantes, estiércol, lodos de aguas residuales, plaguicidas, la irrigación con aguas residuales, los residuos de combustión de carbón, los derrames de petroquímicos y la deposición atmosférica de diferentes fuentes (Alloway, 2013).

Cuando se trata de restaurar áreas contaminadas, en términos de contaminación ambiental, los metales pesados se encuentran entre los más difíciles y difíciles de erradicar. Ponen en peligro la vida humana y animal al contaminar elementos esenciales como el agua, el aire y los alimentos. Los metales no se degradan metabólicamente como la mayoría de las moléculas orgánicas, por lo que se acumulan en los tejidos biológicos. Entre los metales pesados, Zn, Ni, Co y Cu son más peligrosos para las plantas, mientras que As, Cd, Pb, Cr y Hg lo son para los animales superiores (McBride, 1994).

Cd, Hg, Pb, As y Se son los contaminantes más importantes de la cadena alimentaria. La afectación al suelo con As puede ser originada no solo por agroquímicos y operaciones de minería / fundición, sino también por estiércol de ganado que recibe aditivos ricos en As en su alimentación. Ciertos minerales del suelo son ricos en As que mediante procesos geológicos pueden generar altas concentraciones de As (McLaughlin et. al, 1994).

Los metales trazas en pesticidas inorgánicos (a base de Cu) y orgánicos plantean una preocupación ambiental y toxicológica significativa (Komárek et al., 2010). La materia orgánica del suelo (MOS) así como los (hidro)óxidos de Fe<sup>-</sup> y Mn<sup>-</sup> inmovilizan fácilmente el Cu, manteniéndolo en concentraciones relativamente altas en las capas superiores en el suelo. El Cu derivado de fungicidas, por otro lado, se ha detectado en altas concentraciones en la parte teóricamente accesible del suelo (Pietrzak y McPhail, 2004).

### **2.11. Metales en el suelo**

Los metales en el suelo han provenido primero de la meteorización de las rocas, pero luego las actividades humanas agregaron mucho más. Metales como el As, Pb, Cd y Hg no son necesarios para los seres vivos, pero otros, incluidos Mo, Mn, Ca, Mg, K, Na, Cu, Fe, Co, Zn, Sc, V, Ni, Sn y Cr, son elementos esenciales para las funciones biológicas. Sin embargo, algunos niveles de concentración generan consecuencias negativas en los seres vivos; este es el caso cuando los seres humanos entran en contacto con los metales al respirar partículas del suelo o ingerir alimentos contaminados. Además, las elevadas concentraciones de metales tienen un efecto sobre la calidad del suelo (Reyez, 2010).

Debido a la dificultad de eliminar los metales del medio ambiente y la variedad de formas químicas que pueden adoptar, es importante comprender no solo la concentración general de metales, sino también las formas químicas que pueden adoptar (especiación) y su biodisponibilidad debido a que determinan la toxicidad para el sistema biológico (Fuentes, 2012).

### **2.12. Diversidad microbiana en el suelo**

El suelo es un lugar donde los microorganismos pueden prosperar y formar microcolonias en las partículas del suelo. El suelo a menudo tiene una concentración significativamente mayor de microorganismos que ambientes marinos (Atlas y Bartha, 2002).

Los nutrientes, la textura y la estructura del suelo tienen un impacto directo en los tipos y abundancias de arqueas, bacterias, hongos, algas y protozoos que se encuentran en un lugar específico. Las bacterias y los hongos constituyen la mayor parte de la abundante vida del suelo. Los microorganismos del suelo descomponen la materia orgánica y juegan un papel fundamental en el ciclo biogeoquímico por su capacidad de degradar contaminantes (principalmente actinomicetos) (Atlas y Bartha, 2002; Six et al., 2006; Lal, 2007; Maier et al., 2009; Liu et al., 2020). Dado que los microorganismos del suelo reaccionan rápidamente a los cambios en las circunstancias externas, la riqueza de

la comunidad microbiana del suelo suele utilizarse como indicador de su calidad (Rees et al., 2001).

La vasta población de microorganismos del suelo está sujeta a una variedad de condiciones que afectan su actividad y, como resultado, deben evolucionar para sobrevivir en ambientes hostiles. Como resultado, las poblaciones de microbios del suelo están en constante evolución y son dinámicas (Lavelle y Spain, 2021).

Los microorganismos tienen la capacidad única de mantener un suministro de nutrientes de manera frecuente en los nutrientes a través del intercambio mutuo con su entorno inmediato. Para que los microorganismos se reproduzcan, se deben cumplir ciertos requisitos nutricionales. Estos parámetros incluyen la disponibilidad de elementos nutritivos a partir de los cuales los organismos pueden fabricar los componentes de su cuerpo y recibir la energía que necesitan, a través de la oxidación química (Castillo, 2012).

La disponibilidad de energía y de carbono, la composición iónica y la interacción genética entre los microorganismos son solo algunos de los factores que pueden influir en la actividad y la dinámica de las comunidades microbianas del suelo (Nannipieri et al., 2003).

En gran medida, los microorganismos del suelo son responsables del reciclaje de carbono, nitrógeno, azufre, fósforo y otros elementos al descomponer los desechos orgánicos (Ros et al., 2002). En la ecología del suelo, estas bacterias juegan un papel crucial en la conversión de materiales orgánicos en energía (Nielsen y Winding, 2002; Pepper y Gerba, 2005). Cabe mencionar que, pequeños y grandes agregados de suelo se mantienen unidos por polisacáridos secretados por bacterias (Voroney, 2007).

### **2.13. Género *Bacillus* sp.**

La capacidad de producir endosporas ha permitido que las especies de *Bacillus* se dispersen globalmente, rasgo que les permite sobrevivir y prosperar en una amplia gama

de ecosistemas, tanto húmedos como secos, y en una variedad de situaciones climáticas y ambientales (Tejera-Hernández et al., 2011).

La gran mayoría de las especies de *Bacillus* son saprófitas, lo que significa que pueden prosperar a partir de la amplia variedad de sustratos orgánicos que se encuentran en el suelo, lo que las convierte en principal reservorio de este grupo bacteriano, en este entorno intrincado, una amplia variedad de microorganismos puede desarrollarse y multiplicarse (McSpadden, 2004).

*Bacillus*, cuyo tamaño varía entre 0.5 y 10  $\mu\text{m}$ , se caracteriza por su positividad a la tinción Gram, morfología bacilar, motilidad flagelar y su capacidad para crecer aeróbicamente o en condiciones anaeróbicas facultativas. La variedad metabólica de este organismo puede atribuirse a sus condiciones óptimas de desarrollo a pH neutro y su capacidad para prosperar en un amplio rango de temperaturas. Sin embargo, cabe señalar que la mayoría de las especies de este organismo sólo pueden vivir en un rango de temperatura de 30 a 45°C.

Las endosporas de *Bacillus*, que ocurren durante la etapa de crecimiento vegetativo y antes de la etapa de esporulación, son importantes para la capacidad de la especie de propagarse y volverse común en los ambientes.

Primero, la bacteria prospera en un entorno propicio para su crecimiento y se expande rápidamente por fisión binaria. La segunda etapa se inicia como medio de protección ante peligros (crecimiento significativo de la población, fuentes de alimento insuficientes, condiciones ambientales adversas, incluidos niveles de salinidad, temperatura y pH), Como resultado, la célula madre y una pre-espora surgida son productos de la división celular asimétrica, esta comienza con la célula vegetativa cuando forma la endospora. Después de esto, la pre-espora se ingiere y se transforma en una nueva célula, rodeada de membrana externa e interna, en la célula madre. Más tarde, la pre-espora desarrolla una corteza (péptidoglucano modificado) para mantenerla segura. Luego, la pre-espora se seca y completa su desarrollo. La endospora se libera de la célula

madre cuando la muerte celular programada la ha lizado. Si las circunstancias ambientales son adecuadas, la endospora puede comenzar sus operaciones metabólicas y producir una célula vegetativa (Errington, 2003; Tejera et al., 2011; College of Agriculture and Life Sciences [Cals], 2016). Por lo cual, las cepas de esta especie bacteriana, que son capaces de producir endosporas resistentes al calor y la humedad, son ideales para su uso en la creación de productos biotecnológicos (Pérez et al., 2011).

#### **2.14. Género *Pseudomonas* sp.**

La familia Pseudomonadaceae incluye el género *Pseudomonas*. Los bacilos de esta familia pueden ser perfectamente rectos o tener una curvatura muy pequeña y se desarrollan en un ambiente aeróbico. Son bacterias flageladas polares gramnegativas, incapaz de formar esporas y son quimioorganotróficos (Schelegel, 1997). Tienen una alta concentración de oxidasas y catalasas, una tolerancia ácida limitada y poca capacidad para desarrollarse a niveles de pH inferiores a 4.5. El rango metabólico, la amplitud ecológica y la adaptabilidad ambiental de este género se reflejan en su rica diversidad de especies. Las propiedades biodegradables de este género lo hacen útil para la eliminación de desechos de carbono, y también se puede utilizar para descomponer otros contaminantes ambientales dañinos y materiales de desechos orgánicos peligrosos, incluidos el petróleo y los hidrocarburos aromáticos (Batt y Tortorello, 2014).

Estos microbios pueden soportar una amplia variedad de condiciones ambientales, incluidas temperaturas y humedad extremas. La amplia variedad de enzimas y rutas metabólicas a su disposición y su extrema resiliencia les permiten prosperar en una amplia gama de condiciones ambientales. Se han identificado más de 200 especies de *Pseudomonas*, y estas bacterias se pueden encontrar en una amplia gama de entornos (incluidos, entre otros, lodo, agua de mar, vegetación y fauna) (Bush, 2022).

#### **2.15. Movilidad y biodisponibilidad de metales en el suelo**

Los mecanismos de sorción modifican la biodisponibilidad y movilidad de los metales del suelo (Uchimiya et al., 2010); Es importante comprender la dinámica

involucrada cuando los metales migran de una fase líquida móvil a la superficie de una fase sólida (Bradl, 2004). Los procedimientos de sorción de contaminantes están influenciados por muchas variables más allá de la afinidad y la cinética de la sorción del suelo (Saeedi et al., 2018), la forma fisicoquímica en la que se encuentra el metal (especiación) tiene un mayor impacto en la dinámica y toxicidad de los metales que la concentración total de metales (Segovia, 2014).

En cambio, su biodisponibilidad se refiere al porcentaje del metal que puede ser absorbido y asimilado por los receptores en el suelo, mientras que su movilidad describe qué tan rápido puede moverse un metal de un medio a otro (Pérez, 2005). Esto significa que el metal no puede acumularse sin su forma biodisponible (Xiao et al., 2017).

#### **2.16. Parámetros del suelo y movilidad de metales**

El potencial de iones de hidrógeno (pH), la textura del suelo, la conductividad eléctrica (EC), el potencial redox y la biodisponibilidad de los metales son ejemplos de características fisicoquímicas del suelo, así como, óxidos de hierro, manganeso y aluminio, así como la presencia de materia orgánica. Debido a que la mayoría de los metales no se adsorben mucho a pH ácido, con la excepción de As, Mo, Se y Cr, la mayoría de los metales son bastante móviles en este ambiente (Segovia, 2014). A diferencia de los suelos arenosos, los suelos ricos en arcilla pueden retener metales debido a un mecanismo de adsorción en el complejo de intercambio (Larios, 2014).

Los metales reaccionan con la materia orgánica para generar complejos solubles, así el Cu, el Pb y el Zn pueden formar complejos organometálicos, haciéndolos más móviles. Sin embargo, los suelos cristalinos ricos en hierro y manganeso (óxidos e hidróxidos) pueden fijar metales, específicamente As, Cu y Pb (Segovia, 2014).

#### **2.17. Medios de cultivo**

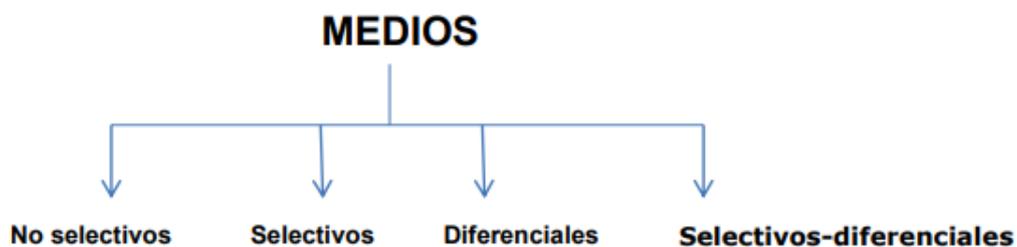
Los microorganismos se pueden cultivar en un laboratorio dándoles un entorno cuidadosamente gestionado con la temperatura, la humedad y los nutrientes adecuados.

Los cultivos se pueden clasificar como discontinuos (donde los nutrientes se agregan a intervalos regulares) o continuos (donde los nutrientes se agregan continuamente) según el medio en el que crecen. Podemos clasificarlos como no selectivos, selectivos, diferenciales o selectivos-diferenciales.

- Los no selectivos son ricos en nutrientes y a menudo se emplean para recuentos totales de microflora o para transferir y conservar microorganismos puros.
- El desarrollo de microorganismos competidores se inhibe en un medio selectivo, lo que permite que se desarrolle el microbio de interés. Los químicos selectivos apropiados son cruciales para el éxito de este medio.
- Medios diferenciales, en los que las colonias de un determinado microbio pueden ser identificadas por uno de los componentes del medio, permitiendo tanto la identificación general de los cultivos como la erradicación de cultivos sospechosos falsos (Yousef, 2006).
- Cuando estas dos últimas cualidades se combinan, las llamamos medios diferenciales selectivos.

#### **Figura 4**

*Tipos de medios de cultivo.*



*Nota:* Fuente: Castillo, 2012.

## 2.18. Microorganismos resistentes y tolerantes a metales pesados

Los metales pesados son muy dañinos, por lo que los suelos contaminados con estos metales sustentan una escasa población de microbios; de ello se deduce que las especies de microorganismos que pueden sobrevivir en entornos de alto riesgo deben ser tolerantes o resistentes a los metales. Las frases "resistencia" y "tolerancia" se han usado indistintamente. Una definición de "resistencia" es la capacidad de un microorganismo para someterse a procesos de desintoxicación que le permitan resistir a los efectos tóxicos de los metales. La "tolerancia" es la cualidad inherente del microorganismo o el ajuste ambiental de la toxicidad del elemento que le permiten persistir a pesar del impacto adverso (Dhal et al., 2013).

La capacidad de estas bacterias para prosperar depende de una serie de variables ambientales, que incluyen, entre otras, la nutrición, el pH y, lo que es más importante, la humedad y la temperatura (Zilli et al., 2003). También es bien conocido que factores como las tasas de aireación, la presencia de cultivos, la época del año y la profundidad del suelo pueden tener un efecto sobre los microorganismos presentes en el suelo (Kavaruma y Espósito, 2010).

En la Tabla 1 se aprecian algunas especies de bacterias que pueden remover y transformar ciertos metales pesados.

**Tabla 1**

*Especies de Bacillus y Pseudomonas utilizados para la biorremediación.*

MICROORGANISMO	METAL PESADO	REFERENCIA
<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Cd	Ammer et al. (2014)
<i>Pseudomonas</i> sp, <i>Bacillus</i> sp.	Cr (VI)	Dhal et al. (2013)

Nota: Fuente: Beltrán y Gómez, 2016.

## **2.19. Tecnologías de remediación**

Se define como cualquier acción utilizada para alterar las propiedades químicas o físicas de un contaminante en el suelo, así como en las aguas subterráneas a fin de reducir su toxicidad, movilidad o concentración en el medio ambiente se considera un tratamiento reparador. Existe diversos métodos físicos, químicos o biológicos destinados a aislar o destruir contaminantes de los componentes ambientales que ahora están disponibles para la rehabilitación de áreas contaminadas. La decisión entre ellos está determinada por factores que incluyen las propiedades inherentes del medio y del contaminante, la efectividad esperada de los tratamientos, la factibilidad técnico-económica de los tratamientos y el tiempo proyectado para llevarlos a cabo (Fundación Chile, 2015).

El uso de enfoques biotecnológicos en biorremediación tiene varias ventajas sobre los enfoques fisicoquímicos ya que se basan en la actividad natural de microorganismos y puede lograr la degradación completa del contaminante. El desarrollo de sondas y biosensores y la biorremediación mediada por biosurfactantes se pueden aplicar con éxito para aumentar la lenta tasa de biodegradación de remediación de desechos mediada por microorganismos y, por lo tanto, puede mejorar la eficacia de las técnicas de biorremediación en el tratamiento de desechos. (Vineet Kumar et.al; 2021)

## **2.20. Tratamiento biológico**

Los organismos vivos (plantas, bacterias, hongos, etc.) se utilizan en procesos de biorremediación con el propósito de degradar, transformar y/o eliminar sustancias químicas peligrosas, los organismos tienen la capacidad de catabolizar productos de desecho y convertirlos en nutrientes y energía utilizable. Las vías de degradación de los contaminantes orgánicos, como los procesos de oxidación-reducción, pueden diferir de un contaminante a otro y de una especie microbiana a otra, los procesos de sorción, el intercambio iónico, la formación de complejos y la quelación son sólo algunas de las reacciones que pueden utilizarse para inmovilizar metales. Los métodos de biorremediación varían en términos del tipo de organismos utilizados propios del sitio

contaminado (nativos) o externos (exógenos), si se llevan a cabo *in situ* o *ex situ*, y si hay oxígeno presente (aeróbico) o ausente (anaeróbico) (Fundación Chile, 2015).

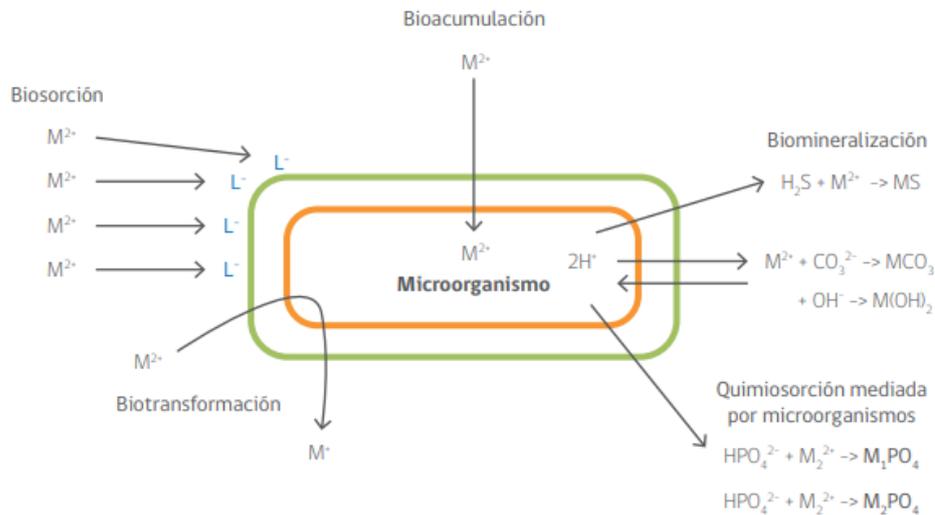
La frase "biorremediación" se refiere al empleo de organismos para descomponer productos químicos y, como concepto amplio, abarca todos los procedimientos y actividades utilizados para restaurar un medio ambiente contaminado. El término "biorremediación" se refiere al proceso de eliminación o reducción de toxinas ambientales mediante el empleo de microorganismos o procesos microbianos (Garbisu y Alkorta, 2003). Las capacidades catabólicas de las bacterias que emplean los contaminantes para su crecimiento son esenciales para estos procesos (Soto et al., 2010).

### **2.21. Biotransformación de metales**

Como resultado, los tratamientos de biorremediación pueden controlar si los metales en los suelos se movilizan o inmovilizan a través de estos procesos. El adsorción, la quelación por metabolitos sideróforos (químicos quelantes de hierro liberados por microorganismos), las transformaciones bajo potenciales especializados de reducción-oxidación (redox), la metilación y la posterior volatilización son formas en que los microbios pueden movilizar metales. Los metales pesados pueden inmovilizarse mediante su conversión a un estado metálico menos bioactivo. Al reducir los metales y vincular este proceso con la oxidación de ácidos orgánicos, alcoholes, H<sub>2</sub> o compuestos aromáticos, las bacterias pueden ayudar en la biodegradación de sustancias químicas orgánicas peligrosas (Emenike et al., 2018).

## Figura 5

Esquema de operación de los microorganismos.



Nota: Fuente: Fundación Chile, 2015.

### 2.22 Estándar de Calidad Ambiental (ECA)

Es el punto de referencia por el cual determinamos si la concentración de un elemento, sustancia o parámetros biológicos, físicos y químicos, presentes en los diferentes componentes ambientales (cuerpos de aire, agua o suelo en sus estados receptivos) no representan riesgo significativo para el medio ambiente y la salud humana. Se pueden expresar en valores máximos, mínimos y rangos para indicar la concentración o el grado, según el tipo de parámetro que se utilice (Ministerio del Ambiente, 2014).

### 2.23. Normativa nacional e internacional para calidad de suelo

Los Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para suelos fueron ordenados mediante Decreto Supremo N° 011-2017-MINAM, que es la base de la ley ambiental peruana. Las concentraciones de los compuestos metálicos se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2***Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para suelo.*

Parámetros en mg/kg	Usos del Suelo		
	Suelo Agrícola	Suelo Residencial / Parques	Suelo Comercial / Extractivo / Industrial
Arsénico	50	50	140
Bario	750	500	2000
Cadmio	1.4	10	22
Cromo	**	400	1000
Plomo	70	140	800

*Nota:* Fuente: Ministerio del ambiente (2017).

Para los parámetros que no están considerados en la Tabla 2, Las "Norma canadiense para la calidad del suelo" para la "Protección de la salud humana y ambiental" se utilizarán como norma rectora como se muestra en la Tabla 3.

**Tabla 3***Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para suelo.*

Parámetros en mg/kg	Usos del Suelo		
	Suelo Agrícola	Suelo Parque / Residencial	Suelo Comercial / Industrial
Talio	1	1	1
Vanadio	130	130	130
Selenio	1	1	2.9
Cobalto	300	300	300
Berilio	4	4	8
Niquel	45	45	89
Molibdeno	40	40	40
Antimonio	40	40	40
Estaño	300	300	300

*Nota:* Fuente: Norma Canadiense de Calidad de Suelos (2022).

Para el caso de los parámetros que no están considerados en las Tablas 2 y 3 se utilizará el límite que fue impuesto por la normativa establecida por el Comisión Nacional del Medio Ambiente (CONAMA) de Brasil, como se muestra en la Tabla 4.

**Tabla 4**

*Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para suelo*

<b>Parámetros en mg/kg</b>	<b>Usos del Suelo Suelo Industrial / Comercial</b>
Plata	100
Cobre	600
Zinc	2000

*Nota:* Fuente: Consejo Nacional del Ambiente (2010).

## Capítulo III. Desarrollo del trabajo de investigación

### 3.1. Ubicación geográfica del área de estudio

El área para la investigación se encuentra ubicado en el distrito de Yauli, provincia de La Oroya, región Junín. En la Tabla 5 se georreferencia las coordenadas en UTM (Universal Transverse Mercator) y en WGS84 (World Geodetic System 1984) del área de estudio las que fueron determinadas mediante el sistema GPS. El área total de estudio es de aproximadamente 0.60 ha.

**Tabla 5**

*Coordenadas Geográficas del Área de Estudio*

Punto	Zona	Norte	Este
V1	18L	8714725	0386645
V2		8714737	0386752
V3		8714751	0386815
V4		8714787	0386842
V5		8714806	0386856
V6		8714818	0386855

*Nota:* Fuente: Elaboración propia.

### 3.2. Toma de muestras de suelo

Se recolectó las muestras de suelo según la Guía Para el Muestreo de Suelos (Ministerio del Ambiente, 2014) y los procedimientos establecidos por CERTIMIN. Se determinó un número de puntos de muestreo de acuerdo a lo indicado por la guía del Ministerio del Ambiente. Ver Tabla 6.

**Tabla 6**

*Número mínimo de puntos de muestreo para el Muestreo de Identificación.*

ÁREA DE POTENCIAL INTERÉS (HA)	PUNTOS DE MUESTREO EN TOTAL
0.1	4
0.5	6
1	9
2	15
3	19
4	21
5	23
10	30
15	33
20	36
25	38
30	40
40	42
50	44
100	50

*Nota:* Fuente: Ministerio del Ambiente (2014).

### **3.3. Lugar de ejecución**

Los ensayos del proyecto de investigación fueron desarrollados en el Laboratorio de Parasitología (LA79) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma ubicado en Av. Benavides 5440, en el distrito de Santiago de Surco, Lima, donde a partir de muestras de suelo se aislaron las bacterias del género *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. La biomasa generada de los microorganismos se aplicó para el tratamiento las muestras de suelo tomadas del área de estudio.

### **3.4. Tipo de investigación**

El estudio es de carácter experimental, debido a que se busca con un tratamiento biológico (biorremediación) reducir los niveles de contaminación de metales en suelos a escala de laboratorio para el aislamiento de bacterias propias del mismo suelo como son *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp.

### 3.5. Variables

Las variables son:

**3.5.1. Variable dependiente:** Capacidad de biorremediación de metales pesados.

**3.5.2. Variable independiente:** Presencia de *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp.

**3.5.3. Variables ambientales:** Humedad, Conductividad eléctrica, Temperatura y pH.

### 3.6. Muestreo

Las muestras de suelo fueron recolectadas el 17 de Julio del 2022 según lo establecido en la Guía Para el Muestreo de Suelos del Ministerio del Ambiente (Ministerio del Ambiente, 2014) y el procedimiento de CERTIMIN, para el Muestreo de Identificación. El área de estudio fue aproximadamente de 0.6 ha, le correspondió un mínimo de 6 puntos los cuales fueron tomadas de forma aleatoria según lo indicado en la Guía del Ministerio del Ambiente, considerando que las 6 muestras tomadas abarquen la totalidad del Área de Estudio y sean muestras representativas. Las coordenadas UTM (Universal Transverse Mercator) y en WGS84 (World Geodetic System 1984) de los puntos de muestreo se enumeran en la Tabla 7.

**Tabla 7**

*Coordenadas Geográficas de Los Puntos de Muestreo*

PUNTO	ZONA	NORTE	ESTE
SU-01	18L	8714741	0386699
SU-02		8714762	0386746
SU-03		8714756	0386779
SU-04		8714773	0386819
SU-05		8714797	0386825
SU-06		8714814	0386851

*Nota:* Fuente: Elaboración propia.

### 3.7. Método de presencia/ausencia de bacterias en el suelo

Se preparó el Caldo Nutritivo de la marca HIMEDIA que permite el crecimiento de microorganismos mediante esta prueba inicial evidenciaremos la presencia, así como ausencia de microorganismos en las muestras de suelo. Se preparó Caldo Nutritivo en la

concentración de 8 gramos en 1 L de agua destilada, en total se prepararon 2 L de Caldo Nutritivo, posteriormente el Caldo Nutritivo se ha distribuido en 12 frascos de vidrio un volumen de 150 mL. Posteriormente se colocaron en autoclave para su esterilización a 121°C durante 15 minutos. Después de enfriar a temperatura ambiente, se agregó 50 g de suelo a cada frasco y fueron colocados en la estufa durante 24 a 48 horas a 35°C.

La fermentación del caldo nutritivo al final del período de incubación demostró de manera concluyente que las bacterias se habían multiplicado. (Turbidez, precipitado y formación de burbujas en el Caldo Nutritivo).

### **3.8. Preparación de medios de cultivo**

Fueron preparados medios de cultivo diferenciado en este caso el Agar Nutritivo y Agar Cetrimide para *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. respectivamente.

El agar se disolvió en agua destilada a razón de 28 g por 1 L para el Agar Nutritivo y 45 g por 1 L para el Agar Cetrimide. Luego, los dos medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Para evitar la contaminación secundaria del medio de cultivo, se roció el espacio de trabajo del Laboratorio de Parasitología con un aerosol de la marca Lysol y se limpió la mesa de trabajo con toallas de papel y alcohol de 70°.

Después de esterilizar el lugar de trabajo y el entorno circundante con un mechero Bunsen, el medio de cultivo se ha distribuido en 60 placas Petri de 100 x 15 mm, de las cuales 30 fueron destinadas para cada medio de cultivo diferenciado, de esas 30 placas, 18 eran para el recuento del número de bacterias y 12 para el ensayo presencia y ausencia de bacterias.

### **3.9. Preparación de diluciones**

En un matraz de 500 mL, se agregaron 25 g de muestra de suelo a 225 mL de agua peptonada y se agitó hasta que la mezcla fue uniforme. Luego, utilizando una pipeta de 10 mL y una pipeta mecánica, se pipetearon 9 mL de agua peptonada en doce tubos de

ensayo de 16 x 100 mm. Después de eso, se utilizaron tapones de rosca de plástico de baquelita para sellar herméticamente los tubos antes de esterilizarlos en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Luego se desinfectó el área de trabajo del Laboratorio de Parasitología con un aerosol de la marca Lysol y la mesa de trabajo con papel toalla y alcohol de 70° para evitar contaminación secundaria en los medios de cultivo, se realizaron las diluciones frente al mechero Bunsen.

Las diluciones necesarias se escribieron en las etiquetas de los tubos de ensayo para facilitar este proceso ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ ), se tomó una muestra de 1000  $\mu\text{L}$  o 1 mL de la mezcla de suelo previamente preparada con agua peptonada utilizando una micropipeta, y se transfirió al tubo de ensayo asignado para la dilución  $10^{-2}$ , después de poner la tapa, se homogeneizó en el mezclador vórtex durante 1 minuto. Luego de eso, se transfirió 1000  $\mu\text{L}$  o 1 mL, de la dilución  $10^{-2}$  al tubo de ensayo que contenía el contenido de la dilución  $10^{-3}$  y la mezcla se homogeneizó en el agitador vórtex durante 1 minuto.

Se prepararon muestras de suelo en varias concentraciones ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ) antes de sembrarlas mediante la técnica de disseminación sobre una superficie de agar en un volumen de 100  $\mu\text{L}$  equivalente a 0.1 mL.

### **3.10. Siembra de muestras**

Previamente a la técnica de siembra de las muestras obtenidas de la dilución  $10^{-3}$ , se desinfectó el área de trabajo del Laboratorio de Parasitología con un aerosol de la marca Lysol y la mesa de trabajo con papel toalla y alcohol de 70° para evitar contaminaciones secundarias en los medios de cultivo. Luego, las placas Petri con Agar Nutritivo y Agar Cetrimide fueron utilizadas para la siembra. El asa de Drigalsky se esterilizó con el mechero Bunsen y luego se abrió con cuidado una placa de Petri por un extremo. Posteriormente, se introdujeron en ella 100  $\mu\text{L}$  de la dilución  $10^{-3}$  con la ayuda de una micropipeta, utilizando un asa de Drigalsky que había pasado por el proceso de esterilización, la dilución se distribuyó uniformemente sobre la superficie del Agar Nutritivo y del Agar Cetrimide, y la

placa se selló rápidamente para evitar la contaminación, este proceso se hizo por triplicado para el recuento de bacterias de *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. respectivamente. Se siguió el mismo paso con las diluciones  $10^{-3}$  para todas las muestras de suelo realizando por triplicado para cada dilución de muestras de suelo obteniendo 18 placas Petri en total para cada especie de bacterias. Luego, las placas de Petri fueron colocados en la estufa a 37 °C durante 24 horas.

Posteriormente se esterilizó el asa de Kolle para hacer la siembra para el ensayo presencia y/o ausencia de *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. en las muestras, este proceso se hizo por duplicado para cada dilución  $10^{-3}$  de cada muestra de suelo. En total se obtuvo 12 placas Petri en total para cada especie de bacteria.

Posteriormente se ha observado el crecimiento de las colonias en las Placas Petri sembradas y se documentó una descripción morfológica detallada de cada colonia. Esta descripción incluyó parámetros como color, forma, tamaño, textura, entre otros, y también se generaron registros fotográficos de las colonias observadas.

### **3.11. Aislamiento de microorganismos**

Luego de la siembra de muestras, los microorganismos que crecieron en los medios de cultivos diferenciales fueron seleccionados para realizar la evaluación macroscópica para analizar si pertenecen al género *Bacillus* sp. o al género *Pseudomonas* sp.

Para el aislamiento de microorganismos de las muestras de suelo, se escogen las cepas que correspondían a los géneros *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp., para generar la biomasa de las cepas de *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp.

Se desinfectó el área de trabajo del Laboratorio de Parasitología con un aerosol de la marca Lysol y la mesa de trabajo con papel toalla y alcohol de 70° para evitar contaminaciones secundarias en los medios de cultivo. Luego, se colocó las placas Petri contenidas de Agar Nutritivo y Agar Cetrimide frente al mechero Bunsen. A cada placa de Petri se le asignó un código único. Se utilizó un asa bacteriológica circular de 5 mm de

diámetro y esterilizada en mechero Bunsen, se dejó enfriar durante aproximadamente 5 segundos y se abrió cuidadosamente una placa Petri para sembrar la cepa. Posteriormente, el asa bacteriológica se sometió nuevamente a esterilización. Las colonias adicionales se trataron de la misma manera. Las placas de Petri fueron colocadas en una estufa a 37°C durante 24 horas para el crecimiento de los microorganismos.

### **3.12. Siembra de *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. de las colonias de cepas**

Los medios de cultivo diferenciales de Agar Cetrimide y Agar Nutritivo se utilizaron para *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. respectivamente, para cada medio de cultivo en la proporción de 22.5 g de Agar Cetrimide en 500 mL de agua destilada y de 14 g de Agar Nutritivo en 500 mL de agua destilada. Ambos medios fueron agitados lentamente y calentados parcialmente para lograr una homogenización de los medios de cultivo, posteriormente se llevó a esterilizar los medios de cultivo en autoclave a 120 °C durante 15 minutos.

Para evitar la contaminación secundaria del medio de cultivo, se roció el espacio de trabajo del Laboratorio de Parasitología con un aerosol desinfectante de marca Lysol y se limpió la superficie de trabajo con toallas de papel y alcohol de 70°. Luego se vertieron aproximadamente 20 mL de cada medio en cada placa de Petri logrando obtener 25 placas para cada medio de cultivo. A continuación, se empleó la Técnica de Punción, que consistió en perforar cuidadosamente el centro de la placa para extraer una pequeña muestra de las colonias obtenidas (apartado 3.11). El mango recto se esterilizó en un mechero Bunsen, antes de transferir la muestra a una placa Petri que contenía medio de cultivo diferencial. Luego las placas Petri fueron colocados en estufa a 37°C durante 24 h para el desarrollo de las colonias de las cepas elegidas.

Mediante este método de siembra se logró observar las características macroscópicas de colonias y mediante tinción diferencial de Gram las características microscópicas de las cepas seleccionadas de las muestras de suelo.

### **3.13. Observación macroscópica de *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp.**

Las colonias crecidas en los medios de cultivo de Agar Nutritivo y Agar Cetrímide para *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. respectivamente fueron evaluadas según las características morfológicas como diámetro, consistencia, forma, bordes, superficie, color, presencia o ausencia de brillo; se realizó la clasificación de las colonias hasta el taxón género según los criterios establecidos morfológicamente de la colonia contrastados con el Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática, volumen 2 (Brenner et al., 2005) y volumen 3 (Vos et al., 2009). Se evidenciaron con registro fotográfico correspondiente para cada colonia de las cepas.

### **3.14. Observación microscópica de *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp.**

Las cepas aisladas del suelo contaminado, *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. se sometieron a caracterización microscópica empleando la técnica de tinción diferencial de Gram, que es un tipo de tinción diferencial comúnmente empleada para visualizar bacterias. Este método implica el uso de Cristal Violeta, Safranina, Lugol y un Decolorante.

Previamente se desinfectó el laboratorio de Parasitología con Lysol y la mesa de trabajo con papel toalla y alcohol de 70°, esta técnica consiste en sembrar con un asa de Kolle esterilizada a fuego directo sobre un mechero Bunsen una cantidad óptima de la colonia obtenidas (inciso 3.12) sobre la lámina portaobjetos con una gota en agua destilada. Luego se dejó secar la lámina portaobjetos al fuego del mechero cuidadosamente durante aproximadamente 5 minutos evidenciándose luego del secado la existencia de una mancha sobre la lámina portaobjetos. Posteriormente se agregaron con la ayuda de goteros los colorantes de tinción Gram de la siguiente manera; una gota de Cristal de Violeta encima de la muestra ya fijada al calor durante 1 minuto, después de lavar con agua destilada, se agregó una gota de Lugol durante 1 minuto antes de enjuagarla nuevamente y se agregó unas gotas de decolorante. Finalmente, se agregó una gota de Safranina, se volvió a enjuagar con agua destilada. Luego se dejó secar la lámina

con la muestra durante 5 minutos sobre el mechero. Posteriormente, se colocó en el microscopio la lámina coloreada para su observación en objetivo de 100x.

### **3.15. Pruebas bioquímicas para *Bacillus* sp.**

#### **3.15.1. Hidrólisis de almidón en placa**

Colocar en un frasco 250 mL de agua destilada, luego agregar 7.5 g de agar Nutritivo y 7.5 g de almidón (maicena). Luego homogenizar por agitación el medio de cultivo formado. Después de eso, se esterilizó en autoclave los medios de cultivo a 121 grados Celsius durante 15 minutos.

Se desinfectó el Laboratorio de Parasitología con Lysol y la mesa de trabajo con papel toalla y alcohol de 70°, para que posteriormente se vierta el medio de cultivo de agar almidón un volumen de aproximadamente 20 mL de medio en cada placa de Petri. Después con la ayuda de un asa de Kolle esterilizada a fuego directo en un mechero Bunsen se tomó una pequeña muestra de las colonias de cepas obtenidas (inciso 3.12) para sembrar utilizando la técnica de estría simple que consiste en hacer un rayado suave en forma de zigzag en la placa de Petri conteniendo los medios de cultivo de agar Almidón. Las colonias de cepas fueron colocadas en la estufa durante 24 horas a 37 grados Celsius. El propósito de esta prueba es determinar la producción de la exoenzima  $\alpha$ -amilasa. Se agregó con la ayuda de un gotero de 2 a 3 gotas de lugol para que cubran el cultivo; el resultado será positivo si se produce un área clara alrededor del cultivo y será negativo si se produce un color azul oscuro alrededor del cultivo.

#### **3.15.2. Prueba de lecitinasa**

Se colocó en un frasco 250 mL de agua destilada, luego se agregó 7.5 g de agar Nutritivo. Una vez preparado el medio de cultivo, se agitó para asegurar la uniformidad. Luego se colocó el medio de cultivo en autoclave a 121 ° C durante 15 minutos. Después de que el agar nutritivo se hubiera enfriado a 48 °C después de haber sido esterilizado en una autoclave, se añadió la emulsión de yema de huevo estéril.

Posteriormente se desinfectó el Laboratorio de Parasitología con Lysol y la mesa de trabajo con papel toalla y alcohol de 70°, para que posteriormente se vierta el medio de cultivo de agar almidón un volumen de aproximadamente 20 mL de medio en cada placa de Petri. Luego con la ayuda de un asa de Kolle esterilizada a fuego directo en un mechero Bunsen se tomó una pequeña muestra de las colonias de cepas obtenidas (inciso 3.12) para sembrar utilizando la técnica de estría simple que consiste en hacer un rayado suave en forma de zigzag en la placa de Petri conteniendo los medios de cultivo de agar Nutritivo más yema de huevo. Las colonias de la cepa fueron colocadas en la estufa durante 24 horas a una temperatura de 37°C. El objetivo de este experimento es determinar la producción de esta enzima por microorganismos específicos, que poseen la capacidad de actuar sobre la lecitina, un compuesto orgánico que se encuentra principalmente en la yema del huevo y que contiene nitrógeno y fosfato. Se logra un resultado positivo cuando el crecimiento microbiano da como resultado la formación de una zona opaca alrededor de la lecitina de yema de huevo hidrolizada.

### **3.15.3. Hidrólisis de gelatina**

Se puso en un frasco 250 mL de agua destilada, luego se agregó 7.5 g de agar Nutritivo y luego se agregó 10 g de gelatina. Luego se homogenizó por agitación el medio de cultivo agar Nutritivo con gelatina. Luego, el medio se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Posteriormente se desinfectó el Laboratorio de Parasitología con Lysol y la mesa de trabajo con papel toalla y alcohol de 70°, para que luego se vierta el medio de cultivo de agar Nutritivo con gelatina un volumen de aproximadamente 20 mL de medio en cada placa Petri. Después con la ayuda de un asa de Kolle esterilizada a fuego directo en un mechero se tomó una pequeña muestra de las colonias de cepas obtenidas (inciso 3.12) para sembrar utilizando la técnica de estría simple que consiste en hacer un rayado lineal suave en la placa de Petri conteniendo el medio de cultivo de agar Nutritivo con gelatina. Las colonias de cepas fueron colocadas en estufa durante 24 horas a 37 °C. Luego post-

incubación se colocaron las placas en la nevera durante 30 minutos. El propósito de esta prueba es la producción de la exoenzima gelatinasa. El resultado será positivo si la gelatina se mantiene líquida al sacarla de la nevera y negativa si se solidifica.

#### **3.15.4. Prueba del citrato**

Esta prueba bioquímica se creó utilizando agar citrato Simmons, que revelará si las colonias de cepas utilizan citrato como fuente de carbono. Durante 15 minutos a 121 °C, se esterilizó en autoclave agar citrato de Simmons. Después con la ayuda de una pipeta se colocó 3 mL de agar de citrato de Simmons en tubos de ensayo, luego se dejó enfriar los tubos con un ligero ángulo de inclinación. Luego con la ayuda de un asa de Kolle esterilizada a fuego directo en un mechero Bunsen se tomó una pequeña muestra de las colonias de cepas obtenidas (inciso 3.12) para sembrar utilizando la técnica de estría simple de cultivos de las cepas en los tubos conteniendo el medio de agar de citrato de Simmons. Luego, los tubos de ensayo de cada cepa fueron colocadas en la estufa a 37 °C durante 24 horas. El resultado será positivo cuando se torne de color azul que indica condiciones alcalinas cuando el ácido cítrico se metaboliza, se produce amonio y  $\text{Na}^+$  y el resultado es negativo de color verde.

#### **3.15.5. Crecimiento a diferente concentración de NaCl**

Se puso en un frasco 500 mL de agua destilada, luego se agregó 14 g de agar Nutritivo. Luego se homogenizó por agitación el medio de cultivo agar Nutritivo. Después, se le colocó en cuatro frascos de 150 mL un volumen de 100 mL de agar nutritivo preparado anteriormente, luego se agregó NaCl al 2%, 7%, 10% y 15%, posteriormente se colocó con una pipeta un volumen de 5 mL a 12 tubos de ensayo para las 4 concentraciones de agar nutritivo con NaCl. Luego se colocó los tubos de ensayo en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Después, con la ayuda de un asa recta, esterilizada a fuego directo en un mechero, se tomó una pequeña muestra de las colonias de cepas obtenidas (inciso 3.12) para sembrar utilizando la técnica de Punción que consiste en introducir una muestra

representativa en el medio líquido. Los tubos de ensayo que contenían las distintas cepas en cada concentración fueron colocados en la estufa a 37°C durante 24 horas para permitir que se desarrollaran las colonias de cepas. El resultado es positivo si se torna turbia el medio de cultivo líquido y será negativa si se mantiene el color inicial del medio líquido.

