

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



**EFFECTO DE SAPONINAS DE *Quillaja saponaria* Molina SOBRE UN
CONSORCIO BACTERIANO DURANTE LA BIORREMEDIACIÓN DE
SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS DE PETRÓLEO**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera, como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo

BÁRBARA BELÉN BARRA SANHUEZA
PROFESOR GUÍA: DR. MICHAEL SEEGER PFEIFFER
TEMUCO – CHILE

2012

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



**EFECTO DE SAPONINAS DE *Quillaja saponaria* Molina SOBRE UN
CONSORCIO BACTERIANO DURANTE LA BIORREMEDIACIÓN DE
SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS DE PETRÓLEO**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera, como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo

BÁRBARA BELÉN BARRA SANHUEZA

TEMUCO – CHILE

2012

**“EFECTO DE SAPONINAS DE *Quillaja saponaria* Molina SOBRE UN
CONSORCIO BACTERIANO DURANTE LA BIORREMEDIACIÓN DE
SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS DE PETRÓLEO”**

PROFESOR GUÍA

: _____

Michael Seeger Pfeiffer
Bioquímico, Universidad de Chile
Doctor en Ciencias de la Universidad de Chile
Departamento de Química
Universidad Técnica Federico Santa María

PROFESOR CONSEJERO

: _____

Maribel Eugenia Parada Ibáñez
Profesor de Biología y Cs. Naturales
Magister en Ciencias mención Protección Vegetal
Doctora en Ciencias por la Universidad de Sevilla
Departamento de Cs. Agronómicas y RRNN
Universidad de La Frontera

CALIFICACIÓN PROMEDIO TESIS

: _____

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mis más sinceros agradecimientos a todos quienes de alguna u otra forma me apoyaron a lo largo de este período. A la Dra. Maribel Parada por motivarme y brindarme las herramientas necesarias para comenzar desde el primer día, por los consejos, el apoyo y los cuidados en momentos difíciles, por todo, muchas gracias de todo corazón. Al Dr. Michael Seeger por brindarme la oportunidad de realizar esta última etapa en su laboratorio, por el apoyo, los consejos y las herramientas necesarias para que esto se llevara a cabo. A los profesores Myriam González y Luis Rojas por sus consejos, apoyo y conocimientos, por su buena disposición y grata acogida. Agradecer a todos los miembros del Laboratorio en Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental, a Sebastián Fuentes por su apoyo, por sus soluciones tan didácticas y su buena onda, por la disposición y los millones de consejos, muchas gracias, a María José Romero por preocuparse de cada paso y guiarme cuando estaba desorientada, a Viviana Urtuvia, Pamela Villegas, Marjorie Contreras, Franco Cárdenas, María José Vargas, Patricia Águila, Francisco Montero por recibirme de forma tan grata y alegrar los arduos días de trabajo con su simpatía y buena onda, por darme ánimo para continuar, por preocuparse y por la gran disposición en todo este tiempo, a Paulina Vega, por apoyarme en mis primeros días, por guiarme y darme ánimo desde un comienzo, a Erwin Strahsburger por ese “Vamos que se puede” de cada día, por los consejos y el apoyo. Agradecer principalmente a mi gran familia, por ser únicos, por apoyarme a la distancia, por darme la confianza y la fuerza para seguir, por ser mi motivación cada día, por formarme como persona y darme las herramientas y la oportunidad de partir hacia un lugar diferente, gracias mamá, papá, Javita, Marquitos, Rorro, Nelson, Darío y César por todo. A Esteban mi pilar, por aguantar mis malos momentos y estar por años apoyándome, por levantarme cada vez que estaba a punto de decaer y por acompañarme en este proceso. A mis amigos de siempre, ustedes saben lo importante que son para mí, a los que estuvieron alguna vez y ahora me acompañan desde otro lugar. A todos quienes estuvieron cerca y me dieron su mano para seguir avanzando, gracias por acompañarme en cada momento y ser partícipes de esta etapa. A todos muchas gracias de corazón.

Bárbara.

ÍNDICE

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	El petróleo	3
2.2	Los hidrocarburos de petróleo como contaminantes	4
2.3	Biorremediación	6
2.4	Bioaumentación en suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo	7
2.5	Surfactantes y biorremediación de hidrocarburos de petróleo	8
2.5.1	Biosurfactantes	10
2.6	Quillay (<i>Quillaja saponaria</i> Molina)	10
2.7	Saponinas	11
2.8	Biorremediación con saponinas	13
3	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	14
3.1	Hipótesis	15
3.2	Objetivo general.	15
3.3	Objetivos específicos.	15
4	MATERIALES Y MÉTODOS	16
4.1	Reactivos	16
4.2	Medios de cultivo	16
4.3	Cepas bacterianas	16
4.4	Crecimiento de las cepas degradadoras en distintas fuentes de carbono	17
4.5	Crecimiento de las cepas degradadoras en medio BHB concentrado con succinato	17
4.6	Crecimiento de las cepas degradadoras en suelo con distintas concentraciones de diésel	18
4.7	Actividad emulsificante de saponinas de quillay	18
4.7.1	Emulsificación de vaselina líquida	19

4.7.2	Emulsificación de diésel	19
4.8	Crecimiento de las cepas degradadoras de hidrocarburos en saponinas de quillay como fuente de carbono	20
4.9	Efecto de saponinas de quillay sobre el crecimiento de las cepas degradadoras de hidrocarburos	20
4.10	Estudios de microcosmos	20
4.10.1	Diseño experimental	20
4.10.2	Preparación microcosmos	22
4.10.3	Preparación de inóculos, inoculación y adición de saponinas de quillay	22
4.10.4	Monitoreo y toma de muestras	23
4.10.5	Recuento de heterótrofos cultivables totales y degradadores de hidrocarburos en estudios de microcosmos	23
5	RESULTADOS	24
5.1	Crecimiento de las cepas degradadoras de hidrocarburos en distintas fuentes de carbono	24
5.2	Crecimiento de las cepas degradadoras de hidrocarburos en medio mineral Bushnell-Haas concentrado con succinato	25
5.3	Crecimiento de las cepas degradadoras de hidrocarburos en suelo con distintas concentraciones de diésel	28
5.4	Actividad emulsificante de saponinas de quillay	29
5.4.1	Emulsificación de vaselina líquida	29
5.4.2	Emulsificación de diésel	30
5.5	Crecimiento de las cepas degradadoras en saponinas de quillay como fuente de carbono	30
5.6	Efecto de saponinas de quillay sobre el crecimiento de las cepas degradadoras	33
5.7	Recuento de heterótrofos cultivables totales y degradadores de hidrocarburos en estudios de microcosmos	34
6	DISCUSIÓN	37
6.1	Crecimiento de las cepas <i>Pseudomonas</i> sp. 34, <i>Pseudomonas</i> sp. 36B, <i>Acinetobacter</i> sp. 53 y <i>Acinetobacter</i> sp. 64 en distintas fuentes de carbono	37

6.2	Efecto de saponinas de quillay en la emulsificación de diésel.	40
6.3	Efecto de las saponinas de quillay sobre el crecimiento y viabilidad de las cepas <i>Pseudomonas</i> sp. 34, <i>Pseudomonas</i> sp. 36B, <i>Acinetobacter</i> sp. 53 y <i>Acinetobacter</i> sp. 64.	41
6.4	Efecto de saponinas de <i>Quillaja saponaria</i> Molina sobre el crecimiento bacteriano en un suelo contaminado con diésel.	42
7	CONCLUSIONES	44
8	LITERATURA CITADA	46

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Clasificación de hidrocarburos de petróleo	4
Figura 2.	Disposición de un surfactante en un medio bifásico	9
Figura 3.	Formación de micelas en surfactantes	9
Figura 4.	<i>Quillaja saponaria</i> Molina	11
Figura 5.	Estructura básica de las saponinas de <i>Quillaja saponaria</i> Molina	12
Figura 6.	Sector Laguna Verde, Región de Valparaíso	21
Figura 7.	Microcosmos de suelo	22
Figura 8.	Crecimiento de las cepas degradadoras de hidrocarburos en distintas fuentes de carbono	24
Figura 9.	Crecimiento de las cepas degradadoras de hidrocarburos en medio mineral concentrado con succinato	26
Figura 10.	Crecimiento de las cepas degradadoras de hidrocarburos en medio mineral BHB 5 × con succinato 40 mM	27
Figura 11.	Crecimiento de las cepas degradadoras de hidrocarburos en suelo con distintas concentraciones de diésel	28
Figura 12.	Emulsificación de vaselina líquida por las saponinas	29
Figura 13.	Emulsificación de diésel por las saponinas	30
Figura 14.	Crecimiento de las cepas degradadoras de hidrocarburos en saponinas de quillay	31
Figura 15.	Análisis estadístico comparativo entre el crecimiento con saponinas y sin fuente de carbono	32
Figura 16.	Crecimiento de las cepas degradadoras de hidrocarburos en presencia de saponinas de quillay	33
Figura 17.	Efecto de saponinas sobre el crecimiento de las cepas degradadoras de hidrocarburos	34
Figura 18.	Fotografías de los recuentos bacterianos en placas de los ensayos de microcosmos	35
Figura 19.	Recuento de heterótrofos cultivables totales y degradadores de hidrocarburos en estudios de microcosmos	36

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1.	Costos de diferentes estrategias de remediación de suelos	7
Tabla 2.	Concentración de saponinas de <i>Quillaja saponaria</i> Molina, utilizadas en la determinación del porcentaje de emulsificación (% E)	19
Tabla 3.	Tratamientos estudiados en ensayos de microcosmos	21
Tabla 4	Composición química para células microbianas	39
Tabla 5	Limitación por Carbono en base a la composición química para células microbianas	39

RESUMEN

Las estrategias de biorremediación combinadas pueden ser utilizadas en la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos (HC) de petróleo. Los biosurfactantes son agentes tensoactivos sintetizados por microorganismos o plantas, que aumentan la biodisponibilidad de compuestos hidrofóbicos. Las saponinas son surfactantes sintetizados por diversas especies vegetales, tales como quillay y quínoa. Las saponinas están formadas por aglicones no polares unidos a uno o más monosacáridos, lo que le confiere una elevada capacidad tensoactiva. En esta tesis se postula que la bioestimulación mediante la adición de saponinas de quillay (*Quillaja saponaria* Molina) favorece el crecimiento de bacterias degradadoras de HC en un suelo contaminado con diésel y bioaumentado con un consorcio microbiano. El objetivo general de este estudio es evaluar el efecto de saponinas de quillay sobre el crecimiento bacteriano en suelo contaminado con diésel y bioaumentado con un consorcio microbiano. Se estudió la capacidad emulsificadora de las saponinas de quillay en presencia de diésel, determinándose un 70 % de emulsificación. Esta actividad combinada con la capacidad degradadora de microorganismos, puede aumentar la eficiencia de degradación de HC. Cuatro cepas bacterianas de una colección de bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Acinetobacter* aisladas desde suelos con historial de contaminación en la Región de Valparaíso, se seleccionaron para ser empleadas en ensayos de biorremediación. Como criterio de selección se consideró su capacidad de utilizar diferentes HC como única fuente de carbono para su crecimiento. Mediante un estudio de tolerancia a diésel se determinó que las cuatro cepas toleran hasta 15 % p/p de diésel en suelo sin afectar su viabilidad. En las cuatro cepas, las saponinas no son utilizadas como fuente de carbono, ni inhiben el crecimiento celular. Se evaluó una estrategia que comprende bioaumentación y bioestimulación con saponinas en microcosmos de suelo contaminado con diésel durante 42 días. Mediante recuentos de heterótrofos cultivables totales y degradadores de HC, se observó un aumento en las unidades formadoras de colonias (UFC) de los degradadores de HC a partir de los 21 días en presencia de saponinas. En los tratamientos bioestimulados con saponinas y bioaumentados se alcanzó 8×10^{10} UFC g⁻¹ de suelo seco de degradadores de HC y en los suelos bioestimulados con saponinas y sin bioaumentar se alcanzó 3×10^{10} UFC g⁻¹ suelo seco. En base a los resultados se puede concluir que la adición de saponinas de quillay aumenta significativamente el crecimiento de degradadores de HC en suelos contaminados. Se cuantificará la degradación de HC en estos ensayos de biorremediación para relacionar el aumento de los degradadores con la degradación de HC.

SUMMARY

Combined bioremediation strategies could be useful for the recovery of petroleum hydrocarbon polluted soils. Biosurfactants are compounds from microorganisms or plants that increase the bioavailability of hydrophobic compounds. Saponins are surfactants synthesized by several plant species, such as quillay and quinoa. The high surfactant activity is due to their amphiphilic structure, consisting of a non polar aglycone bound to one or more monosaccharides. In this thesis we postulate that biostimulation with quillay saponins (*Quillaja saponaria* Molina) promotes the growth of hydrocarbon-degrading bacteria in soil contaminated with diesel fuel and bioaugmented with a microbial consortium. The general aim of this study is to evaluate the effect of quillay saponins on bacterial growth in soil contaminated with diesel and bioaugmented with a microbial consortium. In the present study, quillay saponins showed 70 % emulsifying activity for diesel in water. These saponins activity can act synergically with degrading microorganisms in order to improve oil degradation efficiency. Several bacterial strains belonging to *Pseudomonas* and *Acinetobacter* genera were previously isolated from polluted soils from Valparaíso region. *Pseudomonas* sp. strain 34, *Pseudomonas* sp. strain 36B, *Acinetobacter* sp. strain 53 and *Acinetobacter* sp. strain 64 were selected for bioremediation assays due their ability to grow on different hydrocarbons as sole carbon source. The four strains tolerate up to 15 % w/w diesel in soil without a decrease in viability. Quillay saponins are not a carbon source for growth for these bacterial strains and did not inhibit cell growth. A combined strategy using bioaugmentation and biostimulation with saponins was performed in diesel polluted soil microcosms for 42 days. Analysis of total cultivable heterotrophic and hydrocarbon-degraders showed an increase in colony forming units (CFU) of hydrocarbon-degraders in the presence of the biosurfactant at day 21. In saponins-biostimulated and bioaugmented soil hydrocarbon-degrading bacteria reached 8×10^{10} CFU g⁻¹ dry soil, whereas in saponins-biostimulated soil hydrocarbon-degrading bacteria reached 3×10^{10} CFU g⁻¹ dry soil. These results suggest that the amendment with quillay saponins significantly increased the growth of hydrocarbon-degrading strains in hydrocarbon contaminated soils. Hydrocarbon quantification will be performed in order to establish relationships between biodegradation of hydrocarbons and the observed increase in hydrocarbon degraders.