### **3.15.6. Crecimiento de cepas a diferentes pH**

Se colocó en un frasco 500 mL de agua destilada, luego se agregó 14 g de agar Nutritivo, homogenizó por agitación el medio de cultivo. Luego, se distribuyó en cuatro frasco de 150 ml un volumen de 100 mL de agar nutritivo preparado anteriormente. Posteriormente se le agregó vinagre al medio de cultivo de agar nutritivo un volumen para obtener un pH de 3 y 5 respectivamente; y se agregó hidróxido de sodio al medio de agar nutritivo para obtener un pH de 10. Se colocó con una pipeta un volumen de 5 mL a 12 tubos de ensayo para las 3 concentraciones de pH. Después, se colocaron los tubos de ensayo en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Posteriormente, con la ayuda de un asa recta esterilizada a fuego directo en un mechero Bunsen se tomó una pequeña muestra de las colonias de cepas obtenidas (inciso 3.12) para sembrar utilizando la técnica de Punción que consiste en introducir una muestra representativa en el medio líquido. Posteriormente, los tubos de ensayo que contenían las distintas cepas en cada concentración fueron colocadas en la estufa a 37 °C durante 24 horas. El resultado es positivo si se torna turbia el medio de cultivo líquido y será negativa si se mantiene el color inicial del medio líquido.

### **3.16. Pruebas bioquímicas para *Pseudomonas* sp.**

#### **3.16.1. Prueba de oxidasa**

Con la ayuda de tiras de oxidasa, se procedió a realizar la prueba de oxidasa para cada colonia de cepa obtenida para las *Pseudomonas* sp., con este método podemos determinar si la enzima oxidasa está presente o no. Se tomó una muestra representativa de las cepas de colonias obtenidas con la ayuda de un asa de Kolle esterilizada a fuego directo en un mechero Bunsen dicha muestra fue colocada en la tira de oxidasa cubriendo

toda la parte que contiene el medio de evaluación de oxidasa. El resultado es positivo si se torna un color azul/púrpura el cambio es notable en aproximadamente 15 segundos y será negativo si permanece del mismo color.

### 3.17. Diseño experimental de tratamiento

Para este procedimiento, se seleccionaron doce cepas de *Bacillus* sp. y tres cepas de *Pseudomonas* sp., las cepas enumeradas en la Tabla 8 se seleccionaron en función de sus diversos atributos, que abarcan factores como tamaño (pequeño, mediano, grande), color (blanco, amarillo, marrón, verdoso), brillo de la superficie, textura (seca, mucoide), apariencia del borde. (lisa, ondulada, estriada, filamentosa) y elevación (plana, convexa, elevada, umbeliforme, etc.).

**Tabla 8**

*Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. utilizados en la biorremediación.

Nº DE CEPA AISLADA	CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	TRATAMIENTO A SER INCORPORADO	MUESTRA DE SUELO
Cepa Nº 1	<i>Bacillus</i> sp.	Tratamiento Nº 1	SU-01
Cepa Nº 2	<i>Bacillus</i> sp.	Tratamiento Nº 1	SU-01
Cepa Nº 3	<i>Bacillus</i> sp.	Tratamiento Nº 1	SU-01
Cepa Nº 4	<i>Bacillus</i> sp.	Tratamiento Nº 2	SU-04
Cepa Nº 5	<i>Bacillus</i> sp.	Tratamiento Nº 2	SU-04
Cepa Nº 6	<i>Bacillus</i> sp.	Tratamiento Nº 2	SU-04
Cepa Nº 7	<i>Bacillus</i> sp.	Tratamiento Nº 4	SU-03
Cepa Nº 8	<i>Bacillus</i> sp.	Tratamiento Nº 4	SU-03
Cepa Nº 9	<i>Bacillus</i> sp.	Tratamiento Nº 4	SU-03
Cepa Nº 10	<i>Bacillus</i> sp.	Tratamiento Nº 3	SU-06
Cepa Nº 11	<i>Bacillus</i> sp.	Tratamiento Nº 3	SU-06
Cepa Nº 12	<i>Bacillus</i> sp.	Tratamiento Nº 3	SU-06
Cepa Nº 13	<i>Pseudomonas</i> sp.	Tratamiento Nº 1, Nº 2, Nº3 y Nº 4	SU-03, SU-06, SU-04, SU-01
Cepa Nº 14	<i>Pseudomonas</i> sp.		
Cepa Nº 15	<i>Pseudomonas</i> sp.		

Nota: Fuente: Elaboración propia.

### 3.18. Realización de tratamientos

Muestras de suelo de Yauli, La Oroya, que estaban contaminadas con metales, se almacenaron en 12 recipientes de plástico transparente, cada uno de los cuales medía 35 cm de largo, 12 cm de alto y 20 cm de ancho, y contenían un total de 6 L.

De cada muestra de suelo obtenida durante la fase de identificación del sitio que fueron SU-01, SU-02, SU-03, SU-04, SU-05 y SU-06, se colocaron aproximadamente 3 kg de suelo en los envases de recipientes plásticos de capacidad de 6 L obteniendo 12 submuestras de las 6 muestras generales, asignándoles los siguientes rótulos SU-01<sub>(1)</sub>, SU-01<sub>(2)</sub>, SU-02<sub>(1)</sub>, SU-02<sub>(2)</sub>, SU-03<sub>(1)</sub>, SU-03<sub>(2)</sub>, SU-04<sub>(1)</sub>, SU-04<sub>(2)</sub>, SU-05<sub>(1)</sub>, SU-05<sub>(2)</sub>, SU-06<sub>(1)</sub> y SU-06<sub>(2)</sub>, de esta manera, se adquirieron doce contenedores de plástico para su uso en la implementación del tratamiento.

Posteriormente, se le aplicó 600 mL del Tratamiento N° 1, que viene siendo la combinación de 200 mL de las cepa N° 1, cepa N° 2, cepa N° 3, Tratamiento N° 2 que viene siendo la combinación de 200 mL de las cepa N° 4, cepa N° 5, cepa N° 6, Tratamiento N° 3 que viene siendo la combinación de 200 mL de las cepa N° 10, cepa N° 11, cepa N° 12 y Tratamiento N° 4 que viene siendo la combinación de 200 mL de las cepa N° 7, cepa N° 8 y cepa N° 9, esta distribución de tratamientos se desarrolló para las con las cepas de *Bacillus* sp.

De manera posterior, se le aplicó 600 mL del Tratamiento N° 1, que viene siendo la combinación de 200 mL de las cepa N° 13, cepa N° 14, cepa N° 15, Tratamiento N° 2 que viene siendo la combinación de 200 mL de las cepa N° 13, cepa N° 14, cepa N° 15, Tratamiento N° 3 que viene siendo la combinación de 200 mL de las cepa N° 13, cepa N° 14, cepa N° 15 y Tratamiento N° 4 que viene siendo la combinación de 200 mL de las cepa N° 13, cepa N° 14 y cepa N° 15, esta distribución de tratamientos se desarrolló para las con las cepas de *Pseudomonas* sp.

Después, se le aplicó 600 mL del Tratamiento N° 1, que viene siendo la combinación de 100 mL de las cepa N° 1, cepa N° 2, cepa N° 3, cepa N° 13, cepa N° 14 y

cepa N° 15 Tratamiento N° 2 que viene siendo la combinación de 100 mL de las cepa N° 4, cepa N° 5, cepa N° 6, cepa N° 13, cepa N° 14, cepa N° 15, Tratamiento N° 3 que viene siendo la combinación de 100 mL de las cepa N° 10, cepa N° 11, cepa N° 12, cepa N° 13, cepa N° 14, cepa N° 15 y Tratamiento N° 4 que viene siendo la combinación de 100 mL de las cepa N° 7, cepa N° 8, cepa N° 9, cepa N° 13, cepa N° 14 y cepa N° 15, esta distribución de tratamientos se desarrolló para el tratamiento combinado con las cepas de *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp.

La evaluación de los tratamientos tuvo una duración de un mes, dentro de este tiempo se aplicó la biomasa quincenalmente es decir en dos periodos: al inicio del tratamiento y a mitad del tiempo de tratamiento, con un periodo de aireación del tratamiento de cada tres días con la ayuda de un tenedor de madera, se usó este material de madera para evitar la contaminación cruzada con metales. Posteriormente, las muestras de suelo procesadas se dividieron en bolsas de polietileno herméticas, se marcaron adecuadamente y luego se transportaron al laboratorio de CERTIMIN según el protocolo de muestreo de suelo. Las muestras se encerraron en bolsas de polietileno de 1 kg, se sellaron con cinta adhesiva y se almacenaron en una hielera aséptica esterilizada y limpiada con algodón y alcohol al 70%. De igual forma, en CERTIMIN, luego de la implementación de los tratamientos bacterianos, se realizaron análisis del nivel de concentración final de metales utilizando el Método EPA 9045 D Rev.4. 2004. La evaluación del pH del suelo y los residuos se realizó empleando métodos EPA 3050B Rev.2.1996, 6010D Rev.5.2018, and 6020 B Rev.2.2014. Adicionalmente, el análisis implicó el uso de espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente y espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente para la digestión ácida de sedimentos, lodos y suelos, método aprobado por INACAL (Instituto Nacional de la Calidad). Sin embargo, el equipo de laboratorio utilizado en este estudio se lavó con agua y jabón antes de esterilizarlo a 121°C durante 15 minutos para eliminar cualquier microbio con el que pudieran haber entrado en contacto residuos biológicos peligrosos.

### 3.19. Obtención de biomasa bacteriana

Se preparó 7.5 L de caldo nutritivo el cual se dispuso en 15 frascos un volumen de 500 mL para luego ser esterilizados en autoclave a 121°C por 15 min.

Luego a las 15 cepas, se les asignaron números de identificación únicos y se desinfectó el Laboratorio de Parasitología con Lysol, toallas de papel y alcohol de 70°. Con la ayuda de un asa Kolle esterilizada a fuego directo en un mechero Bunsen se tomó una pequeña muestra de las colonias de cepas obtenidas (inciso 3.12) para sembrar utilizando la técnica de Punción que consiste en introducir una muestra representativa en el medio líquido. Repitiendo este proceso con las otras 14 cepas, las cepas de las bacterias fueron colocadas en la estufa durante 24 horas a 37°C en matraces que contenían las 15 cepas.

### 3.20. Cálculo del Factor de contaminación

El factor de contaminación ( $C_f^i$ ), es ampliamente utilizado para evaluar la contaminación a través de la relación de la concentración de un analito del suelo frente a los valores de referencia o control. El índice de Factor de contaminación se calcula conforme a la ecuación 1:

$$C_f^i = \frac{C_n}{B_n} \quad (1)$$

Donde:

$C_n$ : Concentración medida del metal contaminante  $n$  ( $\frac{mg}{kg}$ ).

$B_n$ : Es el valor de referencia del contaminante  $n$  ( $\frac{mg}{kg}$ ). En este caso se empleará el nivel de referencia señalada en la normativa peruana D.S – 011 – 2017 – MINAM, para suelos industriales – extractivos para los metales que hacen referencia, CCME de Canadá y del CONAMA 2010 para los metales en la normativa nacional no contempla.

**Tabla 9**

*Clasificación de niveles de contaminación de suelos de acuerdo al cálculo del  $C_f^i$ .*

VALOR $C_f^i$	NIVEL DE CONTAMINACIÓN
< 1.5	Nula a baja contaminación
1.5 – 2.0	Baja Contaminación
2.0 – 4.0	Moderada Contaminación
4.0 – 8.0	Alta contaminación
8.0 – 16.0	Muy alta contaminación
16.0 – 32.0	Extremadamente alta contaminación
> 32.0	Ultra alta contaminación

*Nota:* Fuente Abraham y Parker (2008).

### **3.21. Determinación de riesgo ecológico**

Los factores de riesgo ecológico ( $Eri$ ) fueron introducidos por primera vez por Hakanson en 1980 como un medio para cuantificar el daño potencial que una determinada concentración de contaminantes puede causar a los ecosistemas bióticos y abióticos circundantes.

Por consiguiente, la siguiente ecuación 2, para calcular dicho factor es:

$$Eri = Tri * Cfi \quad (2)$$

Donde:

$Tri$  = Factor de respuesta tóxica

$Cfi$  = Factor de contaminación

**Tabla 10**

*Niveles de riesgo ecológico.*

<b>RANGO DEL FACTOR</b>	<b>CRITERIO</b>
< 150	Bajo riesgo ecológico potencial.
150 – 300	Moderado riesgo ecológico potencial.
300 – 600	Considerable riesgo ecológico potencial.
> 600	Muy alto riesgo ecológico potencial.

*Nota:* Fuente Saeedi y Zanjani (2015).

## Capítulo IV. Análisis y discusión de resultados

### 4.1. Caracterización fisicoquímica del suelo

Los informes de ensayo del análisis de caracterización fisicoquímica realizados en el laboratorio acreditado "CERTIMIN" para análisis de muestras ambientales sobre el pH, conductividad, humedad y barrido de metales; las concentraciones se aprecian en la Tabla 11.

**Tabla 11**

*Características fisicoquímicas de las muestras de suelo de nuestra área de estudio.*

PARÁMETRO	SU-01	SU-02	SU-03	SU-04	SU-05	SU-06	MEDIA
pH	2.63	2.65	2.78	2.81	2.70	2.68	2.71
Conductividad	436	420	395	398	413	419	413.50
Humedad	15.53	20.35	17.11	15.92	15.80	14.12	16.47
Ag	59.2	57.2	58.7	61.0	55.4	57.6	58.18
Al	1361	1594	1866	2129	1461	1701	1685.33
As	814.3	880.3	906.5	980.3	883.8	926.3	898.58
B*	26.5	16.0	29.0	28.1	25.4	20.5	24.25
Ba	210	198	219	15	203	261	184.33
Be	< 0.4	< 0.4	< 0.4	< 0.4	< 0.4	< 0.4	<0.4
Bi*	78	77	72	73	74	75	74.83
Ca	8453	9775	8635	9813	8932	9554	9193.67
Cd	16.19	13.83	15.55	16.02	13.27	12.51	14.56
Co	4.18	4.14	3.84	4.40	3.48	3.25	3.88
Cr	2.2	2.4	2.9	2.9	2.3	2.5	2.53
Cu	2030	1710	1820	1950	1730	1630	1811.67
Fe	64267	63999	65486	72853	59187	59387	64196.50
K	2281	2549	2381	2423	2392	2530	2426
Mg	1640	1855	2210	2575	1727	2022	2004.83
Mn	180	206	227	250	186	193	207
Mb	26.47	28.54	26.66	29.92	28.82	35.47	29.31

<b>Na</b>	204	206	198	188	198	198	198.67
<b>Ni</b>	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
<b>P*</b>	269	277	320	323	278	288	292.50
<b>Pb</b>	2518.7	2539.8	2374.8	2264.2	2456.4	2373.5	2421.23
<b>Se</b>	3.4	3.6	3.6	3.7	3.6	3.3	3.53
<b>Sb</b>	72	68	75	58	75	85	72.17
<b>Sn*</b>	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
<b>Sr*</b>	23.7	25.7	25.0	21.6	25.1	25.7	24.47
<b>Ti*</b>	< 100	< 100	103	102	< 100	102	102.33
<b>Tl</b>	0.84	0.85	0.85	0.81	0.87	0.90	0.85
<b>V</b>	7	8	9	10	7	8	8.17
<b>Zn</b>	5014.1	4099.2	4594.5	5068.6	4322.1	3854.8	4492.22

*Nota:* Fuente: Informe de Ensayo N° JUL 1179.R22.

#### **4.2. Determinación del Factor de contaminación.**

Calculando del índice del Factor de contaminación ( $C_f^i$ ) para los metales donde existe normativa ambiental en el ámbito nacional, así como internacional se obtiene la Tabla 12.

**Tabla 12***Grado de Factor de contaminación*

METAL	CONCENTRACIÓN	NORMATIVA	$C_f^i$
	<i>mg/kg</i>		
Plata (Ag)	58.18	100	0.582
Arsénico (As)	898.58	140	6.418
Bario (Ba)	184.33	2000	0.092
Cadmio (Cd)	14.56	22	0.662
Cobalto (Co)	3.88	300	0.013
Cromo (Cr)	2.53	1000	0.003
Cobre (Cu)	1811.67	600	3.019
Molibdeno (Mo)	29.31	40	0.733
Plomo (Pb)	2421.23	800	3.027
Selenio (Se)	3.53	2.9	1.218
Antimonio (Sb)	72.17	40	1.804
Talio (Tl)	0.85	1	0.853
Vanadio (V)	8.17	130	0.063
Zinc (Zn)	4492.22	410	10.957

*Nota:* Fuente: Elaboración propia.

Luego de determinar el Factor de Contaminación ( $C_f^i$ ) y comparándolo con la Tabla 9, se obtiene que los metales presentan los siguientes niveles de contaminación, se determina en la Tabla 13.

**Tabla 13***Niveles de contaminación del suelo por metales.*

METAL	$C_f^i$	NIVEL DE CONTAMINACIÓN DEL SUELO POR METALES
Plata (Ag)	0.582	Nula a baja contaminación por Plata
<b>Arsénico (As)</b>	<b>6.418</b>	<b>Alta contaminación por Arsénico</b>
Bario (Ba)	0.092	Nula a baja contaminación por Bario
Cadmio (Cd)	0.662	Nula a baja contaminación por Cadmio
Cobalto (Co)	0.013	Nula a baja contaminación por Cobalto
Cromo (Cr)	0.003	Nula a baja contaminación por Cromo
<b>Cobre (Cu)</b>	<b>3.019</b>	<b>Moderada contaminación por Cobre</b>
Molibdeno (Mo)	0.733	Nula a baja contaminación por Molibdeno
<b>Plomo (Pb)</b>	<b>3.027</b>	<b>Moderada contaminación por Plomo</b>
Selenio (Se)	1.218	Nula a baja contaminación por Selenio.
Antimonio (Sb)	1.804	Baja contaminación por Antimonio.
Talio (Tl)	0.853	Nula a baja contaminación por Talio.
Vanadio (V)	0.063	Nula a baja contaminación por Vanadio.
<b>Zinc (Zn)</b>	<b>10.957</b>	<b>Muy alta contaminación por Zinc.</b>

*Nota:* Fuente: Elaboración propia.

Después de realizar los diferentes niveles de contaminación para cada metal, se trabajó con los metales que generan ultra alta, extremadamente alta, muy alta, alta y moderada contaminación, los cuales son el **arsénico, cobre, plomo y zinc** que vienen a ser metales pesados, adicionalmente a estos metales se agregaron **plata y cadmio** por ser metales pesados de gran interés.

#### **4.3. Rangos del riesgo ecológico potencial**

En el cálculo de los rangos del riesgo ecológico potencial se debe tener en consideración los factores de respuesta toxica para metales. En la Tabla 14 se calcula el riesgo ecológico potencial para los metales que presentan nivel de contaminación moderado, alto y muy alto, adicionalmente los metales pesados de interés que son plata y cadmio.

**Tabla 14***Determinación del riesgo ecológico potencial.*

METAL	$C_f^i$	FACTOR DE RESPUESTA TÓXICA $Tri$	RIESGO ECOLÓGICO POTENCIAL $RI = Cif \times Tri$
Arsénico (As)	6.418	10	64.18
Cobre (Cu)	3.019	5	15.10
Plomo (Pb)	3.027	5	15.14
Zinc (Zn)	10.957	1	10.96
<b>RIESGO ECOLÓGICO POTENCIAL</b>			<b>105.38</b>

*Nota:* Fuente: Elaboración propia.

Luego de calcular el riesgo ecológico potencial de metales pesados de que presentan un grado de contaminación mencionados anteriormente y comparándolo con la Tabla 10, se obtiene un nivel de bajo riesgo ecológico potencial lo cual nos indica que no es impedimento para desarrollar la fauna y flora en nuestra área de estudio, esto se puede evidenciar que en nuestra área de estudio muestra una vegetación que viene a ser *Stipa lchu*.

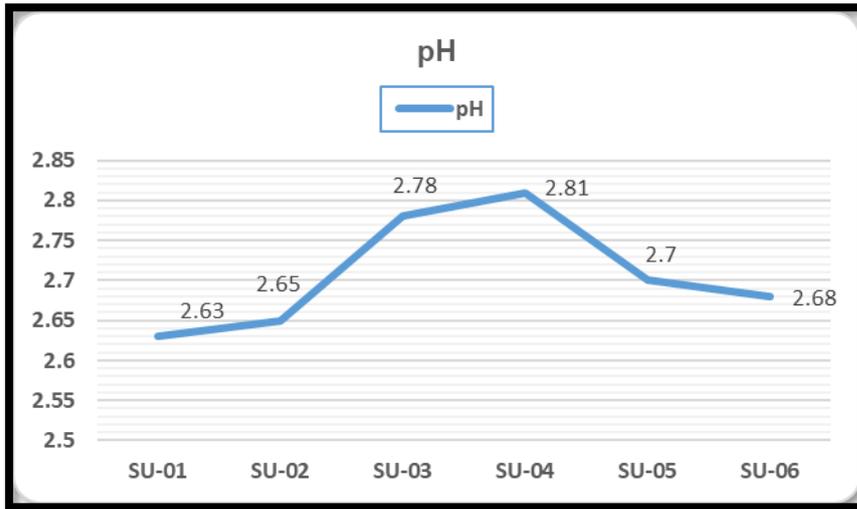
Adicionalmente la fuente de contaminación de aguas acidas fue eliminado con la construcción de la Planta de Tratamiento del Túnel Kingsmill la cual empezó a operar a partir del 2010 captando y tratando todas las aguas acidas de labores subterráneas y vertiendo agua tratada cumpliendo el D.S. 010-2010-MINAM.

#### **4.4. Interpretación de los resultados**

Con relación al pH, se ha observado un valor máximo de 2.81 unidades de pH correspondiente al SU-04 y un valor mínimo de 2.63 unidades de pH correspondiente al SU-01, el valor promedio del pH para las muestras de suelo es de 2.71 unidades de pH, esto nos indica que nuestra área de estudio tiene un pH ácido. Se detalla en Figura 6.

**Figura 6**

*Niveles de pH en las muestras de suelo.*

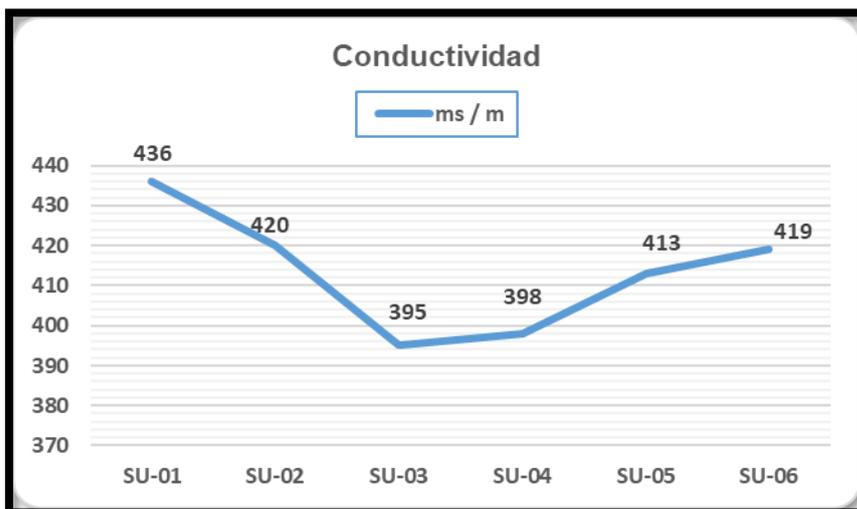


*Nota:* Fuente: Elaboración propia.

Con relación a la conductividad, se ha observado un valor máximo de 436 ms/m. correspondiente al SU-01 y un valor mínimo de 395 ms/m correspondiente al SU-03, el valor promedio de la conductividad para las muestras de suelo es de 413.50 ms/m. Se detalla en Figura 7. Es un suelo con una alta concentración de sales solubles.

**Figura 7**

*Conductividad en las muestras de suelo.*

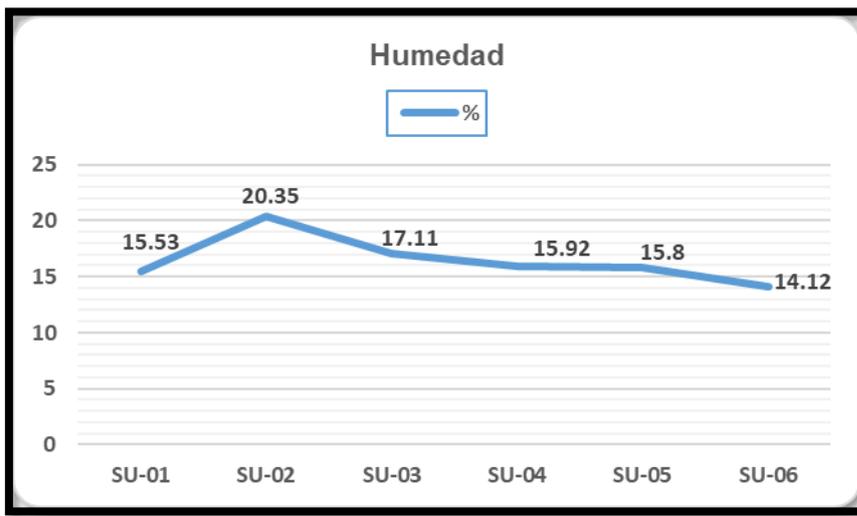


*Nota:* Fuente: Elaboración propia.

Con relación a la humedad, se ha observado un valor máximo de 20.35 % correspondiente al SU-02 y un valor mínimo de 14.12 % correspondiente al SU-06, el valor promedio de la humedad para las muestras de suelo es de 16.47 %. Se detalla en Figura 8.

**Figura 8**

*Humedad de las muestras de suelo.*

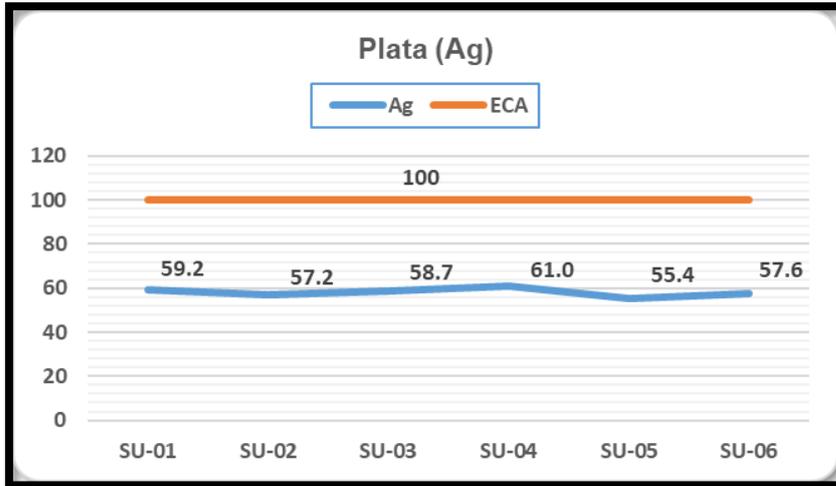


*Nota:* Fuente: Elaboración propia.

Con relación a la Plata, se ha observado un valor máximo de 61 *mg/kg* correspondiente al SU-04 *mg/kg* y un valor mínimo de 55.4 correspondiente al SU-05, el valor promedio de concentración de Plata para las muestras de suelo es de 58.18 *mg/kg*, para todas las muestras la concentración está por debajo del límite que fue impuesto en la normativa del CONAMA. Se detalla en Figura 9.

**Figura 9**

*Concentración de Plata en las muestras de suelo.*

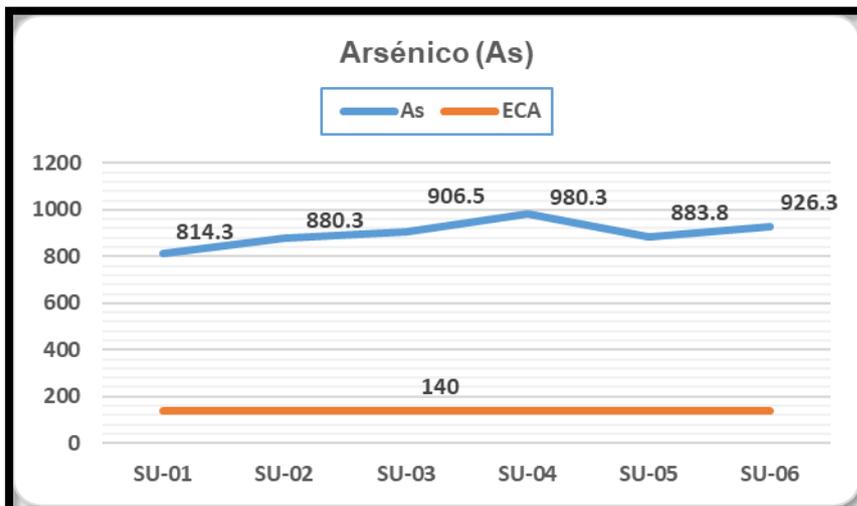


*Nota:* Fuente: Elaboración propia.

Con relación al Arsénico, se ha observado un valor máximo de 980.3 *mg/kg* correspondiente al SU-04 y un valor mínimo de 814.3 *mg/kg* correspondiente al SU-01, el valor promedio de la concentración de Arsénico para las muestras de suelo es de 898.58 *mg/kg*, para todas las muestras superan el límite que fue impuesto por la normativa peruana. Se detalla en Figura 10.

**Figura 10**

*Concentración de Arsénico en las muestras de suelo.*

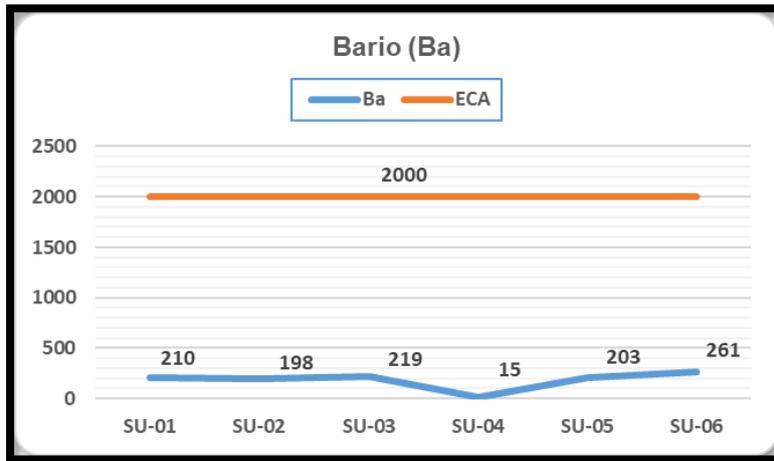


*Nota:* Fuente: Elaboración propia.

Con relación al Bario, se ha observado un valor máximo de 261 *mg/kg* correspondiente al SU-06 y un valor mínimo de 15 *mg/kg* correspondiente al SU-04, el valor promedio de la concentración de Bario para las muestras de suelo es de 184.33 *mg/kg*, para todas las muestras están debajo del límite que fue impuesto por la normativa peruana. Se detalla en la Figura 11.

**Figura 11**

*Concentración de Bario en las muestras de suelo.*

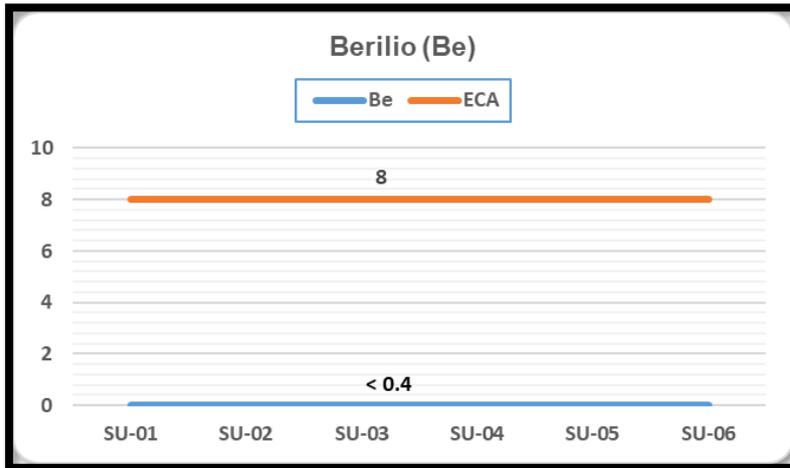


*Nota:* Fuente: Elaboración propia.

Con relación al Berilio, los niveles encontrados en las muestras de suelo son mucho más bajos que el límite de detección de 0,4 *mg/kg* (límite cuantificable); que es tomado en base al Límite de Cuantificación del Método LCM. Para todas las muestras están debajo del límite que fue impuesto por la normativa canadiense. Se detalle en Figura 12.

**Figura 12**

*Concentración de Berilio en las muestras de suelo.*

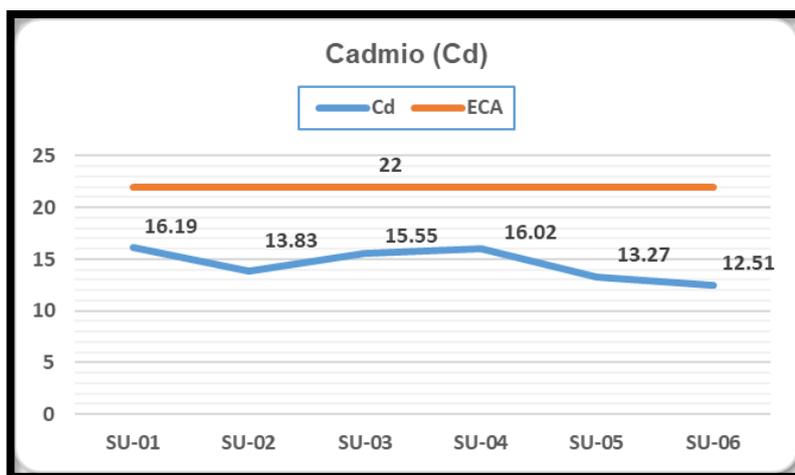


*Nota:* Fuente: Elaboración propia.

Con relación al Cadmio, se ha observado un valor máximo de 16.19 *mg/kg* correspondiente al SU-01 y un valor mínimo de 12.51 *mg/kg* correspondiente al SU-06, el valor promedio de concentración de Cadmio para las muestras de suelo es de 14.56 *mg/kg*, para todas las muestras están debajo del límite que fue impuesto por la normativa peruana. Se detalla en Figura 13.

**Figura 13**

*Concentración de Cadmio en las muestras de suelo.*

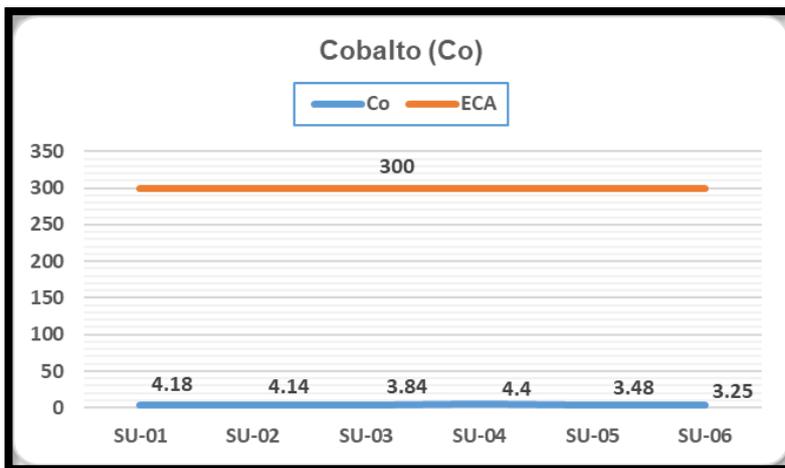


*Nota:* Fuente: Elaboración propia.

Con relación al Cobalto, se ha observado un valor máximo de 4.4 *mg/kg* correspondiente al SU-04 y un valor mínimo de 3.25 *mg/kg* correspondiente al SU-06, el valor promedio de la concentración de Cobalto para las muestras en suelo es de 3.88 *mg/kg*, para todas las muestras están debajo del límite que fue impuesto por la normativa canadiense. Se detalla en Figura 14.

**Figura 14**

*Concentración de Cobalto en las muestras de suelo.*

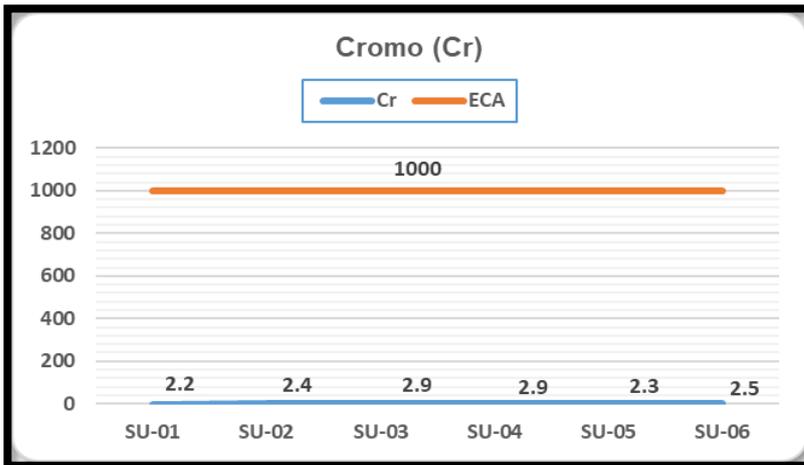


*Nota:* Fuente: Elaboración propia.

Con relación al Cromo, se ha observado un valor máximo de 2.9 *mg/kg* correspondiente a SU-03, SU-04 y un valor mínimo de 2.2 *mg/kg* correspondiente al SU-01, el valor promedio de la concentración de Cromo para las muestras de suelo es de 2.53 *mg/kg*, para todas las muestras están debajo del límite que fue impuesto por la normativa peruana. Se detalla en Figura 15.

**Figura 15**

*Concentración de Cromo en las muestras de suelo.*

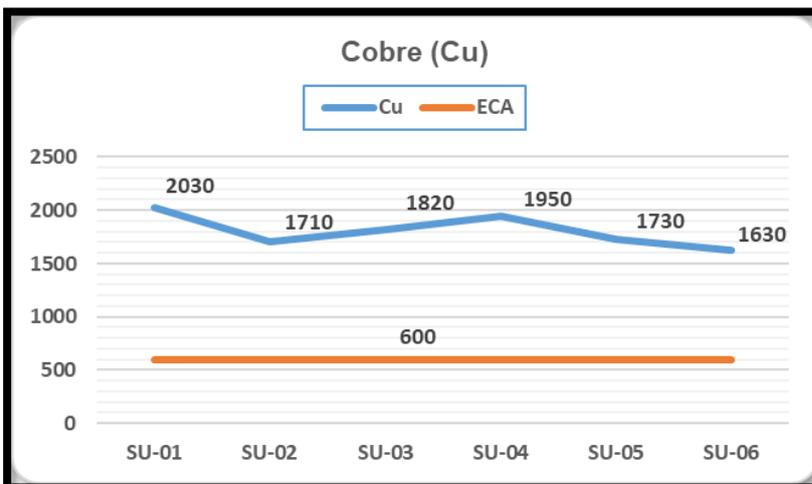


*Nota:* Fuente: Elaboración propia.

Con relación al Cobre, se ha observado un valor máximo de 2030 *mg/kg* correspondiente al SU-01 y un valor mínimo de 1630 *mg/kg* correspondiente al SU-06, el valor promedio de la concentración de Cobre para las muestras en suelo es de 1811.67 *mg/kg*, para todas las muestras superan el límite que fue impuesto por la normativa del CONAMA. Se detalla en Figura 16.

**Figura 16**

*Concentración de Cobre en las muestras de suelo.*

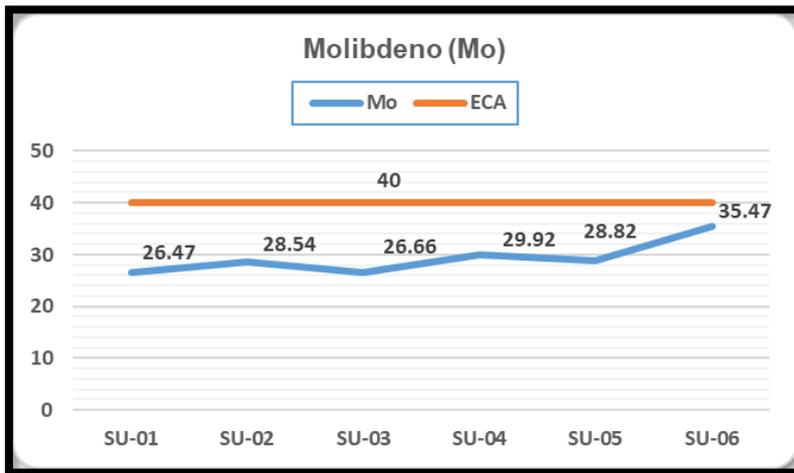


*Nota:* Fuente: Elaboración propia.

Con relación al Molibdeno, se ha observado un valor máximo de 35.47 *mg/kg* correspondiente al SU-06 y un valor mínimo de 26.47 *mg/kg* correspondiente al SU-01, el valor promedio de la concentración de Molibdeno para las muestras de suelo es de 29.31 *mg/kg*, para todas las muestras están debajo del límite que fue impuesto por la normativa canadiense. Se detalla en Figura 17.

**Figura 17**

*Concentración de Molibdeno en las muestras de suelo.*

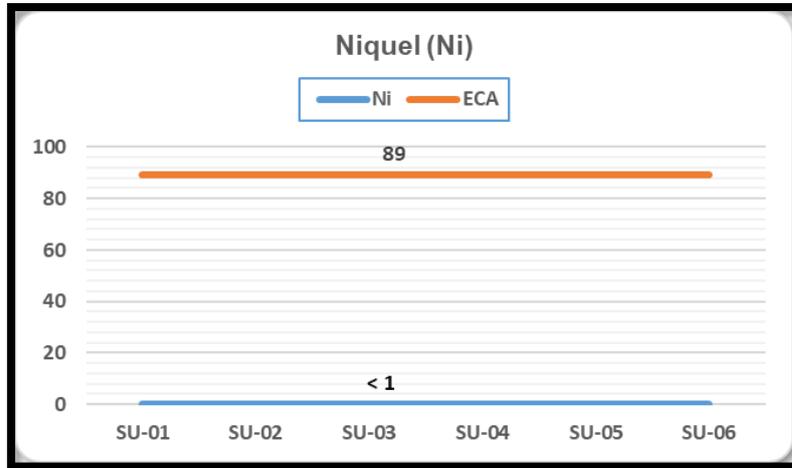


*Nota:* Fuente: Elaboración propia.

Con relación al Níquel, las cantidades encontradas en las muestras de suelo son mucho más bajas que el Límite de Detección (Límite cuantificable), que es 1 *mg/kg*; que es tomado en base al Límite de Cuantificación del Método LCM. Para todas las muestras están debajo del límite que fue impuesto por la normativa canadiense. Se detalla en Figura 18.

**Figura 18**

*Concentración de Níquel en las muestras de suelo.*

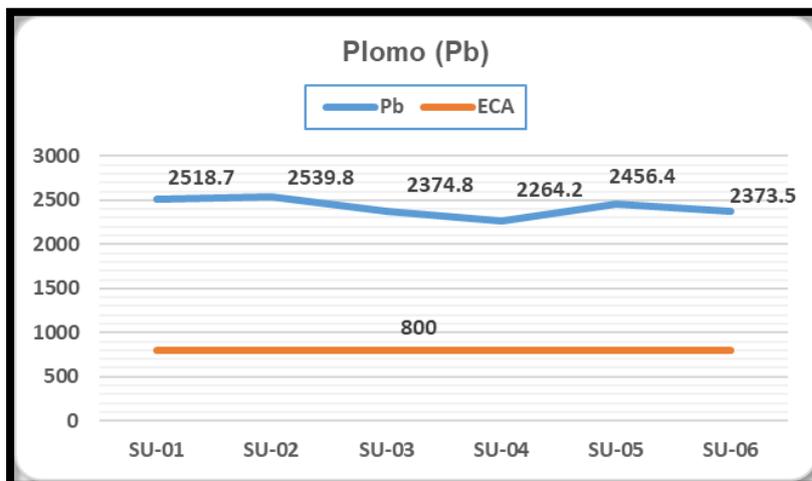


*Nota:* Fuente: Elaboración propia.

Con relación al Plomo, se ha observado un valor máximo de 2539.8 *mg/kg* correspondiente al SU-02 y un valor mínimo de 2264.2 *mg/kg* correspondiente al SU-04, el valor promedio de la concentración de Plomo para las muestras de suelo es de 2421.23 *mg/kg*, para todas las muestras están por encima del límite que fue impuesto por la normativa peruana. Se detalla en Figura 19.

**Figura 19**

*Concentración de Plomo en las muestras de suelo.*

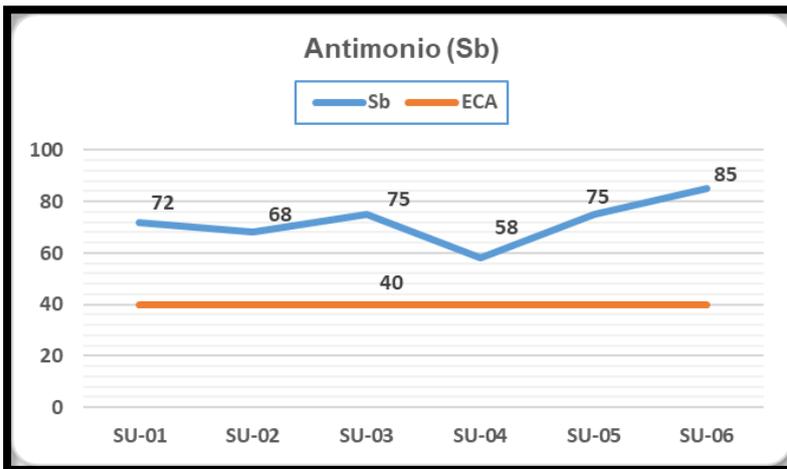


*Nota:* Fuente: Elaboración propia.

Con relación al Antimonio, se ha observado un valor máximo de 85 *mg/kg* correspondiente al SU-06 y un valor mínimo de 58 *mg/kg* correspondiente al SU-04, el valor promedio de la concentración de Antimonio para las muestras en suelo es de 72.17 *mg/kg*, para todas las muestras están por encima del límite que fue impuesto por la normativa canadiense. Se detalla en Figura 20.

**Figura 20**

*Concentración de Antimonio en las muestras de suelo.*

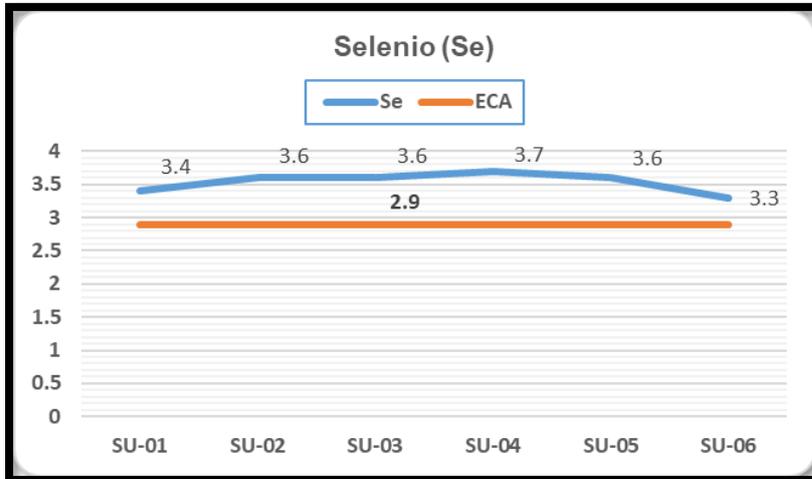


*Nota:* Fuente: Elaboración propia.

Con relación al Selenio, se ha observado un valor máximo de 3.7 *mg/kg* correspondiente al SU-04 y un valor mínimo de 3.3 *mg/kg* correspondiente al SU-06, el valor promedio de la concentración de Selenio para las muestras de suelo es de 3.53 *mg/kg*, para todas las muestras están por encima del límite que fue impuesto por la normativa canadiense. Se detalla en Figura 21.

**Figura 21**

*Concentración de Selenio en las muestras de suelo.*

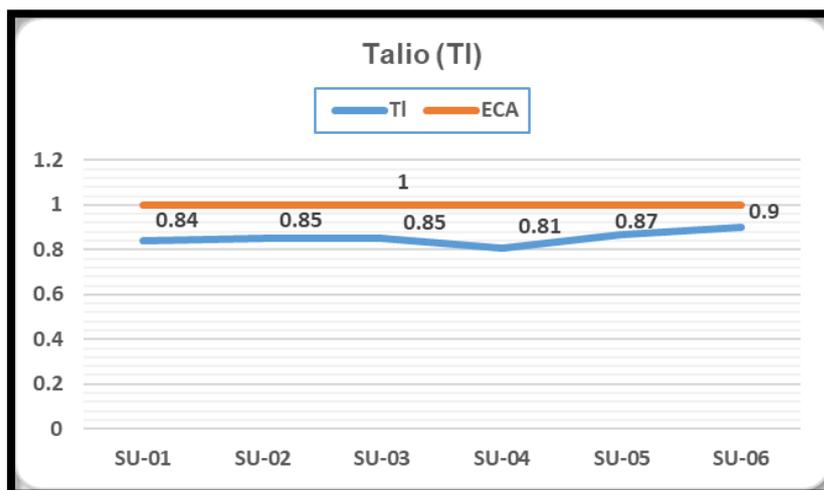


*Nota:* Fuente: Elaboración propia.

Con relación al Talio, se ha observado un valor máximo de  $0.9 \text{ mg/kg}$  correspondiente al SU-06 y un valor mínimo de  $0.81 \text{ mg/kg}$  correspondiente al SU-04, el valor promedio de la concentración de Talio para las muestras en suelo es de  $0.85 \text{ mg/kg}$ , para todas las muestras están por debajo del límite que fue impuesto por la normativa canadiense. Se detalla en Figura 22.

**Figura 22**

*Concentración de Talio en las muestras de suelo.*

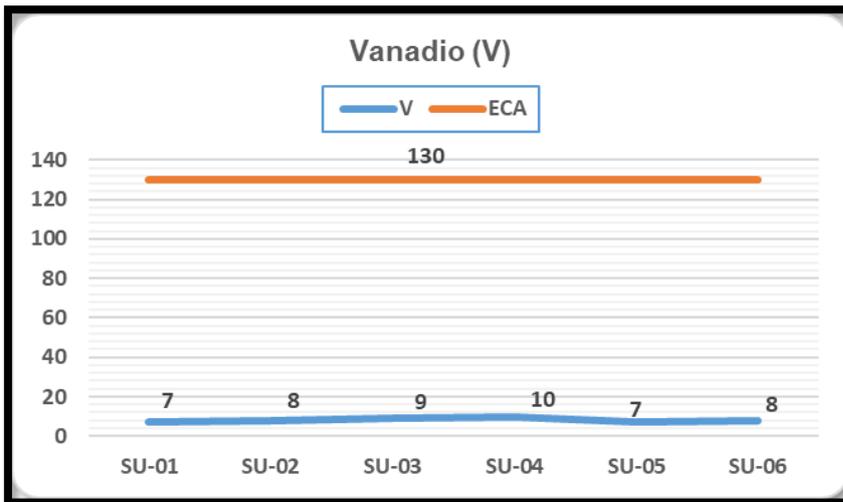


*Nota:* Fuente: Elaboración propia.

Con relación al Vanadio, se ha observado un valor máximo de 10  $mg/kg$  correspondiente al SU-04 y un valor mínimo de 7  $mg/kg$  correspondiente al SU-01 y SU-05, el valor promedio de la concentración de Vanadio para las muestras de suelo es de 8.17  $mg/kg$ , para todas las muestras están por debajo del límite que fue impuesto por la normativa canadiense. Se detalla en Figura 23.

**Figura 23**

*Concentración de Vanadio en las muestras de suelo.*

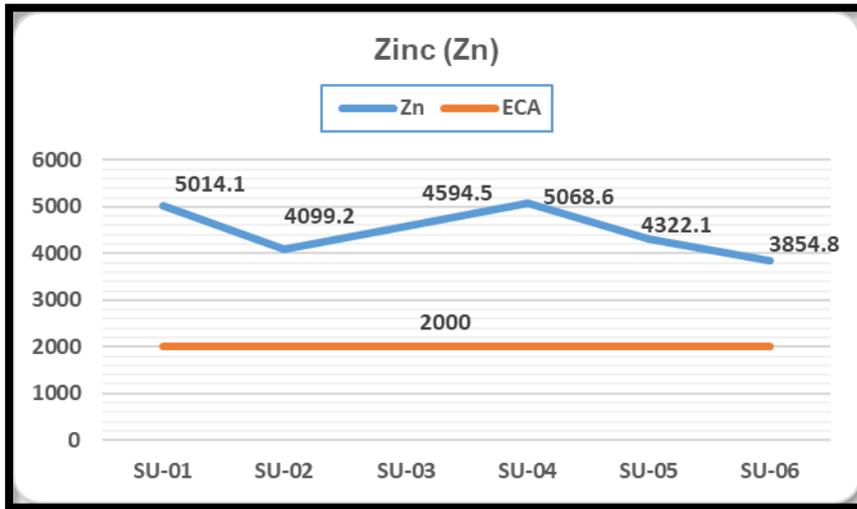


*Nota:* Fuente: Elaboración propia.

Con relación al Zinc, se ha observado un valor máximo de 5068.6  $mg/kg$  correspondiente al SU-04 y un valor mínimo de 3854.8  $mg/kg$  correspondiente al SU-06, el valor promedio de la concentración de Zinc para las muestras de suelo es de 4492.22  $mg/kg$ , para todas las muestras están por encima del valor impuesto por la normativa del CONAMA. Se detalla en Figura 24.

**Figura 24**

Concentración de Zinc en las muestras de suelo.



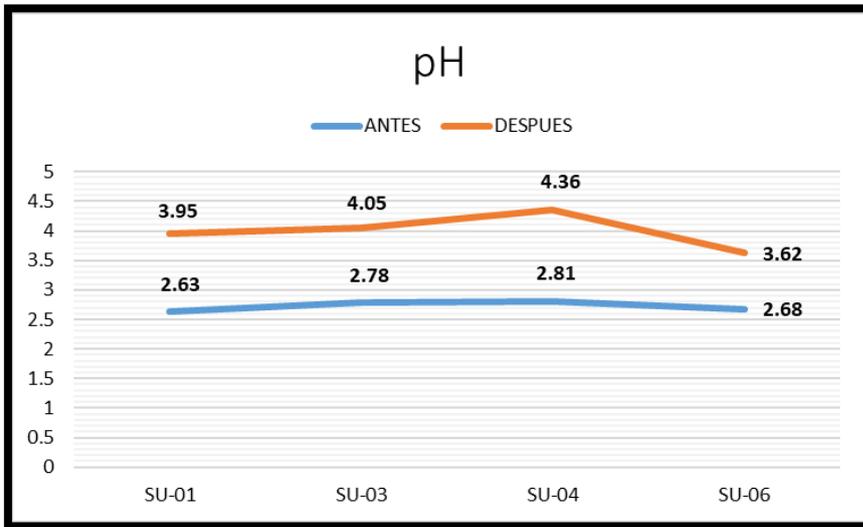
Nota: Fuente: Elaboración propia.

#### 4.5. Tratamiento con *Bacillus* sp

Con relación al pH, el tratamiento con *Bacillus* sp. logró incrementar los niveles de pH para todas las muestras de suelo obteniendo un valor máximo de 4.36 unidades de pH para el SU-04 y un mínimo de 3.62 unidades de pH para el SU-06. Se observa que todas las muestras aumentaron los niveles de pH, lo cual estadísticamente es significativo obteniendo el valor de p igual a 0.0021 lo cual es inferior al nivel de significancia ( $\alpha = 0.05$ ), por lo cual es aceptada la hipótesis alterna ( $H_1$ ). Se detalla en Figura 25.

**Figura 25**

Niveles de pH en las muestras de suelo.

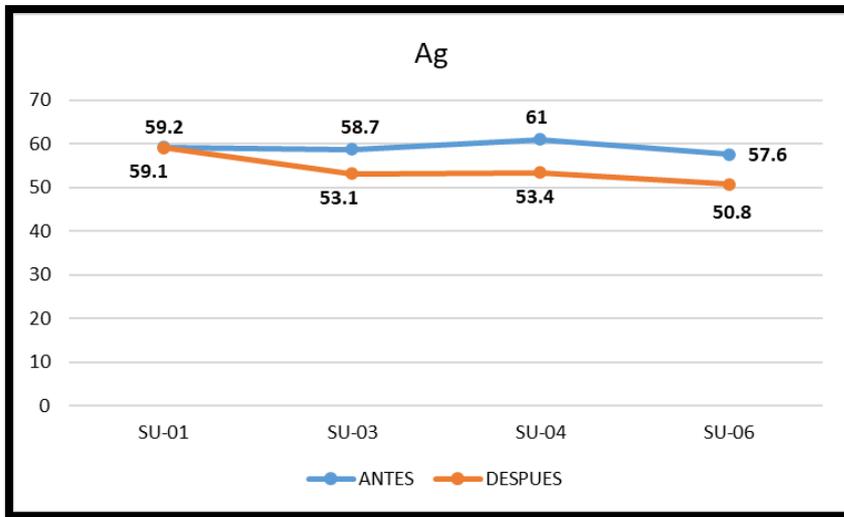


Nota: Fuente: Elaboración propia.

Con respecto a la concentración de Plata, el tratamiento con *Bacillus* sp. logró disminuir la concentración de la Plata en todas las muestras de suelo siendo las de mayor disminución: 7.6 mg/kg para SU-04 y 6.8 mg/kg para SU-06; obteniéndose un 12.5 % y 11.8 % de eficiencia de biorremediación respectivamente, lo cual estadísticamente es significativo obteniendo el valor de p igual a 0.0396 lo cual es inferior al nivel de significancia ( $\alpha = 0.05$ ), por lo cual es aceptada la hipótesis alterna ( $H_1$ ). Se detalla en Figura 26.

**Figura 26**

Concentración de Ag en las muestras de suelo.

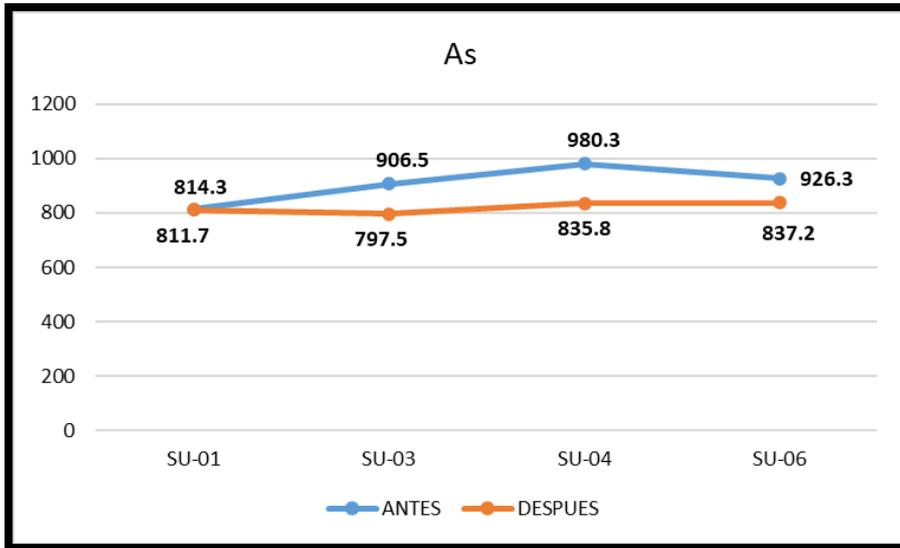


Nota: Fuente: Elaboración propia.

Con respecto a la concentración de Arsénico, el tratamiento con *Bacillus* sp. logró disminuir la concentración de Arsénico en todas las muestras de suelo siendo las de mayor disminución: 144.5 mg/kg para SU-04 y 109 mg/kg para SU-03; obteniéndose un 14.7% y 12.0% de eficiencia de biorremediación respectivamente, lo cual estadísticamente no es significativo obteniendo el valor de p igual a 0.0645 lo cual es mayor al nivel de significancia ( $\alpha = 0.05$ ), por lo cual es aceptada la hipótesis nula ( $H_0$ ). Se detalla en Figura 27.

**Figura 27**

Concentración de As en las muestras de suelo.

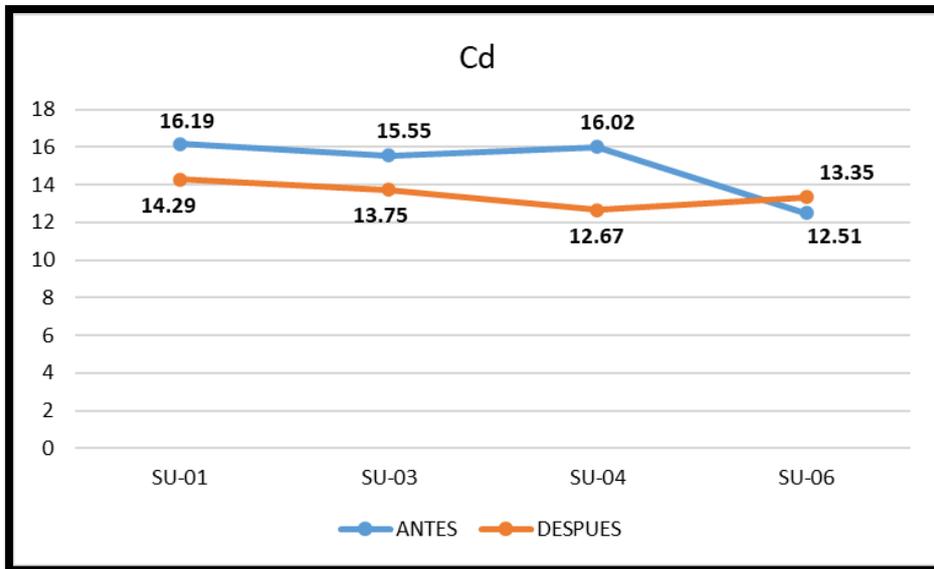


Nota: Fuente: Elaboración propia.

Con respecto a la concentración de Cadmio, el tratamiento con *Bacillus* sp. logró disminuir la concentración de Cadmio en tres de las muestras de suelo siendo las de mayor disminución: 3.35 mg/kg para SU-04 y 1.9 mg/kg para SU-01; obteniéndose un 20.9% y 12.0% de eficiencia de biorremediación respectivamente, lo cual estadísticamente no es significativo obteniendo el valor de p igual a 0.2676 lo cual es mayor al nivel de significancia ( $\alpha = 0.05$ ), por lo cual es aceptada la hipótesis nula ( $H_0$ ). Se detalla en Figura 28.

**Figura 28**

Concentración de Cd en las muestras de suelo.

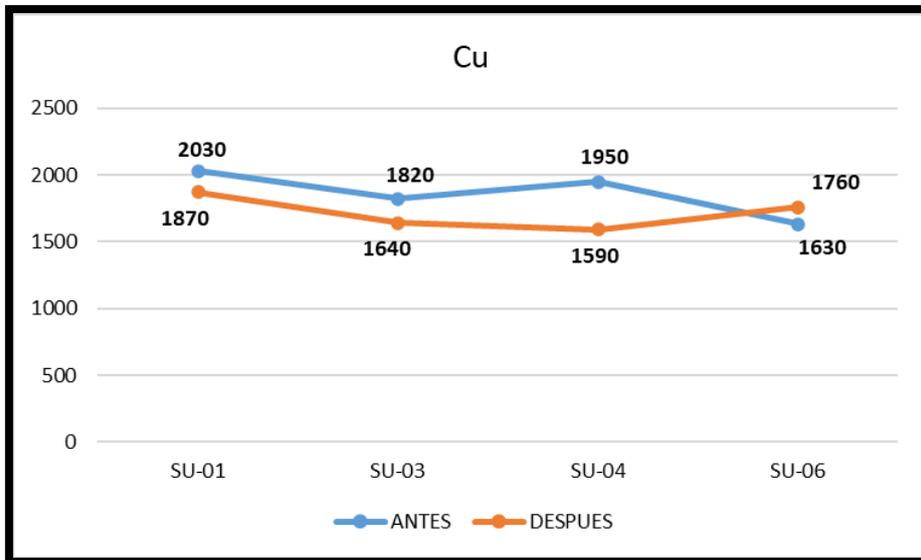


Nota: Fuente: Elaboración propia.

Con respecto a la concentración de Cobre, el tratamiento con *Bacillus* sp. logró disminuir la concentración de Cobre en tres de las muestras de suelo, siendo las de mayor disminución: 360  $mg/kg$  para SU-04 y 180  $mg/kg$  para SU-03; obteniéndose un 18.5% y 9.9% de eficiencia de biorremediación respectivamente, lo cual estadísticamente no es significativo obteniendo el valor de p igual a 0.2544 lo cual es mayor al nivel de significancia ( $\alpha = 0.05$ ), por lo cual es aceptada la hipótesis nula ( $H_0$ ). Se detalla en Figura 29.

**Figura 29**

Concentración de Cu en las muestras de suelo.

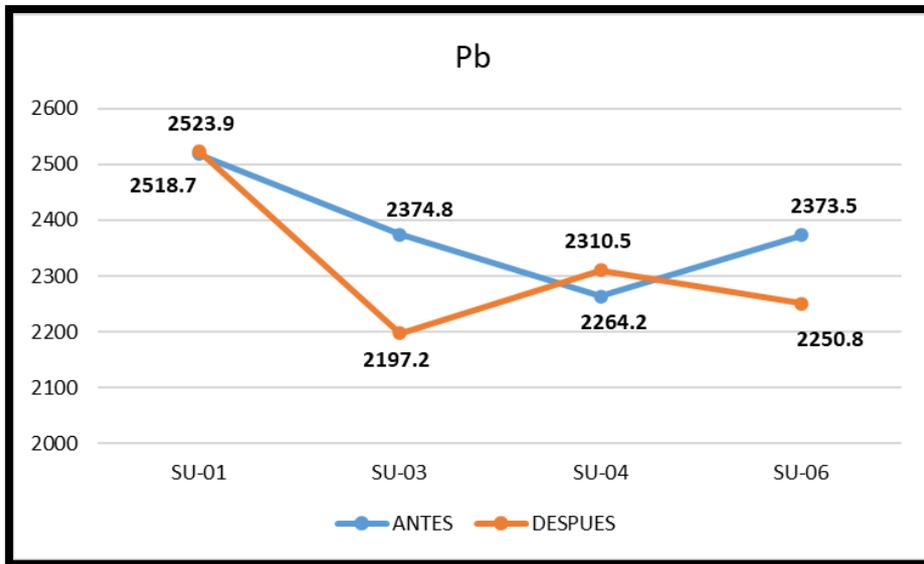


Nota: Fuente: Elaboración propia.

Con respecto a la concentración de Plomo, el tratamiento con *Bacillus* sp. logró disminuir la concentración de Plomo en dos de las muestras de suelo: 177.6 mg/kg en SU-03 y 122.7 mg/kg en SU-06; obteniéndose un 7.5% y 5.2% de eficiencia de biorremediación respectivamente, lo cual estadísticamente no es significativo obteniendo el valor de p igual a 0.3227 lo cual es mayor al nivel de significancia ( $\alpha = 0.05$ ), por lo cual es aceptada la hipótesis nula ( $H_0$ ). Se detalla en Figura 30.

**Figura 30**

Concentración de Pb en las muestras de suelo.

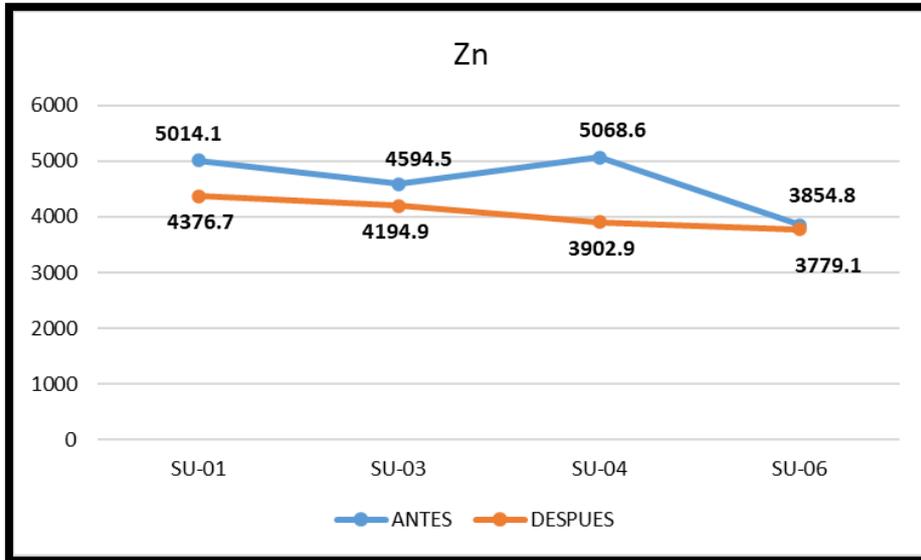


Nota: Fuente: Elaboración propia.

Con respecto a la concentración de Zinc, el tratamiento con *Bacillus* sp. logró disminuir la concentración de Zinc en todas las muestras de suelo siendo las mayores disminuciones: 1165.7 mg/kg para SU-04 y 637.4 mg/kg para SU-01; obteniéndose un 23.0 % y 13 % de eficiencia de biorremediación respectivamente, lo cual estadísticamente es significativo obteniendo el valor de p igual a 0.0408 lo cual es inferior al nivel de significancia ( $\alpha = 0.05$ ), por lo cual es aceptada la hipótesis alterna ( $H_1$ ). Se detalla en la Figura 31.

**Figura 31**

*Concentración de Zn en las muestras de suelo.*



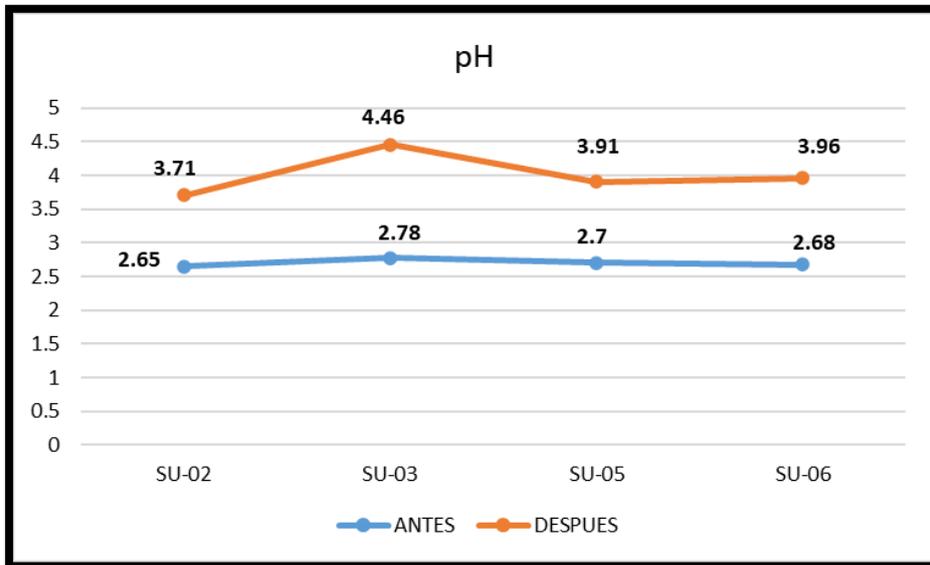
*Nota:* Fuente: Elaboración propia.

#### **4.6. Tratamiento con *Pseudomonas* sp.**

Con relación al pH, el tratamiento con *Pseudomonas* sp. logró incrementar los niveles de pH para todas las muestras de suelo obteniendo un valor máximo de 4.46 unidades de pH en SU-03 y un mínimo de 3.71 unidades de pH en SU-02. Se observa que todas las muestras aumentaron los niveles de pH, lo cual estadísticamente no es significativo obteniendo el valor de p igual a 0.101 lo cual es mayor al nivel de significancia ( $\alpha = 0.05$ ), por lo cual es aceptada la hipótesis nula ( $H_0$ ). Se detalla en Figura 32.

**Figura 32**

*Niveles de pH en las muestras de suelo.*

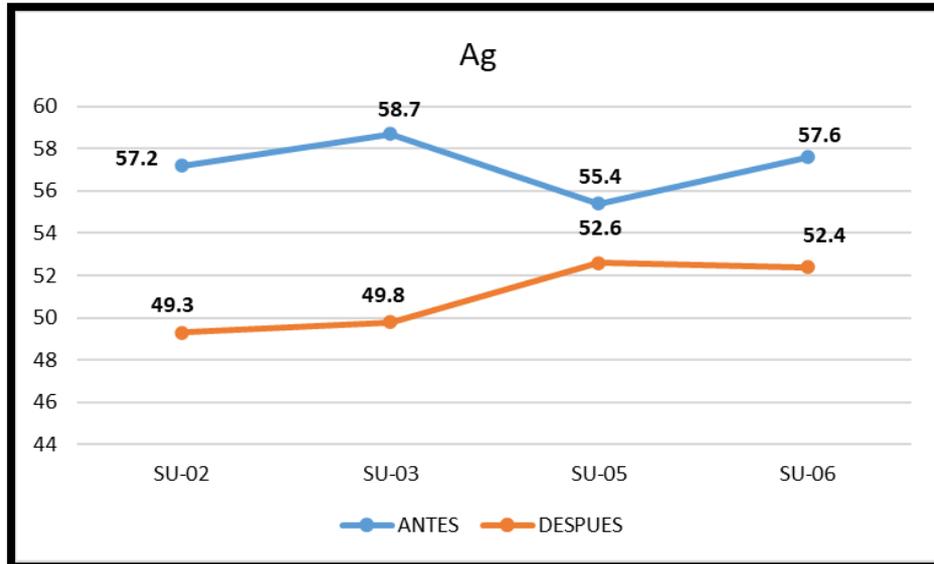


*Nota:* Fuente: Elaboración propia.

Con respecto a la concentración de Plata, el tratamiento con *Pseudomonas* sp. logró disminuir la concentración de la Plata en todas las muestras de suelo siendo las de mayor disminución: 8.9 *mg/kg* para SU-03 y 7.9 *mg/kg* para SU-02; obteniéndose un 15.2% y 13.8% de eficiencia de biorremediación respectivamente, lo cual estadísticamente es significativo obteniendo el valor de p igual a 0.0396 lo cual es inferior al nivel de significancia ( $\alpha = 0.05$ ), por lo cual es aceptada la hipótesis alterna ( $H_1$ ). Se detalla en Figura 33.

**Figura 33**

Concentración de Ag en las muestras de suelo.

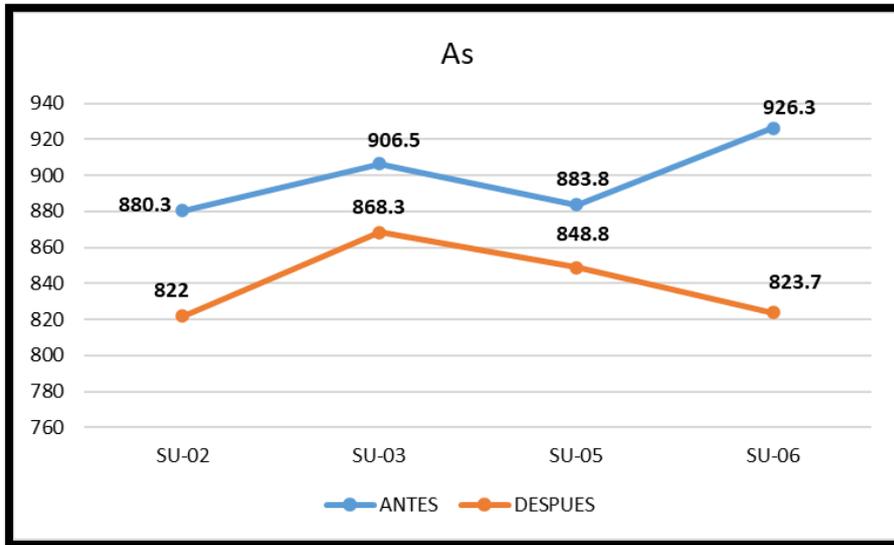


Nota: Fuente: Elaboración propia.

Con respecto a la concentración de Arsénico, el tratamiento con *Pseudomonas* sp. logró disminuir la concentración de Arsénico en todas las muestras de suelo siendo las de mayor disminución: 102.6 mg/kg para SU-06 y 58.3 mg/kg para SU-02; obteniéndose un 11.1% y 6.6% de eficiencia de biorremediación respectivamente, lo cual estadísticamente es significativo obteniendo el valor de p igual a 0.0329 lo cual es inferior al nivel de significancia ( $\alpha = 0.05$ ), por lo cual es aceptada la hipótesis alterna ( $H_1$ ). Se detalla en Figura 34.

**Figura 34**

*Concentración de As en las muestras de suelo.*

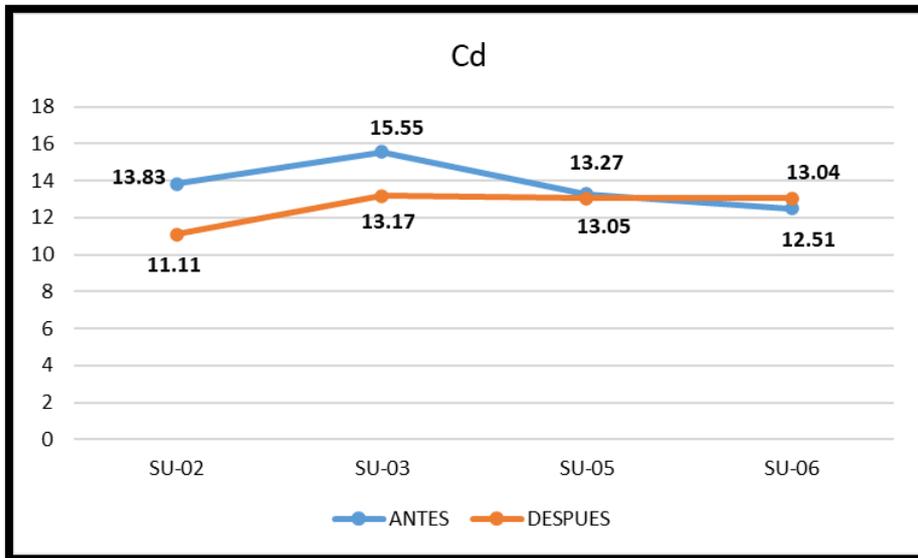


Nota: Fuente: Elaboración propia.

Con respecto a la concentración de Cadmio, el tratamiento con *Pseudomonas* sp. logró disminuir la concentración de Cadmio en tres de las muestras de suelo siendo las de mayor disminución: 2.72 mg/kg para SU-02 y 2.38 mg/kg para SU-03; obteniéndose un 20% y 15.3% de eficiencia de biorremediación respectivamente, lo cual estadísticamente no es significativo obteniendo el valor de p igual a 0.2676 lo cual es mayor al nivel de significancia ( $\alpha = 0.05$ ), por lo cual es aceptada la hipótesis nula ( $H_0$ ). Se detalla en Figura 35.

**Figura 35**

*Concentración de Cd en las muestras de suelo.*

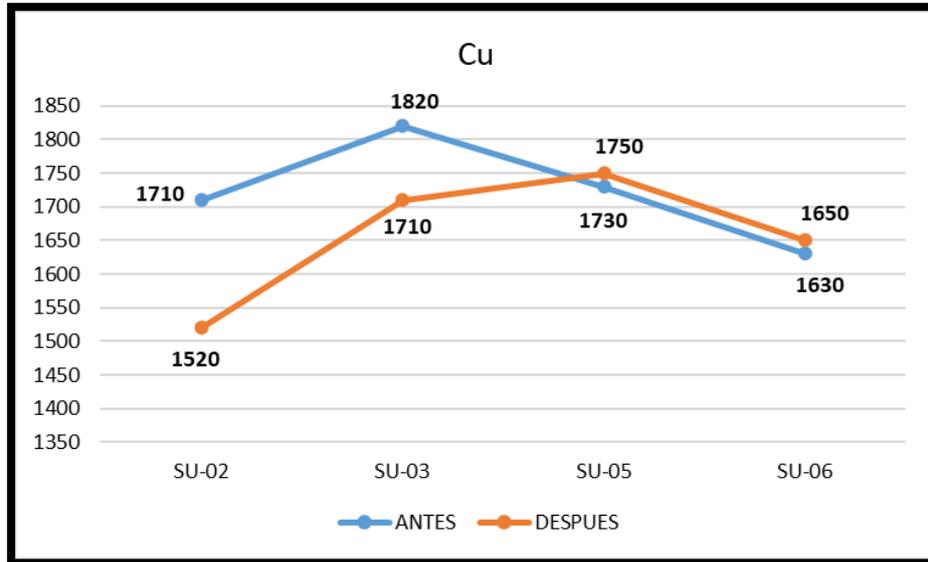


*Nota:* Fuente: Elaboración propia.

Con respecto a la concentración de Cobre, el tratamiento con *Pseudomonas* sp. logró disminuir la concentración de Cobre en dos de las muestras de suelo siendo la mayor disminución: 190 *mg/kg* para SU-02 y 110 *mg/kg* para SU-03; obteniéndose un 11 % y 6.0 % de eficiencia de biorremediación respectivamente, lo cual estadísticamente no es significativo obteniendo el valor de  $p$  igual a 0.2978 lo cual es mayor al nivel de significancia ( $\alpha = 0.05$ ), por lo cual es aceptada la hipótesis nula ( $H_0$ ). Se detalla en Figura 36.

**Figura 36**

*Concentración de Cu en las muestras de suelo.*

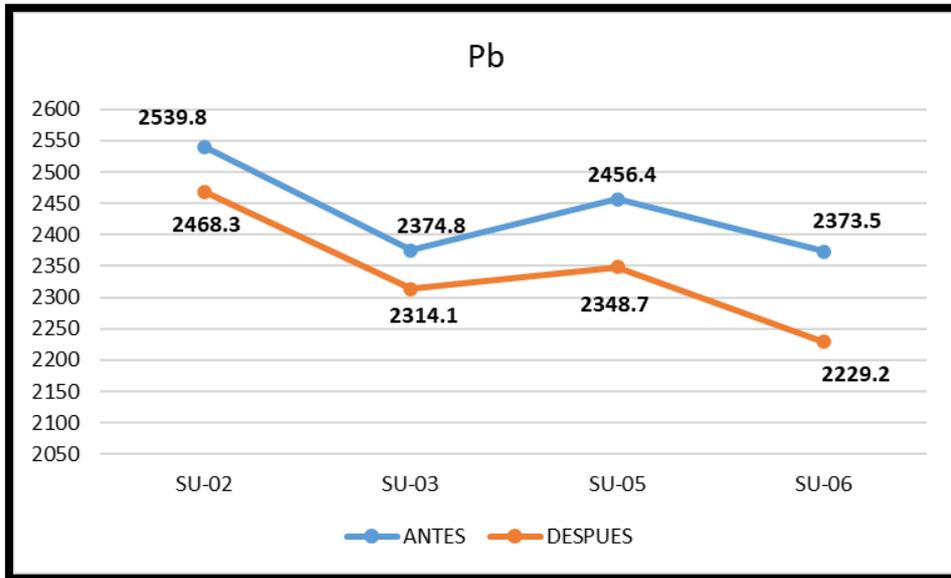


*Nota:* Fuente: Elaboración propia.

Con respecto a la concentración de Plomo, el tratamiento con *Pseudomonas* sp. logró disminuir la concentración de Plomo en todas las muestras de suelo obteniendo mayor disminución: 144.3 *mg/kg* para SU-06 y 107.7 *mg/kg* para SU-05; obteniéndose un 6.1% y 4.4.% de eficiencia de biorremediación respectivamente, lo cual estadísticamente es significativo obteniendo el valor de p igual a 0.031 lo cual es inferior al nivel de significancia ( $\alpha = 0.05$ ), por lo cual es aceptada la hipótesis alterna ( $H_1$ ). Se detalla en Figura 37.

**Figura 37**

Concentración de Pb en las muestras de suelo.

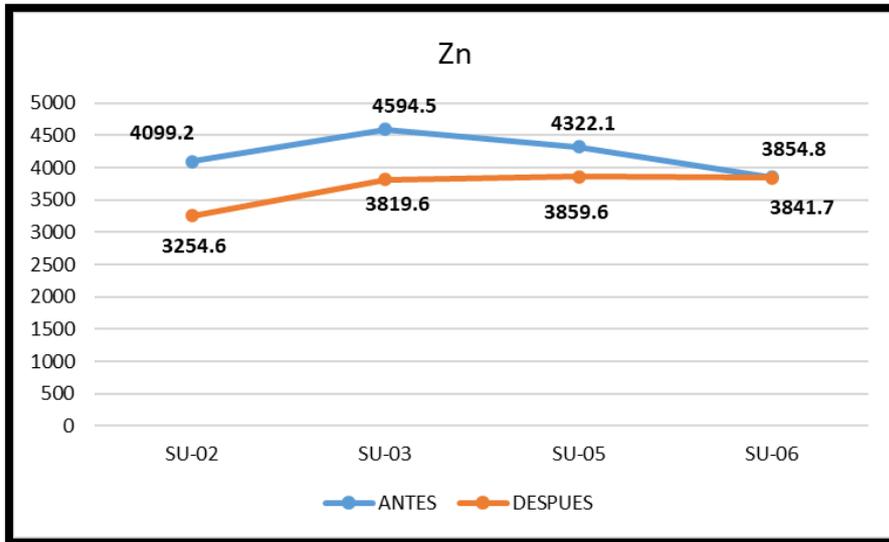


Nota: Fuente: Elaboración propia.