1. INTRODUCCIÓN

El petróleo es una compleja mezcla de compuestos orgánicos, que contiene principalmente hidrocarburos y en menor fracción compuestos nitrogenados, oxigenados y azufrados. La contaminación ambiental por petróleo genera preocupación debido a los problemas ambientales y de salud pública que provoca. Algunos componentes del petróleo son muy tóxicos y pueden afectar a plantas, animales y humanos. En la extracción, almacenaje en depósitos y transporte de este recurso, se producen tanto derrames como filtraciones, que pueden afectar severamente los ecosistemas impactados. La necesidad de remediar los sitios contaminados ha llevado al desarrollo de nuevas tecnologías que permitan atenuar dicha contaminación. Las estrategias de biorremediación constituyen una atractiva tecnología alternativa a los métodos físico-químicos de remediación. La biorremediación es una estrategia que presenta varias ventajas para la descontaminación. La biorremediación emplea las capacidades catabólicas de los microorganismos para la remoción de compuestos altamente tóxicos y recalcitrantes (Wackett & Bruce, 2000; Díaz, 2004; Pieper & Seeger, 2008). En muchos casos, es un método más económico y puede lograr la mineralización completa de los contaminantes orgánicos. Dentro de los organismos con capacidades degradadoras, las bacterias han sido las más estudiadas y utilizadas en estrategias de biorremediación, de manera individual o formando consorcios (Timmis & Pieper, 1999; Wackett & Bruce, 2000; Díaz *et al.*, 2001; Navia & Seeger, 2006; Seeger *et al.*, 2010).

Diversas cepas bacterianas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Acinetobacter* fueron aisladas desde suelos de la Región de Valparaíso con historial de contaminación con hidrocarburos. Por secuencia parcial del gen que codifica el 16S rRNA, se determinó que los aislados de *Pseudomonas* son filogenéticamente cercanos a *P. stutzeri* y las cepas de *Acinetobacter* están relacionadas con *A. tandoii*, *A. baylyi* y *A. radioresistens*. Cuatro cepas bacterianas se seleccionaron para ser empleadas en ensayos de biorremediación, debido a su capacidad de utilizar diferentes hidrocarburos como única fuente de carbono¹.

¹Comunicación personal: Fuentes, S., Águila, P. Candidatos a Doctores Programa de Doctorado en Biotecnología PUCV/UTFSM.

Un factor limitante en la degradación de compuestos hidrofóbicos como los hidrocarburos de petróleo es su biodisponibilidad. La hidrofobicidad de los hidrocarburos evita que estos se encuentren disponibles para ser captados y metabolizados por la microbiota del ambiente impactado. Los surfactantes son agentes tensoactivos que disminuyen la tensión superficial, aumentando así la disponibilidad de los hidrocarburos en la fase acuosa. En algunos casos estos compuestos son sintetizados y secretados por los mismos microorganismos. Sin embargo, no todos los microorganismos poseen la capacidad para sintetizarlos.

Existen compuestos con actividad surfactante de origen vegetal, como son las saponinas producidas por diversas especies como el quillay, la quínoa y la yuca. Las saponinas son espumantes y emulsificantes naturales de múltiples usos: espumante en bebidas, controlador de ácidos en minería, aditivo en alimentos, adyuvante en vacunas, etc. Las saponinas están formadas por aglicones no polares unidos a uno o más monosacáridos. Los monosacáridos le confieren un carácter hidrofílico, mientras que los aglicones un carácter hidrofóbico, lo que las convierte en una molécula anfipática. Esta combinación de estructuras polares y no polares le confiere la capacidad tensoactiva a estos compuestos, característica que les otorga una excelente acción como surfactante, permitiendo la reducción de la tensión superficial, así como la solubilización de productos hidrofóbicos en soluciones acuosas o en la formación de microemulsiones.

El quillay (*Quillaja saponaria* Molina) es un árbol endémico de Chile, cuya biomasa, principalmente la corteza, posee una mezcla compleja de saponinas triterpénicas, siendo éstos los metabolitos mayoritarios en la especie. El interés por estos compuestos ha aumentado significativamente en los últimos años debido a sus propiedades como detergentes naturales y agentes espumantes, así como sus aplicaciones en la reducción del colesterol, su efecto sobre la actividad cardíaca, su actividad hemolítica, su efecto inmunoestimulante, entre otros (Sparg *et al.*, 2004). Al ser las saponinas de quillay un recurso propio del país, su empleo resulta atractivo para la generación de nuevas estrategias de biorremediación mediante microorganismos, es por esto que este trabajo sugiere la evaluación de una estrategia que comprende bioaumentación y bioestimulación con saponinas de quillay en la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 El petróleo

El petróleo (de las palabras latinas *petro* = piedra y *oleo* = aceite que significa “aceite de piedra”). Su precursor principal fue la flora marina, aunque también la fauna aportó parte de los compuestos (Höök *et al.*, 2010). Restos animales y vegetales quedaron aprisionados bajo rocas sedimentarias, donde fueron degradados por microorganismos anaerobios, bajo temperaturas y presiones moderadas. En tales condiciones, la mayor parte del oxígeno y nitrógeno originales se perdieron, mientras que el carbono y el hidrógeno quedaron retenidos. Así pues, el petróleo consiste fundamentalmente en hidrocarburos, compuestos que sólo contienen carbono e hidrógeno, además de fracciones menores de azufre, nitrógeno y oxígeno, así como algunos metales (Higgins & Burns, 1975; Weininger & Stermitz, 1988).

El petróleo, es una mezcla compleja de compuestos orgánicos que se presenta en forma natural en depósitos de roca sedimentaria. Los hidrocarburos son los compuestos más abundantes del petróleo, alcanzando 50 - 98% de la composición total (Clark & Brown, 1977).

Los hidrocarburos de petróleo se clasifican en hidrocarburos alifáticos y aromáticos (Figura 1). Los hidrocarburos alifáticos poseen estructuras lineales, ramificadas o cíclicas, los que pueden ser saturados o (poli)insaturados. Dentro de los hidrocarburos alifáticos se encuentran alcanos o parafinas (hidrocarburos saturados lineales o ramificados), alquenos u olefinas (tienen dobles enlaces en su estructura), alquinos (tienen triples enlaces en su estructura). Por su parte, los hidrocarburos cíclicos están conformados por cicloalcanos (naftenos), cicloalquenos y cicloalquinos, que en conjunto son también llamados hidrocarburos alicíclicos o hidrocarburos alifáticos cíclicos. Los hidrocarburos aromáticos, que usualmente son menos abundantes que los alifáticos, son estructuras cíclicas con dobles enlaces conjugados, formados por al menos un anillo de benceno. Dentro de estos grupos se encuentran los hidrocarburos aromáticos monocíclicos, que poseen un único anillo que puede estar sustituido con cadenas laterales (como el tolueno) o no (benceno) y los hidrocarburos aromáticos policíclicos o naftenoaromáticos (PAH, del inglés *Policyclic Aromatic Hydrocarbons*), que están constituidos por dos (naftaleno) o más (fenantreno) anillos aromáticos condensados.

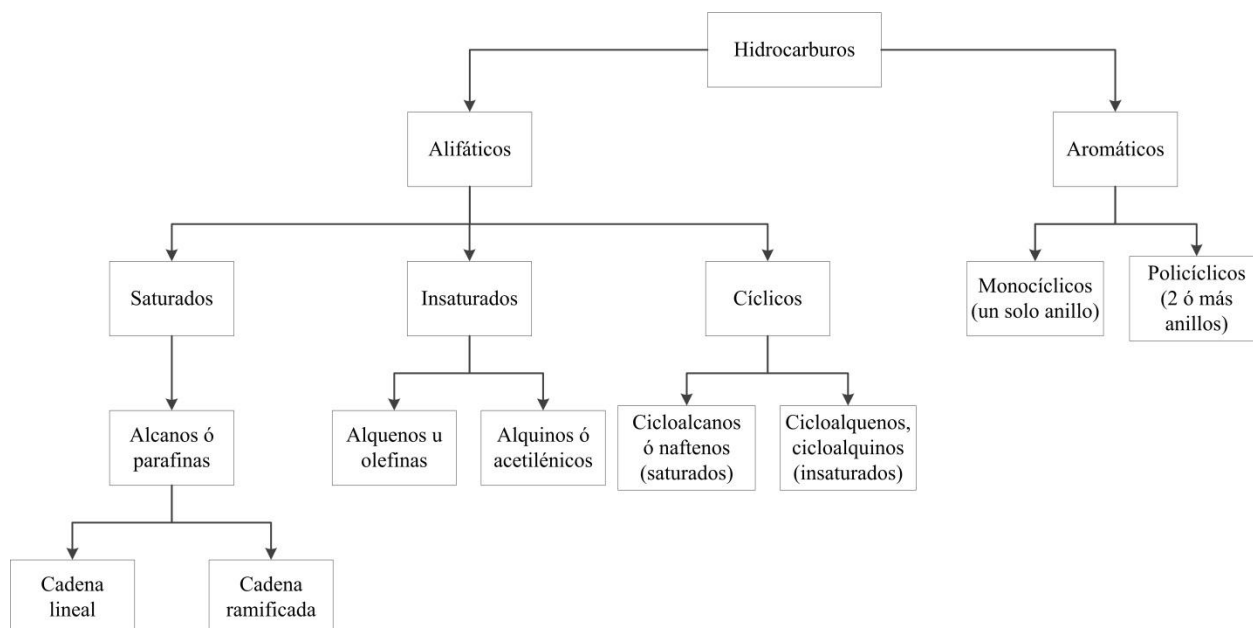


Figura 1. Clasificación de hidrocarburos de petróleo. (Fuente: Composición personal).

2.2 Los hidrocarburos de petróleo como contaminantes

El acelerado incremento en la población mundial y el modelo actual de consumo, ha dado como resultado la demanda de mayores cantidades de combustibles fósiles (hidrocarburos) y materiales que permitan la realización de actividades de producción y consumo mundial (Palazuelos, 2008). Aunque muchos de estos compuestos se utilizan para generar energía, cantidades no despreciables se liberan al ambiente, por la extracción, refinado, transporte y almacenamiento, lo cual representa un riesgo potencial para los ecosistemas (Semple *et al.*, 2001). Se han instalado a nivel mundial miles de tanques para el almacenamiento de productos del petróleo y químicos peligrosos para abastecer la demanda y satisfacer los niveles de producción mundial. El manejo inadecuado de los contenedores y los procesos que utilizan este sistema energético es el principal motivo por el cual representan una fuente de contaminación de suelos, acuíferos, ríos, lagos y mares (Fan & Krishnamurthy, 1995).

La clasificación más amplia de los contaminantes ambientales se divide en dos categorías: orgánicos e inorgánicos. Cuantitativamente, los contaminantes orgánicos que representan un mayor problema son los hidrocarburos en sus diversas formas. Los más comunes son los

hidrocarburos de petróleo (mezclas de alcanos alifáticos, compuestos aromáticos y otros constituyentes menores). Sobre 2.000 millones de toneladas de petróleo son producidas anualmente en el mundo (Atlas & Philp, 2005). Alrededor de 1.500 millones de toneladas de crudo son transportadas anualmente en buques de carga. Accidentes y operaciones de carga y descarga provocan que lleguen al mar y suelo entre 1,7 y 8,8 millones de toneladas. Las grandes catástrofes, como la del Exxon Valdez o la del Prestige, son afortunadamente poco frecuentes y, sin duda, las que más llaman la atención de los medios de comunicación y de la opinión pública. Sin embargo, es en las operaciones de carga-descarga, almacenamiento, transporte y limpieza de los tanques donde se producen innumerables derrames que son cuantitativamente más importantes que las grandes catástrofes (Castillo *et al.*, 2005).

En Chile se han reportado eventos de gran envergadura, principalmente en las costas del país. En 1973 se derramaron cerca de 30.000 toneladas de petróleo en Isla Guamblin, al sur del país, causando serios daños ambientales (SIGWEB, 2010). En 1974 en el estrecho de Magallanes se derramaron 52.000 toneladas de crudo. En 1978 en la bahía de San Vicente en Talcahuano 12.000 toneladas de crudo fueron derramadas (El Mercurio, 2010). En 2002 se derramaron en la ribera del río Aconcagua 75.000 litros de petróleo desde la refinería ubicada en Concón, Región de Valparaíso. En 2005 se vertieron 126,68 m³ de petróleo crudo en las costas de Antofagasta (DIRECTEMAR, 2010). En 2012 un buque panameño encalló en Antofagasta provocando un derrame en la playa Las petroleras. En 2012 en Puerto Chacabuco, Región de Aysén, se derramaron 10.000 litros y en Valparaíso 800 litros de crudo (El Mercurio, 2012).

La contaminación por hidrocarburos de petróleo es un problema ambiental de gran importancia, debido a que los componentes del petróleo son altamente recalcitrantes y se mantienen persistentes en el lugar a pesar de los procesos de degradación natural. Estudios de las zonas contaminadas durante el derrame del petrolero Exxon Valdéz en 1989 en Alaska, muestran que a pesar de los esfuerzos, siete años después aún existían altas concentraciones de hidrocarburos en el área (Carls *et al.*, 2001).

Los combustibles diésel son mezclas complejas de hidrocarburos saturados e hidrocarburos aromáticos obtenidos de la destilación intermedia gas-petróleo durante la separación del petróleo.

Debido a su producción masiva y su empleo como combustible para el transporte, se encuentran entre las causas más comunes de los contaminantes orgánicos de la superficie del suelo. Esto también repercute en el subsuelo a través de fugas de tanques subterráneos de almacenamiento y tuberías. Debido a su movilidad en el suelo, los hidrocarburos de los combustibles diésel liberados, pueden alcanzar tomas de agua o depósitos de agua subterránea, generando riesgos relevantes para los seres humanos y otros organismos vivos (Zanaroli *et al.*, 2010).

La errónea gestión de instalaciones y procesos industriales ha llevado a la contaminación de los suelos en gran parte del mundo y Chile no ha sido una excepción. Esto se traduce en una disminución de la calidad de los suelos y pérdida de sus funciones, e impacta directamente a las actividades que se desarrollan en él, como la agricultura y el turismo. Una de las mayores preocupaciones de la comunidad científica y ecológica es desarrollar estrategias que permitan la eliminación de este tipo de contaminantes del suelo.

2.3 Biorremediación

El proceso de biorremediación, definido como el empleo de microorganismos para detoxificar o remover contaminantes, se basa en las capacidades catabólicas que los microorganismos poseen para transformar o degradar los compuestos contaminantes (Atlas & Philp, 2005). Entre una gran variedad de métodos de remediación, la biorremediación ha sido reconocida como una tecnología eficiente, económica, versátil y ecológica (Margesin & Schinner, 2001).