Con respecto a la concentración de Zinc, el tratamiento con *Pseudomonas* sp. logró disminuir la concentración de Zinc en todas las muestras de suelo obteniendo mayor disminución: 844.6 *mg/kg* para SU-02 y 774.9 *mg/kg* para SU-03; obteniéndose un 21.0% y 16.9% de eficiencia de biorremediación respectivamente, lo cual estadísticamente es significativo obteniendo el valor de p igual a 0.0408 lo cual es inferior al nivel de significancia ( $\alpha = 0.05$ ), por lo cual es aceptada la hipótesis alterna ( $H_1$ ). Se detalla en la Figura 38.

**Figura 38**

*Concentración de Zn en las muestras de suelo.*



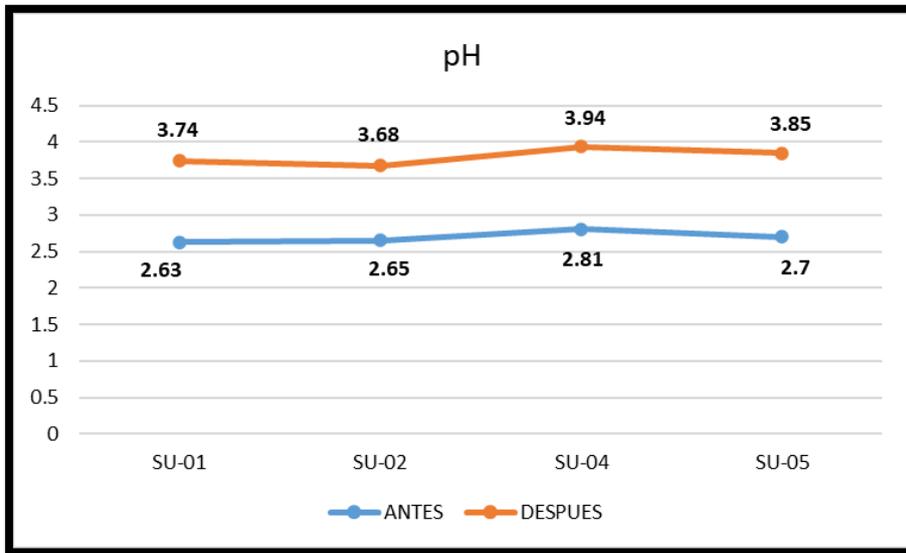
*Nota:* Fuente: Elaboración propia.

#### **4.7. Tratamiento con *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp.**

Con relación al pH, el tratamiento con la combinación de ambas bacterias logró incrementar los niveles de pH para todas las muestras de suelo obteniendo un valor máximo de 3.94 unidades de pH en SU-04 y un mínimo de 3.68 unidades de pH en SU-02. Se observa que todas las muestras aumentaron los niveles de pH, lo cual estadísticamente es significativo obteniendo el valor de  $p < 0.0001$  lo cual es inferior al nivel de significancia ( $\alpha = 0.05$ ), por lo cual es aceptada la hipótesis alterna ( $H_1$ ). Se detalla en la Figura 39.

**Figura 39**

*Niveles de pH en las muestras de suelo.*

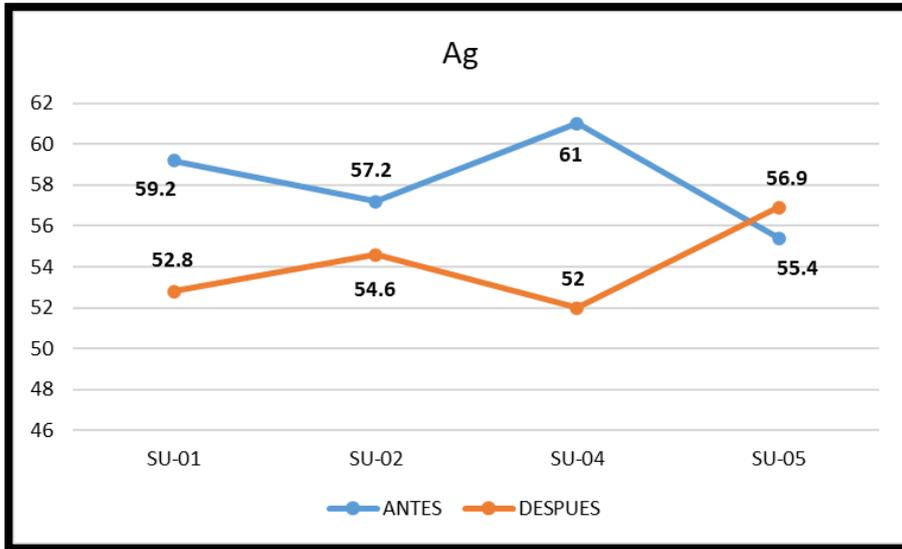


*Nota:* Fuente: Elaboración propia.

Con respecto a la concentración de Plata, el tratamiento con la combinación de ambas bacterias logro disminuir la concentración de la Plata en tres de las muestras de suelo siendo las de mayor disminución:  $9 \text{ mg/kg}$  para SU-04 y  $6.4 \text{ mg/kg}$  para SU-01; obteniéndose un 14.8% y 11% de eficiencia de biorremediación respectivamente, lo cual estadísticamente no es significativo obteniendo el valor de p igual a 0.1694 lo cual es mayor al nivel de significancia ( $\alpha = 0.05$ ), por lo cual es aceptada la hipótesis nula ( $H_0$ ). Se detalla en la Figura 40.

**Figura 40**

*Concentración de Ag en las muestras de suelo.*

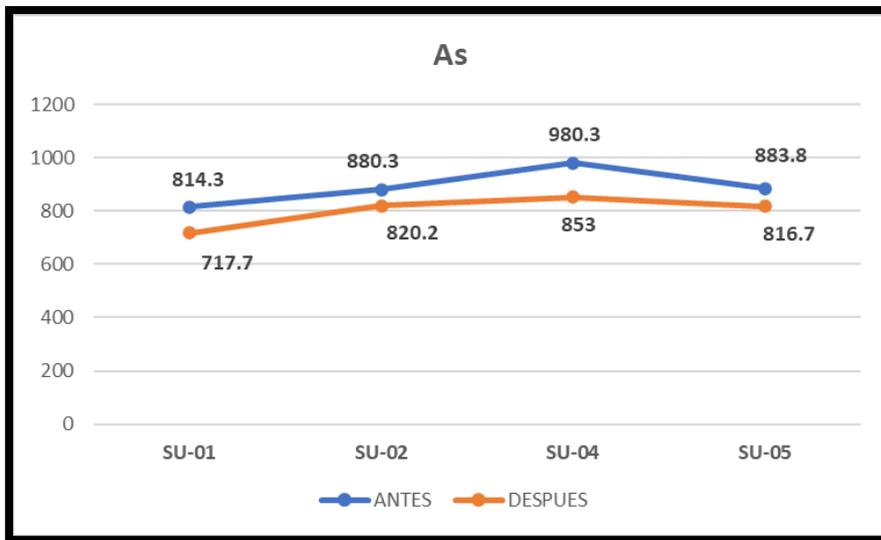


*Nota:* Fuente: Elaboración propia.

Con respecto a la concentración de Arsénico, el tratamiento con la combinación de ambas bacterias logro disminuir la concentración de Arsénico en todas las muestras de suelo siendo las de mayor disminución:  $127.3 \text{ mg/kg}$  para SU-04 y  $96.6 \text{ mg/kg}$  para SU-01; obteniéndose un 13 % y 12 % de eficiencia de biorremediación respectivamente, lo cual estadísticamente es significativo obteniendo el valor de p igual a 0.0394 lo cual es inferior al nivel de significancia ( $\alpha = 0.05$ ), por lo cual es aceptada la hipótesis alterna ( $H_1$ ). Se detalla en la Figura 41.

**Figura 41**

*Concentración de As en las muestras de suelo.*

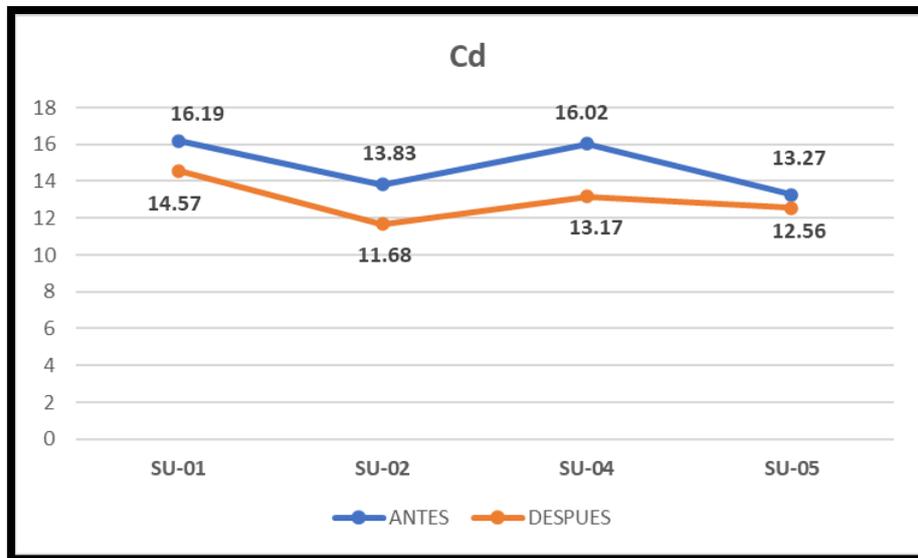


*Nota:* Fuente: Elaboración propia.

Con respecto a la concentración de Cadmio, el tratamiento con la combinación de ambas bacterias logro disminuir la concentración de Cadmio en todas las muestras de suelo siendo las de mayor disminución:  $2.85 \text{ mg/kg}$  en SU-04 y  $2.15 \text{ mg/kg}$  en SU-02; obteniéndose un 17.8% y 15.5% de eficiencia de biorremediación respectivamente, lo cual estadísticamente es significativo obteniendo el valor de p igual a 0.0354 lo cual es inferior al nivel de significancia ( $\alpha = 0.05$ ), por lo cual es aceptada la hipótesis alterna ( $H_1$ ). Se detalla en la Figura 42.

**Figura 42**

*Concentración de Cd en las muestras de suelo.*

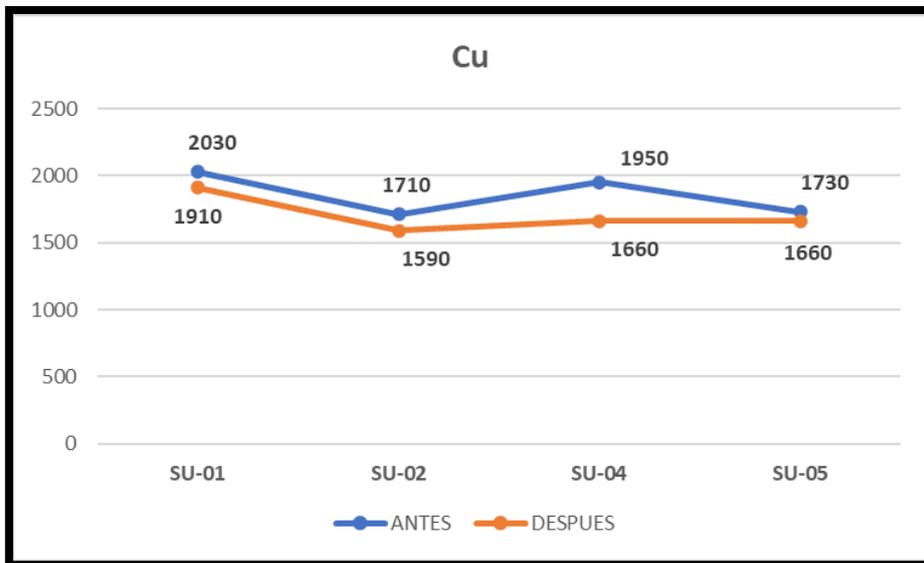


*Nota:* Fuente: Elaboración propia.

Con respecto a la concentración de Cobre, el tratamiento con la combinación de ambas bacterias logró disminuir la concentración de Cobre en todas las muestras de suelo siendo las de mayor disminución: 290 *mg/kg* para SU-04 y 120 *mg/kg* para SU-01 y SU-02; obteniéndose un 14.9%, 7% y 6% de eficiencia de biorremediación respectivamente, lo cual estadísticamente es significativo obteniendo el valor de  $p$  igual a 0.0336 lo cual es inferior al nivel de significancia ( $\alpha = 0.05$ ), por lo cual es aceptada la hipótesis alterna ( $H_1$ ). Se detalla en la Figura 43.

**Figura 43**

*Concentración de Cu en las muestras de suelo.*

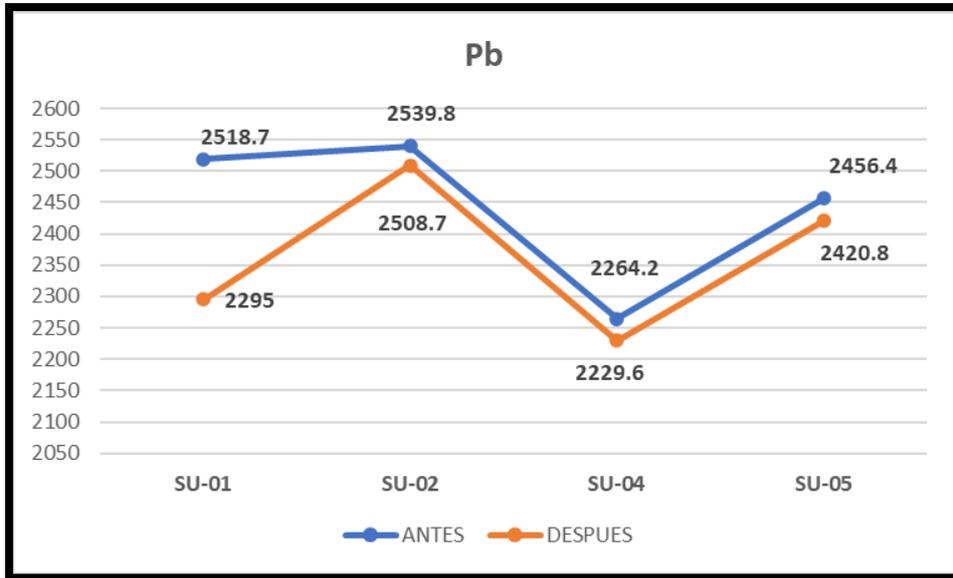


*Nota:* Fuente: Elaboración propia.

Con respecto a la concentración de Plomo, el tratamiento con la combinación de ambas bacterias logró disminuir la concentración de Plomo en todas las muestras de suelo siendo la de mayor disminución :  $223.7 \text{ mg/kg}$  para SU-01; obteniéndose un 9% de eficiencia de biorremediación, lo cual estadísticamente es significativo obteniendo el valor de p igual a 0.0384 lo cual es inferior al nivel de significancia ( $\alpha = 0.05$ ), por lo cual es aceptada la hipótesis alterna ( $H_1$ ). Se detalla en la Figura 44.

**Figura 44**

*Concentración de Pb en las muestras de suelo.*

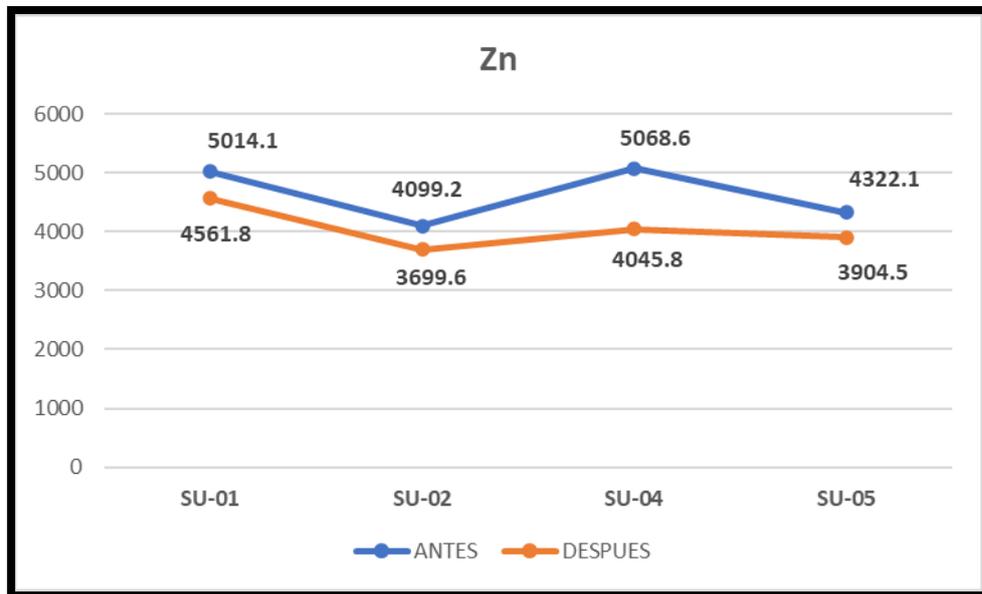


*Nota:* Fuente: Elaboración propia.

Con respecto a la concentración de Zinc, el tratamiento con la combinación de ambas bacterias logró disminuir la concentración de Zinc en todas las muestras de suelo siendo las de mayor disminución:  $1022.8 \text{ mg/kg}$  para SU-04 y  $452.3 \text{ mg/kg}$  para SU-01; obteniéndose un 20.2 % y 9 % de eficiencia de biorremediación respectivamente, lo cual estadísticamente es significativo obteniendo el valor de p igual a 0.0376 lo cual es inferior al nivel de significancia ( $\alpha = 0.05$ ), por lo cual es aceptada la hipótesis alterna ( $H_1$ ). Se detalla en la Figura 45.

**Figura 45**

*Concentración de Zn en las muestras de suelo.*



*Nota:* Fuente: Elaboración propia.

#### 4.7. Características macroscópicas y microscópicas de las cepas.

**Tabla 15**

*Características macroscópicas y microscópicas de las colonias.*

CEPAS	CARACTERÍSTICAS	CARACTERÍSTICAS
	MACROSCÓPICAS	MICROSCÓPICAS
Cepa N° 1	Colonia grande, color crema, aspecto opaco, forma irregular con borde lobulado, con presencia de halo, consistencia mucoide y presenta crecimiento lento.	Forma de bacilo, coloración violeta lo cual indica ser Gram positivo, con presencia de esporas subterminales, extremos ovalados.
Cepa N° 2	Colonia grande, forma irregular con bordes ondulados, color crema, aspecto opaco, con presencia de halo, consistencia blanda presenta crecimiento mediano.	Forma de bacilo, coloración violeta lo cual indica ser Gram positivo, con presencia de esporas centrales, extremos ovalados.
Cepa N° 3	Colonia grande color crema, aspecto opaco, forma irregular, con borde lobulado, con presencia de halo, consistencia dura crecimiento rápido en toda el área de la placa Petri.	Forma de bacilo, coloración violeta lo cual indica ser Gram positivo, con presencia de esporas centrales y terminales, extremos ovalados.
Cepa N° 4	Colonia grande color crema, aspecto brillante, forma irregular, con borde ondulado, consistencia blanda, crecimiento lento.	Forma de bacilo, coloración violeta lo cual indica ser Gram positivo, con presencia de esporas centrales y terminales, extremos ovalados.
Cepa N° 5	Colonia grande color crema, aspecto opaco, forma irregular, con borde ondulado, con presencia de halo, consistencia blanda, crecimiento rápido.	Forma de bacilo, coloración violeta lo cual indica ser Gram positivo, con presencia de esporas terminales, extremos ovalados.
Cepa N° 6	Colonia grande color crema, aspecto brillante, forma circular, con borde ondulado, consistencia blanda, con presencia de halo, crecimiento rápido.	Forma de bacilo, coloración violeta lo cual indica ser Gram positivo, con presencia de esporas subterminales, extremos ovalados.
Cepa N° 7	Colonia grande color crema, aspecto brillante, forma circular, con borde regular, consistencia dura, crecimiento rápido.	Forma de bacilo, coloración violeta lo cual indica ser Gram positivo, con presencia de esporas centrales, extremos ovalados.
Cepa N° 8	Colonia grande color crema, aspecto brillante, forma irregular, con borde filamentosos, consistencia dura, con presencia de halo, crecimiento rápido.	Forma de bacilo, coloración violeta lo cual indica ser Gram positivo, con presencia de esporas centrales, extremos ovalados.

<b>Cepa N° 9</b>	Colonia grande color crema, aspecto opaco, forma irregular, con borde ondulado, con presencia de halo, consistencia dura, crecimiento rápido.	Forma de bacilo, coloración violeta lo cual indica ser Gram positivo, con presencia de esporas terminales, extremos ovalados.
<b>Cepa N° 10</b>	Colonia grande color crema, aspecto brillante, forma circular, con borde filamentosos, consistencia dura, crecimiento rápido.	Forma de bacilo, coloración violeta lo cual indica ser Gram positivo, con presencia de esporas centrales, extremos ovalados.
<b>Cepa N° 11</b>	Colonia grande color crema, aspecto opaco, forma irregular, con borde ondulado y filamentosos, con presencia de halo, consistencia dura, crecimiento rápido.	Forma de bacilo, coloración violeta lo cual indica ser Gram positivo, con presencia de esporas centrales, extremos ovalados.
<b>Cepa N° 12</b>	Colonia grande color crema, aspecto brillante, forma rizoide y circular, con borde filamentosos y ondulado, consistencia blanda, crecimiento rápido.	Forma de bacilo, coloración violeta lo cual indica ser Gram positivo, con presencia de esporas terminales, extremos ovalados.
<b>Cepa N° 13</b>	Colonia grande color verdoso, aspecto brillante, forma circular, con borde regular, consistencia blanda, crecimiento rápido, con presencia de halo.	Forma de bacilo recto, coloración roja lo cual indica ser Gram negativo, con presencia de flagelos.
<b>Cepa N° 14</b>	Colonia grande color verdoso, aspecto opaco, forma irregular, con borde regular, consistencia blanda, crecimiento rápido, con presencia de halo.	Forma de bacilo recto, coloración roja lo cual indica ser Gram negativo, con presencia de flagelos.
<b>Cepa N° 15</b>	Colonia grande color verdoso, aspecto brillante, forma irregular, con borde ondulado, consistencia blanda, crecimiento rápido.	Forma de bacilo recto, coloración roja lo cual indica ser Gram negativo, con presencia de flagelos.

*Nota:* Fuente: Elaboración propia.

#### 4.8. Recuento de *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp.

**Tabla 16**

*Recuento de Bacillus sp. y Pseudomonas sp.*

MUESTRA	DILUCIÓN	RECuento DE BACTERIAS (UFC/g)
SU-01 (R1)	10 <sup>-3</sup>	1 x 10 <sup>-3</sup>
SU-01 (R2)	10 <sup>-3</sup>	1 x 10 <sup>-3</sup>
SU-01 (R3)	10 <sup>-3</sup>	1 x 10 <sup>-3</sup>
SU-02 (R1)	10 <sup>-3</sup>	1 x 10 <sup>-3</sup>
SU-02 (R2)	10 <sup>-3</sup>	1 x 10 <sup>-3</sup>
SU-02 (R3)	10 <sup>-3</sup>	2 x 10 <sup>-3</sup>
SU-03 (R1)	10 <sup>-3</sup>	1 x 10 <sup>-3</sup>
SU-03 (R2)	10 <sup>-3</sup>	1 x 10 <sup>-3</sup>
SU-03 (R3)	10 <sup>-3</sup>	3 x 10 <sup>-3</sup>
SU-04 (R1)	10 <sup>-3</sup>	1 x 10 <sup>-3</sup>
SU-04 (R2)	10 <sup>-3</sup>	2 x 10 <sup>-3</sup>
SU-04 (R3)	10 <sup>-3</sup>	2 x 10 <sup>-3</sup>
SU-05 (R1)	10 <sup>-3</sup>	1 x 10 <sup>-3</sup>
SU-05 (R2)	10 <sup>-3</sup>	1 x 10 <sup>-3</sup>
SU-05 (R3)	10 <sup>-3</sup>	2 x 10 <sup>-3</sup>
SU-06 (R1)	10 <sup>-3</sup>	1 x 10 <sup>-3</sup>
SU-06 (R2)	10 <sup>-3</sup>	1 x 10 <sup>-3</sup>
SU-06 (R3)	10 <sup>-3</sup>	3 x 10 <sup>-3</sup>

*Nota:* Fuente: Elaboración propia.

#### 4.9. Resultados de pruebas bioquímicas *Bacillus* sp.

**Tabla 17**

*Resultados de pruebas bioquímicas Bacillus sp.*

<b>PRUEBAS BIOQUÍMICAS</b>	<b>CEPA 1</b>	<b>CEPA 2</b>	<b>CEPA 3</b>	<b>CEPA 4</b>	<b>CEPA 5</b>	<b>CEPA 6</b>
PRUEBA DE ALMIDON	+	+	-	-	-	-
PRUEBA DE GELATINA	-	-	-	-	-	-
PRUEBA DE LECITINASA	+	-	+	+	+	+
CITRATO	+	-	-	-	-	-
pH = 3	+	+	+	+	+	+
pH = 5	-	-	-	-	-	-
pH = 10	+	+	+	+	+	+
NaCl al 2 %	+	+	+	+	-	+
NaCl al 7 %	+	-	-	-	-	-
NaCl al 10 %	-	-	-	-	-	-

<b>PRUEBAS BIOQUÍMICAS</b>	<b>CEPA 7</b>	<b>CEPA 8</b>	<b>CEPA 9</b>	<b>CEPA 10</b>	<b>CEPA 11</b>	<b>CEPA 12</b>
PRUEBA DE ALMIDON	-	-	+	-	+	-
PRUEBA DE GELATINA	-	-	-	-	-	-
PRUEBA DE LECITINASA	-	-	-	+	+	+
CITRATO	-	-	+	-	-	+
pH = 3	+	+	+	+	+	+
pH = 5	-	-	-	-	-	-
pH = 10	+	+	+	+	+	+
NaCl al 2 %	+	+	+	+	+	-
NaCl al 7 %	+	-	-	-	-	-
NaCl al 10 %	+	-	-	-	-	-

**Tabla 18**

*Resultados de especies pruebas bioquímicas Bacillus sp y Pseudomonas sp.*

N° CEPAS	% ESTIMACIÓN	ESPECIE
CEPA N° 1	70 %	B. Subtilis
CEPA N° 2	60 %	B. Subtilis
CEPA N° 3	70 %	B. Fastidiosus
CEPA N° 4	50 %	B. Subtilis
CEPA N° 5	60 %	B. Fastidiosus
CEPA N° 6	70 %	B. Fastidiosus
CEPA N° 7	50 %	B. Megaterium
CEPA N° 8	50 %	B. Megaterium
CEPA N° 9	60 %	B. Cereus
CEPA N° 10	60 %	B. Fastidiosus
CEPA N° 11	60 %	B. Cereus
CEPA N° 12	40 %	B. Subtilis
CEPA N° 13	100 %	P. Aeruginosa
CEPA N° 14	100 %	P. Aeruginosa
CEPA N° 15	100 %	P. Aeruginosa

*Nota:* Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla 18, se identifica la especie de cada cepa de *Bacillus sp* y *Pseudomonas sp*, con un porcentaje de estimación según las pruebas bioquímicas realizadas y comparándolos con Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática, volumen 2 (Brenner et al., 2005) y volumen 3 (Vos et al., 2009).

#### **4.10. Resultados de pruebas bioquímicas *Pseudomonas sp*.**

Las cepas de *Pseudomonas sp*. (Cepa 13, Cepa 14 y Cepa 15), al realizar las pruebas de oxidasa se pueden concluir que todas son oxidasa positiva con las tiras de oxidasa.

#### **4.11 Discusión de resultados**

**Como objetivo específico se consideró determinar los parámetros físicos (pH, humedad y conductividad) de las muestras de suelo.**

Las muestras de suelo presentaron niveles de pH menores a 3 unidades de pH lo cual nos indica que son suelos ácidos, el porcentaje de humedad es de aproximadamente 15 % entre las 6 muestras de suelo y las muestras de suelo presentan altos niveles de conductividad que en promedio es de 413.50 ms/cm. Posterior al tratamiento los niveles de pH aumentaron por niveles mayores a 3 unidades de pH lo cual nos demuestra que los tres tratamientos son eficientes en aumentar los niveles de pH, los niveles de humedad y conductividad no fueron analizados posterior al tratamiento por no ser de importancia para la investigación al final del tratamiento porque la finalidad de la investigación fue determinar el porcentaje de eficiencia para la remoción de metales.

**Como objetivo específico se consideró determinar los niveles de concentración de metales de los suelos impactados en Yauli – Junín.**

En la investigación desarrollada se determinó la concentración de metales en suelos presente en nuestra área de estudio en Yauli – Junín en CERTIMIN laboratorio acreditado por INACAL. Las muestras de suelo se analizaron según el método de ensayo metales mediante ICP MS/ ICP OES en referencia a The EPA's Method 3050B, Version 2.1996; the EPA's Method 6010D, Version 5.2018; the EPA's Method 6020 B, Version 2.2014; Lab Work on Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry and Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry for Acid Digestion of Sediments, Sludges, and Soils. Con respecto a los metales pesados, su principal generador son las actividades industriales y comerciales. Los metales pesados tienen un gran peso atómico tales como Arsénico, Zinc, Cromo, Mercurio, Cadmio, Níquel, Plomo y Cobre, entre otros metales. En concentraciones pequeñas causan daño a los seres vivos ya que algunas especies son especies bioacumuladoras.

De acuerdo a los hallazgos de la investigación la concentración de metales pesados en nuestra área de estudio, se tienen los siguientes valores: concentración de plata con un valor máximo de 61 *mg/kg* y un valor mínimo de 55.4 *mg/kg* y un valor promedio de 58.18 *mg/kg*, obteniéndose la concentración de arsénico con un valor máximo de 980.3 *mg/kg* y un valor mínimo de 814.3 *mg/kg* y un valor promedio de 898.58 *mg/kg*, obteniéndose la concentración de cadmio con un valor máximo de 16.19 *mg/kg* y un valor mínimo de 12.51 *mg/kg* y un valor promedio de 14.56 *mg/kg*, obteniéndose la concentración de cobre con un valor máximo de 2030 *mg/kg* y un valor mínimo de 1630 *mg/kg* y un valor promedio de 1811.67 *mg/kg*, obteniéndose la concentración de plomo con un valor máximo de 2539.8 *mg/kg* y un valor mínimo de 2264.2 *mg/kg* y un valor promedio de 2421.23 *mg/kg* y obteniéndose la concentración de zinc con un valor máximo de 5068.6 *mg/kg* y un valor mínimo de 3854.8 *mg/kg* y un valor promedio de 4492.22 *mg/kg*

Los hallazgos coinciden con lo obtenido por Dextre (2017), quien caracterizó metales pesados en los suelos alrededores de la Laguna Churuca en tres puntos de muestreo obteniéndose la concentración de cobre con un valor máximo de 786.60 *mg/kg* y un valor mínimo de 278.30 *mg/kg* y un valor promedio de 556.53 *mg/kg*, la concentración de cadmio con un valor máximo de 11.80 *mg/kg* y un valor mínimo de 4.08 *mg/kg* y un valor promedio de 8.60 *mg/kg*, la concentración de plomo con un valor máximo de 2348.30 *mg/kg* y un valor mínimo de 570.27 *mg/kg* y un valor promedio de 1679.12 *mg/kg* y la concentración de arsénico con un valor máximo de 591.30 *mg/kg* y un valor mínimo de 293.80 *mg/kg* y un valor promedio de 412.03 *mg/kg*, las concentraciones son mayores a los ECA para suelo industrial/extractivo para los parámetros de plomo, cobre y arsénico lo cual era de esperarse debido a las actividades mineras presentes en la zona.

**Como objetivo específico se consideró aislar en medios de cultivo selectivos y diferenciales a *Bacillus sp.* y *Pseudomonas sp.* de los suelos impactados en Yauli – Junín.**

De acuerdo a los hallazgos de la investigación se lograron aislar 26 cepas de *Bacillus* sp. y 3 cepas de *Pseudomonas* sp., de las cuales se aislaron las 26 cepas de *Bacillus* sp. y se quedó con las que presentaron crecimiento rápido obteniéndose en total 12 cepas de *Bacillus* sp. y 3 cepas de *Pseudomonas* sp. de las cuales se realizaron las descripciones microscópicas y macroscópicas. Se realizaron las descripciones microscópicas y macroscópicas de estas cepas. Con respecto a *Bacillus* sp. cada cepa presentó diferentes características macroscópicas tanto en forma circular e irregular, colonias grandes (mayor a 3 mm), aspecto brillante y opaco, con bordes filamentosos y ondulado, con presencia de halo, consistencia dura y blanda con crecimiento rápido y lento; y como características microscópicas se observaron forma de bacilo, con coloración violeta lo cual indica ser bacterias Gram Positivo, con presencia de esporas en posición centrales, subterminales y terminales y con extremos ovalados. Con respecto a *Pseudomonas* sp. cada cepa presentó diferentes características macroscópicas colonias grandes (mayor a 3 mm), color verdoso, aspecto brillante y opaco, con borde regular e irregular, consistencia blanda, presencia de halo y crecimiento rápido; y como características microscópicas se puede observar con forma de bacilo recto, coloración roja lo cual indica ser Gram negativo, con presencia de flagelos.

Los hallazgos coinciden con lo obtenido por Muñoz – Silva, et al. (2019), donde se aislaron 18 cepas de bacterias del pasivo minero Santa Rosa, Jangas (Perú), la identificación molecular de las bacterias determinó la presencia del género *Bacillus* representado por las especies de *B. Licheniformis*, *B. Subtilis* y *B. Cereus*.

Los hallazgos coinciden con lo obtenido con M. Mena y H. Rafael (2016), donde se aislaron 53 cepas de bacterias aisladas de pasivos ambientales mineros, así como aguas del río Hualgayoc – Cajamarca. Las bacterias fueron identificadas por pruebas bioquímicas; las cepas fueron seleccionadas por su capacidad de biorremediación siendo las siguientes: *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. y *Corynebacterium* sp.

Con respecto al tratamiento realizado con las bacterias del género *Bacillus* sp. se obtuvieron capacidad de biorremediación en los siguientes metales: Cadmio, Cobre y Zinc; en términos de eficiencia de remediación se obtuvieron los siguientes porcentajes 15% para Cadmio, 12 % para Cobre y 12 % para Zinc.

Para el tratamiento realizado con las bacterias del género *Pseudomonas* sp. se obtuvieron capacidad de biorremediación en los siguientes metales: Plata, Arsénico, Cadmio y Zinc; en términos de eficiencia de remediación se obtuvieron los siguientes porcentajes 11% para Plata, 12% para Cadmio y 12% para Zinc.

Para el tratamiento realizado con la combinación de las bacterias del género *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. se obtuvieron capacidad de biorremediación en los siguientes metales: Plata, Arsénico, Cadmio y Zinc; en términos de eficiencia de remediación se obtuvieron los siguientes porcentajes 10% para Plata, 10% para Arsénico, 12% para Cadmio y 12% de Zinc.

Los hallazgos coinciden con lo descrito con Asunción y Rondo (2021), donde la familia *Bacillaceae* obtuvieron una reducción de 62% de Arsénico, 71.7% de Cadmio, 45% de Cobre, 80% de Zinc y 57.7% de Plomo. Por otro lado; para la familia de *Pseudomonas* se obtuvieron una reducción de 62% de Arsénico, 64.5% de Cadmio, 46.5% de Cobre, 60% de Zinc y 35% de Plomo.

El presente estudio demuestra que las bacterias aisladas de las muestras de suelo son eficientes en disminuir la concentración de los metales, resaltando que la diferencia en los valores de eficiencia podría deberse principalmente a los niveles de pH del suelo y/o a las altas concentraciones de los metales en las muestras de suelo.

## Capítulo V. Conclusiones

- Los tratamientos con *Bacillus* sp. son eficientes para la biorremediación de los metales cadmio, cobre y zinc; las eficiencias de remediación son desde 12% a 21% de cadmio, de 8% a 19% de cobre y de 9% a 23% de zinc.
- Los tratamientos con *Pseudomonas* sp. son eficientes para la biorremediación de metales plata, cadmio y zinc; las eficiencias de remediación son desde 5% a 15% de plata, de 2% a 17% de cadmio y de 11% a 21% de zinc.
- Los tratamientos con *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp., son eficientes para la biorremediación de los metales plata, arsénico, cadmio y zinc; las eficiencias de remediación son desde 5% a 15% de plata, de 7% a 13% de arsénico, de 5% a 18% de cadmio y de 9% a 20% de zinc.
- Se aislaron en total 15 cepas de las cuales 12 son del género *Bacillus* sp. y 3 son del género *Pseudomonas* sp.
- Se determinaron los parámetros físicos como son pH, humedad y conductividad obteniéndose en promedio 2.71 unidades de pH por lo cual podemos decir que son suelos ácidos, con una humedad en promedio de 16.47 % y con una conductividad en promedio de 413.50 *ms/cm*, lo cual nos representa un suelo con alta conductividad debido a la presencia de iones y alta presencia de sales solubles en el suelo.
- Se analizaron las concentraciones de metales en las muestras de suelo, revelando niveles elevados de metales que exceden las regulaciones ambientales nacionales e internacionales para la categoría de suelo industrial extractivo. Estas elevadas concentraciones pueden atribuirse a la presencia de actividades mineras en las cercanías del área de estudio.
- Las especies de *Bacillus* sp y *Pseudomonas* sp obtenidas de las muestras de suelo son *B. Subtilis*, *B. Megaterium*, *B. Fastidiosus*, *B. Cereus* y *P. Aeruginosa*.

## Capítulo VI. Recomendaciones

- Realizar la identificación molecular a las cepas aisladas en el presente estudio para identificar a qué especie bacteriana pertenecen.
- Continuar con la investigación de la eficiencia de biorremediación de metales debido a que las cepas presentaron mayor eficiencia de remediación de metales es por ello de la importancia de continuar con la investigación.
- Buscar otras alternativas de biorremediación usando bacterias propias del área impactada por metales, debido a que se observaron eficiencias en la remoción de metales mayor al 20%, dado que las concentraciones de metales en los suelos son altas concentración especialmente en los metales pesados de plomo, zinc, arsénico.
- Investigar la eficiencia de remediación de metales usando tratamientos combinados tantos tratamientos químicos con biológicos para evaluar la capacidad de remediación de metales.
- Realizar más pruebas bioquímicas para poder identificar a que especie pertenecen las cepas aisladas de *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. para luego compararlos con el Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática.
- Las especies de *Bacillus* sp. son resistentes o se adaptan a condiciones extremas de supervivencia es por ello de la importancia de continuar investigando dicha bacteria para comprobar la eficiencia de biorremediación de metales.

## Capítulo VII. Referencias bibliográficas

- Alloway, B.J. (2013). *Heavy Metals in Soils: Trace Metals and Metalloids in Soils and their Bioavailability*. Third edition. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-94-007-4470-7/cover>
- Anusha, P., & Natarajan, D. (2020). Bioremediation potency of multi metal tolerant native bacteria *Bacillus cereus* isolated from bauxite mines, kolli hills, Tamilnadu-A lab to land approach. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 25, 101581. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1878818119317669>
- Asunción, K. & Rondo, Y. (2021). *Efectividad de las técnicas de biorremediación en suelos contaminados con metales pesados usando microorganismos* [Tesis de pregrado, Universidad César Vallejo]. Repositorio UCV. [https://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12692/81191/Asunci%  
b3n\\_RKT\\_Rondo\\_LYL-SD.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12692/81191/Asunci%c3%b3n_RKT_Rondo_LYL-SD.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Atlas, R. M., & Bartha, R. (2002). *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Prentice Hall. [https://forestaes.uncp.edu.pe/pdf/centro-  
informacion/LE054\\_ECOLOG%  
C3%8DA%20MICROBIANA%20Y%20MICROBIO  
LOG%  
C3%8DA%20AMBIENTAL.pdf](https://forestaes.uncp.edu.pe/pdf/centro-informacion/LE054_ECOLOG%<br/>C3%8DA%20MICROBIANA%20Y%20MICROBIOLOG%<br/>C3%8DA%20AMBIENTAL.pdf)
- Batt, C., & Tortorello, M. L. (2014). *Introduction. Encyclopedia of Food Microbiology*. Editorial Academic Press, Elsevier. <https://search.worldcat.org/es/title/881482027>
- Beltrán, M. E., & Gómez, A. M. (2016). Biorremediación de metales pesados cadmio (Cd), cromo (Cr) y mercurio (Hg), mecanismos bioquímicos e ingeniería genética: una revisión. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*. 12(2), 172-197. <https://doi.org/10.18359/rfcb.2027>
- Bergey's (2013). *Systematic Bacteriology*. Edition second. [https://voifidoctor2.files.wordpress.com/2013/03/bergeys-manual-of-systematic-  
bacteriology-volume-ii-part-b.pdf](https://voifidoctor2.files.wordpress.com/2013/03/bergeys-manual-of-systematic-bacteriology-volume-ii-part-b.pdf)
- Blanco, H., & Lal, R. (2010). *Principles of soil conservation and management*. Springer Nature. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4020-8709-7/cover>
- Bradl, H. (2004). Adsorption of heavy metal ion son solis and soils constituents. *Journal of Colloid and Interface Science*, 277(1), 1-18. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15276031/>
- Buol, S. W. (1995). Sustainability of soil use. *Annual Review of Ecology and Systematic*. 26(1), 25-44. <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.es.26.110195.000325>

- Bush, L. (2022). Infecciones por *Pseudomonas* y patógenos relacionados. *Manual MSD*.  
<https://www.msdmanuals.com/es/hogar/infecciones/infecciones-bacterianas-bacterias-gramnegativas/infecciones-por-pseudomonas>
- Cañizares, R. (2000). Biosorción de metales pesados mediante usos de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42(3), 131-143.  
<https://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2000/mi003f.pdf>
- Castillo, L. (2012). *Identificación de Bacilos Gram negativo no fermentadores para aplicación en celdas de combustible microbianas y en biorremediación* [Tesis de maestría, CIMAV Educación Virtual]. Google Académico.  
<https://cimav.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1004/394>
- College of Agriculture and Life Sciences [CALS]. (2016). *Bacterial Endospores*.  
<https://micro.cornell.edu/research/epulopiscium/bacterial-endospores>
- Conklin, A. R. (2005). *Introduction to soil chemistry: analysis and instrumentation*. John Wiley and Sons.  
[http://lib.jizpi.uz/pluginfile.php/2080/mod\\_resource/content/0/Introduction%20to%20Soil%20Chemistry%20-%20Analysis%20and%20Instrumentation.pdf](http://lib.jizpi.uz/pluginfile.php/2080/mod_resource/content/0/Introduction%20to%20Soil%20Chemistry%20-%20Analysis%20and%20Instrumentation.pdf)
- Dhal, B., Thatoi, H., Das, N., & Pandey, B. (2013). Chemical and microbial remediation of hexavalent chromium form contaminated soil and mining/metallurgical solid waste: A review. *Journal of hazardous materials*, 250, 272-291.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23467183/>
- Doran, J. W., & Parkin, T. B. (1994). *Defining soil quality for a sustainable environment*. Special Publication.  
<https://access.onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.2136/sssaspepub35>
- Emenike, C.U., Jayanthi, B., Agamuthu, P., & Fauziah, S.H. (2018). Biotransformation and removal of heavy metals: A review of phytoremediation and microbial remediation assessment on contaminated soil. *Environmental Reviews*, 26(2), 156-168.  
<https://cdnsiencepub.com/doi/abs/10.1139/er-2017-0045>
- Errington J. (2003). Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature Reviews Microbiology*, 1(2), 117-126. <https://www.nature.com/articles/nrmicro750>
- Fierer, N., Schimel, J. P., & Holden, P. A. (2003). Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(1), 167-176.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0038071702002511>
- Fuentes, G. (2012). (2023, 1 de diciembre). *Qué efectos producen los metales pesados en el medio ambiente*. [https://mundosustentable.com.mx/que-efectos-producen-los-metales-pesados-en-el-medio-ambiente/?expand\\_article=1](https://mundosustentable.com.mx/que-efectos-producen-los-metales-pesados-en-el-medio-ambiente/?expand_article=1)

- Fundación Chile (2015). *Manual de Tecnologías de Remediación de Sitios Contaminados*. [https://fch.cl/wp-content/uploads/2019/10/manual-de-tecnologias-de-remediacion-de-sitios-contaminados\\_baja-1.pdf](https://fch.cl/wp-content/uploads/2019/10/manual-de-tecnologias-de-remediacion-de-sitios-contaminados_baja-1.pdf).
- Garbisu, C., & Alkorta, I. (2003). Basic concept son heavy metal soil bioremediation. *European journal of mineral processing and environmental protection*, 3(1), 58-66. <https://www.911metallurgist.com/blog/wp-content/uploads/2015/12/Basic-concepts-on-heavy-metal-soil-bioremediation.pdf>
- Jhonson, C. (2009). *Biology of soil science*. Editorial Oxford Book Company. <https://www.amazon.com/Biology-Soil-Science-Charlotte-Jhonson/dp/8189473964>
- Juwarkar, A., Nair, A., Dubey, K., Singh, S., & Devotta, S. (2007). Biosurfactant technology for remediation of cadmium and lead contaminated soils. *Revista Chemosphere*, 68(10), 1996-2002. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17399765/>
- Kavaruma, V., & Esposito, E. (2010). Biotechnological strategies applied to the decontamination of soil polluted with heavy metals. *Biotechnology advances*, 28(1), 61-69. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0734975009001530>
- Kemp, D.D. (1998). *The environment dictionary*. Michigan State University. <https://catalog.lib.msu.edu/Record/folio.in00002281726/Similar>
- Komárek, M., Cadková, E., Chrástný, V., Bordas, F. & Bollinger, J.C. (2010). Contamination of vineyard soils with fungicides: a review of environmental and toxicological aspects. *Environment International*, 36(1), 138-151. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19913914/>
- Kumar, A. & Maiti, S.K. (2015). Assessment of potentially toxic heavy metal contamination in agricultural fields, sediment, and water from an abandoned chromite-asbestos mine waste of Roro hill, Chaibasa, India. *Environmental Earth Sciences*, 74, 2617-2633. <https://link.springer.com/article/10.1007/s12665-015-4282-1>
- Lal, R. (2007). Carbon management in agricultural soils. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*. 12, 303-322. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11027-006-9036-7>
- Larios, M. (2014). *Niveles de Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb Y Zn en los suelos de ribera de la cuenca del rio Turia* [Tesis de posgrado, Universidad Autónoma de Barcelona]. Google Académico. <https://digital.csic.es/handle/10261/141280>
- Larson, W.E. y Pierce, F.J. (1991). Conservation and Enhancement of Soil Quality. *Scientific Research*, 2. <https://scirp.org/reference/referencespapers?referenceid=3210641>
- Lavelle, P., & Spain, A. V. (2001). Soil ecology. *Kluwer Academic Publishers*. <https://www.scirp.org/reference/referencespapers?referenceid=2134988>

- Liu, L., Zhu, K., Wurzbürger, N., & Zhang, J. (2020). Relationships between plant diversity and soil microbial diversity vary across taxonomic groups and spatial scales. *Ecosphere*, 11(1), e02999. <https://doi.org/10.1002/ecs2.2999>
- Luo, L., Meng, H., Wu, R. & Gu, J.-D. (2017). Impact of nitrogen pollution/deposition on extracellular enzyme activity, microbial abundance and carbon storage in coastal mangrove sediment. *Chemosphere*, 177, 275-283. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045653517303806>
- Maier, R. M., Pepper, I. L., & Gerba, C. P. (2009). *Environmental microbiology*. Editorial Academic Press. [https://booksite.elsevier.com/samplechapters/9780123705198/Sample\\_Chapters/01~Front\\_Matter.pdf](https://booksite.elsevier.com/samplechapters/9780123705198/Sample_Chapters/01~Front_Matter.pdf)
- McBride, M.B. (1994). *Environmental chemistry of soils*. Oxford University Press. <https://www.amazon.com/Environmental-Chemistry-Soils-Murray-McBride/dp/0195070119>
- McLaughlin, M.J., Palmer, L.T., Tiller, K.G., Beech, T.A. & Smart, M.K. (1994). Increased Soil Salinity Causes Elevated Cadmium Concentrations in Field-Grown Potato Tubers. *Journal of Environmental Quality*, Vol. 23, No. 5, pp. 1013-1018. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34872221/>
- McSpadden, B. B. (2004). Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. In *Agricultural Systems*. *Phytopathology*, 94(11), 1252-1258. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18944463/>
- Mena, M. P., & Rafael, H. A. (2017). *Biorremediación de Metales Pesados con Aislados Microbianos Procedentes de Pasivos Ambientales Mineros y Aguas del Río Hualgayoc - Cajamarca* [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo]. Repositorio Unprg. <https://repositorio.unprg.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12893/994/BC-TES-5757.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Mileusnić, M., Mapani, B.S., Kamona, A.F., Ružičić, S., Mapaure, I. & Chimwamuombe, P.M. (2014). Assessment of agricultural soil contamination by potentially toxic metals dispersed from improperly disposed tailings, Kombat mine, Namibia. *Journal of Geochemical Exploration*, 144, 409-420. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0375674214000119>
- Ministerio de Energía y Minas [MEN]. (2022, 7 de setiembre). *Resolución Ministerial N° 335-2022-MINEM/DM*. <https://www.gob.pe/institucion/minem/normas-legales/3456690-335-2022-minem-dm>
- Ministerio de Energía y Minas [MEN]. (2022). *Boletín Estadístico Minero*. <https://www.gob.pe/institucion/minem/colecciones/6-boletin-estadistico-minero>

- Ministerio del Ambiente (2014). *Guía Para el Muestreo de Suelos*.  
<https://www.minam.gob.pe/calidadambiental/wp-content/uploads/sites/22/2013/10/GUIA-PARA-EL-MUESTREO-DE-SUELOS-final.pdf>
- Ministerio del Ambiente (2021). *Guía para evaluar sitios contaminados y la Elaboración de Planes Dirigidos a la Remediación*.  
[https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/2009315/Anexo%20RM%20118-2021-MINAM%20-%20GUIA%20DE%20EVALUACION\\_DGCA.pdf.pdf](https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/2009315/Anexo%20RM%20118-2021-MINAM%20-%20GUIA%20DE%20EVALUACION_DGCA.pdf.pdf)
- Ministerio del Ambiente. (2017). *Decreto Supremo N° 011-2017-MINAM*.  
<https://sinia.minam.gob.pe/normas/aprueban-estandares-calidad-ambiental-eca-suelo-0#:~:text=Los%20ECA%20para%20Suelo%20constituyen,productivas%2C%20extractivas%20y%20de%20servicios.>
- Muñoz, L., Olivera, P., Santillán, M., & Tamariz, C. (2019). Microorganismos tolerantes a metales pesados del pasivo minero Santa Rosa, Jangas (Perú). *Revista Peruana de Biología*, 26(1), 109-118.  
[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1727-99332019000100013](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332019000100013)
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M. T., Landi, L., Pietramellara, G., & Renella, G. (2003). Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 54(4), 655-670.  
<https://bsssjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1351-0754.2003.0556.x>
- Nieder, R., & Benbi, D. K. (2008). Bidirectional biosphere-atmosphere interactions. *Carbon and nitrogen in the terrestrial environment*, 235-305.  
[https://www.researchgate.net/publication/313965337\\_Bidirectional\\_Biosphere-Atmosphere\\_Interactions](https://www.researchgate.net/publication/313965337_Bidirectional_Biosphere-Atmosphere_Interactions)
- Nielsen, M. N., & Winding, A. (2002). *Microorganisms as indicators of soil health*. National Environmental Research Institute of Denmark.  
[https://www.dmu.dk/1\\_viden/2\\_Publikationer/3\\_fagrappporter/rapporter/FR388.pdf](https://www.dmu.dk/1_viden/2_Publikationer/3_fagrappporter/rapporter/FR388.pdf)
- Njoku, K. L., Akinyede, O. R., & Obidi, O. F. (2020). Microbial Remediation of Heavy Metals Contaminated Media by *Bacillus megaterium* and *Rhizopus stolonifer*. *Scientific African*, 10, e00545.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468227620302830>
- Ogundele, L.T., Owoade, O.K., Hopke, P.K. & Olise, F.S. (2017). Heavy metals in industrially emitted particulate matter in Ile-Ife, Nigeria. *Environmental Research*, 156, 320-325. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28390299/>

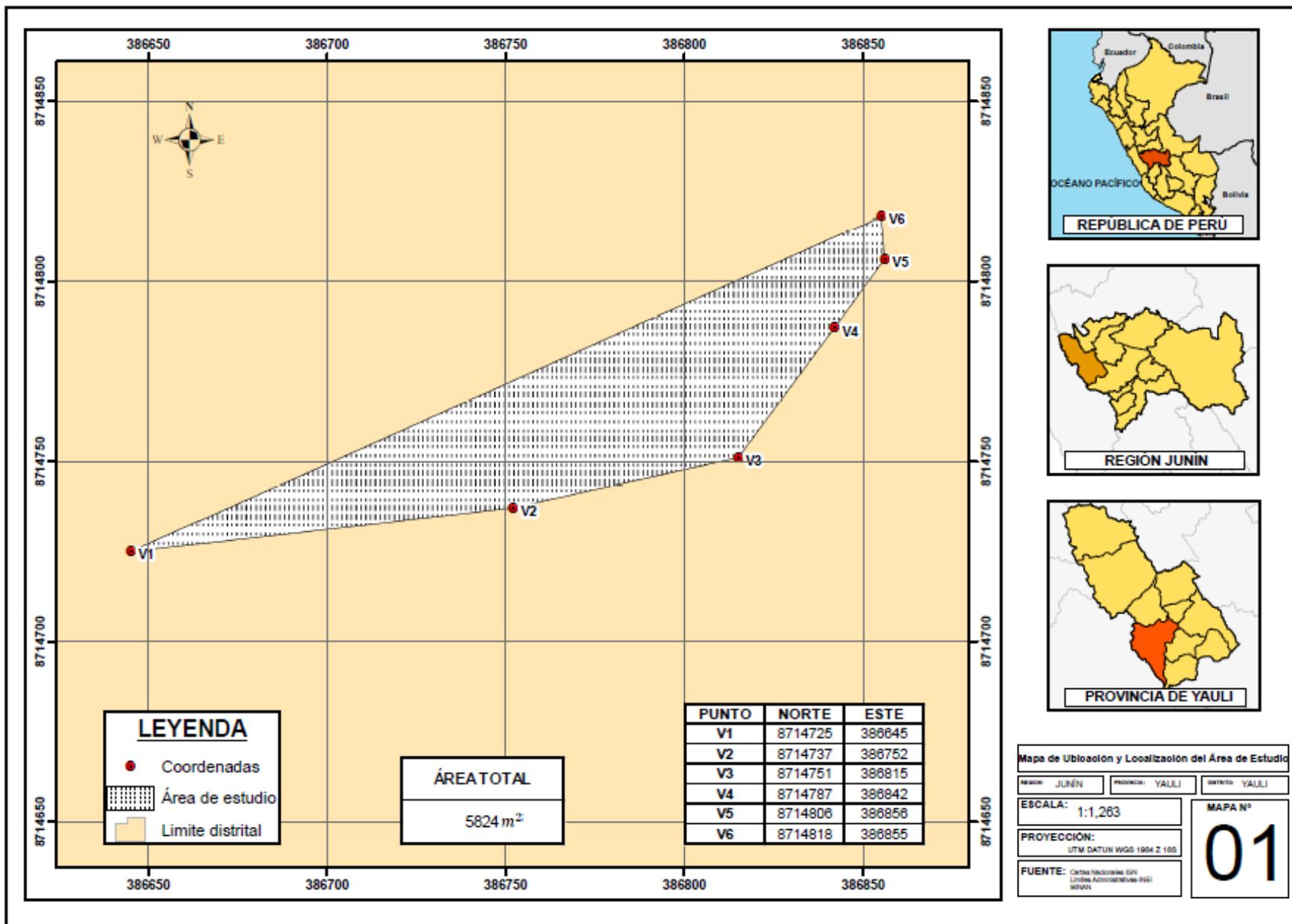
- Ojuederie, O. B., & Babalola, O. O. (2017). Microbial and plant-assisted bioremediation of heavy metal polluted environments: A review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(12), 1504. <https://www.mdpi.com/1660-4601/14/12/1504>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2019). *La contaminación del suelo: Una realidad oculta*. <https://www.fao.org/3/i9183es/i9183es.pdf>
- Organización Internacional de Normalización (ISO). (2015). *Calidad del suelo. Vocabulario - ISO 11074:2015*. <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:11074:ed-2:v1:en>
- Organización Internacional de Normalización (ISO). (2015). *Calidad del suelo. Vocabulario - ISO 11074:2015*.
- Otiniano, N. M. (2018). Biorremediación de metales pesados. *UCV-SCIENTIA*, 9(1), 171-171. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7114837>
- Parr, J.F., Papendick, R.I., Hornick, S.B. y Meyer, R.E. (1992). Soil quality: attributes and relationships to alternative and sustainable agriculture. *American J. of Alternative Agriculture*, 7, 5-11. <https://acortar.link/V9Bjks>
- Paul, E. A. (2007). *Soil microbiology, ecology, and biochemistry*. Academic Press is an imprint of Elsevier. <https://msibsri4313.files.wordpress.com/2013/11/soil-microbiology-ecology-and-biochemistry.pdf>
- Pepper, I. L., & Gerba, C. P. (2005). *Environmental microbiology: a laboratory manual*. Academic Press. <https://www.amazon.com/Environmental-Microbiology-Laboratory-Ian-Pepper/dp/0125506562>
- Pérez, A., Romero, D., & De Vicente, A. (2011). Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(2):187-93. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21211960/>
- Pérez, G. (2005). *Disponibilidad de metales tóxicos en sitios contaminados* [Tesis de pregrado, Universidad Autónoma de Barcelona]. Google Académico. <https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2005/tdx-0503106-000433/gpg1de2.pdf>
- Pietrzak, U. & McPhail, D.C. (2004). Copper accumulation, distribution and fractionation in vineyard soils of Victoria, Australia. *Geoderma*, 151-166. [https://www.researchgate.net/publication/223347057\\_Copper\\_accumulation\\_distribution\\_and\\_fractionation\\_in\\_vineyard\\_soils\\_of\\_Victoria\\_Australia](https://www.researchgate.net/publication/223347057_Copper_accumulation_distribution_and_fractionation_in_vineyard_soils_of_Victoria_Australia)
- Rees, R. M., Ball, B. C., Campbell, C. D., & Watson, C. A. (2001). Sustainable management of soil organic matter. *Rees RM, Ball BC, Campbell CD and Watson CA (Eds)*. <http://ndl.ethernet.edu.et/bitstream/123456789/3295/1/20.pdf>

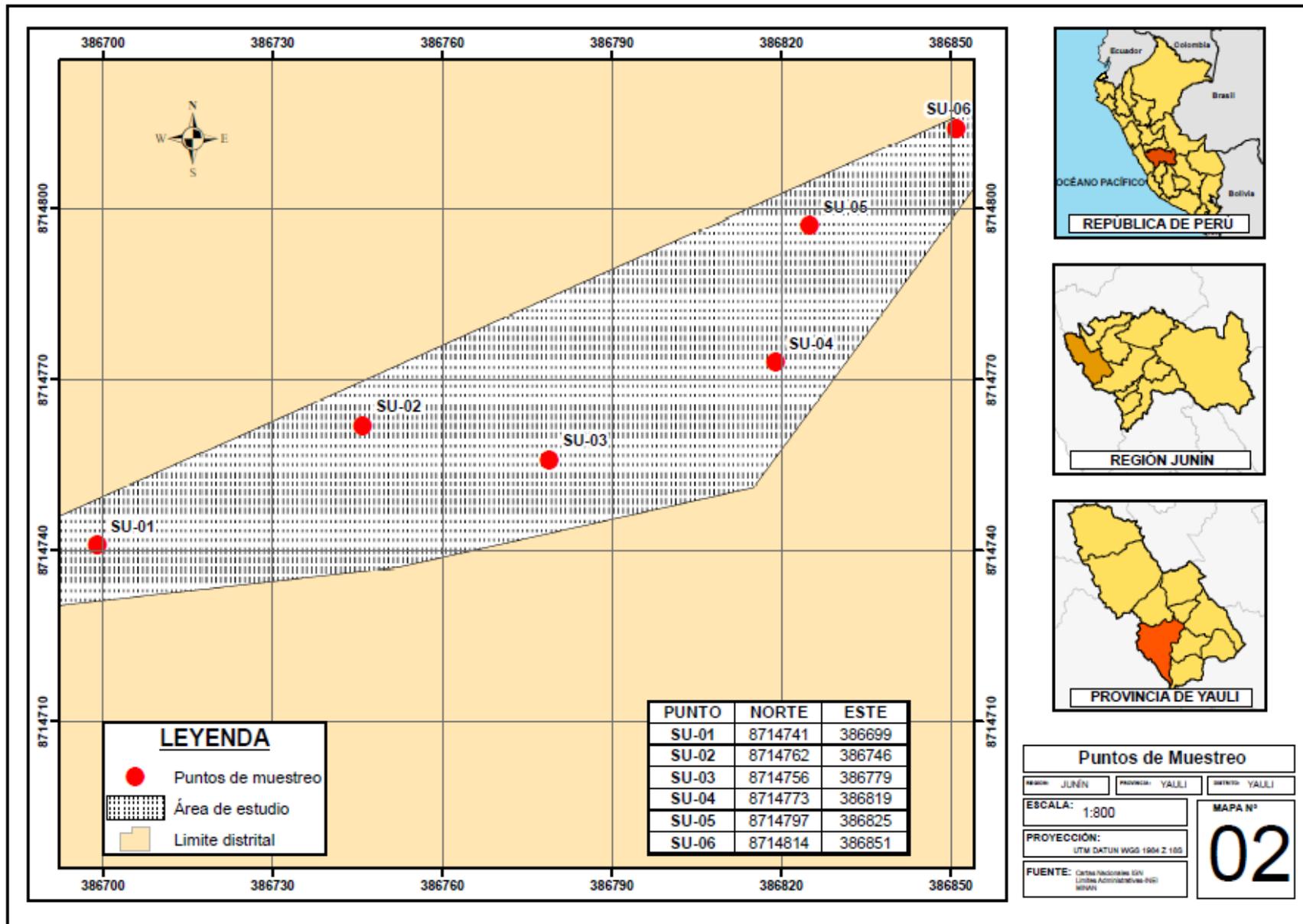
- Reyez, M. (2010). Comportamiento de los metales pesados en el suelo. *Épsilon*.  
<https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1105&context=ep>
- Rillig, M. C., & Mummey, D. L. (2006). Mycorrhizas and soil structure. *New Phytologist*.  
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01750.x>
- Ros, M., Rodríguez, I., García, C., & Hernández, T. (2010). Microbial communities involved in the bioremediation of an aged recalcitrant hydrocarbon polluted soil by using organic amendments. *Bioresour Technol*.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852410006401>
- Rousk, J., Demoling, L. A., & Baath, E. (2009). Contrasting short-term antibiotic effects on respiration and bacterial growth compromises the validity of the selective respiratory inhibition technique to distinguish fungi and bacteria. *Microbial Ecology*.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18797957/>
- Saeedi, M.; Li, L. & Grace, J. (2018). Desorption and mobility mechanisms of co-existing polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals in clays and clay minerals. *Journal of Environmental Management*.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0301479718301725>
- Segovia, M. (2014). *Bioaccesibilidad y biodisponibilidad de elementos traza en suelos contaminados y plantas* [Tesis de posgrado, Universidad de Chile]. Google Académico.  
<https://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/138279/Bioaccesibilidad-y-biodisponibilidad-de-elementos-traza-en-suelos-contaminados-y-plantas.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Servicios Geológico de Estados Unidos (2022). *Mineral Commodity Summaries 2022*.  
<https://pubs.usgs.gov/periodicals/mcs2022/mcs2022.pdf>
- Six, J., Frey, S.D., Thiet, R.K. and Batten, K.M. (2006), Bacterial and Fungal Contributions to Carbon Sequestration in Agroecosystems. *Soil Science Society of America Journal*. 70: 555-569. <https://doi.org/10.2136/sssaj2004.0347>
- Soto, C., Gutiérrez, S., Rey-León, A., y González-Rojas, E. (2010). Biotransformación de metales pesados presentes en lodos ribereños de los ríos Bogotá y Tunjuelo. *NOVA*, 8(14). <https://doi.org/10.22490/24629448.450>
- Swartjes, F.A. (2011). *Dealing with Contaminated Sites*. Springer.  
<https://link.springer.com/book/10.1007/978-90-481-9757-6>
- Tejera B, Rojas M. & Heydrich-Pérez M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. <https://www.redalyc.org/pdf/1812/181222321004.pdf>
- Uchimiya, M.; Klasson, T.; Wartelle, L. & Lima, I. (2010). Influence of soil properties on heavy metal sequestration by biochar amendment: 1. Copper sorption isotherms

- and the release of cations. *Chemosphere*.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21190718/>
- Voroney, R. P. (2007). *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*. Academic Press.  
<https://msibsri4313.files.wordpress.com/2013/11/soil-microbiology-ecology-and-biochemistry.pdf>
- Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K.-H., & Whitman, W. B. (Eds.). (2009). *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes (2a ed.)*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-68489-5>
- Xiao, L.; Guan, D.; Paert, M.; Chen, Y.; Li, Q. & Dai, J. (2017). The influence of bioavailable heavy metals and microbial parameters of soil on the metal accumulation in rice grain. *Chemosphere*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28746996/>
- Yousef, Ahmed. (2006). *Food Microbiology; A Laboratory manual*. Limusa.  
<https://www.amazon.com/Food-Microbiology-Laboratory-Ahmed-Yousef/dp/0471391050>
- Zilli, J., Rumjanek, N., Xabier, G., Countinho, H., & Neves, M. (2003). Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. *Alice*.  
<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/338214/1/diversidademicrobianaok.pdf>

## **ANEXOS**

**Anexo 1: Mapa de ubicación del área de estudio y de puntos de muestreo.**





**Anexo 3: Toma de muestras de suelo.**



**Anexo 4: Presencia / Ausencia de bacterias en el suelo.**



a. Caldo Nutritivo HIMEDIA



b. 50 gr de suelo



c. Caldo Nutritivo más suelo



d. Presencia / Ausencia de bacterias en el suelo

**Anexo 5: Preparación de medios de cultivo.**



a. Agar Nutritivo HIMEDIA



b. Agar Nutritivo



d. Agar Cetrimide



c. Placas Petri con Agar Cetrimide

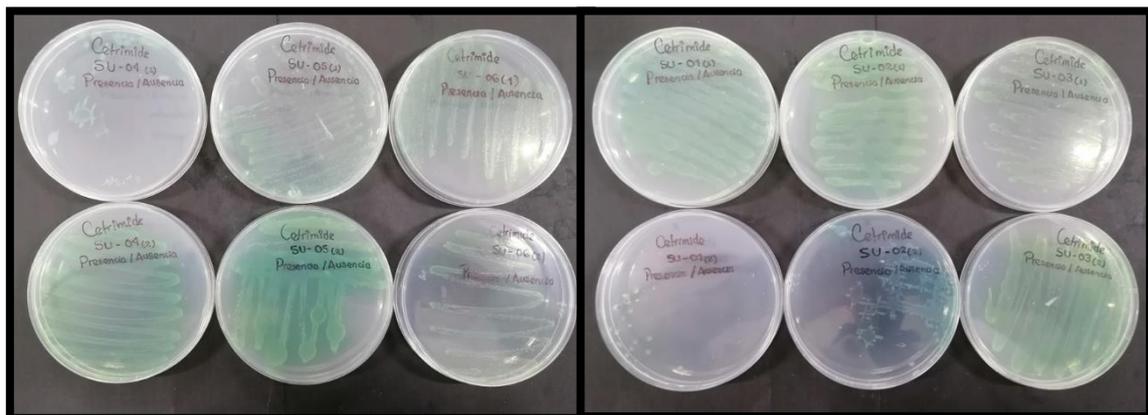


d. Medios de Cultivo Diferenciales (Agar Nutritivo / Agar Cetrimide)

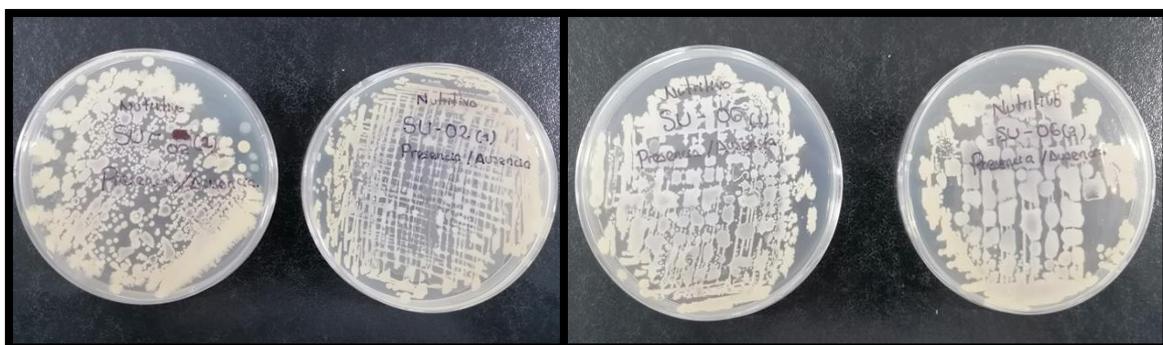
Anexo 6: Presencia / Ausencia de *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp.



a. Sembrado de bacterias en los medios diferenciales.

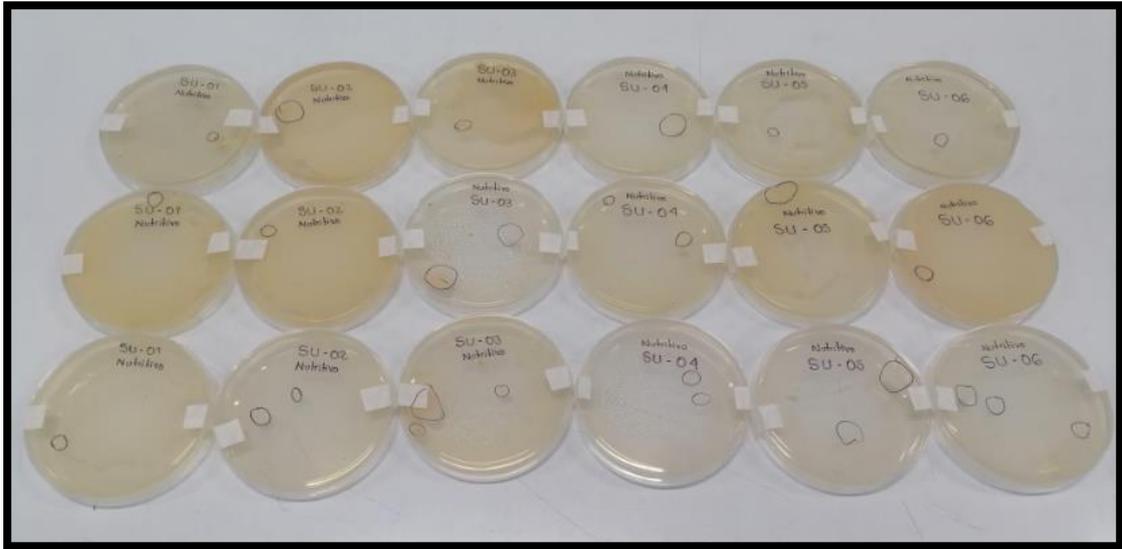


b. Presencia de *Pseudomonas* sp en las muestras de suelo.

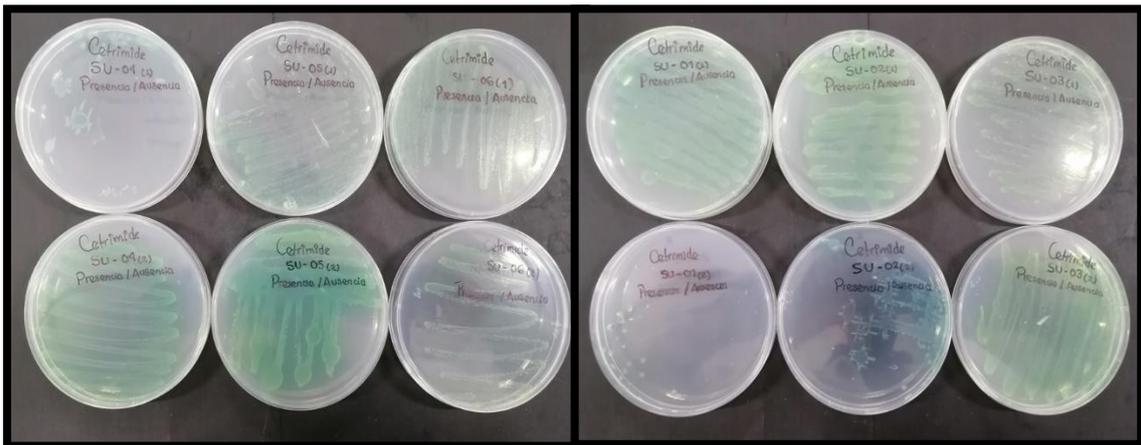


c. Presencia de *Bacillus* sp en las muestras de suelo

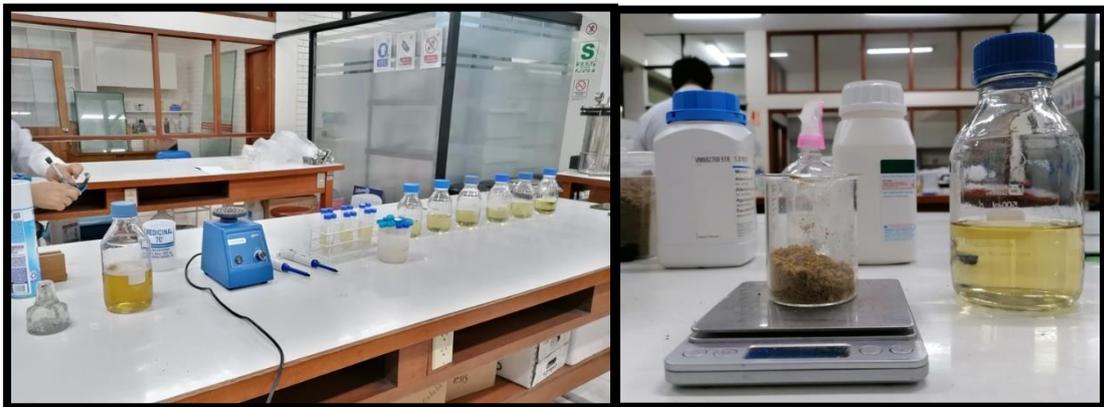
**Anexo 7: Recuento de Bacillus sp y Pseudomonas sp.**



a. Recuento de colonias de Bacillus sp obtenidas en las muestras de suelo.

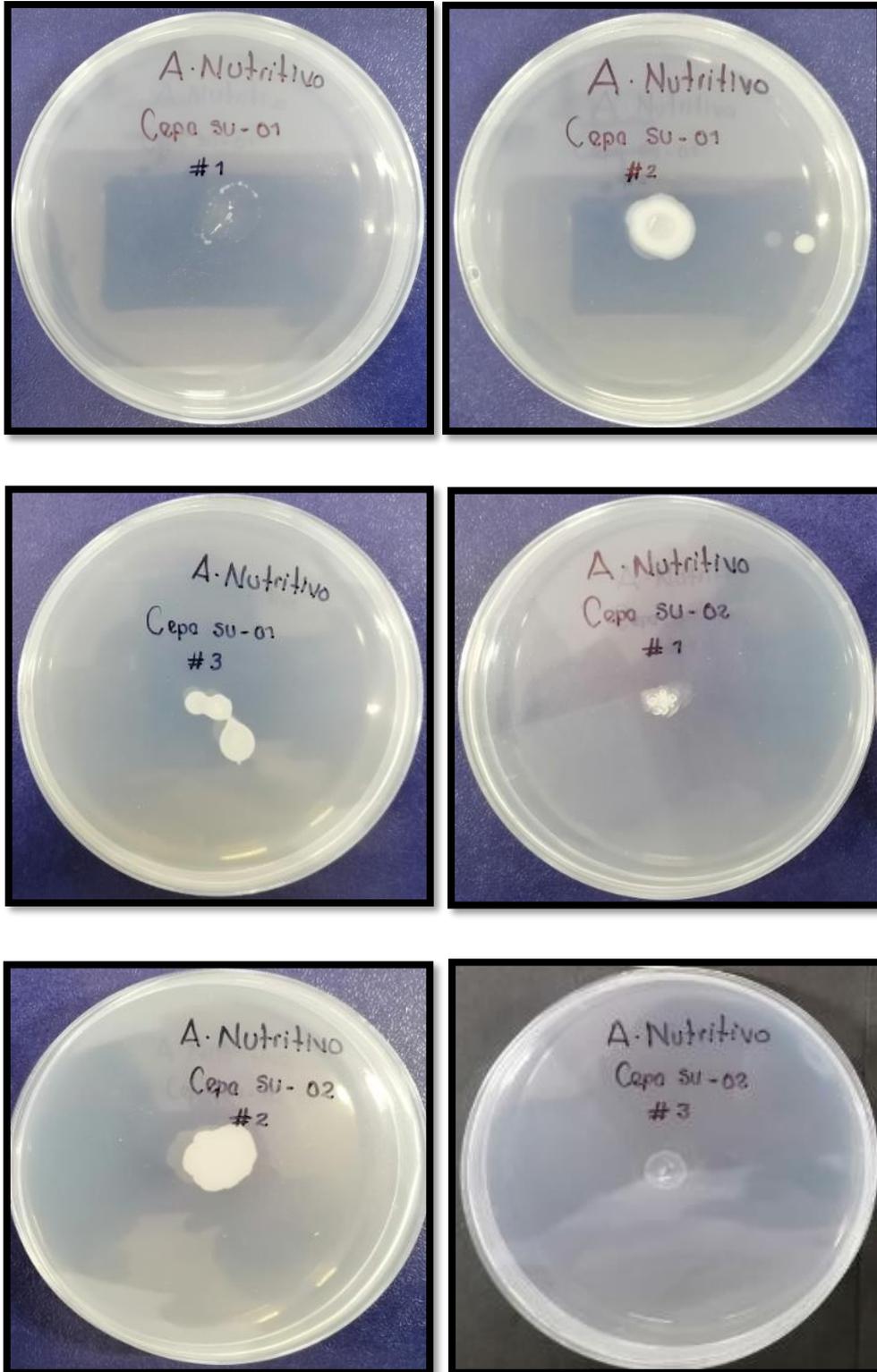


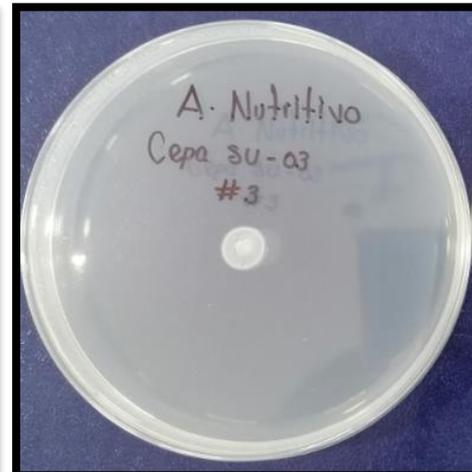
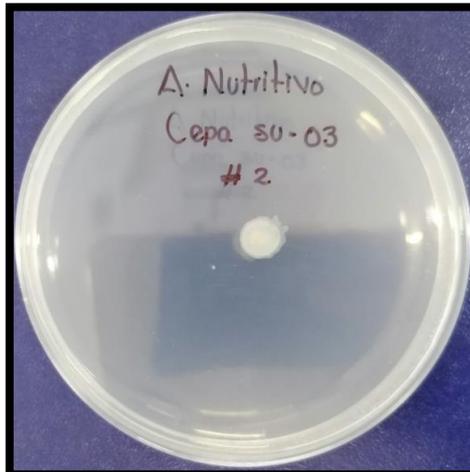
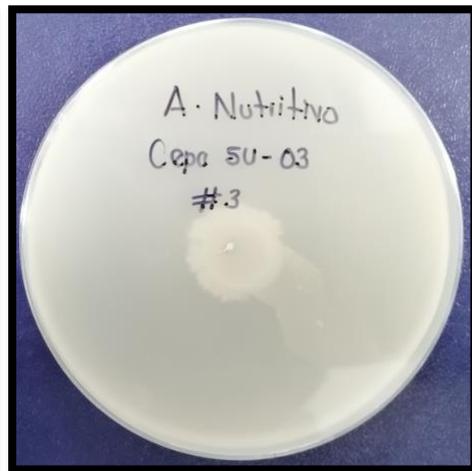
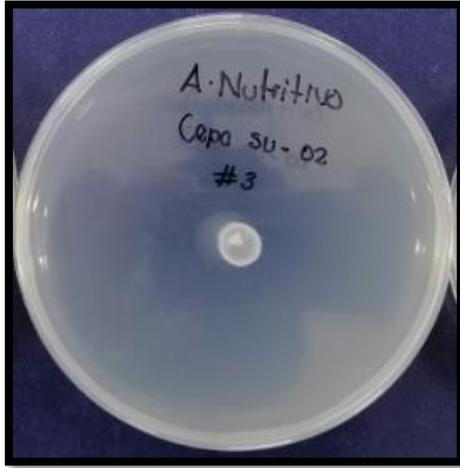
c. Recuento de colonias de Pseudomonas obtenidas en las muestras de suelo.

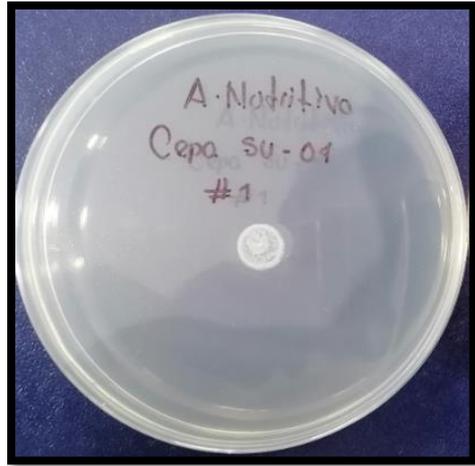
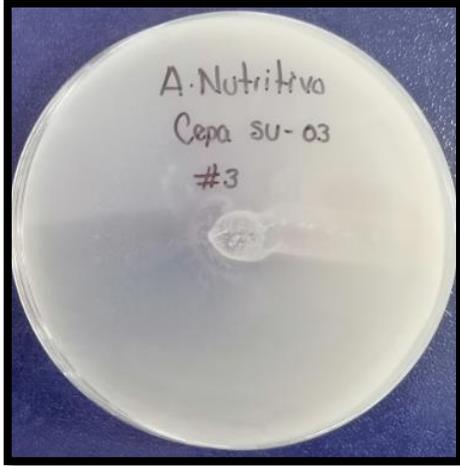


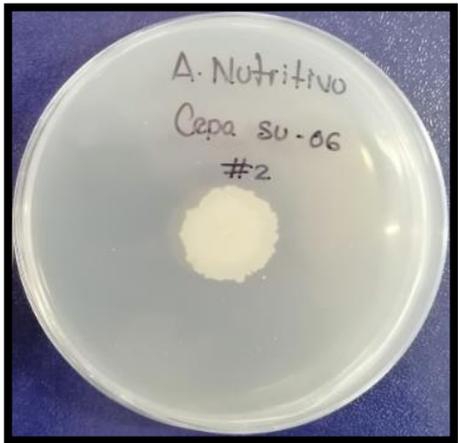
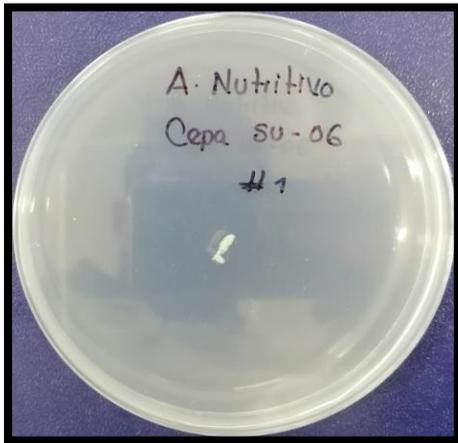
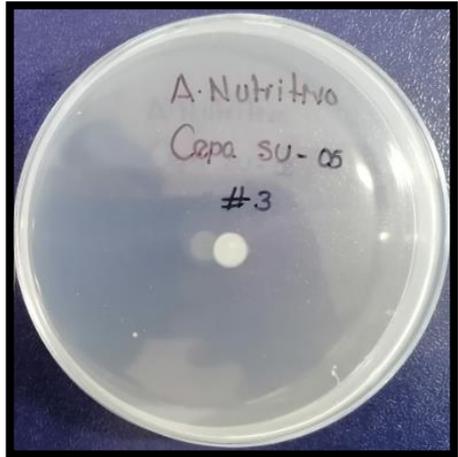
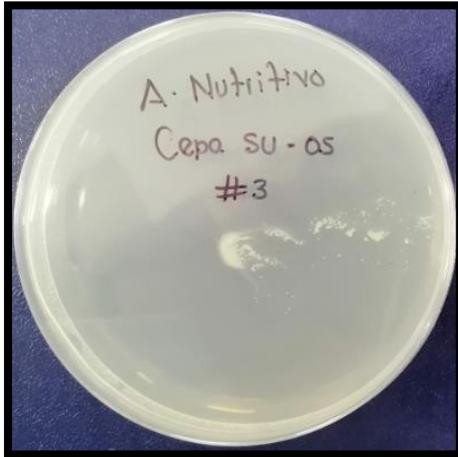
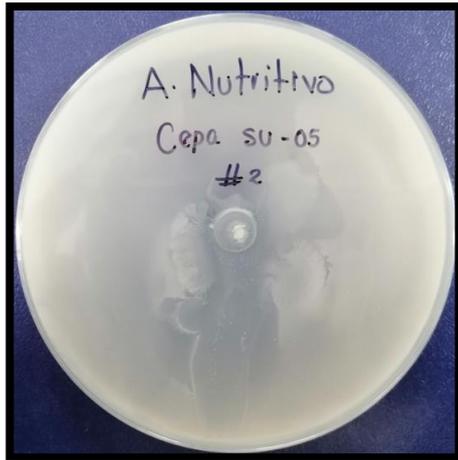
b. Preparación de diluciones en las muestras de suelo.