Hay dos estrategias principales en las tecnologías de biorremediación. La bioaumentación consiste en la adición de microorganismos individuales o consorcios específicos para mejorar la degradación del contaminante, cuando la microbiota nativa no posee el potencial para degradar eficientemente el contaminante (Alexander, 1999; El Fantroussi & Agathos, 2005). La bioestimulación comprende la suplementación de nutrientes, inyección de oxígeno o adición de biosurfactantes, para aumentar la actividad de los microorganismos nativos capaces de degradar el contaminante (Atlas & Philp, 2005). La biorremediación presenta ventajas y desventajas respecto a métodos de remediación físico-químicos. Dentro de las ventajas se puede mencionar

que es una técnica segura y económica, el suelo saneado no requiere un confinamiento posterior y los contaminantes son transformados, pudiendo llegar a la mineralización completa hasta CO₂ y H₂O. Posibles desventajas son el requerimiento de periodos largos de tratamiento y la posible inhibición de los microorganismos por la presencia de altas concentraciones del contaminante, como hidrocarburos halogenados, metales y desechos radioactivos (Navia & Seeger, 2006).

Las estrategias de remediación, y dependiendo del sistema contaminado, pueden ser métodos de remoción físicos, químicos o biológicos, los que a su vez pueden ser *in situ* o *ex situ*. Dentro de las estrategias para recuperar suelos contaminados destacan la incineración, excavación, enterramiento, solidificación, estabilización, extracción de vapores, lavado, encapsulación y biorremediación. La biorremediación se erige en muchos casos como la estrategia más económica (Tabla 1) y sustentable con el ambiente, debido a que se transforma el contaminante en compuestos inocuos, pudiendo llegar a la mineralización completa (Philip *et al.*, 2005).

Tabla 1. Costos de diferentes estrategias de remediación de suelos (Philip *et al.*, 2005).

Técnica de remediación	Costo (US\$/m ³)
Tratamiento térmico: Incineración <i>in situ</i>	178-715
Excavación y enterramiento	53-134
Lavado	26-62
Encapsulación con geomembranas	71-107
Solidificación/estabilización	17-178
Biorremediación	2-268

2.4 Bioaumentación en suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo

Las mezclas petroquímicas pueden contener cientos de compuestos de hidrocarburos alifáticos y aromáticos, que poseen una amplia gama de toxicidades (Blomberg *et al.*, 1997; Potter & Simmons, 1998). El petróleo es una rica fuente de materia orgánica y algunos de sus componentes son metabolizados eficazmente por microorganismos en condiciones aerobias (Madigan *et al.*, 2003). Para la biorremediación de contaminantes del petróleo se prefieren los consorcios microbianos con la capacidad metabólica para degradar una amplia gama de

hidrocarburos sobre aislados puros (Ghazali *et al.*, 2004). Los consorcios pueden combinar las capacidades de diversos microorganismos capaces de utilizar diferentes hidrocarburos como fuente de carbono y energía (Viñas *et al.*, 2002; Van Beilen *et al.*, 2003; Cámara *et al.*, 2004; Wentzel *et al.*, 2007; Rojo, 2009).

Los componentes alifáticos corresponden a más del 75% del total de hidrocarburos presentes en el petróleo (Potter & Simmons, 1998). Los hidrocarburos alifáticos son biodegradados más rápidamente que los hidrocarburos aromáticos como se ha demostrado en estudios de laboratorio (Díaz-Ramírez *et al.*, 2008; Zrafi-Nouira *et al.*, 2009). La baja disponibilidad de los hidrocarburos como sustrato microbiano debido a su hidrofobicidad, es uno de los obstáculos limitantes para la biorremediación. Esto hace que las escalas de tiempo se prolonguen debido a la baja transferencia de masas a la fase acuosa, que es el paso limitante de la velocidad de degradación. Esto se aplica tanto a los suelos contaminados como a las aguas subterráneas. Se han realizado esfuerzos importantes en la búsqueda de nuevas técnicas que permitan aumentar la biodisponibilidad de los contaminantes. Algunos surfactantes aumentan la solubilización y eliminación de contaminantes (Atlas & Philp, 2005), resultando ser una posible solución para esta limitante.

2.5 Surfactantes y biorremediación de hidrocarburos de petróleo

Los surfactantes o tensioactivos son moléculas anfifílicas que causan la reducción de la tensión superficial. Tienen una estructura característica, que posee al menos un grupo hidrófobo y un grupo hidrófilo funcional (Geick & Ternes, 1999; Gautam & Tyagi, 2006). Debido a esta propiedad, los surfactantes se ubican en la interfase de fluidos como son los sistemas aceite-agua y aire-agua (Stoyanov *et al.*, 2003).

La estructura molecular de los surfactantes es tal que cada molécula se alinea con su parte hidrófoba tan lejos de la fase acuosa como sea posible mientras que la parte hidrófila permanece en contacto con el agua (Figura 2). Si la concentración de los surfactantes en la solución aumenta, se forma un aglomerado de moléculas monoméricas denominado micelas (Figura 3) (Geick & Ternes, 1999). La presencia de surfactantes en un medio incrementa la solubilidad en agua y

disponibilidad de compuestos orgánicos, siendo ésta una de sus principales propiedades para su aplicación en el área de la biotecnología ambiental para la remoción y biodegradación de contaminantes (Liu *et al.*, 1990). La industria de extracción y transformación del petróleo emplea surfactantes en la limpieza de los tanques de almacenamiento para incrementar la solubilidad de hidrocarburos no miscibles en fases acuosas, tales como pentano, hexano, ciclohexano, octano, dodecano, hexadecano, tolueno y naftaleno (Perfumo *et al.*, 2006). Estos materiales de superficie activa, aumentan el área de superficie de los compuestos hidrófobos insolubles en agua y aumentan su biodisponibilidad, lo que mejora el crecimiento de las bacterias y la tasa de biorremediación (Ron & Rosenberg, 2002).

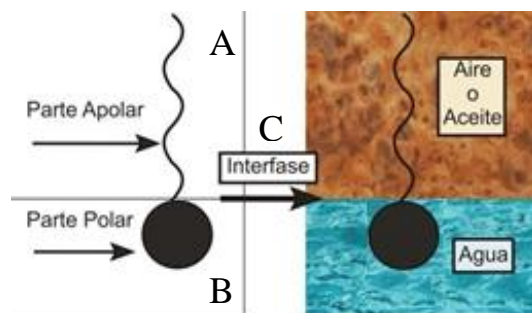


Figura 2. Disposición de un surfactante en un medio bifásico. A) Zona hidrófoba, B) Zona hidrofílica, C) Interfase. (Riojas *et al.*, 2010).

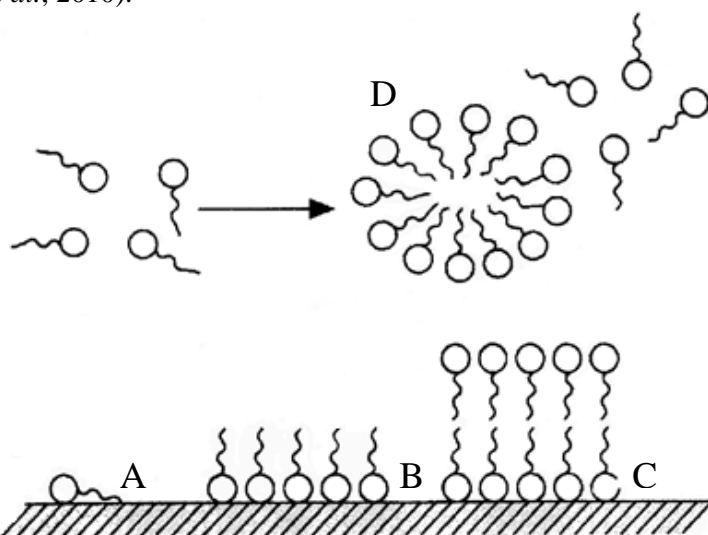


Figura 3. Formación de micelas en surfactantes. A) Monómeros, B) Hemimicela, C) Admicela, D) Micela. A muy bajas concentraciones los monómeros del surfactante adsorbido comienzan a aglomerarse y formar tipos de micelas llamadas admicelas y hemimicelas, dependiendo si los agregados tienen una o dos capas de surfactante. (Fuente: Composición personal).

2.5.1 Biosurfactantes. Los biosurfactantes son compuestos activos de superficie, sintetizados por microorganismos durante su crecimiento en sustratos específicos y por algunas especies vegetales como *Yucca shidigera*, *Agave lechuguilla*, *Pithecellobium saman*, *Sapindus saponaria* y *Quillaja saponaria* (Soeder *et al.*, 1996; Cheeke, 2000; Nitschke & Pastore, 2002; Santos *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2005; Moya *et al.*, 2010). Diversos biosurfactantes se derivan a partir de recursos vegetales renovables. El mercado europeo de surfactantes en el año 2004 alcanzó 2,5 millones de toneladas, de los cuales un 25% eran derivados de plantas (Xu *et al.*, 2011). Estos compuestos muestran ventajas sobre los de síntesis química debido a su compatibilidad con el ambiente, baja toxicidad y biodegradabilidad (Desai & Banat, 1997; Islas *et al.*, 2010). El interés en los biotensoactivos se ha incrementado considerablemente en años recientes por sus aplicaciones en la industria y el ambiente (Gautam & Tyagi, 2006). La producción y el empleo de biosurfactantes han adquirido gran interés en el área biotecnológica, principalmente en aplicaciones ambientales para mejorar la biodisponibilidad de compuestos hidrofóbicos con aplicaciones en procesos biológicos e industriales (Luna *et al.*, 2005). Dentro de las propiedades de interés se destaca que disminuyen la tensión superficial e interfacial, son agentes humectantes e intercalantes, mejoran el crecimiento microbiano, ayudan en el secuestro de metales y poseen actividad antimicrobiana (Kosaric, 2001). Debido a esto, la inclusión de biosurfactantes en la biorremediación de matrices contaminadas con hidrocarburos puede ser una alternativa ventajosa.

2.6 Quillay (*Quillaja saponaria* Molina)

El quillay es una especie endémica de Chile (Figura 4), especialmente dominante en la zona central del país, donde se distribuye desde la Provincia de Limarí en la Región de Coquimbo hasta la Región del Bío-Bío, formando parte del matorral esclerófilo desde la Cordillera de la Costa hasta la Cordillera de los Andes (Hoffmann *et al.*, 1992; Montenegro, 2002). Su cultivo se concentra en la Región de Valparaíso y la Región Metropolitana (Hoffmann *et al.*, 1992). La palabra quillay deriva del Mapudungun “kullay”, que significa “*jabón de palo*”. Por otro lado, el nombre de la especie proviene del latín *sapo* (jabón) y hace referencia al alto contenido de saponinas en la corteza de árbol, metabolitos que se caracterizan por sus propiedades espumantes (Hoffmann, 1998). Es sabido que algunas etnias utilizaban las infusiones de la corteza del quillay

como detergente. En la etnomedicina esta especie se recomienda para tratar enfermedades respiratorias y afecciones cutáneas; como inyección vaginal para combatir hemorragias, sus flores preparadas en forma de baños, para reumatismos crónicos; como infusión, para frotar extremidades y zonas enfermas; su corteza macerada, como expectorante; la infusión de su corteza, para afecciones escamosas y crónicas de la piel, en lavados hace desaparecer las indigestiones. Además el quillay se utiliza para tratar las alopecias, como estimulante de la mucosa gástrica, sudorífico y diurético (Hoffmann *et al.*, 1992).

El quillay sintetiza una mezcla compleja de saponinas triterpénicas, siendo éstos los metabolitos mayoritarios en la especie, almacenados principalmente en la corteza (Ribera, 2007). La corteza de este árbol constituye actualmente una de las principales fuentes de saponinas triterpenoides en el mundo por sus aplicaciones y usos (San Martín & Briones, 1999; Copaja *et al.*, 2003).

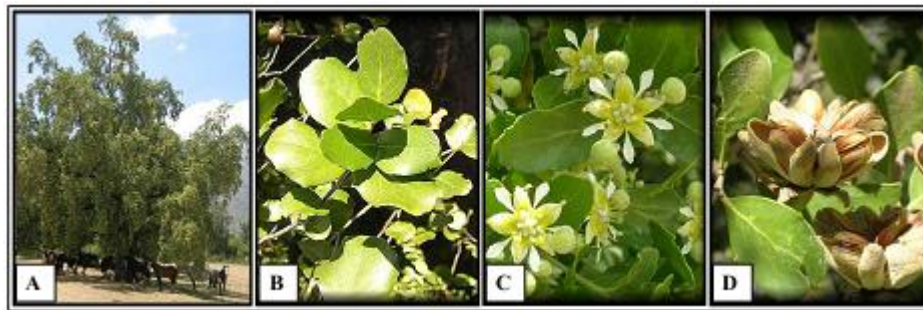


Figura 4. *Quillaja saponaria* Molina. A) Árbol adulto, B) Follaje, C) Flores y D) Frutos. (Fotografías de Juan Pablo Gabella y Diego Alarcón; <http://www.chilebosque.cl/tree/qsapo.html>. Adoptado de Ribera, 2007).

2.7 Saponinas

Las saponinas se definen como compuestos no volátiles con actividad surfactante, formados por el metabolismo secundario de diversas especies vegetales (Soeder *et al.*, 1996; Sen *et al.*, 1998; Guo & Kenne, 2000; Santos *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2005; Ghagi *et al.*, 2011). El nombre saponina deriva del latín *sapo* que significa jabón, ya que producen espuma en soluciones acuosas. Las saponinas están formadas por aglicones esteroidales o terpenoides unidos a una o más moléculas de monosacáridos. La estructura básica de las saponinas de quillay, es el

triterpeno ácido quillaico sustituido en la posición C-3 con un trisacárido y en la posición C-28 con un oligosacárido a través de un residuo de fucosa, el cual a su vez, se encuentra unido a uno o dos grupos acil (Figura 5) (Nord *et al.*, 2001).

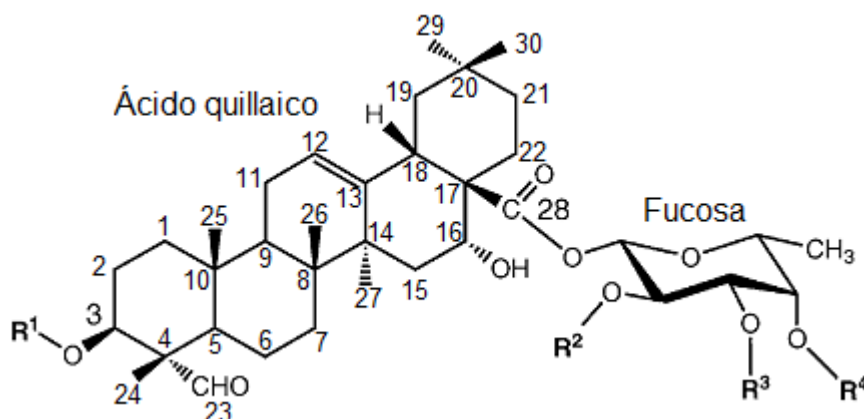


Figura 5. Estructura básica de las saponinas de *Quillaja saponaria* Molina. La aglicona es el triterpeno ácido quillaico con ramificaciones de un trisacárido o disacárido unido en posición 3 (R^1). El residuo fucosil (Fuc) unido al éster en la posición 28, es sustituido por un oligosacárido en la posición 2 (R^2), por un residuo monosacárido o un grupo acil en la posición 3 (R^3), y por un grupo acil en la posición 4 (R^4). (Fuente: Nord *et al.*, 2001).