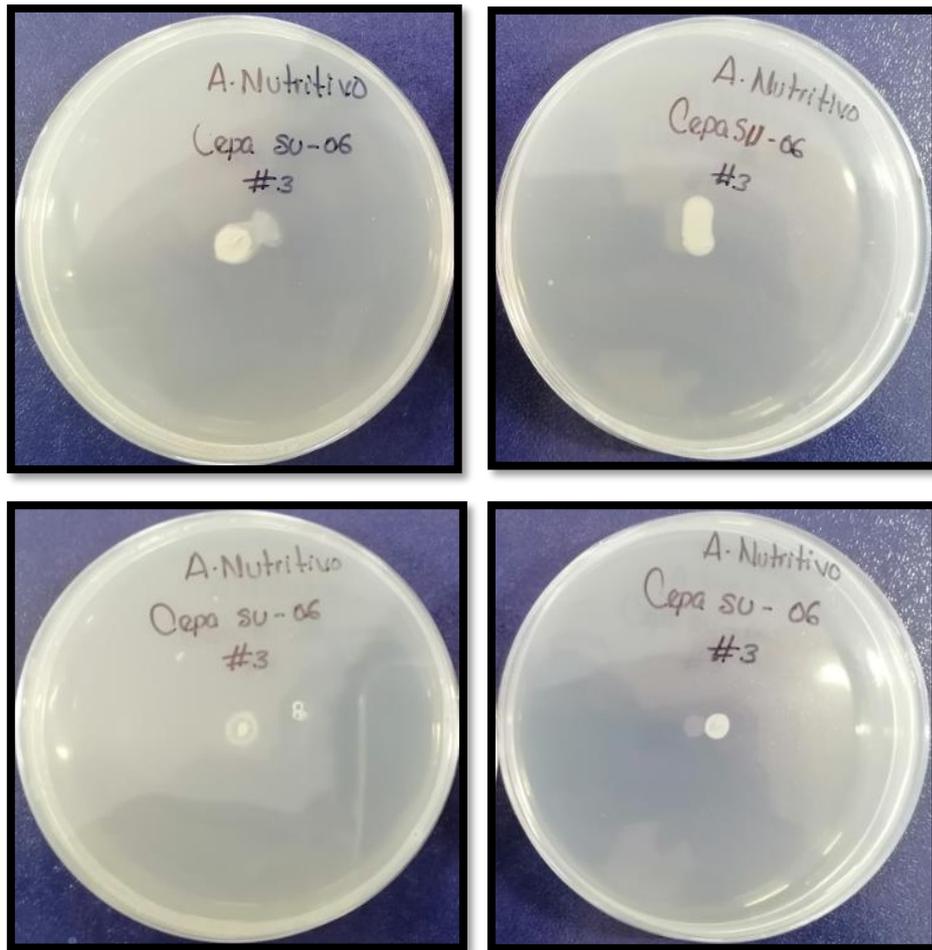
Anexo 8: Colonia de *Bacillus* sp y *Pseudomonas* sp, obtenidas de las muestras de suelo.









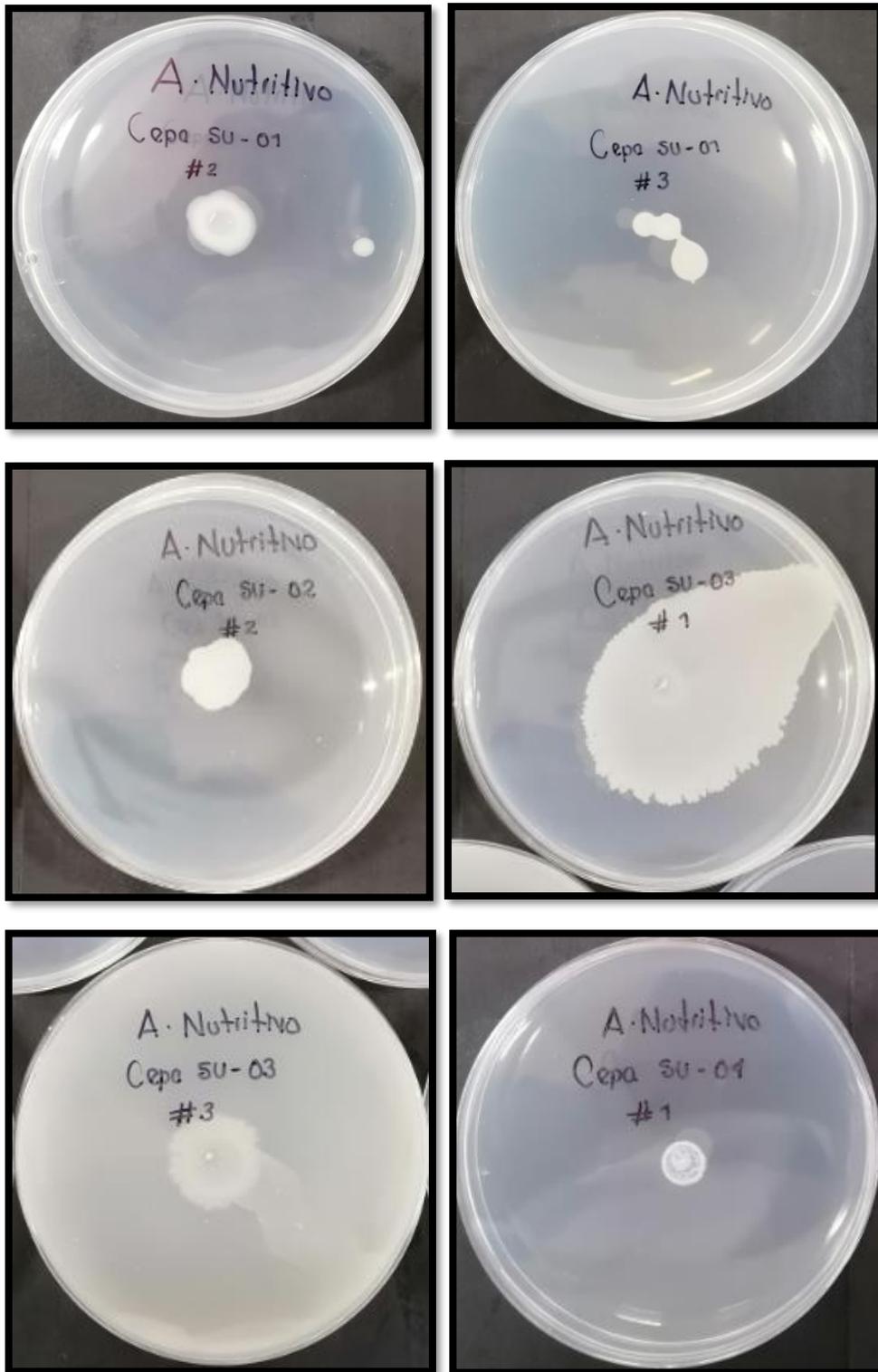


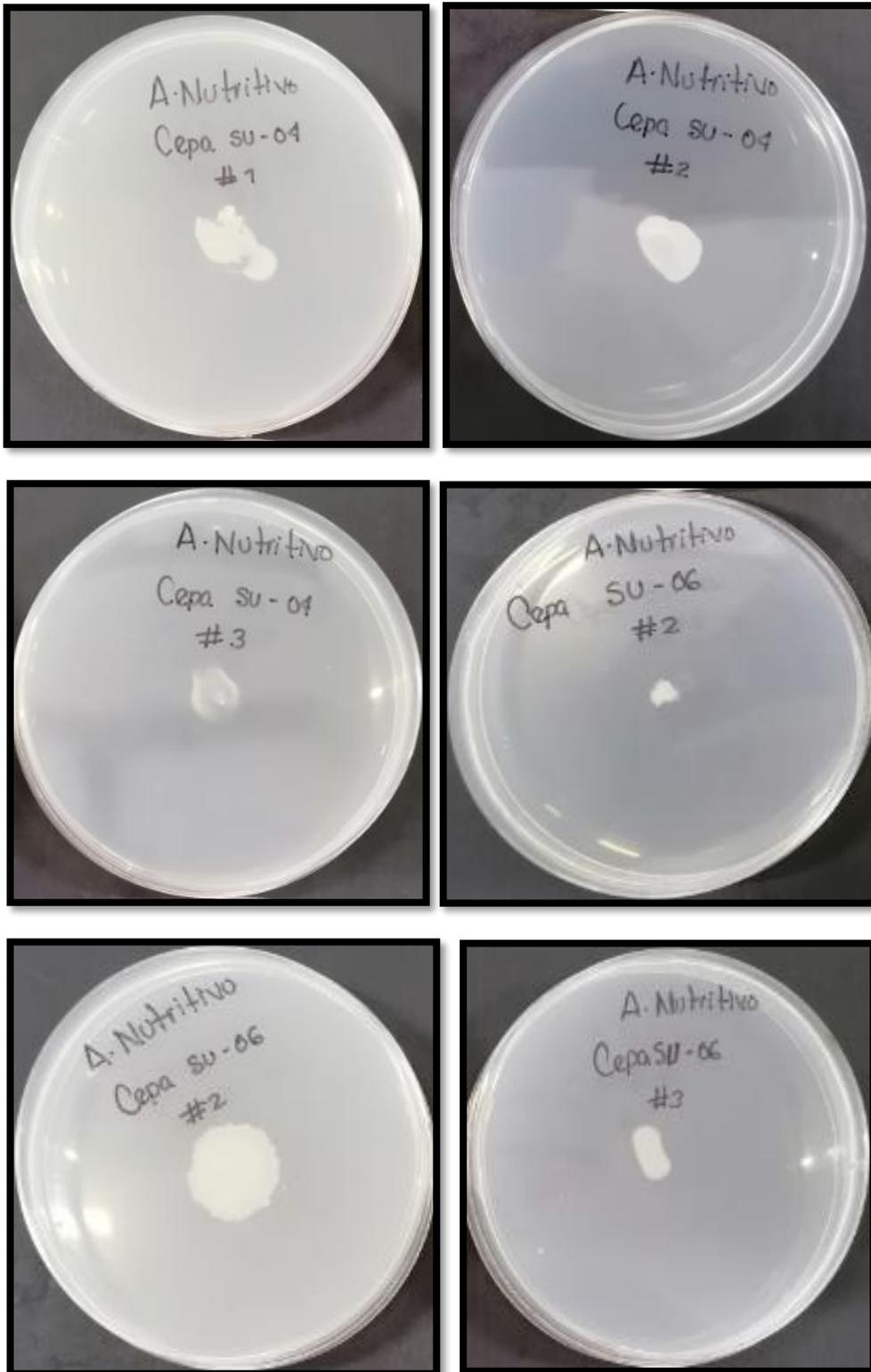
a. Colonias de Bacillus sp obtenidas en las muestras de suelo.



b. Colonias de Pseudomonas sp obtenidas en las muestras de suelo.

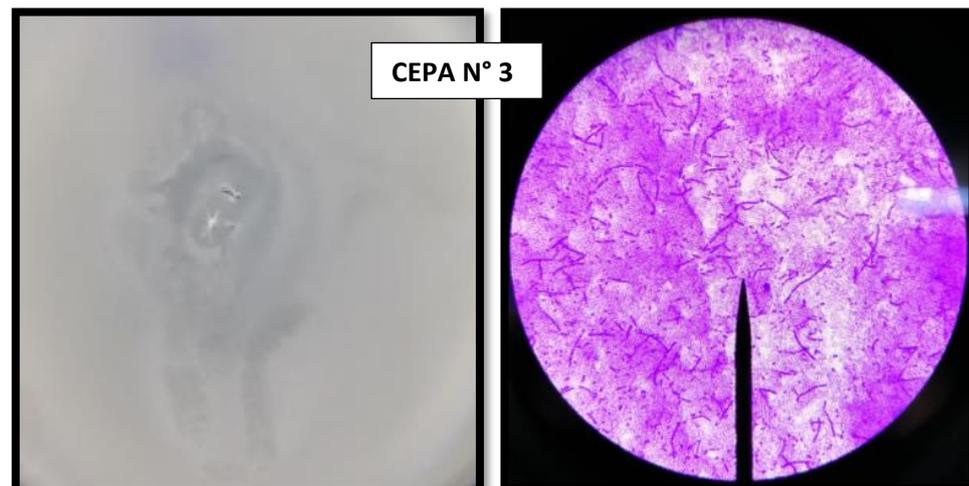
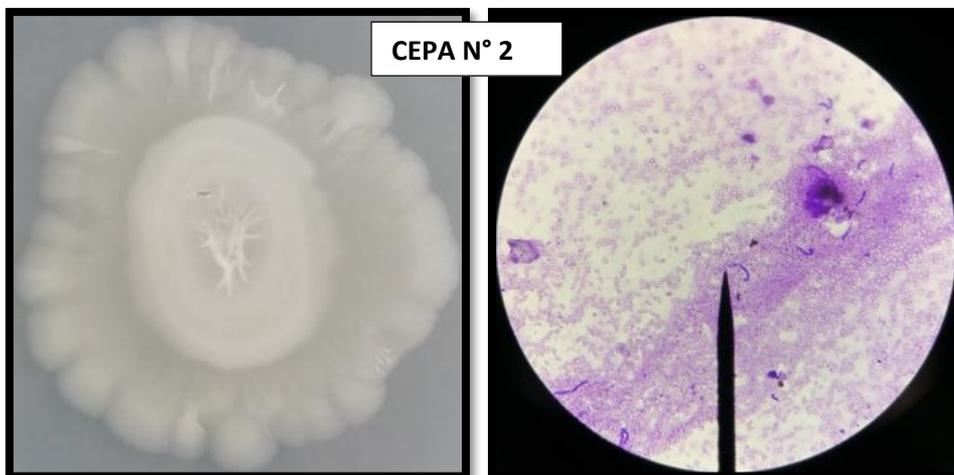
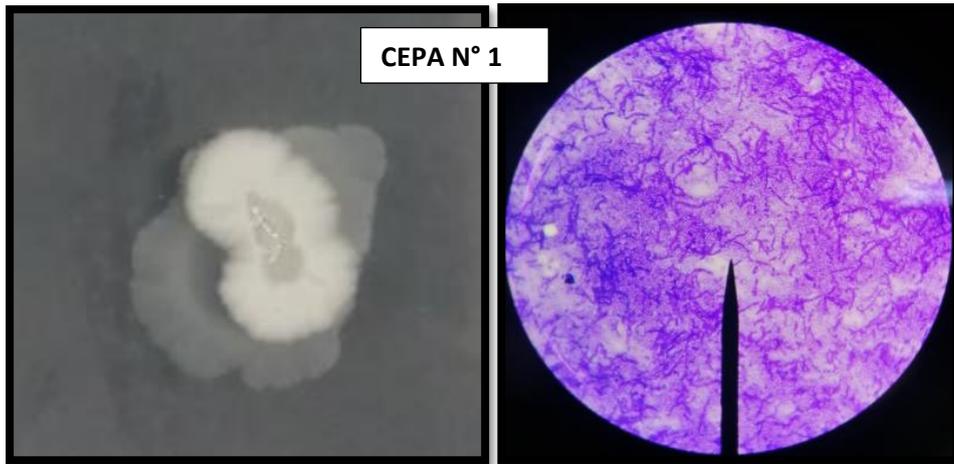
Anexo 9: Colonia de *Bacillus* sp y *Pseudomonas* sp, obtenidas de las muestras de suelo.

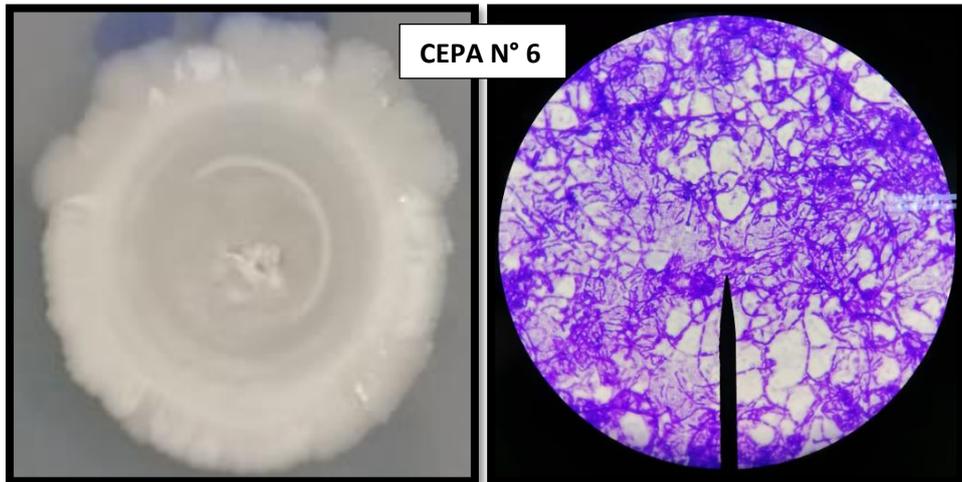
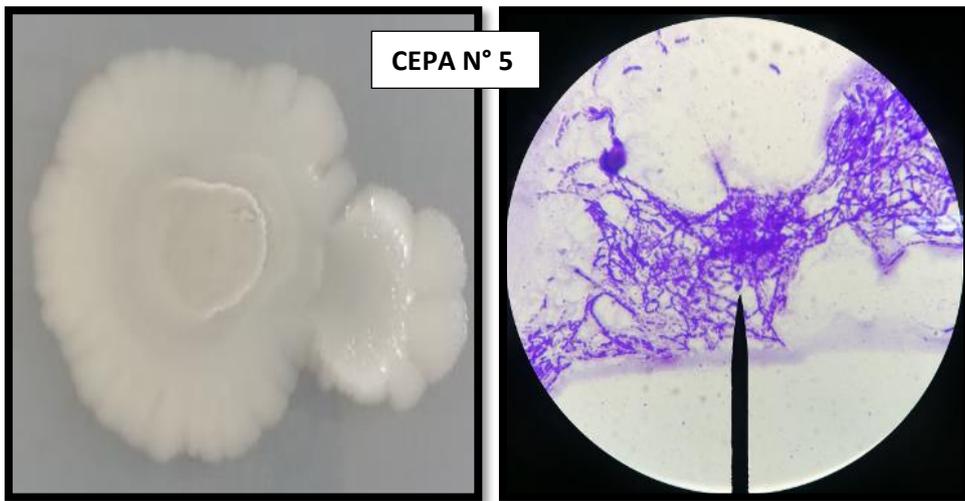
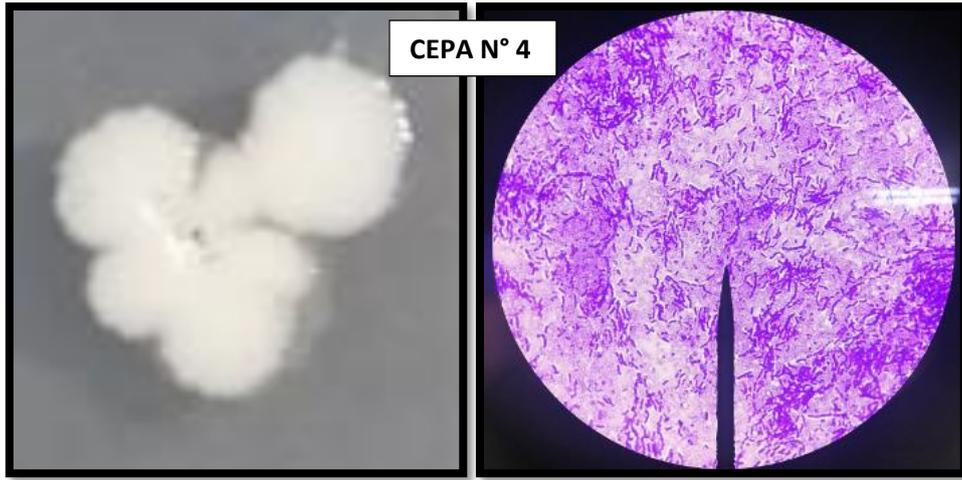


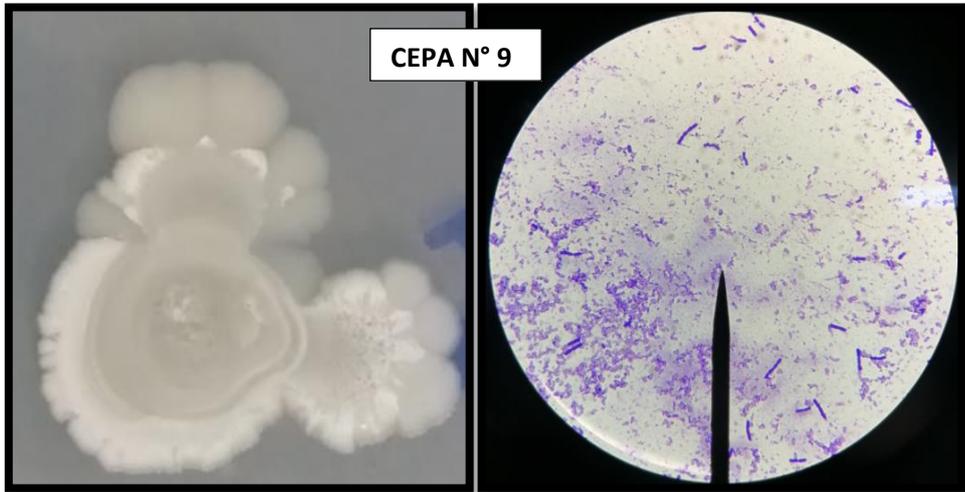
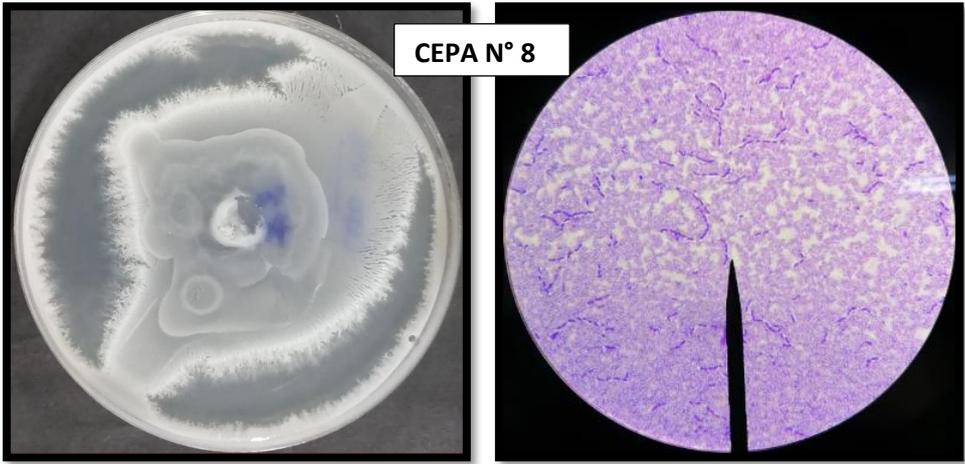
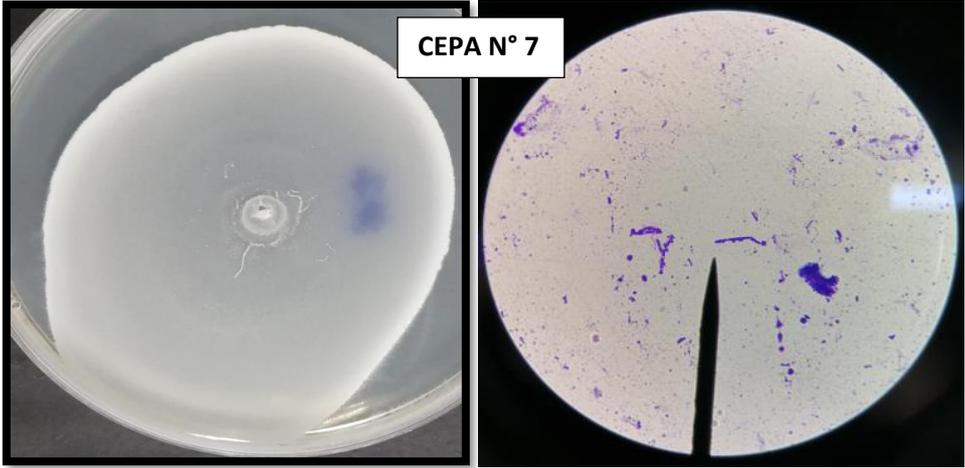


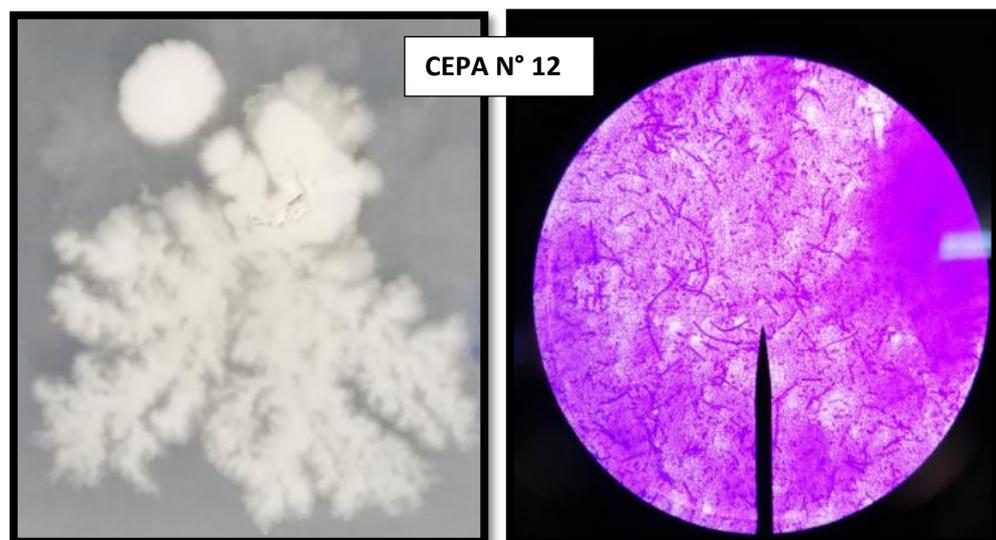
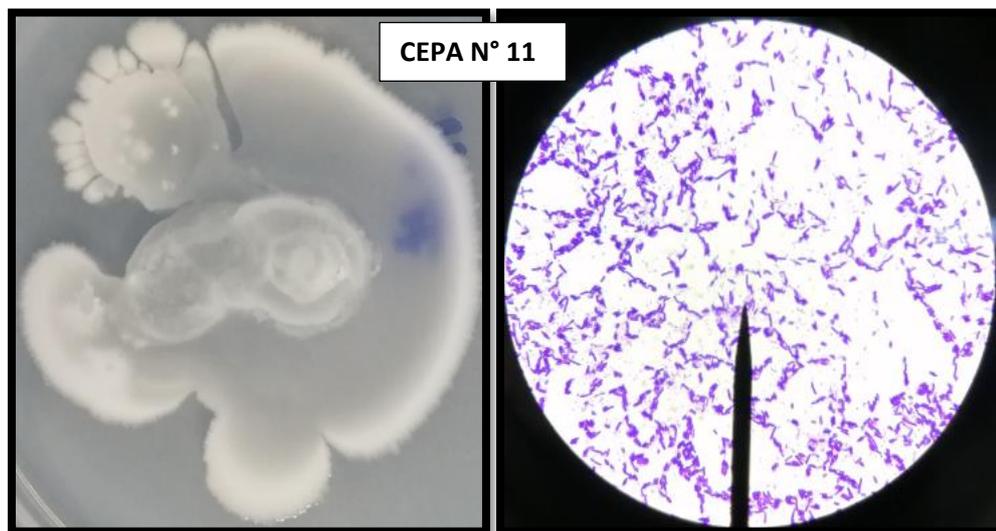
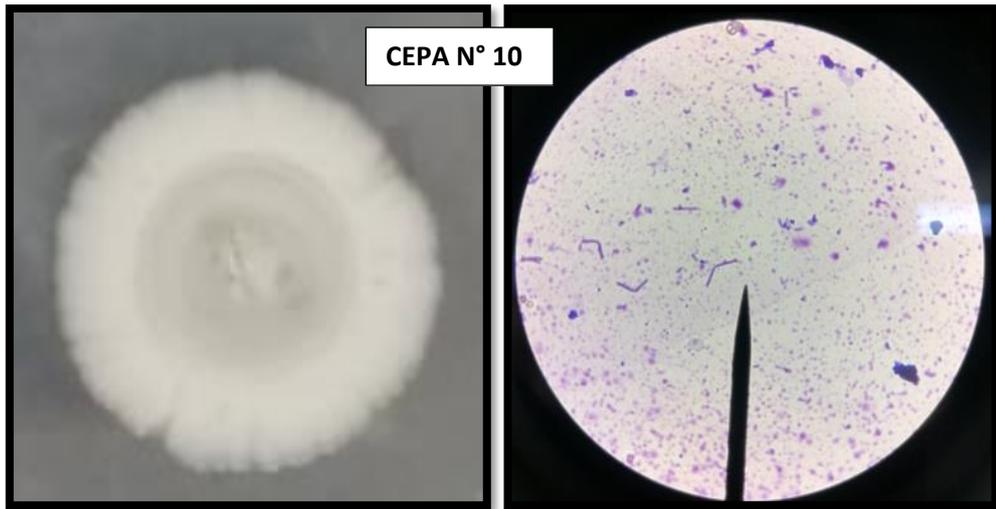
a. Cepas de Bacillus sp obtenidas en las muestras de suelo.

Anexo 9: Características macroscópicas y microscópicas de *Bacillus* sp y *Pseudomonas* sp, obtenidas de las muestras de suelo.

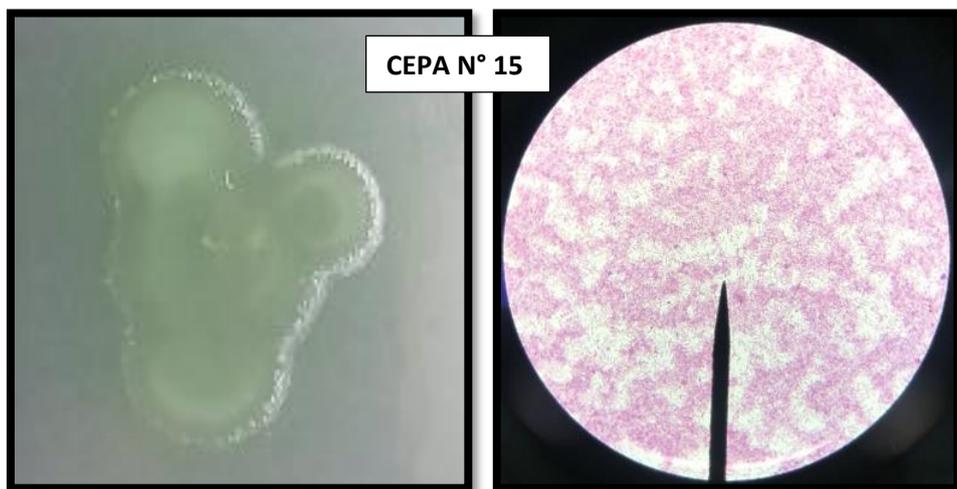
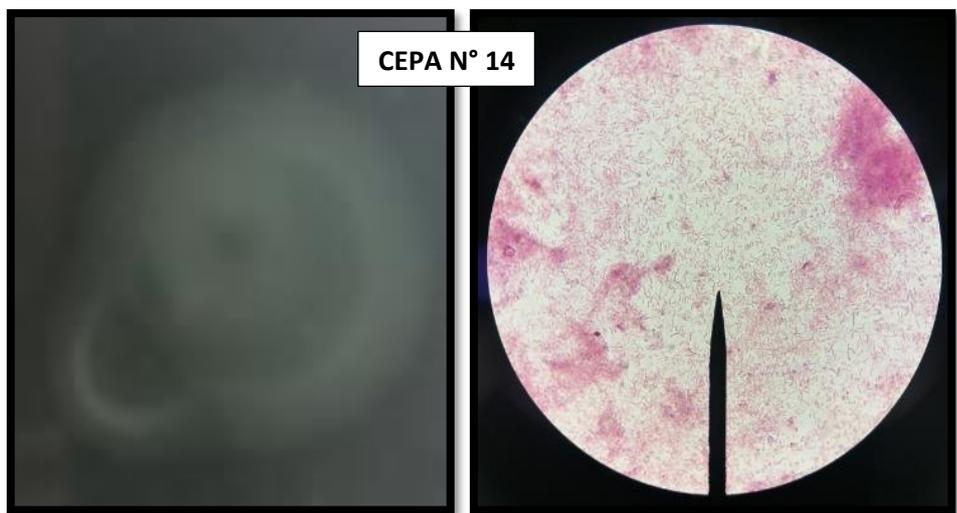
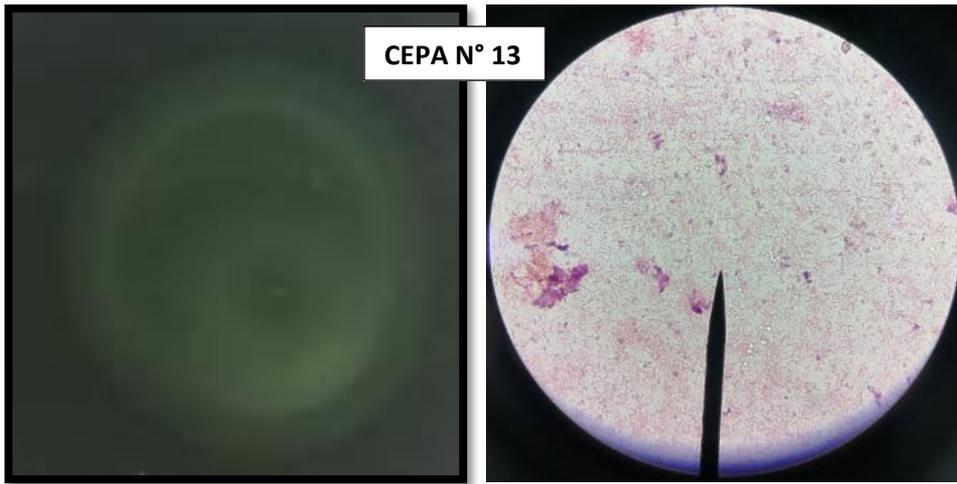








a. Cepas de *Bacillus* sp obtenidas en las muestras de suelo.



b. Cepas de *Pseudomonas* sp obtenidas en las muestras de suelo.

Anexo 10: Pruebas Bioquímicas de *Bacillus* sp.



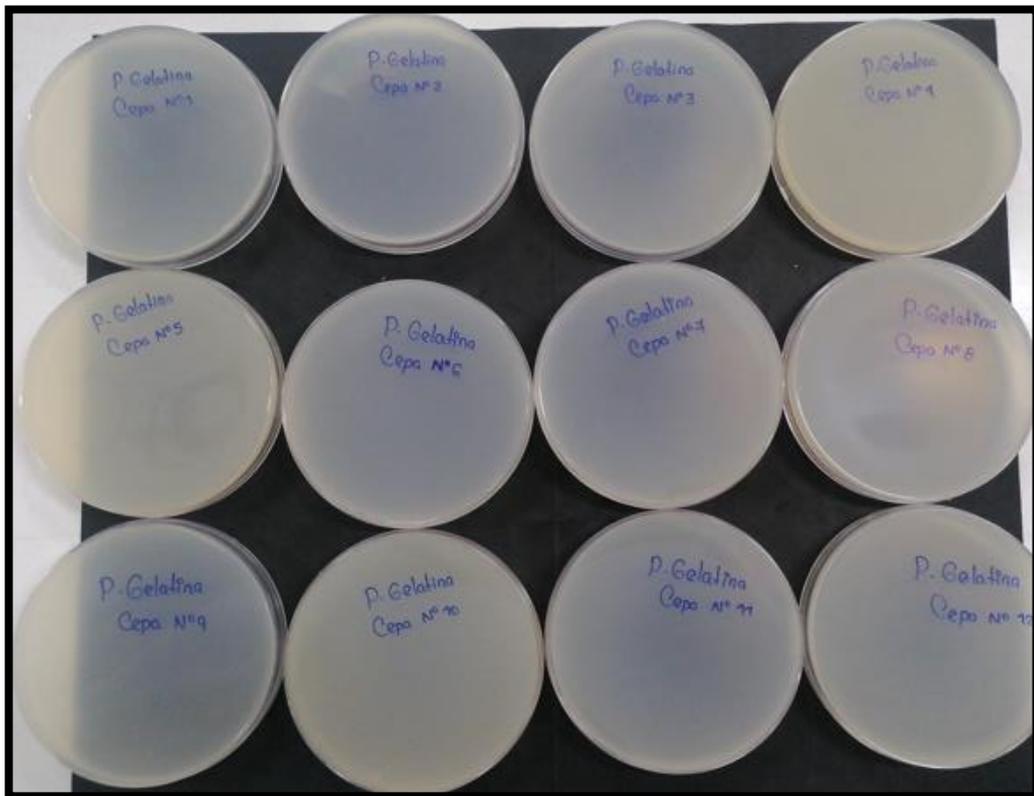
a. Prueba de Almidón







b. Prueba de Lecitinasa



c. Prueba de la Gelatina



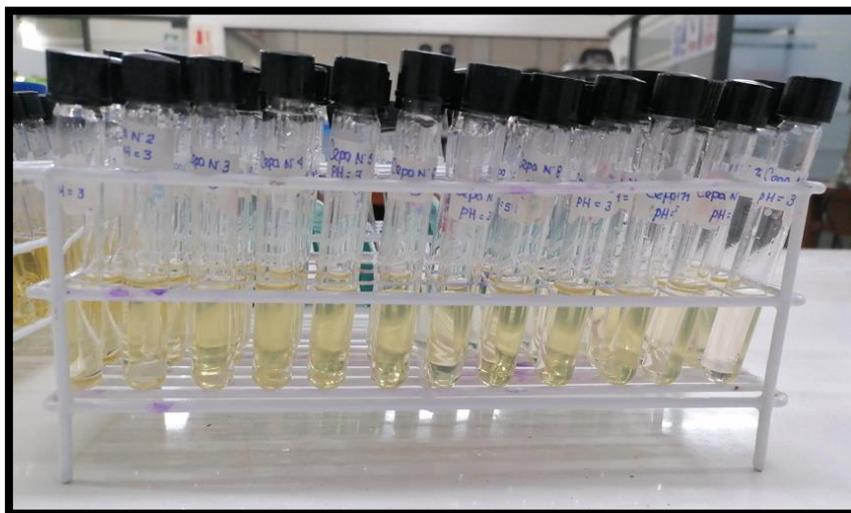
b. pH = 5.00



a. pH = 10.00



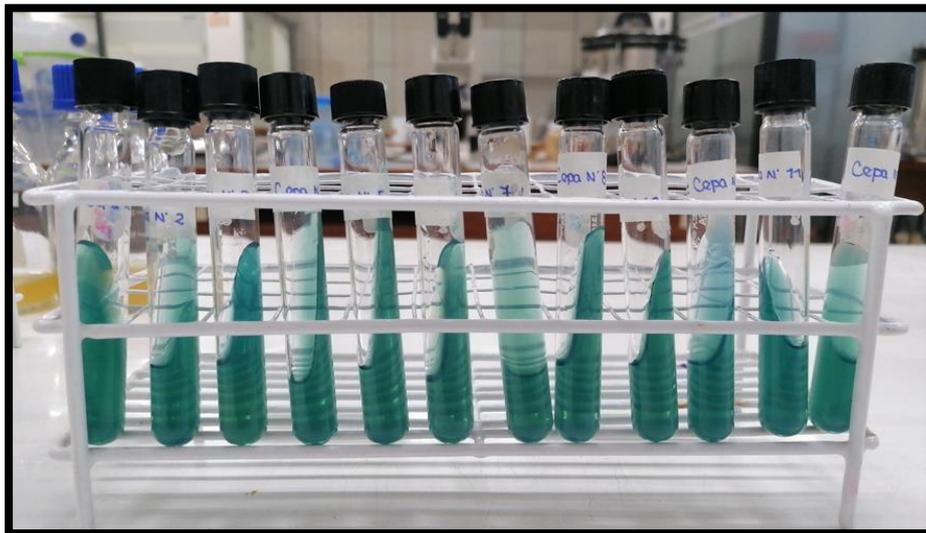
c. pH = 3.00



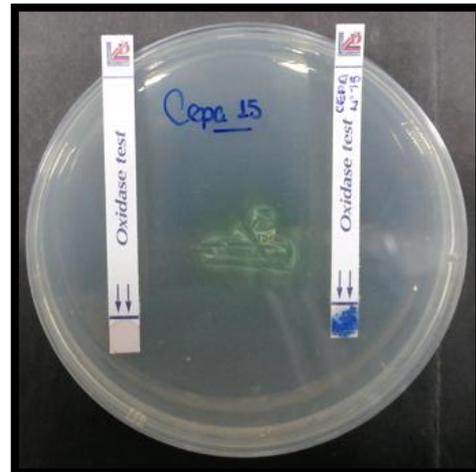
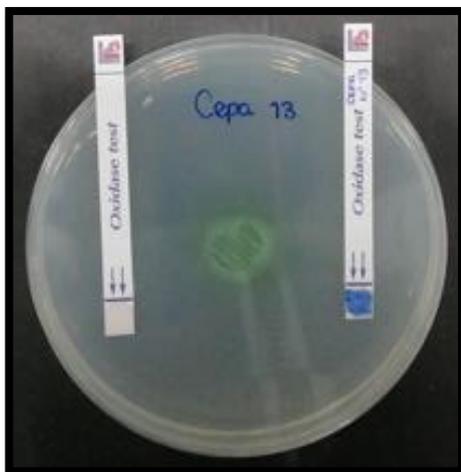
d. Prueba de crecimiento a diferente pH.

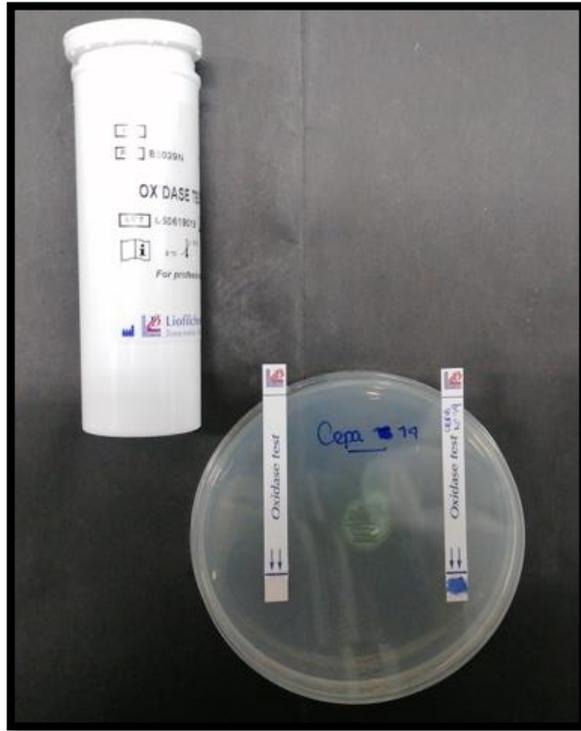


a. Prueba de crecimiento a diferente concentración de NaCl.



b. Prueba de Citrato.





a. Prueba de Test de Oxidasa para *Pseudomonas* sp.

**Anexo 11: Obtención de la biomasa bacteriana.**

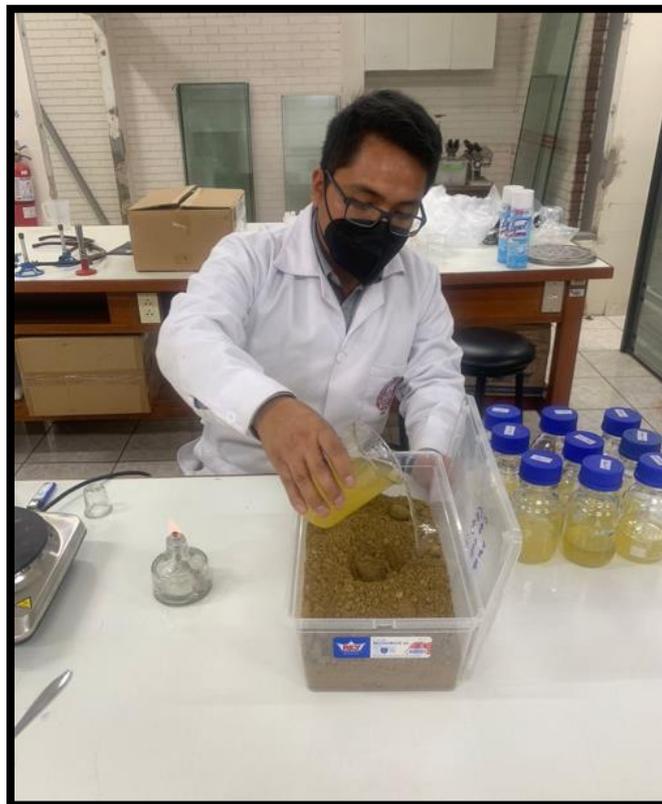


Anexo 12: Diseño experimental del tratamiento.





Anexo 13: Aplicación del tratamiento.



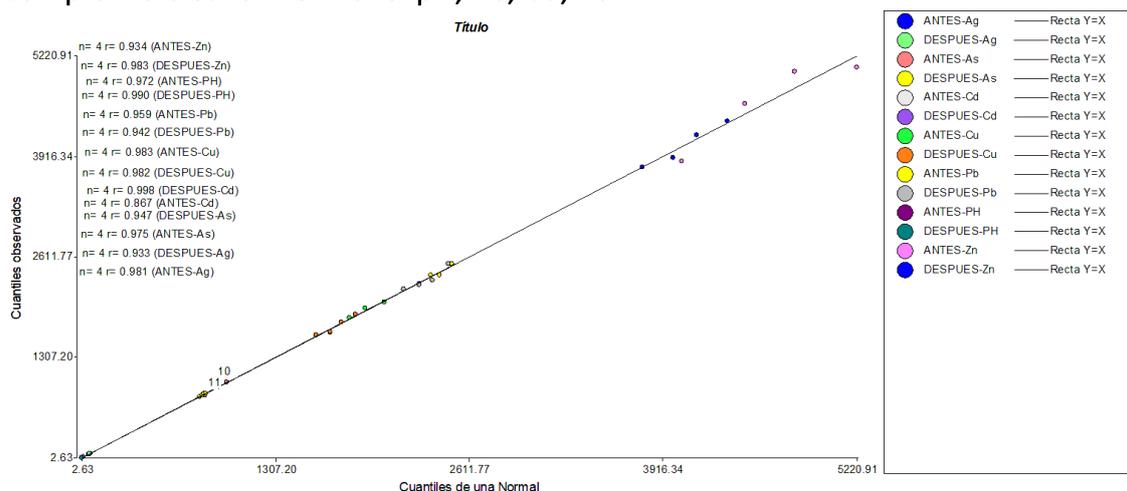
## Anexo 14: Análisis estadístico.

### Metodología

Se aplicó la prueba T pareada. En cada caso se analizó el supuesto de la dist. Normal de los datos. En caso de no haber dist. Normal, se aplicó una prueba T pareada no paramétrica. Para la normalidad, se aplicó la prueba Shapiro Francia, donde si R es mayor a 0.94, la variable posee dist. Normal.

### T. Bacillus

Cumplen la distrib. Normal el pH, Pb, Cu, As.



### Prueba T Pareada.

Factor	Obs(1)	Obs(2)	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	p-value
As	ANTES	DESPUES	86.3	906.85	820.55	60.32	-9.68	182.28	2.86	0.0645
Cu	ANTES	DESPUES	142.5	1857.5	1715	202.71	-180.06	465.06	1.41	0.2544
Pb	ANTES	DESPUES	62.2	2382.8	2320.6	105.34	-105.43	229.83	1.18	0.3227
pH	ANTES	DESPUES	-1.27	2.73	4	0.25	-1.67	-0.87	10.1	0.0021

Sólo se encontró diferencias significativas para pH (p-value < 0.05).

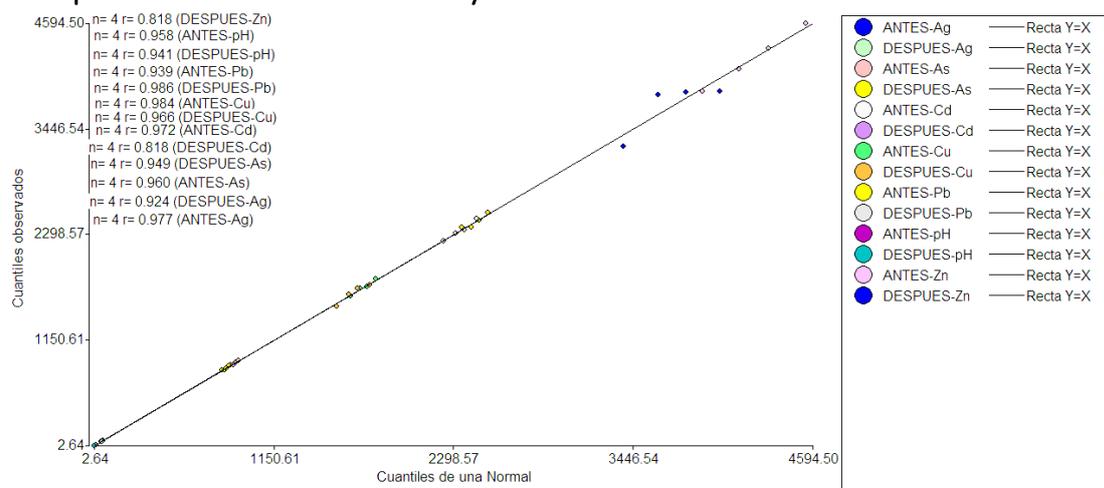
### Prueba T No Paramétrica

Elemento	Obs(1)	Obs(2)	media(dif)	DE(dif)	Z	p(2 colas)
Ag	ANTES	DESPUES	6.2	2.75	1.83	0.0396
Cd	ANTES	DESPUES	1.2	1.6	1.1	0.2676
Zn	ANTES	DESPUES	523.78	378.83	1.83	0.0408

Sólo se encontró diferencias significativas para Ag y Zn (p-value < 0.05).

## T. Pseudomonas

### Cumplen la distrib. Normal el Cu y el As



### Prueba T Pareada.

Elemento	Obs(1)	Obs(2)	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
As	ANTES	DESPUES	58.53	899.23	840.7	31.14	8.97	108.08	3.76	0.0329
Cu	ANTES	DESPUES	65	1722.5	1657.5	103.44	-99.6	229.6	1.26	0.2978

Sólo se encontró diferencia sólo para el As (p-value < 0.05)

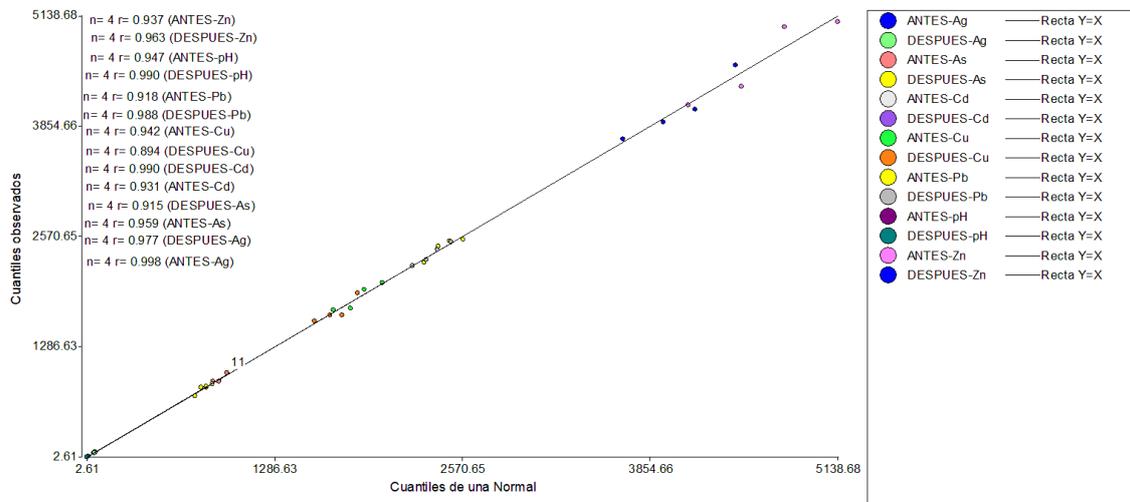
### Prueba T pareada No Paramétrica (Wilcoxon)

Elemento	Obs(1)	Obs(2)	media(dif)	DE(dif)	Z	p(2 colas)
Ag	ANTES	DESPUES	6.2	2.75	1.83	0.0396
Cd	ANTES	DESPUES	1.2	1.6	1.1	0.2676
Pb	ANTES	DESPUES	96.05	37.93	1.83	0.031
pH	ANTES	DESPUES	-1.31	0.26	-1.83	0.101
Zn	ANTES	DESPUES	523.78	378.83	1.83	0.0408

Sólo se encontró diferencia sólo para el Ag, Pb y el Zn (p-value < 0.05)

## Tratamiento Combinado

### Cumplen la distrib. Normal: pH, Ag



### Prueba T Pareada.

Elemento	Obs(1)	Obs(2)	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
Ag	ANTES	DESPUES	4.13	58.2	54.08	4.58	-3.16	11.41	1.8	0.1694
pH	ANTES	DESPUES	-1.11	2.7	3.8	0.05	-1.19	-1.02	-42.02	<0.0001

Sólo se encontró diferencia sólo para el As (p-value < 0.05)

### Prueba T pareada No Paramétrica (Wilcoxon)

Elemento	Obs(1)	Obs(2)	media(dif)	DE(dif)	Z	p(2 colas)
As	ANTES	DESPUES	87.77	30.73	1.83	0.0394
Cd	ANTES	DESPUES	1.83	0.9	1.83	0.0354
Cu	ANTES	DESPUES	150	96.26	1.84	0.0336
Pb	ANTES	DESPUES	81.25	94.99	1.83	0.0384
Zn	ANTES	DESPUES	573.08	300.61	1.83	0.0376

Se encontraron diferencia para As, Cd, Cu, Pb y Zn (p-value < 0.05)

**Anexo 15: Matriz de consistencia.**

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES
<p>¿Los <i>Bacillus</i> sp y <i>Pseudomonas</i> sp aislados de los suelos impactados en Yauli – Junín tendrán la capacidad de biorremediación de metales?</p>	<p><b>Objetivo general:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Evaluar la capacidad de biorremediación de metales mediante <i>Bacillus</i> sp y <i>Pseudomonas</i> sp aislados de los suelos impactados en Yauli – Junín.</li> </ul> <p><b>Objetivo específicos:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Aislar en medios de cultivos selectivos y diferenciales a <i>Bacillus</i> sp y <i>Pseudomonas</i> sp de los suelos impactados en Yauli – Junín.</li> <li>● Identificar mediante pruebas de coloración y bioquímicas a <i>Bacillus</i> sp y <i>Pseudomonas</i> sp aislados de los suelos impactados en Yauli - Junín.</li> <li>● Determinar los parámetros físicos (pH, humedad y temperatura) de las muestras de suelo.</li> <li>● Determinar los niveles de concentración de metales de los suelos impactados en Yauli – Junín.</li> </ul>	<p><b>Hipótesis general:</b></p> <p>Los <i>Bacillus</i> sp y <i>Pseudomonas</i> sp aislados de los suelos impactados en Yauli – Junín tienen la capacidad de biorremediación de metales.</p>	<p><b>Variable independiente:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Presencia de <i>Bacillus</i> sp.</li> <li>● Presencia de <i>Pseudomonas</i> sp.</li> </ul> <p><b>Indicadores:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Método de diseminación (UFC/gr).</li> </ul> <p><b>Variable dependiente:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Capacidad de biorremediación de metales.</li> </ul> <p><b>Indicadores:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Capacidad de biorremediación (%).</li> </ul>

**Anexo 16. Procedimiento de muestreo e Informes de ensayo CERTIMIN.**

	<b>PROCEDIMIENTO DE MUESTREO</b>	Código	PM-OPE-07
		Revisión	06
		F. Aprobación	2021-03-01
		Página	1 de 14
		Aprobado por	Yul Abad S.
<b>Muestreo de Suelos, Lodo y Sedimentos</b>			

## 1. OBJETIVO:

Establecer los lineamientos generales para realizar muestreo en suelos, lodo y muestreo de sedimentos en ríos, lagunas, estuarios y mares.

## 2. ALCANCE:

2.1 Este procedimiento es aplicable al muestreo de suelos, lodos y sedimentos, toda vez que en ellos se pretenda determinar:

- 2.1.1 Sus propiedades físicas,
- 2.1.2 Sus propiedades químicas,
- 2.1.3 Su composición, y,
- 2.1.4 La presencia de contaminantes.

Abarca el muestreo superficial y el muestreo en profundidad, así como la extracción de muestras disturbadas y no disturbadas.

## 3. REFERENCIAS

- 3.1 “Guía para el Muestreo y Análisis de Suelo” – Ministerio de Energía y Minas, Sub-Sector Hidrocarburos, DGAA, Octubre 2000.
- 3.2 Guía empresarial sobre suelos contaminados del Gobierno de Aragón.
- 3.3 Manual de gestión de CERTIMIN.
- 3.4 **Guía para el muestreo de suelos RM 085-2014-MINAM**
- 3.5 “Soil Sampling: Field Sampling Guidance Document # 1205”. U.S. EPA Region 9 Laboratory. Richmond, California.
- 3.6 US EPA Environmental Response Team, Standard Operating Procedures, SOP 2012 (Date 02/18/00, Rev. 0.0).
- 3.7 “Characterization of Hazardous Waste Sites - A Methods Manual”: Volume II: “Available Sampling Methods”, Second Edition. United States Environmental Protection Agency. EPA 600/4-84-076. December 1984.
- 3.8 **EPA Method 9045D Rev.04:2004 SOIL AND WASTE pH**

## 4. RESPONSABILIDADES

### 4.1 Analistas de Campo

4.1.1 Los analistas de campo son los responsables de ejecutar el siguiente procedimiento.

	<b>PROCEDIMIENTO DE MUESTREO</b>	Código	PM-OPE-07
		Revisión	06
		F. Aprobación	2021-03-01
		Página	2 de 14
		Aprobado por	Yul Abad S.
<b>Muestreo de Suelos, Lodo y Sedimentos</b>			

**4.1.2 Cumplir con la metodología establecida para la toma de muestra de suelos, lodo y sedimentos.**

**4.2 Coordinador de Operaciones**

**4.2.1 Hacer cumplir el procedimiento con participación de los analistas de campo.**

**4.2.2 Supervisar el estricto cumplimiento entre el personal a su cargo.**

**4.3 Jefe de Operaciones**

**4.3.1 [ ] Aprobar el presente procedimiento.**

**4.3.2 Realizar la difusión de los procedimientos actualizados.**

**4.3.3 Revisar, conocer y hacer cumplir el procedimiento; así como supervisar su estricto funcionamiento.**

**4.4 Gerente de Calidad, Seguridad y Ambiente**

**4.4.1 Revisar [ ] el presente procedimiento.**

**4.4.2 Mantener actualizado el presente procedimiento.**

**5. DEFINICIONES**

**5.1 Suelo:** Desde el punto de vista ambiental, el suelo es una fina capa superior de la corteza terrestre (litosfera), situada entre el lecho rocoso y la superficie. Está compuesto por partículas minerales, materia orgánica, agua, aire y organismos vivos.

**5.2 Horizonte:** Se definen a las capas que forman el suelo. El perfil de un suelo ideal comprende los siguientes horizontes:

**5.2.1 Horizonte A:** Llamado también Horizonte de Lavado por estar expuesto a la erosión y lavado de la lluvia. Es la capa más superficial del suelo, abundan las raíces y se pueden encontrar los microorganismos animales y vegetales, es de color oscuro debido a la presencia del humus.

**5.2.2 Horizonte B:** Recibe el nombre también de Horizonte de Precipitación, ya que aquí se acumulan las arcillas que han sido arrastradas por el agua del horizonte, es de color más claro que el anterior y está constituido por humus mezclado con fragmentos de rocas.

**5.2.3 Horizonte C:** Se le conoce también como Subsuelo o Zona de Transición, está formado por la roca madre fragmentada en proceso de desintegración.

	<b>PROCEDIMIENTO DE MUESTREO</b>		Código	PM-OPE-07
			Revisión	06
			F. Aprobación	2021-03-01
			Página	3 de 14
			Aprobado por	Yul Abad S.
<b>Muestreo de Suelos, Lodo y Sedimentos</b>				

**5.2.4 Horizonte D:** Es la capa más profunda del suelo, está formado por la roca madre fragmentada, por lo que también recibe el nombre de Horizonte R.

**5.3 Lodo:** Barro fino que se forma en el suelo cuando llueve o que se deposita en el fondo de una corriente o un depósito de agua.

**5.4 Sedimento:** material (minerales, materia orgánica, etc.) que habiendo estado suspendido en un líquido, se deposita en el fondo.

**5.5 Muestra compuesta:** *Es aquella constituida por un conjunto de muestras simples (sub muestras), convenientemente mezcladas, y llevadas al laboratorio para su correspondiente análisis, siendo el resultado un valor analítico medio de la propiedad o compuesto analizado. El número de sub muestras dependerá de la variabilidad de la sustancia o propiedad a analizar en el área de estudio y tiene la ventaja de permitir un muestreo mayor sin aumentar el número de muestras a analizar. Números de muestras oscilan entre 4 y 16 (máximo 25) y como regla general el área representada por una muestra compuesta no debería superar a 1 Ha (100 x 100m)*

**5.6 Muestra simple:** *Las muestras colectadas en un tiempo y en un lugar particular son llamadas muestras simples. Este tipo de muestras representa las condiciones puntuales de una muestra de la población en el tiempo que fue colectado. Estas muestras siempre se aplicarán para compuestos orgánicos volátiles (COV's), Hidrocarburos y Benceno, Tolueno, Etilbenceno, Xilenos (BTEX).*

**5.7 Muestra en profundidad:** *Muestra obtenida de los horizontes o capas del suelo en donde se ubican y lixivian los contaminantes que se desean evaluar.*

**5.8 Muestra de Suelo Disturbada:** Aquella en que el suelo ha sufrido la alteración de una cualquiera, o varias, de sus propiedades físicas, químicas o biológicas, y no conserva la configuración ni la textura que poseía originalmente dentro del perfil u horizonte en que se hallaba situado.

**5.9 Muestra de Suelo No Disturbada:** Aquella que no ha sido sometida a la alteración de sus propiedades físicas, químicas o biológicas, así como a variaciones en su textura original y en su configuración dentro del perfil u horizonte en que se hallaba.

**5.10 Muestreo Aleatorio:** Aquél en que, en el área de interés (población), cada punto de muestreo (elemento) es elegido aleatoria o arbitrariamente. **Es un método por el que cada muestra o propiedad de un suelo tiene la misma probabilidad de ser tomada y considerada. En un campo homogéneo es un método satisfactorio.**

**5.11 Muestreo Sistemático:** Aquél en que las muestras se toman a intervalos regulares o pre-establecidos de espacio o tiempo.

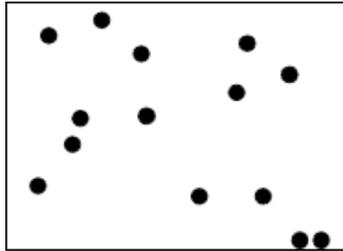
**5.12 Muestreo Estratificado Aleatorio:** En este tipo de muestreo una población (área, cuerpo o lugar) heterogénea es dividida en unidades o grupos de características homogéneas, denominadas estratos. En este caso, la variabilidad en cada estrato es menor que la variabilidad en la población entera.



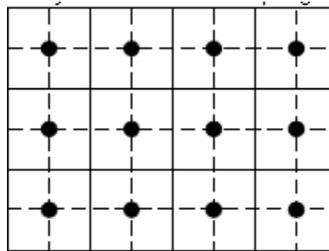
## PROCEDIMIENTO DE MUESTREO

Código	PM-OPE-07
Revisión	06
F. Aprobación	2021-03-01
Página	4 de 14
Aprobado por	Yul Abad S.

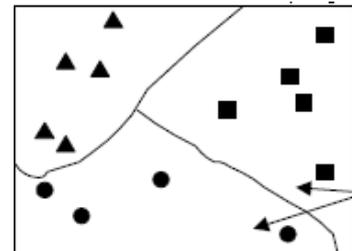
### Muestreo de Suelos, Lodo y Sedimentos



Muestreo Aleatorio



Muestreo Sistemático



Muestreo Estratificado

## 6. PREPARACIÓN PARA EL MUESTREO

- 6.1 Identifique los parámetros a monitorear, el número de muestras y las metodologías a aplicar [ ] **contemplados en el Plan de Muestreo (PM)**, registrar los equipos, instrumentos y materiales a utilizar en el muestreo de suelos en el formato F04-PM.OPE.08 “**Check List de Equipos y Materiales para el Monitoreo de Suelos**” para definir la cantidad de equipos, herramientas y materiales que necesitará durante el muestreo. [ ] **Se debe tener en cuenta el Reconocimiento o Inspección de la zona e investigación preliminar.** Todos los equipos, herramientas y materiales a emplearse deberán estar limpios y exentos de contaminantes.
- 6.2 Para elegir las características y tamaño de los recipientes que contendrán a las muestras - dependiendo del (los) parámetro(s) a muestrear- y conocer las prácticas de conservación y preservación de las mismas, remítase al reverso del formato F01-PM.OPE.01” ***Cadena de Custodia” / Suelos.***
- 6.3 Acopie y revise información sobre el lugar y el área de muestreo [ ] **La planificación del muestreo de una zona para conocer su posible contaminación, se debe realizar sobre la base de una serie de datos adquiridos a partir del reconocimiento y de la investigación preliminar.**
- Trabajos en Gabinete: Revisión y acopio de toda información relevante sobre la zona de estudio como: Localización, mapas geográficos, mapas topográficos, mapas de suelo, mapas geológicos, planos de planta, infraestructura, usos, historia, tipo de suelos, propiedades,**
  - Visita de Campo: Brinda información en corto tiempo con ello ayuda a elegir correctamente los equipos de muestreo; una visita de inspección y reconocimiento al lugar de muestreo a fin de establecer, con precisión, el tamaño del área, las vías de acceso, las metodologías de muestreo a emplear, los peligros y los riesgos.**

### 6.4 EQUIPOS, HERRAMIENTAS Y MATERIALES:

#### 6.4.1 Herramientas:

- 6.4.1.1 Lampas (o palas) de acero
- 6.4.1.2 Pico de acero
- 6.4.1.3 Barreta de acero
- 6.4.1.4 Picota de geólogo o pico pequeño
- 6.4.1.5 Kit de herramientas para muestreo de suelos:
  - 6.4.1.5.1 Barrenos (augers)



## PROCEDIMIENTO DE MUESTREO

Código	PM-OPE-07
Revisión	06
F. Aprobación	2021-03-01
Página	5 de 14
Aprobado por	Yul Abad S.

### Muestreo de Suelos, Lodo y Sedimentos

- 6.4.1.5.2 Muestreador de núcleos de suelo (soil core sampler)
- 6.4.1.5.3 Barreno de tornillo (screw auger)
- 6.4.1.5.4 Tubo muestreador (probe sampler)
- 6.4.1.5.5 Espátulas de acero inoxidable y/o plástico (scoops)
- 6.4.1.5.6 Probetas de plástico, acero inoxidable, bronce o aluminio (liners)
- 6.4.1.5.7 Accesorios (extensiones o varillas, martillo deslizante, mangos, etc.)

#### 6.4.1.6 Cucharas y/o cucharitas de acero inoxidable



#### 6.4.2 Materiales

- 6.4.2.1 Balde
- 6.4.2.2 Jarra
- 6.4.2.3 Agua de caño
- 6.4.2.4 Agua destilada o desionizada
- 6.4.2.5 Picetas
- 6.4.2.6 Detergente libre de fosfatos
- 6.4.2.7 Cepillos
- 6.4.2.8 Tazones o cuencos de acero inoxidable y/o plástico
- 6.4.2.9 Manta o lienzo de plástico de 2x2m
- 6.4.2.10 Papel toalla
- 6.4.2.11 Cinta métrica (wincha) de 2m
- 6.4.2.12 Recipientes para muestras (bolsas ziplock, frascos de plástico y/o frascos de vidrio) en cantidad suficiente
- 6.4.2.13 Guantes de látex (exentos de talco) o nitrilo
- 6.4.2.14 Guantes de badana o de cuero
- 6.4.2.15 Mascarillas para polvo
- 6.4.2.16 Cadenas de custodia para suelos, lodos, barros y sedimentos
- 6.4.2.17 Cuaderno y/o formatos de campo
- 6.4.2.18 Coolers o hieleras
- 6.4.2.19 Ice packs
- 6.4.2.20 Cinta de embalaje
- 6.4.2.21 Cuchilla
- 6.4.2.22 **Recipiente de 50mL**
- 6.4.2.23 **Baqueta**
- 6.4.2.24 **Probeta de 100mL**

	<b>PROCEDIMIENTO DE MUESTREO</b>	Código	PM-OPE-07
		Revisión	06
		F. Aprobación	2021-03-01
		Página	6 de 14
		Aprobado por	Yul Abad S.
<b>Muestreo de Suelos, Lodo y Sedimentos</b>			

6.4.2.25 Pesas 20 g

**6.4.3 Equipos**

6.4.3.1 GPS

6.4.3.2 Cámara fotográfica

6.4.3.3 Brújula

6.4.3.4 Medidor de pH

6.4.3.5 Electrodo de pH

6.4.3.6 Balanza capaz de pesar 0,1 g

**6.5 LIMPIEZA Y DESCONTAMINACIÓN DE HERRAMIENTAS Y MATERIALES**

Antes de iniciar el monitoreo y, de preferencia, antes de dirigirse al lugar, área o estación donde desarrollará los trabajos, limpie, lave, descontamine y seque todas las herramientas que entrarán en contacto con el suelo (lampas, picos, barretas, barrenos, tubos muestreadores, espátulas, etc.). Hágalo ciñéndose al siguiente procedimiento:

- 6.5.1 Lave la herramienta dos veces, con agua de caño y detergente sin fosfato, cepillándola para remover la suciedad y los contaminantes;
- 6.5.2 Enjuague con agua de caño;
- 6.5.3 Enjuague dos veces con agua desionizada;
- 6.5.4 Deje escurrir y luego seque la herramienta con papel toalla;
- 6.5.5 Finalmente, cubra y envuelva herméticamente cada herramienta con bolsas o material de plástico limpio. Mantenga las herramientas así protegidas durante el transporte, hasta el inicio del muestreo.

**7. PROCEDIMIENTO DE MUESTREO**

**7.1 DETERMINACIÓN DEL NÚMERO Y POSICIÓN DE LOS PUNTOS DE MUESTREO**

- 7.1.1 El muestreo de áreas grandes o muy extensas de suelos, se efectúa, generalmente, después de haber realizado un muestreo preliminar aleatorio que perfila la distribución aproximada de los contaminantes en el área de interés. Dependiendo de los usos que se den o se proyecte dar al suelo, estos muestreos de aproximación se realizarán ya sea en superficie o en profundidad, o ambos. Antes de iniciar las labores en campo, cerciórese de si esos datos existen, o si se cuenta con datos históricos.

*Los contaminantes, preponderantemente líquidos -o transportados por ellos- se mueven de las cotas altas a las bajas, siguiendo la gradiente del suelo y penetrando sus distintas capas u horizontes, dependiendo de la permeabilidad y porosidad de los mismos.*

- 7.1.2 Una vez definida el área de muestreo, establezca visualmente -si fuera posible- el grado de dispersión y concentración de los contaminantes sobre la misma, empleando los criterios del muestreo estratificado. Según los distintos grados de contaminación que encuentre, determine el número de estratos en los cuales realizará el muestreo.  
Si el nivel de contaminación fuese homogéneo en toda el área considere a ésta como un solo estrato.  
Si el usuario solicitara muestreo en profundidad, establezca también, mediante la misma técnica, una estratificación de los niveles de contaminación atendiendo a la profundidad.



## PROCEDIMIENTO DE MUESTREO

Código	PM-OPE-07
Revisión	06
F. Aprobación	2021-03-01
Página	7 de 14
Aprobado por	Yul Abad S.

### Muestreo de Suelos, Lodo y Sedimentos

- 7.1.3** Delimite cada estrato y mida su extensión (área):
- 7.1.3.1 Si el estrato tuviese un área no mayor a 1 m<sup>2</sup>, elija dentro de ella, aleatoriamente, un solo punto de muestreo;
  - 7.1.3.2 si el área del estrato fuera mayor a 1 m<sup>2</sup> y menor, o igual, a 4 m<sup>2</sup>, el mínimo número de puntos para la toma de muestra será dos (02);
  - 7.1.3.3 si el área fuese mayor de 4 m<sup>2</sup> y menor, o igual, a 12 m<sup>2</sup> el número mínimo de puntos de muestreo será tres (03).
  - 7.1.3.4 En los dos casos precedentes, para determinar la posición de los puntos de muestreo, trace aleatoriamente una línea transversal por toda la extensión del estrato y sitúe sobre ella un número de puntos igual al número de puntos de muestreo que determinó en los pasos anteriores, de tal suerte que la línea quede dividida en segmentos iguales. Cada uno de los puntos que dividen a la línea en partes iguales será un punto de muestreo.
  - 7.1.3.5 Si el estrato tiene más de 12 m<sup>2</sup>, divídalo en cuadrados de 2m x 2m y sitúe, sistemáticamente, en cada uno de ellos un punto de muestreo.
- 7.1.4** Durante el monitoreo, dependiendo del interés del usuario o del grado de precisión por él requerido, las muestras de cada estrato podrán analizarse una a una o pasarán a conformar una muestra compuesta.

**7.2** Localice cada punto de muestreo con el GPS y registre sus coordenadas.

**7.3** Limpie la superficie del terreno, dejándolo libre de vegetación, rocas y/o residuos.

**7.4** Tome un lienzo o manta de plástico limpia y extiéndala en el terreno, cerca del punto de muestreo. Allí dispondrá la tierra que remueva durante el proceso de muestreo.

#### **7.5 MUESTREO SUPERFICIAL (ENTRE 0 Y 30 cm DE PROFUNDIDAD O HASTA LA LÍNEA QUE SEPARA EL HORIZONTE A DEL B)**

Para el muestreo en superficie pueden emplearse palas, espátulas y/o cucharas. Si va a tomar muestras de VOC's tenga a la mano una cucharita de acero inoxidable.

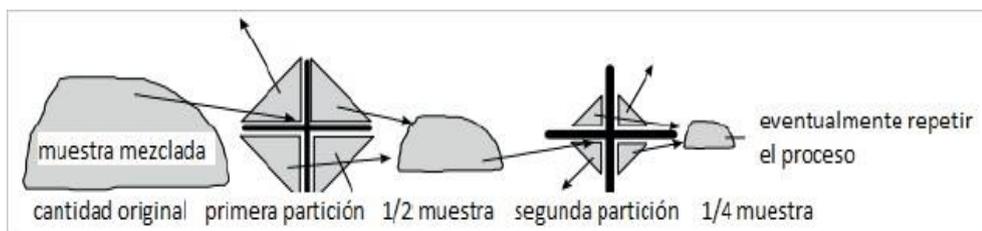
- 7.5.1** Utilizando una pala o espátula cave un hoyo en el suelo, de unos 20 a 30cm de diámetro, hasta la profundidad deseada. Retire frecuentemente el suelo que va desprendiéndose, disponiéndolo sobre el lienzo de plástico que colocó cerca al punto de muestreo.
- 7.5.2** Con otra espátula limpia y descontaminada, proceda a limpiar las paredes del hoyo del que extraerá la muestra, o retire la capa de tierra que estuvo en contacto con la pala (o espátula) utilizada en el paso anterior.
- 7.5.3** Para tomar muestras de VOC's (muestra no disturbada) utilice una cucharita de acero inoxidable, introdúzcala en la base del hoyo y tome directamente la muestra. Evitando perturbar la porción de suelo extraída, colóquela inmediatamente en un vial de vidrio (ámbar) de 40ml: llene el vial completamente hasta el tope, limpie totalmente la tierra que haya quedado en la rosca del vial, seque si fuera necesario y tape herméticamente. El forro interno de la tapa del vial debe ser de Teflón y deberá sellar herméticamente el frasco.
- 7.5.4** Para tomar las muestras restantes, desprenda y remueva el terreno que se halla cerca de la base del hoyo con una espátula o cuchara limpia; sitúe la cantidad necesaria de material en un tazón de acero inoxidable (o plástico) y mezcle completamente para obtener una muestra homogénea y representativa. Descarte los fragmentos gruesos (gravillas, gravas, guijarros y piedras) anotando su volumen aproximado.

## Muestreo de Suelos, Lodo y Sedimentos

- 7.5.5 Utilizando la espátula, vierta la muestra del tazón al recipiente apropiado (de vidrio o plástico), asegurándose que en el recipiente quede la menor cantidad posible de aire. Selle el recipiente herméticamente; etiquételo y refrigere.
- 7.5.6 Para obtener una muestra compuesta, mezcle completamente, en un tazón de acero inoxidable (o de plástico), todas las muestras extraídas en cada uno de los puntos de interés. Vierta la cantidad necesaria de esta mezcla homogénea al recipiente apropiado; séllelo herméticamente, etiquételo y refrigere.
- 7.5.7 Una vez terminada la toma de muestras en cada punto de muestreo, lave, descontamine y seque cada herramienta empleada. Recuerde que debe realizar la descontaminación de las herramientas antes de pasar al siguiente punto de muestreo.
- 7.5.8 Antes de retirarse de cada punto de muestreo reponga el suelo extraído a la perforación o calicata de la que fue retirado.

*Si deseara obtener muestras no disturbadas, tómelas utilizando muestreadores de núcleos de suelo, siguiendo lo establecido en la siguiente Sección, en la parte que trata sobre la colección de este tipo de muestras.*

**NOTA: Cuando es una muestra compuesta y de índole superficial se requieren someterla a partición (cuarteo) para reducirla y obtener una muestra compuesta representativa. Para esto se recomienda cuartear la muestra mezclada y repetir el proceso hasta que llegue a la cantidad necesario (Fig. 1)**



**Fig 1: Partición de muestras**

### 7.6 MUESTREO EN PROFUNDIDAD

#### 7.6.1 Muestreo con Barreno y Tubo Muestreador (o Muestreador de Núcleos de Suelo)

- 7.6.1.1 Tome un barreno y enrósquelo firmemente a su extensión (varilla); añada también -al otro extremo de la varilla- el mango apropiado que le permita maniobrar cómodamente la herramienta.
- 7.6.1.2 Perfore el suelo con el barreno y retire periódicamente el material que se va acumulando sobre la manta de plástico que dispuso inicialmente cerca de la estación de muestreo.
- 7.6.1.3 Cuando haya alcanzado la profundidad deseada, retire cuidadosamente el barreno de la calicata. Si deseara tomar la muestra directamente del barreno, hágalo cuando éste se halle completamente fuera de la calicata.
- 7.6.1.4 Desenrosque el barreno y reemplácelo por un tubo muestreador limpio -si fuera el caso, puede utilizar, en su lugar, un muestreador de núcleos de suelo-.

*Para el caso de muestras no disturbadas, inserte previamente una probeta de plástico (puede ser también de acero inoxidable, bronce o aluminio) al interior del muestreador de núcleos de suelo.*

	<b>PROCEDIMIENTO DE MUESTREO</b>	Código	PM-OPE-07
		Revisión	06
		F. Aprobación	2021-03-01
		Página	9 de 14
		Aprobado por	Yul Abad S.
<b>Muestreo de Suelos, Lodo y Sedimentos</b>			

- 7.6.1.5 Evitando tocar las paredes de la calicata y sin emplear el martillo deslizante, descienda cuidadosamente el tubo muestreador (o el muestreador de núcleos de suelo) e introdúzcalo totalmente a la base de la calicata.
- 7.6.1.6 Retire cuidadosamente el tubo muestreador (o el muestreador de núcleos de suelo) de la perforación y sepárelo de su extensión.
- 7.6.1.7 Descarte la parte superior de la porción de suelo extraída en el tubo muestreador (unos 2,5 cm). Si tuviera que recolectar una muestra de VOC's, tómela directamente, y sin producir perturbaciones, del suelo extraído, con una cucharita de acero inoxidable; transfírela a un vial de vidrio ámbar de 40 ml (ciñéndose a lo especificado en el parágrafo 6.5.3); cierre herméticamente, rotule y refrigere. Coloque la porción intacta restante en un tazón de acero inoxidable; mezcle y homogenice completamente. Con una cuchara o espátula descontaminada tome las muestras necesarias en sus respectivos envases. Cierre herméticamente, rotule y refrigere.

*Las muestras no disturbadas, extraídas con el muestreador de núcleos de suelo en sus respectivas probetas de plástico (acero inoxidable, bronce o aluminio) se tapan cuidadosamente por sus extremos y se envían intactas y sin alteración al Laboratorio, luego de rotularlas y refrigerarlas.*

- 7.6.1.8 Prosiga como en los parágrafos 6.5.3, 6.5.4 y 6.5.5.

		
Martillo deslizante y extensiones	Modo de empleo del martillo deslizante	Probeta y muestreador de núcleos de suelo

## 7.7 MUESTREO DEL PERFIL Y DE LOS HORIZONTES DEL SUELO

- 7.7.1 Marque en el terreno un área de 1m x 1,5m (área de la calicata), orientándola de tal suerte que, una vez excavada, la luz solar ilumine completamente a uno de los lados de 1m.
- 7.7.2 Excave la calicata hasta 1,5 m de profundidad, o hasta toparse con un impedimento que no le permita seguir cavando: roca madre, fragmentos muy gruesos en altas proporciones, napa freática.

	<b>PROCEDIMIENTO DE MUESTREO</b>	Código	PM-OPE-07
		Revisión	06
		F. Aprobación	2021-03-01
		Página	10 de 14
		Aprobado por	Yul Abad S.
<b>Muestreo de Suelos, Lodo y Sedimentos</b>			

- 7.7.3 Ingrese a la calicata e identifique y describa los horizontes o capas (profundidad, espesor, presencia de raíces, color, textura, consistencia, etc.). Anote esta información en su formato o cuaderno de campo.
- 7.7.4 Inicie la toma de muestra desde el horizonte más inferior hasta el más superior.
- 7.7.5 Proceda a tomar las muestras, en cada una de las capas u horizontes, del siguiente modo:
- 7.7.5.1 Sitúese en la capa u horizonte a muestrear y proceda a limpiar la pared respectiva con una espátula limpia (para retirar cualquier resto de contaminación proveniente del proceso de excavación).
- 7.7.5.2 Si va a tomar una muestra de VOC's, obténgala directamente de la pared del horizonte respectivo, con una cucharita de acero inoxidable; evitando perturbar la porción de suelo extraída transfírela a su respectivo recipiente, ciñéndose a lo especificado en el acápite 6.5.3. Cierre herméticamente, rotule y refrigere.
- 7.7.5.3 Obtenga las muestras restantes colocando una pala o espátula descontaminada en la base del horizonte y dejando caer de la pared, mediante una picota, pico pequeño, cuchara o espátula limpia, la cantidad necesaria de suelo. Mezcle y homogenice completamente, descarte los fragmentos gruesos (grava, gravilla, guijarros y piedras), anotando el volumen total que ocupan. Utilizando la espátula (o cuchara) coloque la cantidad necesaria de muestra en su respectivo recipiente. Tape herméticamente, rotule y refrigere cada muestra.
- 7.7.6 Cada vez que termine de muestrear en un horizonte, para pasar al siguiente, lave, descontamine y seque cada una de las herramientas utilizadas.
- 7.7.7 Prosiga como en los parágrafos 6.5.4 y 6.5.5.

## **7.8 DETERMINACIÓN DE pH EN SUELOS Y RESIDUOS (SÓLIDOS, LODOS O LÍQUIDOS NO ACUOSOS)**

### **7.8.1 AJUSTE**

- 7.8.1.1 **Cada sistema de instrumento/electrodo debe ajustar a un mínimo de dos puntos que soportan el pH esperado de las muestras.**
- 7.8.1.2 **Verifique en porciones sucesivas de las soluciones tampón hasta que las lecturas estén dentro de 0,05 unidades de pH del valor de la solución tampón.**

### **7.8.2 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA Y MEDICIÓN DE PH DE SUELOS.**

- 7.8.2.1 **Coloque 20g de suelo en un recipiente de 50mL, agregue 20mL de agua desionizada, cubrir y agitar continuamente la suspensión por 5 min. Se permiten diluciones adicionales si se trabajan con suelos higroscópicos, sales u otras matrices problemáticas.**
- 7.8.2.2 **Dejar que la suspensión de suelo repose durante aproximadamente 1 hora para permitir que la mayor parte de la arcilla se asiente.**
- 7.8.2.3 **Sumerja el electrodo del medidor de pH en la solución sobrenadante.**
- 7.8.2.4 **Reporte los resultados como pH del suelo medido en agua y anotar la temperatura a la que se realizó la prueba.**

	<b>PROCEDIMIENTO DE MUESTREO</b>		Código	PM-OPE-07
			Revisión	06
			F. Aprobación	2021-03-01
			Página	11 de 14
			Aprobado por	Yul Abad S.
<b>Muestreo de Suelos, Lodo y Sedimentos</b>				

**7.8.3 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA Y MEDICIÓN DE PH DE MUESTRAS RESIDUALES. (SÓLIDOS, LODOS O LÍQUIDOS NO ACUOSOS)**

7.8.3.1 Coloque 20g de suelo en un recipiente de 50mL, agregue 20mL de agua desionizada, cubrir y agitar continuamente la suspensión por 5 min. Se permiten diluciones adicionales si se trabajan con suelos higroscópicos, sales u otras matrices problemáticas.

7.8.3.2 Dejar que la suspensión de muestra residual (sólido, lodo o líquido no acuoso) repose durante 15 min para permitir que la mayor parte del residuo suspendido se asiente para la medición.