Una fuente rica en saponinas es el árbol sudamericano *Quillaja saponaria* Molina, que contiene una mezcla compleja de saponinas triterpenoides. En extractos de corteza del árbol se han encontrado diversas saponinas triterpénicas, las cuales poseen un amplio empleo como, por ejemplo, tensioactivos para la industria fotográfica, agentes espumantes en bebidas, aditivos en alimentos y productos cosméticos (San Martín & Briones, 1999). En el organismo vegetal las saponinas presentan una amplia gama de actividades: emulsionante, insecticida y acción fitoprotectora contra ataques de microorganismos y herbívoros. Sus aplicaciones incluyen aficidas naturales y elementos de disuasión, además se utilizan en la fabricación de películas, papel heliográfico, reveladores fotográficos, bebidas analcohólicas, cervezas y vacunas (De Conchard, 1997; De Geyter *et al.*, 2012). Por otra parte, se han realizado estudios sobre la aplicación de saponinas en alimentos tanto de humanos como de animales (Cheeke, 2000). Por sus propiedades, se utilizan en la industria farmacéutica y en cosmética, además en la elaboración de confites y bebidas (Xu *et al.*, 2011). Existen más de 200 referencias científicas sobre las posibles aplicaciones industriales de las saponinas de quillay (San Martín & Briones, 1999).

2.8 Biorremediación con saponinas

La influencia de surfactantes fitogénicos en la eliminación de fenantreno y fluoreno en sistemas acuosos ha sido descrita (Soeder *et al.*, 1996). La adición de saponinas como surfactante favorece la degradación y remoción de compuestos contaminantes y recalcitrantes como hidrocarburos y metales pesados (Kaczorek *et al.*, 2008; Lord, 2010; Kiliç *et al.*, 2011). La presencia de surfactantes fitogénicos, genera una mayor disponibilidad del contaminante para los microorganismos y un consistente aumento en la eficiencia de la degradación (Pijanowska *et al.*, 2006; Kaczorek *et al.*, 2008).

3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Desde el siglo pasado se ha observado un gran aumento de la contaminación ambiental global. El desarrollo industrial, el crecimiento demográfico, la urbanización y el desconocimiento de las consecuencias ambientales de la liberación de sustancias químicas en el medio ambiente, contribuyeron a la situación de contaminación ambiental. Una amplia gama de industrias, entre las que destacan la industria de petróleo y gas, ha contribuido al problema de la contaminación ambiental.

Se ha estudiado la capacidad de los microorganismos para degradar contaminantes orgánicos y transformarlos en componentes inocuos para el medio ambiente como un medio para tratar biológicamente ambientes contaminados. El objetivo de numerosas investigaciones y aplicaciones a gran escala, ha sido el estudio de microorganismos degradadores, que constituyen la base para la biorremediación. Uno de los factores limitantes de la biorremediación es la baja biodisponibilidad de los contaminantes hidrofóbicos, por lo que la utilización de compuestos tensioactivos es una alternativa relevante.

Existen escasos reportes acerca de la utilización de surfactantes fitogénicos, dado que se prioriza la utilización de biosurfactantes sintetizados por la propia microbiota. Los estudios que se han realizado se han enfocado en hidrocarburos específicos en sistemas acuosos. Es en este marco que se propone evaluar el efecto de la adición de saponinas de quillay sobre un consorcio bacteriano en microcosmos de suelos contaminados con diésel. Dado que las saponinas de quillay son un recurso presente en Chile, son atractivas para generar una estrategia que colabore a los procesos de biorremediación de suelos contaminados con contaminantes hidrofóbicos como los hidrocarburos de petróleo.

3.1 Hipótesis

La bioestimulación mediante la adición de saponinas de *Quillaja saponaria* Molina favorece el crecimiento de bacterias degradadoras de hidrocarburos en un suelo contaminado con diésel y bioaumentado con un consorcio microbiano.

3.2 Objetivo general

Evaluar el efecto de la adición de saponinas de *Quillaja saponaria* Molina sobre el crecimiento bacteriano en suelo contaminado con diésel y bioaumentado con un consorcio microbiano.

3.3 Objetivos específicos

1. Caracterizar el crecimiento de las cepas degradadoras de hidrocarburos *Pseudomonas* sp. 34, *Pseudomonas* sp. 36B, *Acinetobacter* sp. 53 y *Acinetobacter* sp. 64 en glucosa, piruvato, sacarosa y succinato como fuentes de carbono.
2. Evaluar el efecto de la adición de saponinas de *Quillaja saponaria* Molina sobre las bacterias degradadoras de hidrocarburos.
3. Determinar el efecto de la adición de saponinas de *Quillaja saponaria* Molina sobre el crecimiento de bacterias degradadoras de hidrocarburos en un suelo contaminado con diésel y bioaumentado con un consorcio microbiano.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo de esta tesis se realizó en el Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental de la Universidad Técnica Federico Santa María ubicada en la ciudad de Valparaíso.

4.1 Reactivos

Saponinas de corteza de quillay, piruvato sódico, succinato sódico dibásico hexahidratado, D-(+)-glucosa, se adquirieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EE. UU). Cicloheximida se adquirió en US-Biological (Marblehead, Massachusetts, EE. UU). Sulfato de sodio anhidro, sulfato de magnesio anhidro y sacarosa se obtuvieron en Merck (Darmstadt, Alemania).

4.2 Medios de cultivo

Se preparó medio de cultivo agar de soja tríptica (Tryptic Soy Agar, TSA) 40 g/L y caldo de soja tríptica (Tryptic Soy Broth, TSB) 30 g/L según condiciones del fabricante BD Difco™ (Sparks, Maryland, Estados Unidos). Además se preparó medio mineral caldo Bushnell–Haas (BHB) (Bushnell & Haas, 1941) compuesto por KH_2PO_4 1 g/L, K_2HPO_4 1 g/L, NH_4NO_3 1 g/L, MgSO_4 0,2 g/L, FeCl_3 0,05 g/L y CaCl_2 0,02 g/L. Se ajustó a pH 7. Para la preparación de placas de cultivo, se agregó al medio 15 g/L de agar. La preparación de las soluciones se realizó con agua MilliQ.

4.3 Cepas bacterianas

Acinetobacter sp. cepa 53 y *Acinetobacter* sp. cepa 64 fueron aisladas a partir de suelos con historial de contaminación por hidrocarburos desde la desembocadura del río Aconcagua (Coordenadas geográficas 32° 55' 4.40" latitud sur y 71° 30' 31.49" longitud oeste). *Pseudomonas* sp. cepa 34 y *Pseudomonas* sp. cepa 36B, son cepas nativas aisladas desde suelos

contaminados con hidrocarburos provenientes de la refinería de Concón (Coordenadas geográficas 32° 55' 21.20" latitud sur y 71° 30' 20.75" longitud oeste). Las cuatro cepas se seleccionaron para ser utilizadas como consorcio en estrategias de biorremediación, debido a su capacidad catabólica de hidrocarburos (Fuentes S., Águila P., comunicación personal)¹. Estas cepas son capaces de utilizar diferentes hidrocarburos como única fuente de carbono.

4.4 Crecimiento de las cepas degradadoras en distintas fuentes de carbono

Se evaluó el crecimiento de los aislados en medio BHB suplementado con distintas fuentes de carbono: glucosa (5 mM), piruvato (10 mM), sacarosa (2,5 mM) y succinato (10 mM). Se incubaron a 30 °C en agitación (180 rpm), tomando alícuotas a diferentes tiempos (200 µL). El crecimiento bacteriano se determinó por medición de la turbidez a una longitud de onda de 600 nm. Los cultivos se realizaron en triplicado.

4.5 Crecimiento de las cepas degradadoras en medio BHB concentrado con succinato

Con el objetivo de obtener mayor biomasa se probaron distintas concentraciones de medio mineral BHB y fuente de carbono. Las cepas bacterianas crecidas en medio BHB con succinato (8 mM), se inocularon en medio BHB en distintas concentraciones 1 ×, 5 × y 8 × suplementado con succinato (8 mM, 40 mM y 64 mM) como fuente de carbono. Los cultivos se incubaron a 30 °C con agitación constante a 180 rpm. Se tomaron alícuotas de los cultivos (200 µL) cada 2 h hasta las 18 h de cultivo. El crecimiento bacteriano se determinó por medición de la turbidez a una longitud de onda de 600 nm. Adicionalmente, se realizó un recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC mL⁻¹). Se tomaron alícuotas de 10 µL de cultivo y se realizaron diluciones seriadas en 90 µL de agua MilliQ estéril. En placas con medio TSA se sembraron 8 diluciones consecutivas, cada una en triplicado. Las placas se incubaron a 30 °C. Se realizó el recuento en las placas y se calculó las UFC mL⁻¹ (Madigan *et al.*, 2003):

$$UFC/mL = \bar{X} \cdot Factor\ dilución \cdot Factor\ inóculo \quad (\text{Ecuación 1})$$

donde \bar{X} es el promedio de los recuentos en placas.

Se calculó la velocidad específica de crecimiento bacteriano (μ) en la fase exponencial, y el tiempo de duplicación (t_d), con las siguientes ecuaciones (Madigan *et al.*, 2003):

$$\mu = \frac{\Delta(\ln(\bar{X}))}{\Delta t} \quad (\text{Ecuación 2})$$

$$t_d = \frac{\ln(2)}{\mu} \quad (\text{Ecuación 3})$$

4.6 Crecimiento de las cepas degradadoras en suelo con distintas concentraciones de diésel

Se determinó la tolerancia de las cepas a hidrocarburos, mediante ensayos de crecimiento en suelo con 0, 5, 10 y 15 % p/p de diésel. Cada concentración se evaluó en 20 g de suelo estéril seco. Se inocularon 10^8 UFC mL⁻¹ de cada cepa bacteriana. El ensayo fue realizado a temperatura ambiente durante 13 días. Se analizaron 4 tiempos durante el periodo del ensayo: 0, 2, 6 y 13 días. El crecimiento bacteriano se determinó mediante recuento de unidades formadoras de colonias (UFC mL⁻¹) por g de suelo seco. Para determinar la humedad de las muestras se utilizó una balanza analítica con detector de humedad por desecación por infrarrojo (Balanza Sartorius). Para realizar los recuentos bacterianos se empleó el cultivo en placas. Se tomó 1 g de suelo y se resuspendió en 10 mL de agua MilliQ estéril. Se llevó a agitación vigorosa durante 30 min. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas de la suspensión tomando 10 μ L de solución en 90 μ L de agua MilliQ estéril. En placas con medio TSA se realizaron siembras en triplicado de 8 diluciones consecutivas, para luego incubar a 30 °C.

4.7 Actividad emulsificante de saponinas de quillay

La actividad emulsificante se definió en base al porcentaje de emulsificación (% E) en presencia de distintas concentraciones de saponinas de quillay. Se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% E = \frac{\text{Altura de capa emulsificada (mm)} \times 100}{\text{Altura solución total (mm)}} \quad (\text{Ecuación 4})$$

4.7.1 Emulsificación de vaselina líquida. Se determinó la capacidad de emulsificación adicionando 0,5 mL de vaselina líquida a igual volumen de una solución de saponinas. Se evaluaron 24 concentraciones (Tabla 2). Se homogeneizó mediante agitación vigorosa con vortex durante 2 min. Una vez estabilizada la capa emulsificada se midió la altura. Se dejó reposar durante 24 h, para luego medir nuevamente la altura de la capa emulsificada.

Tabla 2. Concentración de saponinas de *Quillaja saponaria* Molina, utilizadas en la determinación del porcentaje de emulsificación (% E)

Concentración de saponinas de <i>Quillaja saponaria</i> (mg mL⁻¹)	
10 ×	1 ×
500,00	50,00
250,00	25,00
125,00	12,50
62,50	6,25
31,30	3,13
15,60	1,56
7,80	0,78
3,90	0,39
2,00	0,20
1,00	0,10
0,5	0,05
0,24	0,024

4.7.2 Emulsificación de diésel. Se determinó adicionando 2 mL de diésel 100 % o 3 % a igual volumen de solución de saponinas de quillay 1,56 mg mL⁻¹. Se homogeneizó mediante agitación vigorosa con vortex durante 2 min y se midió la altura de la capa emulsificada estable. Se dejó en reposo y se midió nuevamente a las 24 h.

4.8 Crecimiento de las cepas degradadoras de hidrocarburos en saponinas de quillay como fuente de carbono

Para evaluar el efecto de las saponinas sobre el crecimiento bacteriano, se realizó una curva de crecimiento para cada cepa en medio BHB con saponinas como fuente de carbono en triplicado. El inóculo correspondió al 1 % del volumen total a una turbidez de 0,6 a 600 nm. El preinóculo fue crecido en medio mineral BHB con succinato como fuente de carbono. Las células se colectaron por centrifugación 15 min a 4863 g, con lavados entre cada ciclo. Se incluyeron los controles saponinas y succinato, sin fuente de carbono y con succinato como única fuente de carbono. El crecimiento bacteriano se determinó por medición de la turbidez a una longitud de onda de 600 nm. Adicionalmente, se realizó un recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC mL⁻¹). Se tomaron alícuotas de 10 µL de cultivo y se realizaron diluciones seriadas en 90 µL de agua MilliQ estéril. En placas con medio TSA se sembraron en triplicado 8 diluciones consecutivas. Las placas se incubaron a 30 °C.

4.9 Efecto de saponinas de quillay sobre el crecimiento de las cepas degradadoras de hidrocarburos

Se analizaron 12 concentraciones de saponinas de quillay (Tabla 2). En una microplaca se añadieron 20 µL de solución de saponinas de quillay 10 × con el fin de obtener la concentración final al agregar 180 µL de cultivo bacteriano con 5,55 × 10⁵ UFC mL⁻¹ por pocillo (Volumen final de 200 µL). Cada condición fue realizada en triplicado. Las microplacas se incubaron a 30 °C en agitación durante 36 h. El crecimiento bacteriano se determinó mediante la medición de la turbidez a una longitud de onda de 600 nm cada 12 h.