NOTA: Si el residuo es higroscópico y absorbe toda el agua desionizada, comenzar el análisis nuevamente usando 20g de residuo y 40mL de agua desionizada.

NOTA: Si el sobrenadante es multifásico, decantar la fase oleosa y medir el pH de la fase acuosa. El electrodo puede necesitar limpieza si se cubre con un material aceitoso.

7.8.3.3 Sumerja el electrodo del medidor de pH en la solución sobrenadante.

7.8.3.4 Reporte los resultados como pH del residuo medido en agua y anotar la temperatura a la que se realizó la prueba

**8. CONSERVACIÓN, REGISTRO Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS**

8.1 Una vez preservadas, tapadas herméticamente y rotuladas, las muestras deben colocarse en los coolers o hieleras, en posición vertical, con sus respectivos ice packs (o refrigerantes), a una temperatura aproximada de 4°C. Bajo ninguna circunstancia las muestras deberán congelarse.

8.2 Registre las muestras en la Cadena de Custodia para Monitoreo de Suelos, Lodos, Barros y Sedimentos (F01-PM.OPE.01). *En su transporte al Laboratorio, hasta su entrega, toda muestra debe estar siempre acompañada de su respectiva Cadena de Custodia.*

8.3 Para evitar que los recipientes sufran golpes, se malogren, rajen o rompan durante el transporte al Laboratorio, debe colocarse entre ellos material de empaque limpio (de preferencia chips de poliuretano o plástico preformado para relleno, también pueden utilizarse cartón o papel corrugados).

8.3.1 Una vez que haya empackado y refrigerado las muestras, cierre los coolers, embálelos con cinta adhesiva y/o plastifilm (o stretch film) y transpórtelos (envíelos) lo antes posible al Laboratorio, acompañado las muestras con su correspondiente Cadena de Custodia. Además de los datos con la dirección del Laboratorio, el lugar de origen, el remitente y el consignatario, los coolers deberán tener etiquetas que señalen la posición correcta en que deben ser transportados.

**9. CONTROL DE CALIDAD (QC)**

9.1 **Duplicado de Campo:** Muestra que se toma en el mismo punto, en la misma porción de suelo y al mismo momento que la muestra original. Se tomará una muestra duplicada de suelo si el número de estaciones de muestreo es menor a diez (10) puntos.

9.2 Ajuste y verificación Se ajusta y verifica, cada vez que se realiza el ensayo. Los datos de ajuste y verificación se registran en el formato F02-PM-OPE-07.

	<b>PROCEDIMIENTO DE MUESTREO</b>	Código	PM-OPE-07
		Revisión	06
		F. Aprobación	2021-03-01
		Página	12 de 14
		Aprobado por	Yul Abad S.
<b>Muestreo de Suelos, Lodo y Sedimentos</b>			

## 10. SEGURIDAD Y SALUD OCUPACIONAL

- 10.1** Los analistas de campo de CERTIMIN., dependiendo del lugar (o lugares) donde realizarán actividades de monitoreo, deberán contar con su Certificado de Vacunas y su Pase Médico vigentes, que los habilite para ingresar a las distintas zonas donde efectuarán trabajos.
- 10.2** Realice una visita previa de inspección y reconocimiento al área donde realizará el monitoreo. Anote y tenga presente los peligros y riesgos a los que estará expuesto durante la ejecución de sus labores y la permanencia en el lugar.
- 10.3** Cuando llegué al lugar de muestreo, identifiqué los peligros y riesgos asociados a la actividad. Si los peligros o riesgos a los que se expondrá durante los trabajos no se hallaran contemplados en el IPER para Monitoreo de Suelos realice un Análisis de Riesgo, para determinar si son necesarias medidas y equipos de seguridad adicionales.
- 10.4** Cuando realice caminatas o trabajos a campo abierto -sobre todo en selva- utilice, de preferencia, caminos y accesos frecuentados por los lugareños; evite transitar por bosque tupido, a no ser que sea absolutamente necesario. A menos que el analista conozca bien el lugar y a la población, toda caminata debe ser liderada por un guía de la zona. Labores en zonas remotas, poco exploradas, boscosas o agrestes deben ser realizadas por, al menos, dos analistas. Lleve consigo un botiquín.
- 10.5** Utilice su equipo básico de seguridad (casco, lentes, zapato de seguridad y uniforme con cinta reflectante).
- 10.6** Para el traslado o transporte manual de equipos y materiales utilice guantes de badana o cuero.
- 10.7** En instalaciones industriales y en lugares de alto tráfico de vehículos y personas, el área donde se desarrollarán las labores de monitoreo será delimitada y señalizada con cinta reflectante y, cuando sea necesario, con conos de seguridad, para aislarla de riesgos externos y no exponer a personas ajenas a las actividades a los riesgos propios de la labor a ejecutarse.
- 10.8** Los analistas de campo de CERTIMIN. estarán siempre provistos de un equipo de comunicaciones (radio, nextel, teléfono satelital o celular) que les permita mantenerse en contacto con los supervisores (superintendentes), personal responsable de las actividades en campo y con la unidad médica o centro hospitalario más cercano.
- 10.9** En la siguiente tabla se muestran los peligros asociados al muestreo de suelos además de sus respectivos controles:

	<b>PROCEDIMIENTO DE MUESTREO</b>	Código	PM-OPE-07
		Revisión	06
		F. Aprobación	2021-03-01
		Página	13 de 14
		Aprobado por	Yul Abad S.
<b>Muestreo de Suelos, Lodo y Sedimentos</b>			

Tabla1

Peligros	Control
Herramientas de trabajo	<p>Antes de manipular las herramientas verifíquelas. De ser necesario revise sus instrucciones de esa manera accidentes de cortes.</p> <p>Manipule con cuidado las herramientas, luego de utilizarlos, almacénelos adecuadamente así evitará posibles caídas que puedan lastimarlo; de darse el caso utilice los EPP's adecuados para la manipulación de estos.</p>
Terreno inestable (calicatas)	<p>Para la ejecución de calicatas y durante la manipulación de las herramientas utilice guantes de cuero o badana.</p> <p>Tenga cuidado al hacer las calicatas ya que el suelo estará inestable, utilice botas con suela que tenga buen agarre, así evitará caídas.</p>
Características de la zona	Al tomar las muestras de suelos, colóquese guantes y mantenga las mangas del uniforme bajas, de esta manera evitará cortes.
Muestras de suelo, lodo, sedimento	Para la manipulación de las muestras, utilice guantes resistentes a los cortes por materiales como espinas, astillas, etc.
Vectores	<p>Infórmese sobre las características de la zona (clima) así como también de las enfermedades.</p> <p>Lleve prendas de vestir el cual le cubran lo más posible.</p> <p>Aplíquese el repelente de insectos tanto en ropa como en piel, de acuerdo a las indicaciones del fabricante.</p> <p>Cuando regrese el monitoreo revise sus prendas, asegúrese de que no trae consigo algún insecto.</p> <p>No toque ningún animal muerto. Evite tocarse los ojos, nariz y boca con las manos a menos que estas estén limpias.</p> <p>Tenga presente que algunas fragancias atraen a los insectos, así que utilice jabones y otros productos para la higiene que no estén aromatizados.</p>
Climas extremos	<p>Clima tropical (temperaturas por encima de los 18°C, radiación solar, lluvias): utilice ropa de trabajo ligera de manga larga, botas de caña alta, capote impermeable, bebidas rehidratantes, bloqueador y anteojos para radiación solar;</p> <p>Clima frío (temperaturas por debajo de los 18°C, altura, lluvias con granizo o nieve): utilice ropa que conserve el calor de manga larga, capote impermeable.</p>

	<b>PROCEDIMIENTO DE MUESTREO</b>	Código	PM-OPE-07
		Revisión	06
		F. Aprobación	2021-03-01
		Página	14 de 14
		Aprobado por	Yul Abad S.
<b>Muestreo de Suelos, Lodo y Sedimentos</b>			

#### 11. CONTROL OPERATIVO AMBIENTAL:

- 11.1 El suelo removido para la toma de las muestras debe ser retornado a la calita u hoyo practicado.
- 11.2 Los residuos sólidos y líquidos generados durante las labores de monitoreo deben segregarse y disponerse en lugares autorizados.

[ ]

#### 12. REGISTROS

Nombre	Código
Hoja de campo	F03-PM.OPE.01
Cadena de Custodia	F01-PM.OPE.01



## INFORME DE ENSAYO N° JUL1179.R22

<b>SOLICITANTE :</b>	JAVIER EDISON IGNACIO VILCAPOMA
<b>DOMICILIO LEGAL :</b>	Psj. Canipaco S/N Puzo Chilca, Huancayo, Junín
<b>SOLICITADO POR :</b>	Javier Edison Ignacio Vilcapoma
<b>SOLICITUD DE SERVICIO AMBIENTAL:</b>	SSA N° 514-22 Cadena de Custodia N° 1651-22/CERTIMIN
<b>REFERENCIA :</b>	Tesis aprobado según carta N° 341-CGTfIA-2021 Yauli / Yauli / Junín Monitoreo Calidad de Suelo Colindante a la carretera Pachachaca - Yauli, debajo de presa de relaves
<b>FECHA DE MUESTREO :</b>	2022/07/17
<b>MUESTRA TOMADA POR :</b>	EL CLIENTE
<b>PROTOCOLO :</b>	--
<b>TIPO DE MUESTRA:</b>	Suelos
<b>NÚMERO DE ESTACIONES DE MUESTREO :</b>	6
<b>PRESENTACIÓN DE LAS MUESTRAS :</b>	Bolsas Selladas
<b>CONDICIÓN DE LAS MUESTRAS : RECEPCIONADAS</b>	Muestras en buenas condiciones para los análisis solicitados.
<b>FECHA DE RECEPCIÓN :</b>	lunes, 18 de julio de 2022
<b>IDENTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS :</b>	Según se indica
<b>FECHA DE EJECUCIÓN DE ENSAYO :</b>	2022-07-18 al 2022-08-01
<b>FECHA DE REPORTE :</b>	lunes, 02 de agosto de 2022
<b>PERIODO DE CUSTODIA :</b>	Hasta un mes. De acuerdo a las recomendaciones de la metodología o norma empleada.

**EDGAR NINA VELÁSQUEZ**  
**Jefe Ambiental**  
**CQP. 729**

Lima, 2 de agosto de 2022

"Prohibida la reproducción total o parcial de este informe, sin autorización escrita de CERTIMIN S.A."  
"Los resultados de los ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce".  
Los resultados corresponden a las muestras indicadas.  
El laboratorio no es responsable de la información proporcionada por el cliente y que pueda afectar a la validez de los resultados.  
Los resultados se aplican a la muestra cómo se recibió por parte del cliente.  
Los ensayos han sido realizados en CERTIMIN S.A. sede Lima.



## RESULTADOS

Muestras		Ensayos														
N°	Codigo de Servicio Ensayo Unidad Limite de Detección LD	MON0000 Fecha Muestreo	MON0000 Tipo Muestra	MA1000 Nor* WGS-84	MA1000 Est* WGS-84	MA1000 Altitud* msnm	MA0386 pH Unidad pH	MA1239 Conductiv. mS/m	MA0447 Humedad* %	MA1124 Ag mg/Kg PS 0.2	MA1124 Al mg/Kg PS 100	MA1124 As mg/Kg PS 0.2	MA1124 B* mg/Kg PS 2.5	MA1124 Ba mg/Kg PS 1	MA1124 Be mg/Kg PS 0.4	MA1124 Bi* mg/Kg PS 5
1	SU-01	2022-07-17 13:00	Suelos	8714741	386699	3987	2.63	436	15.53	59.2	1361	814.3	26.5	210	<0.4	78
2	SU-02	2022-07-17 13:30	Suelos	8714762	386746	3987	2.65	420	20.35	57.2	1594	880.3	16.0	198	<0.4	77
3	SU-03	2022-07-17 14:00	Suelos	8714756	386779	3986	2.78	395	17.11	58.7	1866	906.5	29.0	219	<0.4	72
4	SU-04	2022-07-17 14:30	Suelos	8714773	386819	3987	2.81	398	15.92	61.0	2129	980.3	28.1	15	<0.4	73
5	SU-05	2022-07-17 15:00	Suelos	8714797	386825	3988	2.70	413	15.80	55.4	1461	883.8	25.4	203	<0.4	74
6	SU-06	2022-07-17 15:30	Suelos	8714814	386851	3989	2.68	419	14.12	57.6	1701	926.3	20.5	261	<0.4	75

(\*) Los resultados obtenidos corresponden a métodos que no han sido acreditados por el INACAL-DA.

Las Coordenadas\*, Altitud\*: son datos proporcionados por el cliente.

PS: Peso Seco

LD: Límite de Detección (Limite Reportable) que es tomado en base al Límite de Cuantificación del Método LCM.

EL USO INDEBIDO DE ESTE INFORME DE ENSAYO CONSTITUYE DELITO SANCIONADO CONFORME A LA LEY, POR LA AUTORIDAD COMPETENTE



LABORATORIO DE ENSAYO ACREDITADO POR EL ORGANISMO DE ACREDITACIÓN INACAL - DA CON REGISTRO N° LE 022



INFORME DE ENSAYO  
N° JUL1179.R22

Registro N°LE -022

Muestras		Ensayos															
N°	Codigo de Servicio	MA1124	MA1124	MA1124	MA1124												
	Ensayo	Ca	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Mo	Na	Ni	P*	Pb	Se	Sb
	Unidad	mg/Kg PS	mg/Kg PS	mg/Kg PS	mg/Kg PS												
	Limite de Detección LD	100	0.36	0.04	0.3	0.5	100	100	100	2	0.09	100	1	100	0.3	0.9	5
1	SU-01	8453	16.19	4.18	2.2	2030	64267	2281	1640	180	26.47	204	<1	<b>269</b>	2518.7	3.4	72
2	SU-02	9775	13.83	4.14	2.4	1710	63999	2549	1855	206	28.54	206	<1	<b>277</b>	2539.8	3.6	68
3	SU-03	8635	15.55	3.84	2.9	1820	65486	2381	2210	227	26.66	198	<1	<b>320</b>	2374.8	3.6	75
4	SU-04	9813	16.02	4.40	2.9	1950	72853	2423	2575	250	29.92	188	<1	<b>323</b>	2264.2	3.7	58
5	SU-05	8932	13.27	3.48	2.3	1730	59187	2392	1727	186	28.82	198	3	<b>278</b>	2456.4	3.6	75
6	SU-06	9554	12.51	3.25	2.5	1630	59387	2530	2022	193	35.47	198	<1	<b>288</b>	2373.5	3.3	85

(\* Los resultados obtenidos corresponden a métodos que no han sido acreditados por el INACAL-DA.

"EL USO INDEBIDO DE ESTE INFORME DE ENSAYO CONSTITUTE DELITO SANCIONADO CONFORME A LA LEY, POR LA AUTORIDAD COMPETENTE"



Muestras		Ensayos					
N°	Codigo de Servicio	MA1124	MA1124	MA1124	MA1124	MA1124	MA1124
	Ensayo	Sn*	Sr*	Ti*	Tl	V	Zn
	Unidad	mg/Kg PS					
	Limite de Detección LD	10	0.5	100	0.03	2	0.5
1	SU-01	<10	23.7	<100	0.84	7	5014.1
2	SU-02	<10	25.7	<100	0.85	8	4099.2
3	SU-03	<10	25.0	103	0.85	9	4594.5
4	SU-04	<10	21.6	102	0.81	10	5068.6
5	SU-05	<10	25.1	<100	0.87	7	4322.1
6	SU-06	<10	25.7	102	0.90	8	3854.8

(\*) Los resultados obtenidos corresponden a métodos que no han sido acreditados por el INACAL-DA.



CONTROL DE CALIDAD

Muestras QC		Ensayos													
N°	Codigo de Servicio Ensayo Unidad Limite de Detección LD	MA0386 pH Unidad pH	MA1239 Conductiv. mS/m	MA1124 Ag mg/Kg PS 0.2	MA1124 Al mg/Kg PS 100	MA1124 As mg/Kg PS 0.2	MA1124 B* mg/Kg PS 2.5	MA1124 Ba mg/Kg PS 1	MA1124 Be mg/Kg PS 0.4	MA1124 Bi* mg/Kg PS 5	MA1124 Ca mg/Kg PS 100	MA1124 Cd mg/Kg PS 0.36	MA1124 Co mg/Kg PS 0.04	MA1124 Cr mg/Kg PS 0.3	MA1124 Cu mg/Kg PS 0.5
1	Adición (% Recup.)	--	--	99.4	107.0	102.4	<b>88.0</b>	107.5	81.6	--	107.5	86.1	80.8	83.2	95.0
2	Adición (% Recup.)	--	--	99.9	113.0	105.6	<b>94.4</b>	104.5	81.6	--	107.5	88.6	82.9	81.6	85.0
3	Adición Rango (%)	--	--	80.0 - 120.0	80.0 - 120.0	80.0 - 120.0	<b>80.0 - 120.0</b>	80.0 - 120.0	80.0 - 120.0	--	80.0 - 120.0	80.0 - 120.0	80.0 - 120.0	80.0 - 120.0	80.0 - 120.0
4	STD - Recuperación Obtenido (%)	99.9	100.0	102.5	63.0	99.7	<b>99.4</b>	101.5	98.2	--	100.3	97.8	97.8	99.2	100.9
5	STD - Rango (%)	99.7-100.3	99.5-100.5	97.5-102.5	23.7-176.3	97.5-102.5	<b>97.4-102.6</b>	97.8-102.2	97.9-102.1	--	97.1-102.9	97.7-102.3	97.5-102.5	97.7-102.3	97.7-102.3
6	SU-01 (Original)	2.63	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
7	SU-01 (Dup)	2.64	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
8	SU-02 (Original)	--	--	57.2	1594	880.3	<b>16.0</b>	198	<0.4	<b>77</b>	9775	13.83	4.14	2.4	1710
9	SU-02 (Dup)	--	--	57.3	1587	878.1	<b>16.5</b>	196	<0.4	<b>68</b>	9728	14.08	4.21	2.5	1700
10	SU-06 (Original)	--	419	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
11	SU-06 (Dup)	--	420	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
12	Blanco	--	--	<0.2	<100	<0.2	<b>&lt;2.5</b>	<1	<0.4	<b>&lt;5</b>	<100	<0.36	<0.04	<0.3	<0.5

"EL USO INDEBIDO DE ESTE INFORME DE ENSAYO CONSTITUYE DELITO SANCIONADO CONFORME A LA LEY, POR LA AUTORIDAD COMPETENTE"



LABORATORIO DE ENSAYO ACREDITADO POR EL ORGANISMO DE ACREDITACIÓN INACAL - DA CON REGISTRO N° LE 022



INFORME DE ENSAYO  
N° JUL1179.R22

Registro N°LE -022

Muestras QC		Ensayos													
N°	Codigo de Servicio Ensayo Unidad Limite de Detección LD	MA1124	MA1124	MA1124	MA1124	MA1124	MA1124	MA1124	MA1124	MA1124	MA1124	MA1124	MA1124	MA1124	MA1124
		Fe mg/Kg PS 100	K mg/Kg PS 100	Mg mg/Kg PS 100	Mn mg/Kg PS 2	Mo mg/Kg PS 0.09	Na mg/Kg PS 100	Ni mg/Kg PS 1	P* mg/Kg PS 100	Pb mg/Kg PS 0.3	Se mg/Kg PS 0.9	Sb mg/Kg PS 5	Sn* mg/Kg PS 10	Sr* mg/Kg PS 0.5	Ti* mg/Kg PS 100
1	Adición (% Recup.)	102.5	100.5	101.5	102.5	82.2	110.0	108.0	--	84.8	83.2	104.5	<b>98.2</b>	<b>84.3</b>	--
2	Adición (% Recup.)	82.5	100.0	101.5	101.5	84.0	111.0	109.5	--	100.8	84.8	103.0	<b>96.8</b>	<b>84.1</b>	--
3	Adición Rango (%)	80.0 - 120.0	80.0 - 120.0	80.0 - 120.0	80.0 - 120.0	80.0 - 120.0	80.0 - 120.0	80.0 - 120.0	--	80.0 - 120.0	80.0 - 120.0	80.0 - 120.0	<b>80.0 - 120.0</b>	<b>80.0 - 120.0</b>	--
4	STD - Recuperación Obtenido (%)	101.4	97.3	101.9	102.8	102.2	98.2	100.0	<b>107.3</b>	101.6	97.3	103.8	<b>95.7</b>	<b>99.1</b>	--
5	STD - Rango (%)	96.0-104.0	97.2-102.8	96.4-103.6	96.2-103.8	97.7-102.3	97.0-103.0	97.5-102.5	<b>90.5-109.5</b>	97.6-102.4	96.8-103.2	79.0-121.0	<b>95.5-104.5</b>	<b>96.7-103.3</b>	--
6	SU-01 (Original)	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
7	SU-01 (Dup)	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
8	SU-02 (Original)	63999	2549	1855	206	28.54	206	<1	<b>277</b>	2539.8	3.6	68	<b>&lt;10</b>	<b>25.7</b>	<b>&lt;100</b>
9	SU-02 (Dup)	64029	2530	1833	203	29.13	206	<1	<b>280</b>	2504.2	3.6	69	<b>&lt;10</b>	<b>25.5</b>	<b>&lt;100</b>
10	SU-06 (Original)	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
11	SU-06 (Dup)	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
12	Blanco	<100	<100	<100	<2	<0.09	<100	<1	<b>&lt;100</b>	<0.3	<0.9	<5	<b>&lt;10</b>	<b>&lt;0.5</b>	<b>&lt;100</b>

EL USO INDEBIDO DE ESTE INFORME DE ENSAYO CONSTITUYE DELITO SANCIONADO CONFORME A LA LEY, POR LA AUTORIDAD COMPETENTE



Muestras QC		Ensayos		
N°	Codigo de Servicio	MA1124	MA1124	MA1124
	Ensayo	Tl	V	Zn
	Unidad	mg/Kg PS	mg/Kg PS	mg/Kg PS
	Limite de Detección LD	0.03	2	0.5
1	Adición (% Recup.)	82.4	109.5	103.3
2	Adición (% Recup.)	81.9	109.5	104.8
3	Adición Rango (%)	80.0 - 120.0	80.0 - 120.0	80.0 - 120.0
4	STD - Recuperación Obtenido (%)	100.2	99.4	101.2
5	STD - Rango (%)	97.1-102.9	98.2-101.8	97.4-102.6
6	SU-01 (Original)	--	--	--
7	SU-01 (Dup)	--	--	--
8	SU-02 (Original)	0.85	8	4099.2
9	SU-02 (Dup)	0.88	8	4074.7
10	SU-06 (Original)	--	--	--
11	SU-06 (Dup)	--	--	--
12	Blanco	<0.03	<2	<0.5



## METODOS DE ENSAYO Y CODIGOS DE SERVICIO

N°	Descripción			
	Ensayo	Denominación	Cod.Serv	(1) Norma o Referencia
1	Nor *	Norte	MA1000	Estandar GPS
2	Est *	Este	MA1000	Estandar GPS
3	Altitud *	Altitud	MA1000	Estandar GPS
4	Humedad *	Determinación de humedad.	MA0447	NOM-021-RECNAT-2000- Especificaciones de Fertilidad, Sanidad y Clasificación de Suelos. Estudios, Muestreo y Análisis, Sección 7.1.5 Determinación del contenido de Humedad del Suelo por Gavimetría
5	Conductiv.	Conductividad	MA1239	ISO 11265:1994 Soil Quality - Determination of the specific electrical conductivity
6	Metales Por ICP MS/ICP OES	Metales Por ICP MS/ICP OES	MA1124	EPA Method 3050B Rev.2.1996/EPA Method 6010D Rev.5. 2018/EPA Method 6020 B Rev.2. 2014/Acid Digestion of Sediments, Sludges, and Soils/Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry/Inductively coupled Plasma-Mass Spectrometry.
7	pH	Potencial de Hidrógeno	MA0386	EPA Method 9045 D Rev.4. 2004. Soil and Waste pH.

- (1) SMEWW: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.  
APHA : American Public Health Association.  
AWWA: American Water Works Association.  
WEF : Water Environment Federation.  
EPA : Environmental Protection Agency.  
ASTM: American Society for Testing and Materials.  
ISO: International Organization for Standardization.  
NTP: Norma Técnica Peruana.  
NIOSH: The National Institute for Occupational Safety and Health.

EL USO INDEBIDO DE ESTE INFORME DE ENSAYO CONSTITUYE DELITO SANCIONADO CONFORME A LA LEY, POR LA AUTORIDAD COMPETENTE\*



## INFORME DE ENSAYO N° SEP1213.R22

<b>SOLICITANTE :</b>	JAVIER EDISON IGNACIO VILCAPOMA
<b>DOMICILIO LEGAL :</b>	Psj. Canipaco S/N Puzo Chilca, Huancayo, Junín
<b>SOLICITADO POR :</b>	Javier Edison Ignacio Vilcapoma
<b>SOLICITUD DE SERVICIO AMBIENTAL:</b>	SSA N° 694-22 Cadena de Custodia N° 2312-22/CERTIMIN
<b>REFERENCIA :</b>	Santiago de Surco / Lima / Lima Monitoreo Calidad de Suelo
<b>FECHA DE MUESTREO :</b>	2022/09/13
<b>MUESTRA TOMADA POR :</b>	EL CLIENTE
<b>PROTOCOLO :</b>	--
<b>TIPO DE MUESTRA:</b>	Suelos
<b>NÚMERO DE ESTACIONES DE MUESTREO :</b>	12
<b>PRESENTACIÓN DE LAS MUESTRAS :</b>	Bolsas Selladas
<b>CONDICIÓN DE LAS MUESTRAS : RECEPCIONADAS</b>	Muestras en buenas condiciones para los análisis solicitados.
<b>FECHA DE RECEPCIÓN :</b>	martes, 13 de Setiembre de 2022
<b>IDENTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS :</b>	Según se indica
<b>FECHA DE EJECUCIÓN DE ENSAYO :</b>	2022-09-13 al 2022-09-29
<b>FECHA DE REPORTE :</b>	jueves, 29 de Setiembre de 2022
<b>PERIODO DE CUSTODIA :</b>	Hasta un mes. De acuerdo a las recomendaciones de la metodología o norma empleada.

**EDGAR NINA VELÁSQUEZ**  
**Jefe Ambiental**  
**CQP. 729**

Lima, 6 de Octubre de 2022

"Prohibida la reproducción total o parcial de este informe, sin autorización escrita de CERTIMIN S.A."  
"Los resultados de los ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce".  
Los resultados corresponden a las muestras indicadas.  
El laboratorio no es responsable de la información proporcionada por el cliente y que pueda afectar a la validez de los resultados.  
Los resultados se aplican a la muestra cómo se recibió por parte del cliente.  
Los ensayos han sido realizados en CERTIMIN S.A. sede Lima.



## RESULTADOS

Muestras		Ensayos														
N°	Codigo de Servicio Ensayo Unidad Limite de Detección LD	MON0000 Fecha Muestreo	MON0000 Tipo Muestra	MA0386 pH Unidad pH	MA1124 Ag mg/Kg PS 0.2	MA1124 Al mg/Kg PS 100	MA1124 As mg/Kg PS 0.2	MA1124 B* mg/Kg PS 2.5	MA1124 Ba mg/Kg PS 1	MA1124 Be mg/Kg PS 0.4	MA1124 Bi* mg/Kg PS 5	MA1124 Ca mg/Kg PS 100	MA1124 Cd mg/Kg PS 0.36	MA1124 Co mg/Kg PS 0.04	MA1124 Cr mg/Kg PS 0.3	MA1124 Cu mg/Kg PS 0.5
1	Bs-ST2	2022-09-13 09:00	Suelos	4.36	53.4	1808	835.8	<b>10.2</b>	77	<0.4	<b>62</b>	10185	12.67	4.24	4.0	1590
2	Ps-ST2	2022-09-13 09:10	Suelos	3.91	52.6	1541	848.8	<b>11.5</b>	464	<0.4	<b>60</b>	9846	13.05	5.08	5.7	1750
3	Cs-ST2	2022-09-13 09:20	Suelos	3.94	52.0	2000	853.0	<b>9.7</b>	371	<0.4	<b>62</b>	9373	13.17	4.91	6.5	1660
4	Bs-ST3	2022-09-13 09:30	Suelos	3.62	50.8	1623	837.2	<b>11.7</b>	444	<0.4	<b>63</b>	8851	13.35	4.79	3.9	1760
5	Ps-ST3	2022-09-13 09:40	Suelos	3.96	52.4	1596	823.7	<b>10.5</b>	505	<0.4	<b>65</b>	9955	13.04	4.32	5.4	1650
6	Cs-ST3	2022-09-13 09:50	Suelos	3.85	56.9	1602	816.7	<b>12.2</b>	312	<0.4	<b>70</b>	9504	12.56	4.90	6.7	1660
7	Bs-ST4	2022-09-13 10:00	Suelos	4.05	53.1	1667	797.5	<b>10.9</b>	329	<0.4	<b>68</b>	9819	13.75	4.37	6.9	1640
8	Ps-ST4	2022-09-13 10:10	Suelos	4.46	49.8	1529	868.3	<b>9.5</b>	444	<0.4	<b>66</b>	8907	13.17	4.90	6.8	1710
9	Cs-ST4	2022-09-13 10:20	Suelos	3.68	54.6	1591	820.2	<b>9.6</b>	369	<0.4	<b>70</b>	10277	11.68	4.77	5.7	1590
10	Ps-ST1	2022-09-13 10:30	Suelos	3.71	49.3	1428	822.0	<b>11.2</b>	401	<0.4	<b>67</b>	9398	11.11	4.55	6.8	1520
11	Cs-ST1	2022-09-13 10:40	Suelos	3.74	52.8	1417	713.7	<b>8.8</b>	412	<0.4	<b>67</b>	10358	14.57	5.12	12.1	1910
12	Bs-ST1	2022-09-13 10:50	Suelos	3.95	59.1	1505	811.7	<b>9.3</b>	172	<0.4	<b>71</b>	9991	14.29	5.17	8.0	1870

LD: Límite de Detección (Limite Reportable) que es tomado en base al Límite de Cuantificación del Método LCM.

pH: medición realizada a la Temperatura de 25°C

PS: Peso seco

(\*) Los resultados obtenidos corresponden a métodos que no han sido acreditados por el INACAL-DA.



LABORATORIO DE ENSAYO ACREDITADO POR EL ORGANISMO DE ACREDITACIÓN INACAL - DA CON REGISTRO N° LE 022



INFORME DE ENSAYO  
N° SEP1213.R22

Registro N°LE -022

Muestras		Ensayos																	
N°	Codigo de Servicio	MA1124	MA1124	MA1124	MA1124	MA1124	MA1124	MA1124	MA1124	MA1124	MA1124	MA1124	MA1124	MA1124	MA1124	MA1124	MA1124		
	Ensayo	Fe	K	Mg	Mn	Mo	Na	Ni	P*	Pb	Se	Sb	Sn*	Sr*	Ti*	Tl	V		
	Unidad	mg/Kg	PS	mg/Kg	PS	mg/Kg	PS	mg/Kg	PS	mg/Kg	PS	mg/Kg	PS	mg/Kg	PS	mg/Kg	PS	mg/Kg	PS
	Limite de Detección LD	100	100	100	2	0.09	100	1	100	0.3	0.9	5	10	0.5	100	0.03	2		
1	Bs-ST2	71568	2522	2077	220	19.81	1063	<1	<b>331</b>	2310.5	3.0	83	<b>15</b>	<b>23.2</b>	<b>103</b>	0.82	8		
2	Ps-ST2	70623	2764	2017	216	23.18	1196	<1	<b>309</b>	2348.7	3.7	83	<b>14</b>	<b>32.9</b>	<b>114</b>	0.88	8		
3	Cs-ST2	70451	2609	2181	238	45.60	1266	<1	<b>321</b>	2229.6	3.4	72	<b>&lt;10</b>	<b>30.0</b>	<b>113</b>	0.84	9		
4	Bs-ST3	66292	2723	2023	205	25.45	1192	<1	<b>298</b>	2250.8	3.6	93	<b>&lt;10</b>	<b>32.4</b>	<b>120</b>	0.91	8		
5	Ps-ST3	66315	2847	1990	202	40.52	1228	<1	<b>336</b>	2229.2	3.5	101	<b>11</b>	<b>35.4</b>	<b>125</b>	0.94	8		
6	Cs-ST3	73940	2737	2067	261	32.94	1347	2	<b>318</b>	2420.8	4.0	99	<b>&lt;10</b>	<b>29.4</b>	<b>124</b>	0.94	9		
7	Bs-ST4	73540	2619	2431	257	23.36	1160	4	<b>333</b>	2197.2	3.7	75	<b>12</b>	<b>30.5</b>	<b>115</b>	0.75	10		
8	Ps-ST4	65870	2582	1722	187	24.07	1278	3	<b>321</b>	2314.1	3.3	97	<b>&lt;10</b>	<b>31.7</b>	<b>116</b>	0.85	7		
9	Cs-ST4	71766	2754	2159	217	25.40	1231	<1	<b>335</b>	2508.7	3.4	57	<b>&lt;10</b>	<b>31.5</b>	<b>121</b>	0.91	9		
10	Ps-ST1	65369	2689	1633	175	22.85	1397	<1	<b>324</b>	2468.3	3.5	79	<b>&lt;10</b>	<b>30.8</b>	<b>123</b>	0.92	7		
11	Cs-ST1	71659	2480	1829	213	72.85	1250	5	<b>291</b>	2295.0	3.7	97	<b>19</b>	<b>31.8</b>	<b>111</b>	0.84	8		
12	Bs-ST1	74551	2592	1954	236	24.08	1185	<1	<b>306</b>	2523.9	3.8	80	<b>&lt;10</b>	<b>26.9</b>	<b>110</b>	1.03	9		

"EL USO INDEBIDO DE ESTE INFORME DE ENSAYO CONSTITUYE DELITO SANCIONADO CONFORME A LA LEY, POR LA AUTORIDAD COMPETENTE"

(\*) Los resultados obtenidos corresponden a métodos que no han sido acreditados por el INACAL-DA.



LABORATORIO DE ENSAYO ACREDITADO POR EL ORGANISMO  
DE ACREDITACIÓN INACAL - DA CON REGISTRO N° LE 022



Registro N°LE -022

INFORME DE ENSAYO  
N° SEP1213.R22

Muestras		Ensayo
N°	Codigo de Servicio	MA1124
	Ensayo	Zn
	Unidad	mg/Kg PS
	Limite de Detección LD	0.5
1	Bs-ST2	3902.9
2	Ps-ST2	3859.6
3	Cs-ST2	4045.8
4	Bs-ST3	3779.1
5	Ps-ST3	3841.7
6	Cs-ST3	3904.5
7	Bs-ST4	4194.9
8	Ps-ST4	3819.6
9	Cs-ST4	3699.6
10	Ps-ST1	3254.6
11	Cs-ST1	4561.8
12	Bs-ST1	4376.7

\*EL USO INDEBIDO DE ESTE INFORME DE ENSAYO CONSTITUYE DELITO SANCIONADO CONFORME A LA LEY, POR LA AUTORIDAD COMPETENTE\*

(\* Los resultados obtenidos corresponden a métodos que no han sido acreditados por el INACAL-DA.



Registro N°LE -022

INFORME DE ENSAYO  
N° SEP1213.R22

## CONTROL DE CALIDAD

Muestras QC		Ensayos													
N°	Codigo de Servicio Ensayo Unidad Limite de Detección LD	MA0386 pH Unidad pH	MA1124 Ag mg/Kg PS 0.2	MA1124 Al mg/Kg PS 100	MA1124 As mg/Kg PS 0.2	MA1124 B* mg/Kg PS 2.5	MA1124 Ba mg/Kg PS 1	MA1124 Be mg/Kg PS 0.4	MA1124 Bi* mg/Kg PS 5	MA1124 Ca mg/Kg PS 100	MA1124 Cd mg/Kg PS 0.36	MA1124 Co mg/Kg PS 0.04	MA1124 Cr mg/Kg PS 0.3	MA1124 Cu mg/Kg PS 0.5	MA1124 Fe mg/Kg PS 100
1	Adición (% Recup.)	--	99.8	98.0	89.6	<b>110.4</b>	108.0	92.8	--	105.0	89.6	82.4	115.2	100.0	102.0
2	Adición (% Recup.)	--	100.3	100.5	102.4	<b>112.0</b>	108.5	92.8	--	118.0	90.6	82.9	116.8	100.0	91.5
3	Adición Rango (%)	--	80.0 - 120.0	80.0 - 120.0	80.0 - 120.0	<b>80.0 - 120.0</b>	80.0 - 120.0	80.0 - 120.0	--	80.0 - 120.0	80.0 - 120.0	80.0 - 120.0	80.0 - 120.0	80.0 - 120.0	80.0 - 120.0
4	STD - Recuperación Obtenido (%)	99.9	100.7	103.2	98.1	<b>102.5</b>	99.2	98.1	--	97.2	98.1	97.6	99.5	100.9	99.2
5	STD - Rango (%)	99.7-100.3	97.5-102.5	92.4-107.6	97.5-102.5	<b>97.4-102.6</b>	97.8-102.2	97.9-102.1	--	97.1-102.9	97.7-102.3	97.5-102.5	97.7-102.3	97.7-102.3	96.0-104.0
6	Bs-ST2 (Original)	4.36	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
7	Bs-ST2 (Dup)	4.34	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
8	Ps-ST2 (Original)	--	52.6	1541	848.8	<b>11.5</b>	464	<0.4	<b>60</b>	9846	13.05	5.08	5.7	1750	70623
9	Ps-ST2 (Dup)	--	52.9	1546	820.0	<b>11.6</b>	462	<0.4	<b>59</b>	9819	13.09	5.28	5.5	1740	70627
10	Blanco	--	<0.2	<100	<0.2	<b>&lt;2.5</b>	<1	<0.4	<b>&lt;5</b>	<100	<0.36	<0.04	<0.3	<0.5	<100



LABORATORIO DE ENSAYO ACREDITADO POR EL ORGANISMO DE ACREDITACIÓN INACAL - DA CON REGISTRO N° LE 022



INFORME DE ENSAYO  
N° SEP1213.R22

Muestras QC		Ensayos													
N°	Codigo de Servicio Ensayo Unidad Limite de Detección LD	MA1124	MA1124	MA1124	MA1124	MA1124	MA1124	MA1124	MA1124						
		K	Mg	Mn	Mo	Na	Ni	P*	Pb	Se	Sb	Sn*	Sr*	Ti*	Tl
		mg/Kg PS	mg/Kg PS	mg/Kg PS	mg/Kg PS	mg/Kg PS	mg/Kg PS	mg/Kg PS	mg/Kg PS						
		100	100	2	0.09	100	1	100	0.3	0.9	5	10	0.5	100	0.03
1	Adición (% Recup.)	95.0	95.5	100.0	85.6	110.0	112.0	--	94.4	108.8	102.5	<b>100.0</b>	<b>87.2</b>	--	93.0
2	Adición (% Recup.)	98.5	98.5	100.5	86.9	111.5	112.5	--	118.4	108.8	103.0	<b>100.5</b>	<b>87.5</b>	--	93.4
3	Adición Rango (%)	80.0 - 120.0	80.0 - 120.0	80.0 - 120.0	80.0 - 120.0	80.0 - 120.0	80.0 - 120.0	--	80.0 - 120.0	80.0 - 120.0	80.0 - 120.0	<b>80.0 - 120.0</b>	<b>80.0 - 120.0</b>	--	80.0 - 120.0
4	STD - Recuperación Obtenido (%)	100.7	99.9	100.9	101.1	99.4	101.2	<b>99.5</b>	101.9	98.0	99.8	<b>104.3</b>	<b>99.9</b>	--	100.3
5	STD - Rango (%)	97.2-102.8	96.4-103.6	96.2-103.8	97.7-102.3	97.0-103.0	97.5-102.5	<b>90.5-109.5</b>	97.6-102.4	96.8-103.2	79.0-121.0	<b>95.5-104.5</b>	<b>96.7-103.3</b>	--	97.1-102.9
6	Bs-ST2 (Original)	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
7	Bs-ST2 (Dup)	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
8	Ps-ST2 (Original)	2764	2017	216	23.18	1196	<1	<b>309</b>	2348.7	3.7	83	<b>14</b>	<b>32.9</b>	<b>114</b>	0.88
9	Ps-ST2 (Dup)	2767	2025	216	23.03	1202	<1	<b>304</b>	2367.8	3.6	85	<b>14</b>	<b>32.8</b>	<b>113</b>	0.87
10	Blanco	<100	<100	<2	<0.09	<100	<1	<b>&lt;100</b>	<0.3	<0.9	<5	<b>&lt;10</b>	<b>&lt;0.5</b>	<b>&lt;100</b>	<0.03

"EL USO INDEBIDO DE ESTE INFORME DE ENSAYO CONSTITUYE DELITO SANCIONADO CONFORME A LA LEY, POR LA AUTORIDAD COMPETENTE"



LABORATORIO DE ENSAYO ACREDITADO POR EL ORGANISMO  
DE ACREDITACIÓN INACAL - DA CON REGISTRO N° LE 022



Registro N°LE -022

INFORME DE ENSAYO  
N° SEP1213.R22

Muestras QC		Ensayos	
N°	Codigo de Servicio	MA1124	MA1124
	Ensayo	V	Zn
	Unidad	mg/Kg PS	mg/Kg PS
	Limite de Detección LD	2	0.5
1	Adición (% Recup.)	96.5	110.0
2	Adición (% Recup.)	96.5	115.1
3	Adición Rango (%)	80.0 - 120.0	80.0 - 120.0
4	STD - Recuperación Obtenido (%)	100.0	100.6
5	STD - Rango (%)	98.2-101.8	97.4-102.6
6	Bs-ST2 (Original)	--	--
7	Bs-ST2 (Dup)	--	--
8	Ps-ST2 (Original)	8	3859.6
9	Ps-ST2 (Dup)	8	3863.4
10	Blanco	<2	<0.5



## METODOS DE ENSAYO Y CODIGOS DE SERVICIO

N°	Descripción			
	Ensayo	Denominación	Cod. Serv	(1) Norma o Referencia
1	pH	Potencial de Hidrógeno	MA0386	EPA Method 9045 D Rev.4. 2004. Soil and Waste pH.
2	Metales Por ICP MS/ICP OES	Metales Por ICP MS/ICP OES	MA1124	EPA Method 3050B Rev.2.1996/EPA Method 6010D Rev.5. 2018/EPA Method 6020 B Rev.2. 2014/Acid Digestion of Sediments, Sludges, and Soils/Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry/Inductively coupled Plasma-Mass Spectrometry.

- (1) SMEWW: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.  
APHA : American Public Health Association.  
AWWA: American Water Works Association.  
WEF : Water Environment Federation.  
EPA : Environmental Protection Agency.  
ASTM: American Society for Testing and Materials.  
ISO: International Organization for Standardization.  
NTP: Norma Técnica Peruana.  
NIOSH: The National Institute for Occupational Safety and Health.

EL USO INDEBIDO DE ESTE INFORME DE ENSAYO CONSTITUYE DELITO SANCCIONADO CONFORME A LA LEY, POR LA AUTORIDAD COMPETENTE\*