4.10 Estudios de microcosmos

4.10.1 Diseño experimental. Se evaluó la degradación de hidrocarburos por el consorcio conformado por las cuatro cepas bacterianas en microcosmos de suelo, en presencia y ausencia de saponinas de quillay 0,165 % p/p (1,56 mg mL⁻¹, 0,5 g/microcosmo). Cada microcosmos

consistió en 300 g de suelo, el que fue dopado con diésel 3 % p/p. El suelo utilizado para la elaboración de los microcosmos (estrato superficial 1-10 cm de profundidad) sin historial de contaminación por hidrocarburos fue obtenido desde el sector Laguna Verde en la Región de Valparaíso (33°5' de latitud sur y 71°38' de longitud oeste) (Figura 6). Los tratamientos estudiados se presentan en la Tabla 3. Se establecieron cinco sets experimentales en frascos de vidrio (Figura 7).

Tabla 3. Tratamientos estudiados en ensayos de microcosmos

Microcosmos	Tratamiento	
	Bioaumentación Consortio	Bioestimulación Saponinas de quillay
C _A -1, C _A -2, C _A -3	-	-
C ₁ -1, C ₁ -2, C ₁ -3	-	-
S ₁ -1, S ₁ -2, S ₁ -3	-	+
S ₂ -1, S ₂ -2, S ₂ -3	+	+
E ₁ -1, E ₁ -2, E ₁ -3	+	-

C_A= Control abiótico, C₁=Set sin bioaumentar y sin bioestimular, S₁= Set sin bioaumentar y bioestimulado con saponinas, S₂= Set bioaumentado con consorcio microbiano y bioestimulado con saponinas, E₁= Set bioaumentado con consorcio microbiano. Los números corresponden a cada réplica.



Figura 6. Sector Laguna Verde, Región de Valparaíso. Coordenadas geográficas: 33°5' de latitud sur y 71°38' de longitud oeste.

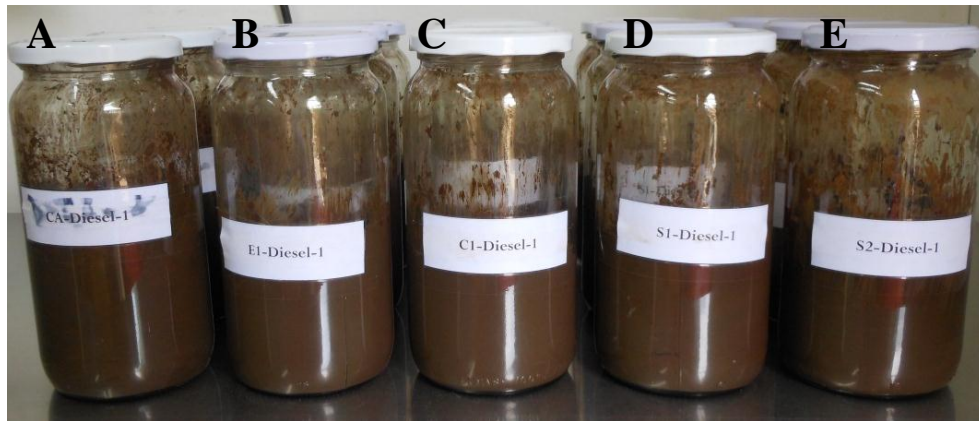


Figura 7. Microcosmos de suelo. A) Control abiótico, B) Set bioaumentado con consorcio microbiano conformado por las cepas *Pseudomonas* sp. 34, *Pseudomonas* sp. 36B, *Acinetobacter* sp. 53 y *Acinetobacter* sp. 64, C) Set sin bioaumentar, D) Set sin bioaumentar y bioestimulado con saponinas 0,165 % p/p, E) Set bioaumentado con consorcio microbiano y bioestimulado con saponinas 0,165 % p/p. Cada set comprende tres réplicas.

4.10.2 Preparación microcosmos. El suelo fue secado a 25 °C durante 1 día, para luego tamizarlo a 4,75 y 2 mm, respectivamente. Una vez tamizado fue secado nuevamente durante 1 día a 25 °C. Se determinó la humedad del suelo (10,06 %) mediante una balanza analítica con detector de humedad por desecación por infrarrojo (Balanza Sartorius). Los microcosmos fueron preparados con 300 g de suelo cada uno, se utilizaron frascos de vidrio de 1 litro con tapa metálica. Posteriormente los microcosmos se contaminaron con diésel a una concentración final de 3 % p/p.

4.10.3 Preparación de inóculos, inoculación y adición de saponinas de quillay. Las cepas se crecieron en medio BHB 5 × con succinato 40 mM como fuente de carbono. El crecimiento de *Pseudomonas* sp. cepa 34 y 36B se desfasó 1 hora del crecimiento bacteriano de *Acinetobacter* sp. cepa 53 y cepa 64. Los cultivos se incubaron a 30 °C por un periodo de 10 y 9 h, respectivamente. Las células se colectaron por centrifugación a 4863 g por 15 min y se lavaron 3 veces con agua MilliQ estéril, centrifugando entre cada lavado. Finalmente se resuspendieron las células en un volumen final de 105 mL de agua MilliQ estéril. La suspensión bacteriana fue adicionada al suelo en una concentración aproximada de $1,07 \times 10^8$ UFC g⁻¹ de suelo seco. La inoculación se realizó nuevamente a los 21 días. Adicionalmente se preparó una solución de

saponinas de quillay 250 mg mL^{-1} en agua destilada estéril y se añadieron 2 mL de solución a los microcosmos correspondientes, equivalente a $1,56 \text{ mg mL}^{-1}$ ($0,5 \text{ g/microcosmo}$). Los microcosmos controles no bioaumentados o bioestimulados, se completaron con un volumen equivalente de agua MilliQ. Para los controles abióticos, el suelo fue autoclavado cinco veces a $1,21 \text{ atmósferas}$ por 30 min, dejándolo secar y enfriar antes de la esterilización siguiente, para eliminar cualquier espora resistente al proceso. La preparación de estos microcosmos se realizó en ambiente estéril. Una vez preparados los microcosmos se homogenizaron y humedecieron (19-24 % humedad), para dar paso a la toma de muestras.

4.10.4 Monitoreo y toma de muestras. Los microcosmos se monitorearon periódicamente cada 7 días, determinando humedad y temperatura. Se tomaron muestras cada 7 días durante los 42 días del ensayo ($t_0, t_1, t_2, t_3, t_4, t_5$ y t_6). Las muestras se tomaron utilizando espátula de acero, se guardaron en sobres de papel aluminio y se almacenaron a -30 °C hasta su posterior análisis. La humedad de las muestras se determinó con una balanza analítica con detector de humedad por desecación por infrarrojo (Miralles, 2007).

4.10.5 Recuento de heterótrofos cultivables totales y degradadores de hidrocarburos en estudios de microcosmos. En cada muestreo se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias de heterótrofos cultivables totales y de degradadores de hidrocarburos por gramo de suelo seco (Ponce, 2010). Para determinar las UFC g^{-1} de suelo seco, se extrajeron 0,5 g de muestra y se resuspendieron en 4,5 mL de agua MilliQ estéril. Las muestras en suspensión se llevaron a agitación vigorosa durante 30 min. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas de las suspensiones tomando $10 \mu\text{L}$ de solución en $90 \mu\text{L}$ de agua MilliQ estéril. El recuento de heterótrofos cultivables totales se realizó en placas con medio de cultivo TSA, mientras que el recuento de degradadores de hidrocarburos se realizó en placas de medio agar BHB con un disco de papel filtro en la tapa embebido con diésel. Se sembraron en triplicado 8 diluciones consecutivas. Las placas se incubaron a 30 °C y se realizaron recuentos de UFC a las 12 y 48 h.

5. RESULTADOS

Este trabajo de investigación se centró en dos líneas principales para su desarrollo. En primer lugar se evaluó el crecimiento de las cuatro cepas seleccionadas en distintas fuentes de carbono y el efecto de las saponinas de quillay sobre el crecimiento y viabilidad de las cepas. En una segunda etapa, se diseñó y evaluó la estrategia de biorremediación de hidrocarburos que contempla bioaumentación y bioestimulación con saponinas de quillay en microcosmos de suelo.

5.1 Crecimiento de las cepas degradadoras de hidrocarburos en distintas fuentes de carbono

Con el fin de evaluar la fuente de carbono apropiada que permita obtener una mayor biomasa de los cultivos bacterianos, se realizaron crecimientos de las cepas degradadoras de hidrocarburos en glucosa (5 mM), piruvato (10 mM), sacarosa (2,5 mM) y succinato (10 mM) (Figura 8).

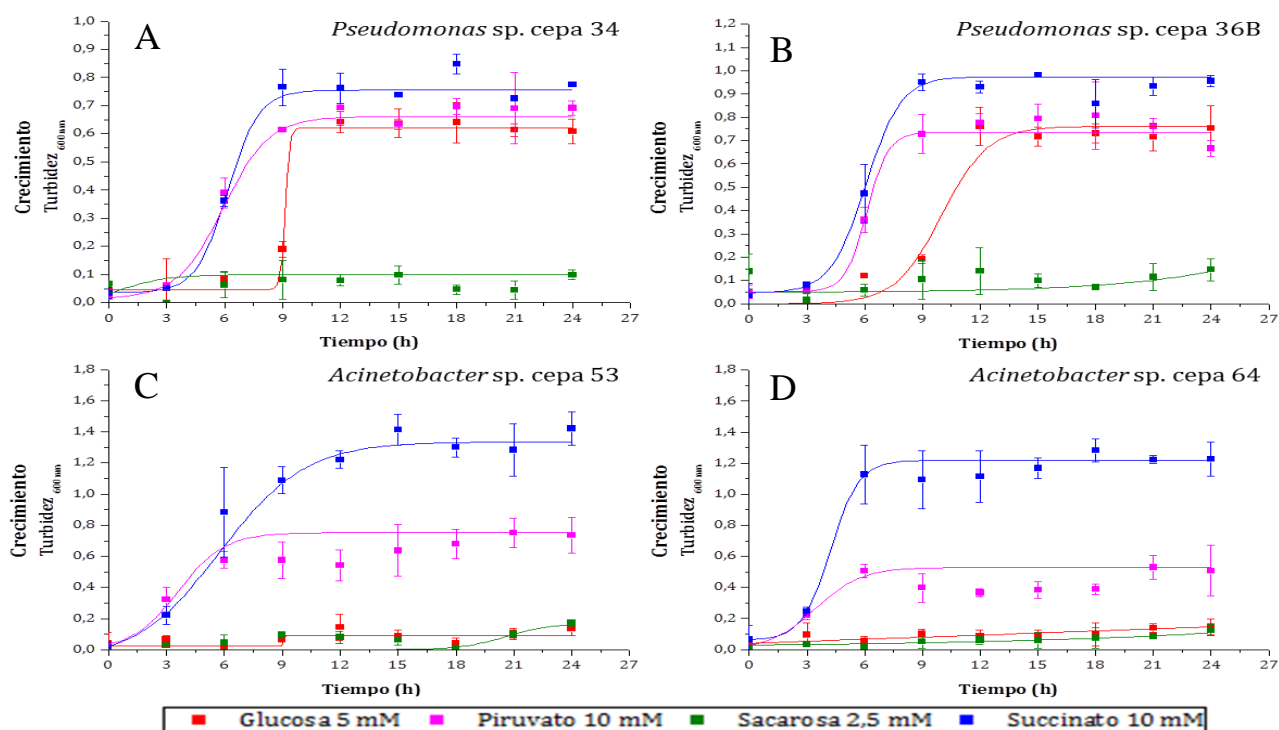


Figura 8. Crecimiento de las cepas degradadoras de hidrocarburos en distintas fuentes de carbono. Cultivos en medio BHB con glucosa (5mM), piruvato (10 mM), sacarosa (2,5 mM) y succinato (10 mM) como fuente de carbono. Los valores que se presentan corresponden al promedio de tres réplicas independientes \pm desviación estándar.

Se observó crecimiento de las cepas *Pseudomonas* sp. 34 y *Pseudomonas* sp. 36B en succinato, piruvato y glucosa. Las cepas *Acinetobacter* sp. 53 y *Acinetobacter* sp. 64 presentaron crecimiento en succinato y piruvato como fuente de carbono. Las cepas *Pseudomonas* sp. 34, *Pseudomonas* sp. 36B, *Acinetobacter* sp. 53 y *Acinetobacter* sp. 64 alcanzaron los mayores crecimientos en presencia de succinato, alcanzando la fase estacionaria a las 9 h de cultivo. Se observó una turbidez a 600 nm de 0,75 en *Pseudomonas* sp. cepa 34, en tanto *Pseudomonas* sp. cepa 36B llegó a una turbidez de 1. *Acinetobacter* sp. cepa 53 alcanzó una turbidez a 600 nm de 1,3 y *Acinetobacter* sp. cepa 64 de 1,25 a las 9 h de cultivo. En base a los resultados obtenidos y con el objetivo de conseguir una fuente de carbono en común para el crecimiento de las cuatro cepas, se escogió succinato como fuente de carbono para los ensayos posteriores.

5.2 Crecimiento de las cepas degradadoras de hidrocarburos en medio mineral Bushnell-Haas concentrado con succinato

Con el fin de aumentar la biomasa de los cultivos, se realizaron curvas de crecimiento en medio mineral BHB (Bushnell-Haas) utilizando distintas concentraciones con succinato como fuente de carbono (Figura 9). En *Pseudomonas* sp. cepa 36B, *Acinetobacter* sp. cepa 53 y *Acinetobacter* sp. cepa 64 se observó mayor crecimiento en la condición con medio BHB concentrado 5 × con succinato 40 mM. En esta condición se alcanzó en fase estacionaria una turbidez de 3,0 a 600 nm en las cepas *Pseudomonas* sp. 36B, *Acinetobacter* sp. 53 y *Acinetobacter* sp. 64 a las 18 h de cultivo. Por otra parte, *Pseudomonas* sp. cepa 34 alcanzó una turbidez de 2,0 a 600 nm a las 11 h de cultivo. Los crecimientos en medio BHB 8 × con succinato 64 mM alcanzaron la fase estacionaria a las 12 h de cultivo en las cepas del género *Acinetobacter* con una turbidez de 2,0 a 600 nm. *Pseudomonas* sp. cepa 36B alcanzó la fase estacionaria a las 16 h con una turbidez de 2,0 a 600 nm. *Pseudomonas* sp. cepa 34 presentó un crecimiento mayor en la condición con medio BHB concentrado 8 × con succinato 64 mM alcanzando una turbidez de 3,5 a 600 nm luego de 18 h de cultivo. Los crecimientos en la condición con BHB 1 × y succinato 10 mM mostraron que a las 8 h se alcanzó una turbidez de 1,0 a 600 nm para las cepas del género *Acinetobacter* y una turbidez de 0,6 a 600 nm para las cepas del género *Pseudomonas*.

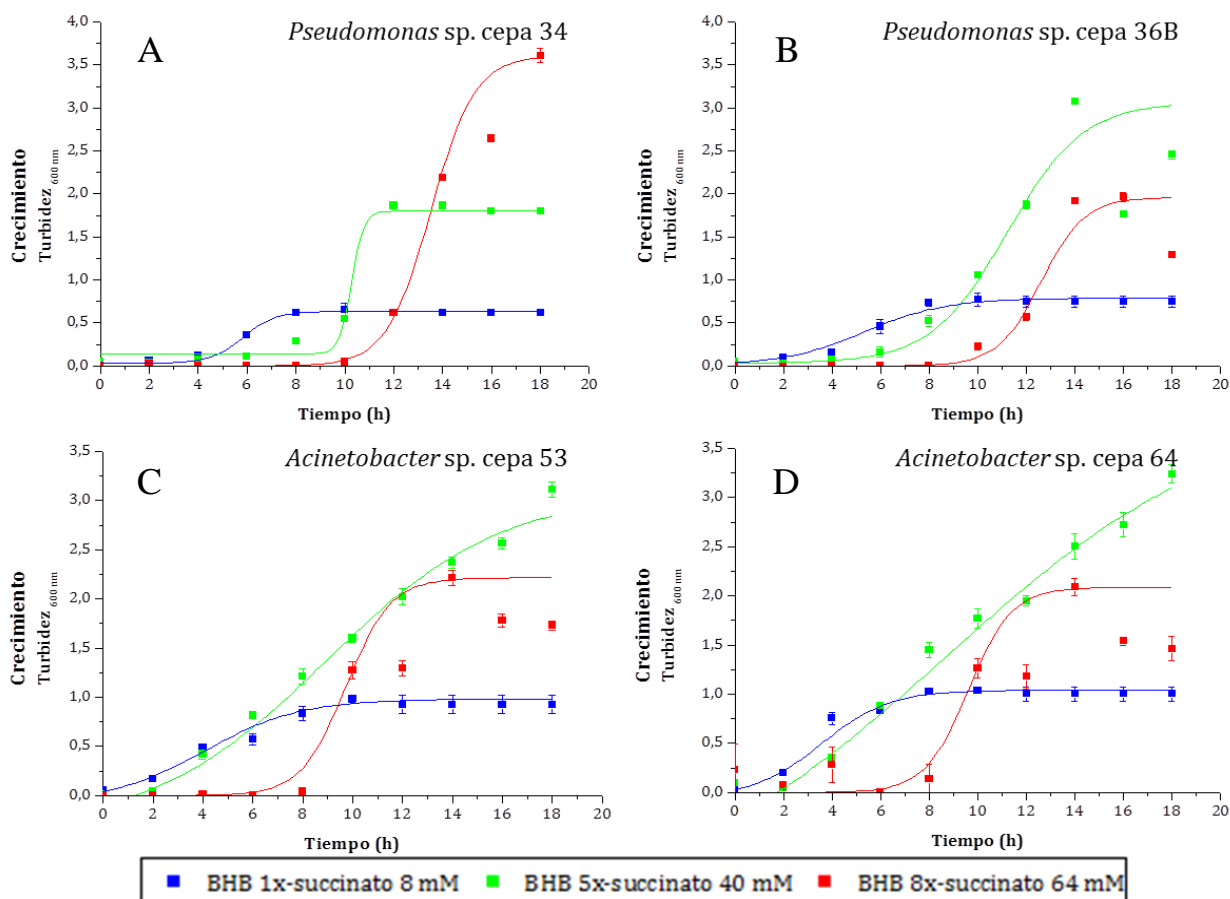


Figura 9. Crecimiento de las cepas degradadoras de hidrocarburos en medio mineral concentrado con succinato. Cultivos en medio BHB concentrado con succinato 40 mM como fuente de carbono. Los valores presentados corresponden al promedio de tres réplicas independientes \pm desviación estándar.

En base a los resultados obtenidos se escogió la condición BHB 5 \times con succinato 40 mM para realizar los pre-cultivos de los ensayos posteriores. Para esta condición se realizó una curva de crecimiento en base a las unidades formadoras de colonias de las cepas *Pseudomonas sp. 34*, *Pseudomonas sp. 36B*, *Acinetobacter sp. 53* y *Acinetobacter sp. 64* (Figura 10). Además se determinó el tiempo de duplicación (t_d) y la velocidad de crecimiento (μ) de cada cepa. En las cepas del género *Pseudomonas* se observó una fase de latencia de 6 h, los cultivos alcanzan la fase estacionaria a las 9 h con 3×10^9 UFC mL⁻¹. *Pseudomonas sp. cepa 34* posee un tiempo de duplicación de 48,6 minutos y una velocidad de crecimiento de $0,86$ h⁻¹. Por otro lado, las cepas del género *Acinetobacter* tienen una fase de latencia menor de 3 h, la fase estacionaria se alcanza a las 8 h llegando a 5×10^9 UFC mL⁻¹ para *Acinetobacter sp. cepa 53* y a 3×10^9 UFC mL⁻¹ para

Acinetobacter sp. cepa 64. *Acinetobacter* sp. cepa 53 presentó un tiempo de duplicación de 33,6 minutos y una velocidad de crecimiento de $1,24 \text{ h}^{-1}$. *Acinetobacter* sp. cepa 64 por su parte presentó un tiempo de duplicación de 30,6 minutos y una velocidad de crecimiento de $1,36 \text{ h}^{-1}$.

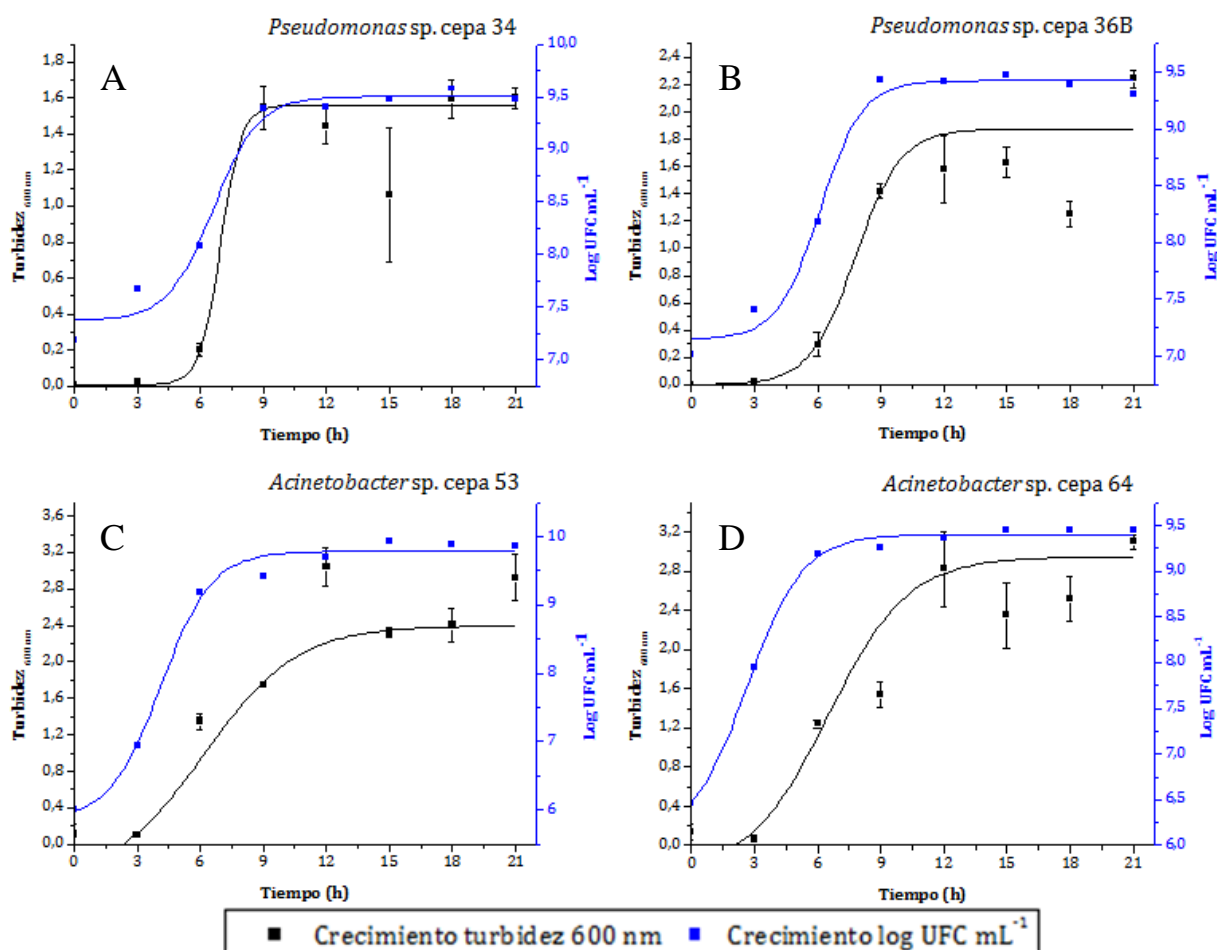


Figura 10. Crecimiento de las cepas degradadoras de hidrocarburos en medio mineral BHB 5× con succinato 40 mM. Los valores presentados corresponden al promedio de tres réplicas independientes \pm desviación estándar. Las barras representan la desviación estándar. Se presentan en negro los valores de la turbidez medida a 600 nm y en azul los valores correspondientes al recuento bacteriano (logaritmo de UFC mL⁻¹).

5.3 Crecimiento de las cepas degradadoras de hidrocarburos en suelo con distintas concentraciones de diésel

Se estudió la tolerancia a diésel de las cepas *Pseudomonas* sp. cepa 34, *Pseudomonas* sp. cepa 36B, *Acinetobacter* sp. cepa 53 y *Acinetobacter* sp. cepa 64 en suelos contaminados con diésel en cuatro concentraciones (Figura 11). Se observó crecimiento de las cuatro cepas en presencia de diésel hasta en un 15 % p/p. La viabilidad celular de las cepas no se ve afectada por la presencia de diésel llegando a 7×10^{10} UFC mL⁻¹ en *Pseudomonas* sp. cepa 34, 9×10^{10} UFC mL⁻¹ en *Pseudomonas* sp. cepa 36B, 2×10^{11} UFC mL⁻¹ en *Acinetobacter* sp. 53 y 3×10^{11} UFC mL⁻¹ en *Acinetobacter* sp. cepa 64 a los 13 días de incubación.

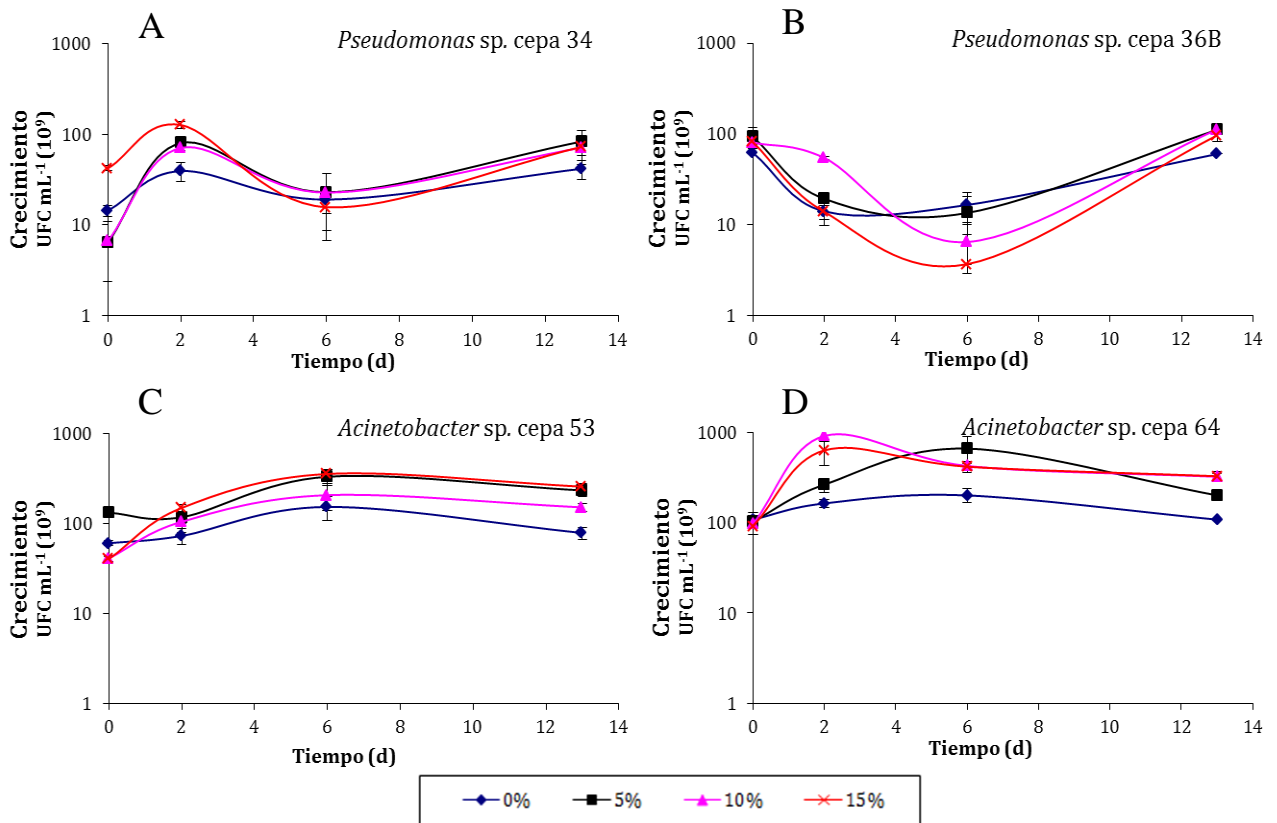


Figura 11. Crecimiento de las cepas degradadoras de hidrocarburos en suelo con distintas concentraciones de diésel. Los valores presentados corresponden al promedio de tres réplicas independientes \pm desviación estándar. Se ilustra el crecimiento bacteriano en base a las unidades formadoras de colonias por g de suelo seco.

5.4 Actividad emulsificante de saponinas de quillay

La actividad emulsificante es una de las principales propiedades de un potencial biosurfactante (Ghagi *et al.*, 2011).

5.4.1 Emulsificación de vaselina líquida. Se evaluó el porcentaje de emulsificación de 24 concentraciones de saponinas frente a vaselina líquida como agente insoluble (Figura 12). Se observó sobre un 60 % de emulsificación en las concentraciones medias (0,39 - 62,5 mg mL⁻¹). En las condiciones de saponinas más concentradas (500, 250 y 125 mg mL⁻¹) no se observó emulsificación. Por otra parte, en las condiciones de saponinas menos concentradas (0,24, 0,19, 0,1, 0,05 y 0,024 mg mL⁻¹) no se observó emulsificación. En la concentración 1,56 mg mL⁻¹ se observó la mayor emulsificación (72,2 %). En base a los resultados obtenidos se escogió la concentración 1,56 mg mL⁻¹ para los ensayos posteriores.

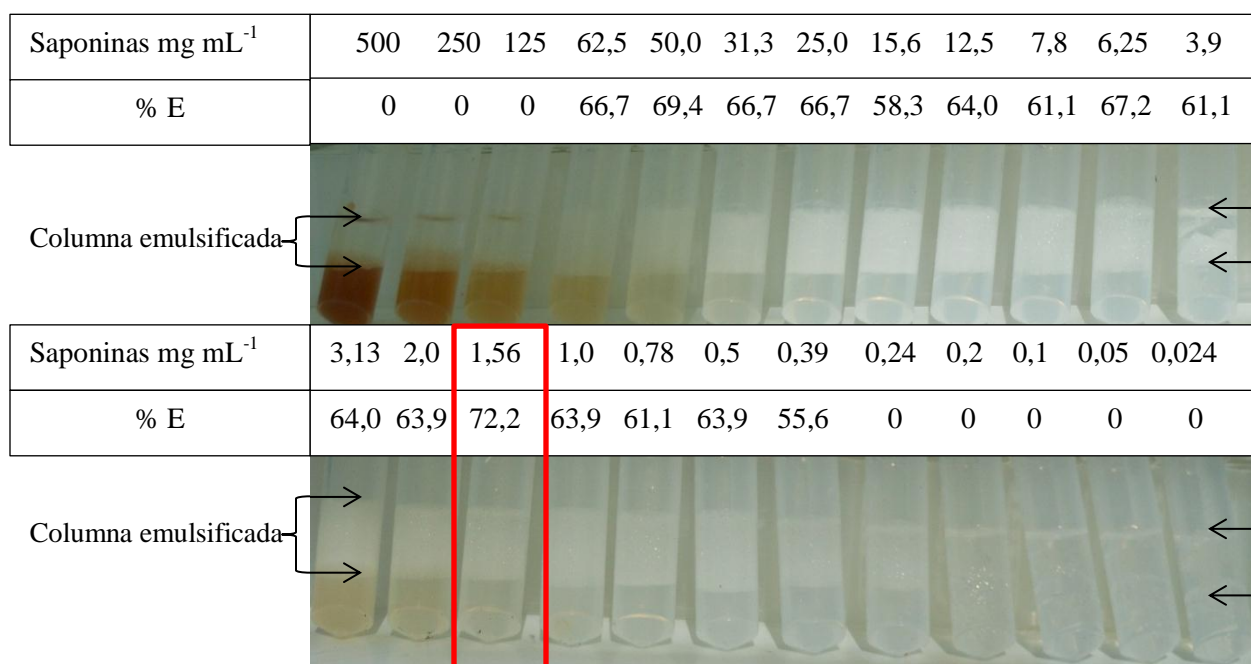


Figura 12. Emulsificación de vaselina líquida por las saponinas. En la parte superior se presentan las concentraciones de saponinas utilizadas y el porcentaje de emulsificación (% E) generado. Con flechas negras se presenta la columna emulsificada para cada concentración de saponinas. En rojo se muestra la concentración de saponinas con mayor emulsificación. El ensayo fue realizado en tres réplicas independientes para cada condición.

5.4.2 Emulsificación de diésel. Se evaluó la emulsificación con saponinas de quillay $1,56 \text{ mg mL}^{-1}$ de diésel como agente insoluble (Figura 13). Se utilizó vaselina líquida como control. El ensayo se realizó en diésel 100 % y diésel 3 %. Se observó 70 % de emulsificación en todas las condiciones una vez estabilizada la emulsión. A las 24 h de iniciado el ensayo se observó que las emulsiones de vaselina, diésel 100 % y diésel 3 % continuaban estables manteniendo un 70 % de emulsificación (Figura 13b).

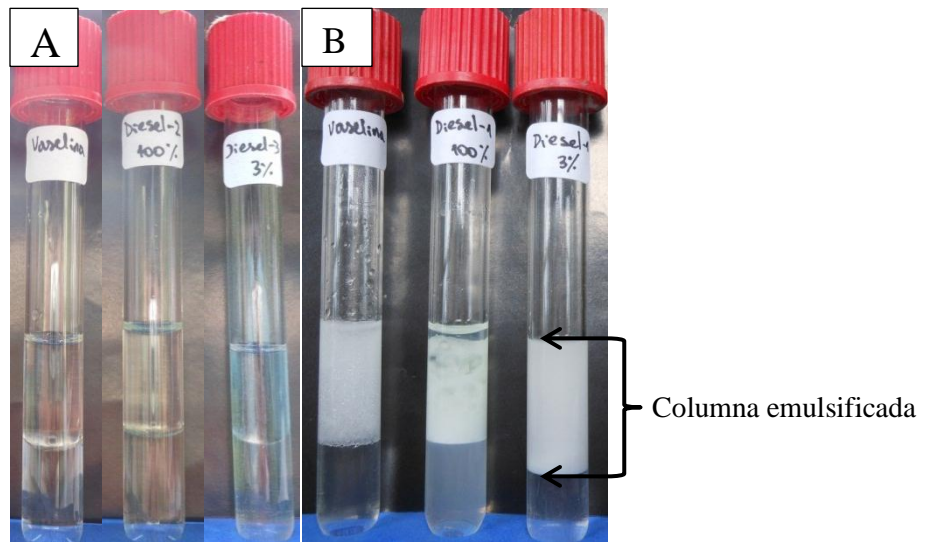


Figura 13. Emulsificación de diésel por las saponinas. De izquierda a derecha: vaselina, diésel 100 % y diésel 3 %. A) Saponinas $1,56 \text{ mg mL}^{-1}$ y agente insoluble sin agitar. B) Columna emulsificada a las 24 h. Flechas negras muestran columna emulsificada. Se realizaron tres réplicas independientes.

5.5 Crecimiento de las cepas degradadoras en saponinas de quillay como fuente de carbono

Se realizaron curvas de crecimiento en presencia de saponinas $1,56 \text{ mg mL}^{-1}$ como única fuente de carbono con el fin de determinar el efecto de las saponinas de quillay sobre el crecimiento de las cepas *Pseudomonas* sp. 34, *Pseudomonas* sp. 36B, *Acinetobacter* sp. 53 y *Acinetobacter* sp. 64 (Figura 14). Se utilizó succinato como control positivo y sin fuente de carbono como control negativo de crecimiento. Por otra parte, se evaluó el crecimiento de las cepas en presencia de saponinas y succinato como fuentes de carbono combinadas. Se observó que al suplementar el medio con saponinas como única fuente de carbono no se presentó crecimiento de las cuatro cepas. Se determinó una fase de latencia de 3 h para las condiciones saponinas-succinato y succinato como única fuente de carbono en las cepas *Pseudomonas* sp. 34

y 36B. Ambas cepas del género *Pseudomonas* alcanzaron la fase estacionaria a las 8 h de cultivo en presencia de saponinas y succinato como fuente de carbono. Las cepas *Acinetobacter* sp. 53 y 64 presentaron una fase de latencia menor de 2 h. La fase estacionaria para ambas cepas se alcanzó a las 8 h de cultivo en presencia de saponinas y succinato. Se observó que en presencia de saponinas las cuatro cepas aumentan su crecimiento en succinato como fuente de carbono. *Pseudomonas* sp. cepa 34 alcanzó en fase estacionaria una turbidez de 0,5 a 600 nm, en tanto *Pseudomonas* sp. cepa 36B alcanzó una turbidez de 0,6 a 600 nm. Ambas cepas del género *Acinetobacter* alcanzaron en fase estacionaria una turbidez de 0,7 a 600 nm.

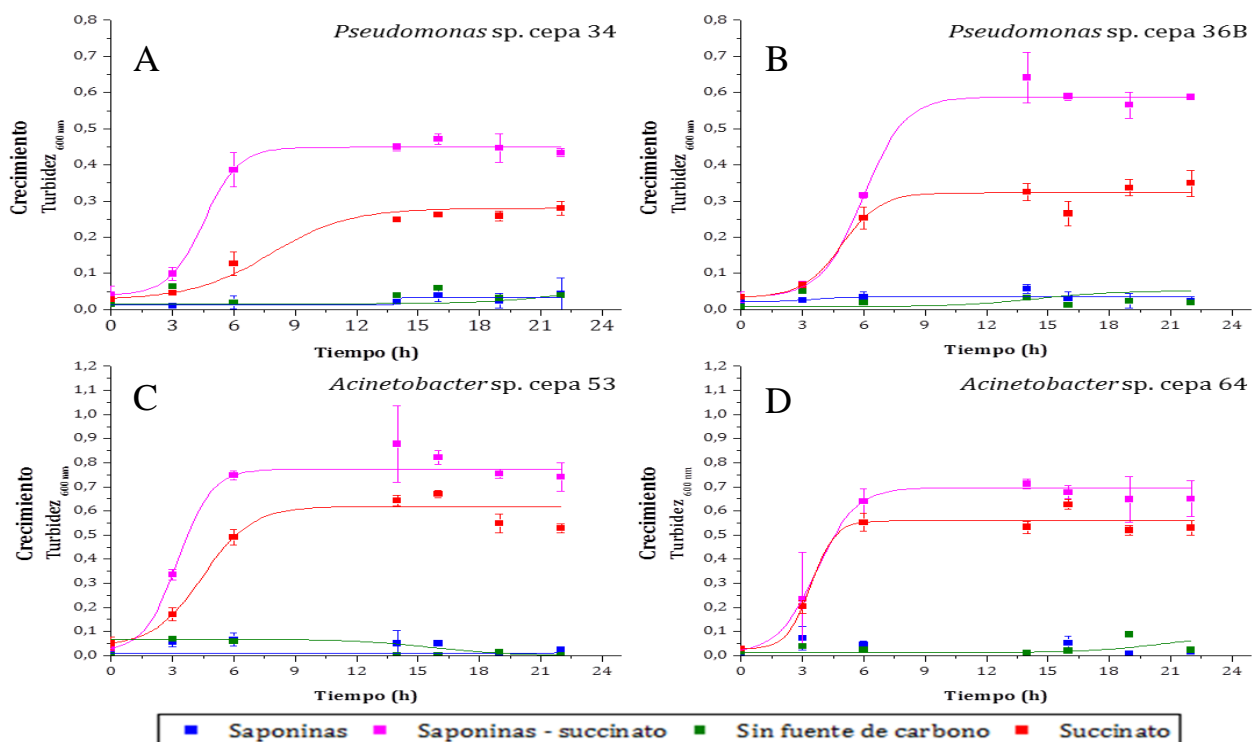


Figura 14. Crecimiento de las cepas degradadoras de hidrocarburos en saponinas de quillay. Se presentan los crecimientos en saponinas, saponinas-succinato, succinato y sin fuente de carbono. Los valores corresponden al promedio de tres réplicas independientes. Las barras representan la desviación estándar.

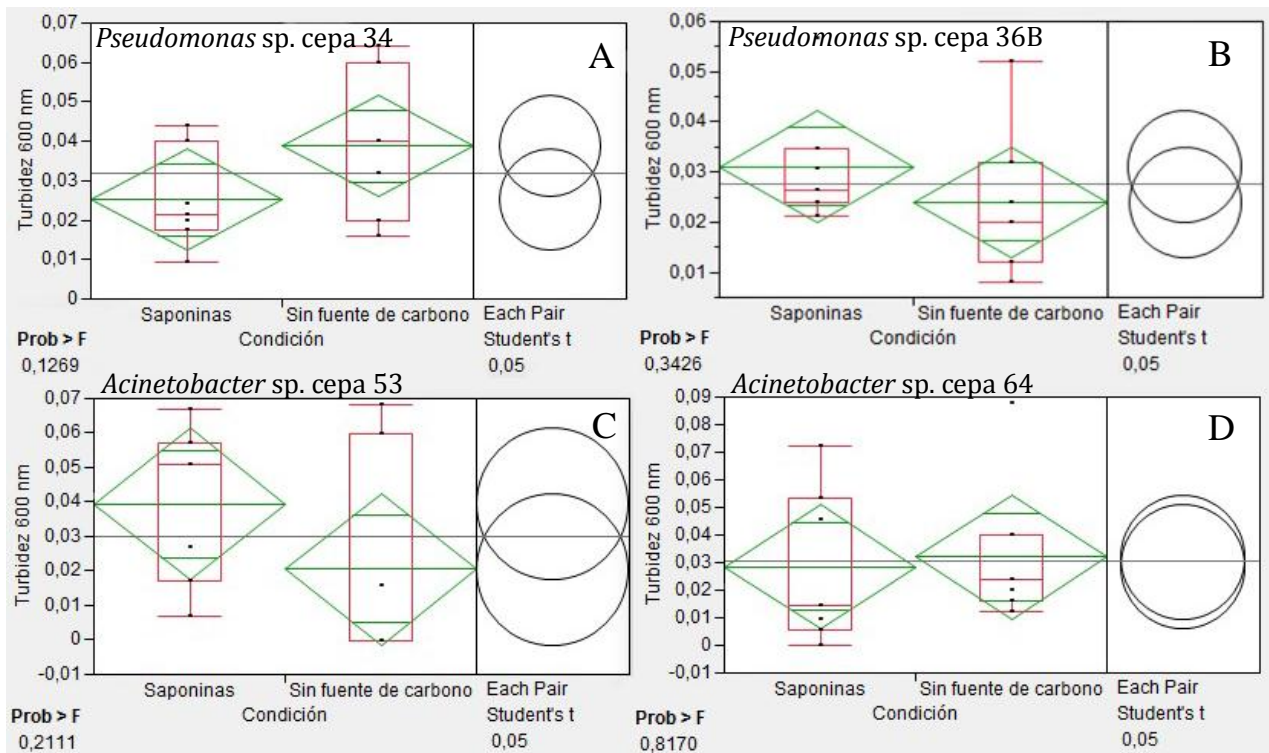


Figura 15. Análisis estadístico comparativo entre el crecimiento con saponinas y sin fuente de carbono. Análisis t-Student en programa estadístico JMP 8. A) *Pseudomonas* sp. cepa 34. B) *Pseudomonas* sp. cepa 36B. C) *Acinetobacter* sp. cepa 53. D) *Acinetobacter* sp. cepa 64. Se presenta el valor $\text{Prob} > 0,05$. No hay diferencias estadísticamente significativas entre el crecimiento con saponinas como fuente de carbono y el crecimiento sin fuente de carbono.

Se evaluó la viabilidad celular de las cepas *Pseudomonas* sp. 34, *Pseudomonas* sp. 36B, *Acinetobacter* sp. 53 y *Acinetobacter* sp. 64 en presencia de saponinas (Figura 16). Se observó que en presencia de saponinas no hay crecimiento significativo a las 42 h de cultivo en las cuatro cepas. El crecimiento en presencia de saponinas-succinato en las cuatro cepas se ve aumentado en relación al control con succinato. *Pseudomonas* sp. cepa 34 alcanzó $2,8 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ en saponinas-succinato y 2×10^8 UFC mL⁻¹ en succinato a las 42 h. *Pseudomonas* sp. cepa 36B presentó $6,2 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ en saponinas-succinato y $4,2 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ en succinato como única fuente de carbono a las 42 h de cultivo. *Acinetobacter* sp. cepa 53 alcanzó $6,8 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ a las 42 h en saponinas-succinato y $4,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ en succinato. *Acinetobacter* sp. cepa 64 presentó mayor crecimiento en saponinas-succinato alcanzando $1,15 \times 10^9$ UFC mL⁻¹ y en succinato 4×10^8 UFC mL⁻¹ a las 42 h de cultivo.

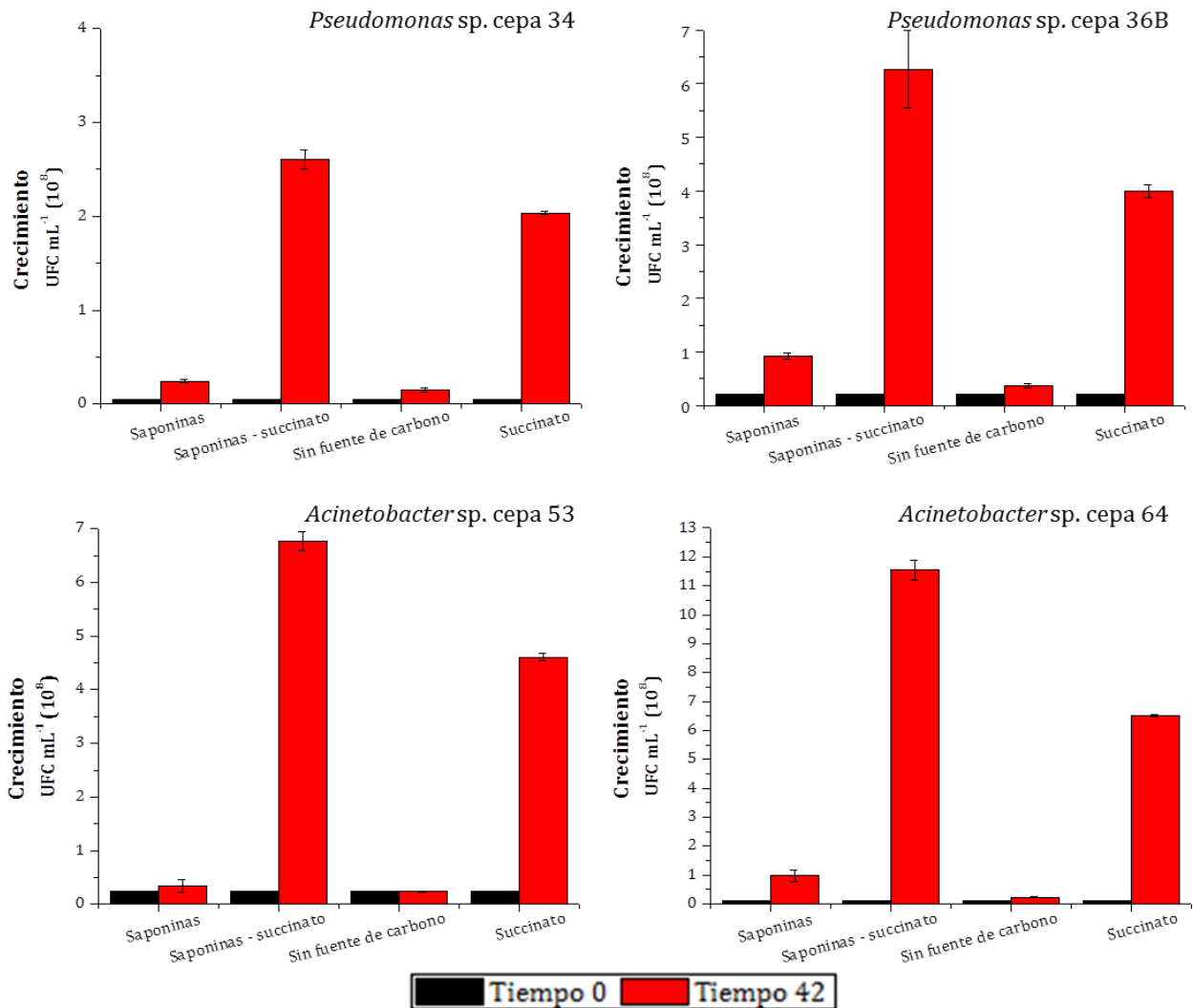


Figura 16. Crecimiento de las cepas degradadoras de hidrocarburos en presencia de saponinas de quillay. Se presentan en negro los crecimientos celulares en UFC mL⁻¹ a las 0 h de cultivo y en rojo a las 42 h de cultivo. Los valores corresponden al promedio de tres réplicas independientes. Las barras representan la desviación estándar.

5.6 Efecto de saponinas de quillay sobre el crecimiento de las cepas degradadoras

Con el fin de estudiar el posible efecto inhibitorio de las saponinas sobre el crecimiento bacteriano, se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de saponinas de quillay sobre los crecimientos de las cepas *Pseudomonas* sp. 34, *Pseudomonas* sp. 36B, *Acinetobacter* sp. 53 y *Acinetobacter* sp. 64 (Figura 17). Se observó que las saponinas de quillay en las concentraciones estudiadas no poseen un efecto inhibitorio sobre las cepas. Se presentó un aumento del

crecimiento de cada cepa que se correlaciona con la concentración de saponinas. Las cepas del género *Acinetobacter* muestran mayor crecimiento que las cepas del género *Pseudomonas*, alcanzando una turbidez de 1,6 a 600 nm en la concentración 50 mg mL⁻¹. Se determinó que una concentración de saponinas de 50 mg mL⁻¹ no inhibe las cuatro cepas estudiadas.

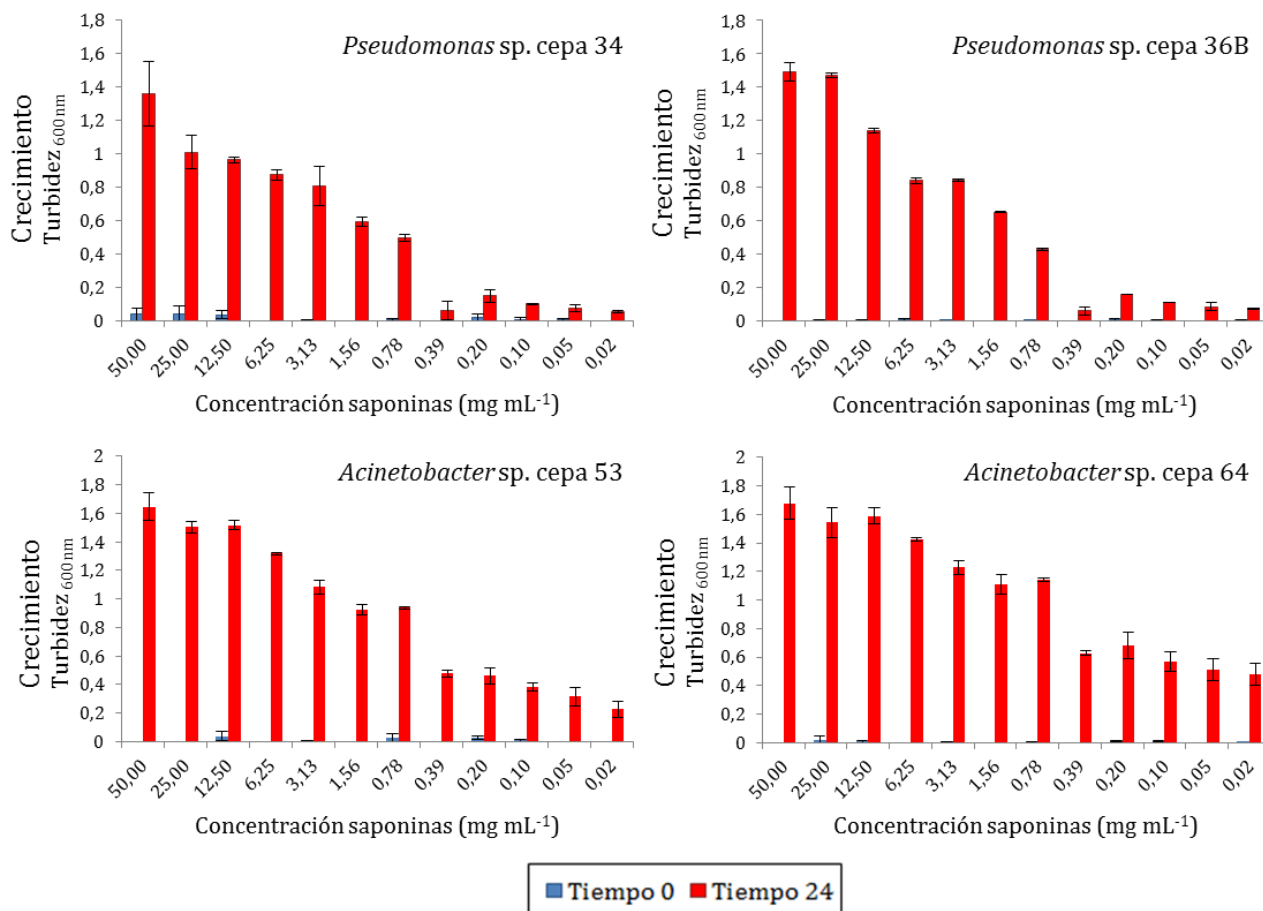


Figura 17. Efecto de saponinas sobre el crecimiento de las cepas degradadoras de hidrocarburos. Se presenta en azul la turbidez a 600 nm a las 0 h de cultivo y en rojo a las 24 h de cultivo. Los valores que se presentan corresponden al promedio de tres réplicas independientes \pm desviación estándar.

5.7 Recuento de heterótrofos cultivables totales y degradadores de hidrocarburos en estudios de microcosmos

Con el objetivo de evaluar el crecimiento bacteriano en suelos contaminados sin bioaumentar y bioaumentados, se realizaron estudios de microcosmos de suelos contaminados con diésel en presencia y ausencia de saponinas de quillay durante 42 días.

Se evaluó el crecimiento de heterótrofos cultivables totales y degradadores de hidrocarburos presentes en cada tratamiento cada 7 días en los ensayos de microcosmos (Figuras 18 y 19). Se observó que los tratamientos bioaumentados y bioestimulados evidenciaron mayor crecimiento bacteriano durante el ensayo alcanzando 9×10^{10} UFC g^{-1} de suelo seco de heterótrofos totales y 8×10^{10} UFC g^{-1} de suelo seco de degradadores de hidrocarburos. A las 12 h de cultivo de la placa sólo se observó crecimiento de degradadores de hidrocarburos en los microcosmos bioaumentados, llegando a 3×10^{10} UFC g^{-1} de suelo seco. Sin embargo, los tratamientos sin bioaumentar en presencia de saponinas a los 28 días alcanzaron 3×10^{10} UFC g^{-1} de suelo seco a las 48 h de cultivo. El tratamiento sin bioaumentar y sin bioestimar alcanzó 3×10^{10} UFC g^{-1} de suelo seco de degradadores de hidrocarburos a los 42 días. Se observó un aumento en el crecimiento bacteriano en los tratamientos bioestimulados con saponinas de quillay, alcanzando 8×10^{10} UFC g^{-1} de suelo seco en los suelos bioaumentados y 3×10^{10} UFC g^{-1} de suelo seco en los suelos sin bioaumentar a los 42 días.

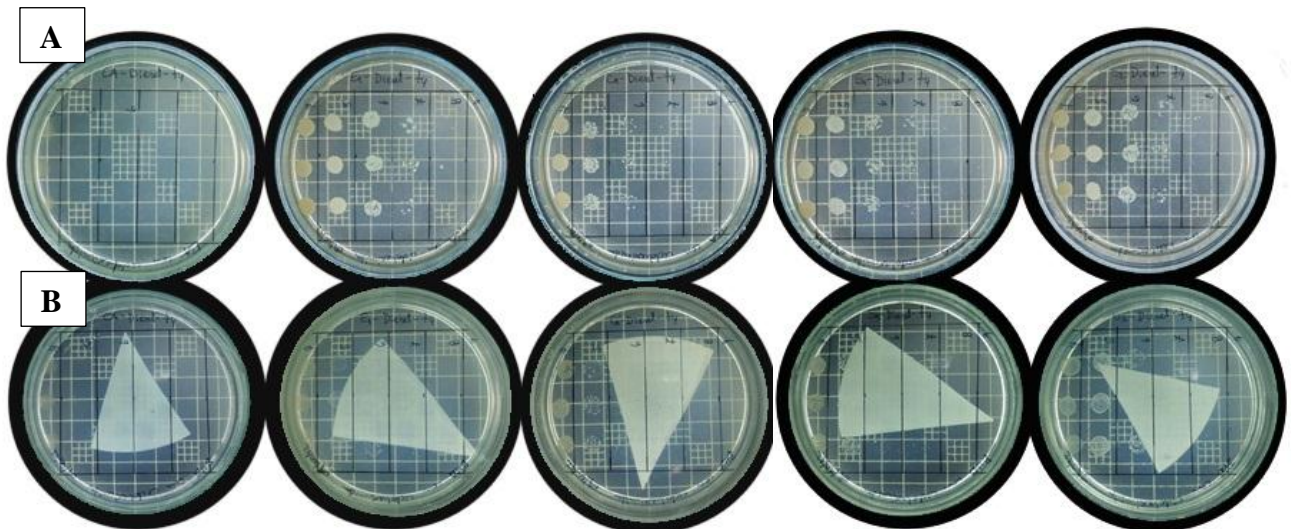


Figura 18. Fotografías de los recuentos bacterianos en placas de los ensayos de microcosmos. Placas de cultivo con crecimientos en medio TSA para heterótrofos cultivables totales y placas de cultivo con crecimientos en medio BHB con disco de papel filtro embebido en diésel como fuente de carbono para degradadores de hidrocarburos. Las fotografías son representativas de un total de 70 recuentos en placas realizados. Las fotografías corresponden a las 12 h de incubación de las placas. A) Heterótrofos totales en medio TSA, B) Degradadores en medio BHB con diésel. De izquierda a derecha las fotografías corresponden: control abiótico, control bioaumentado, control sin bioaumentar, condición con saponinas, condición bioaumentada más saponinas.

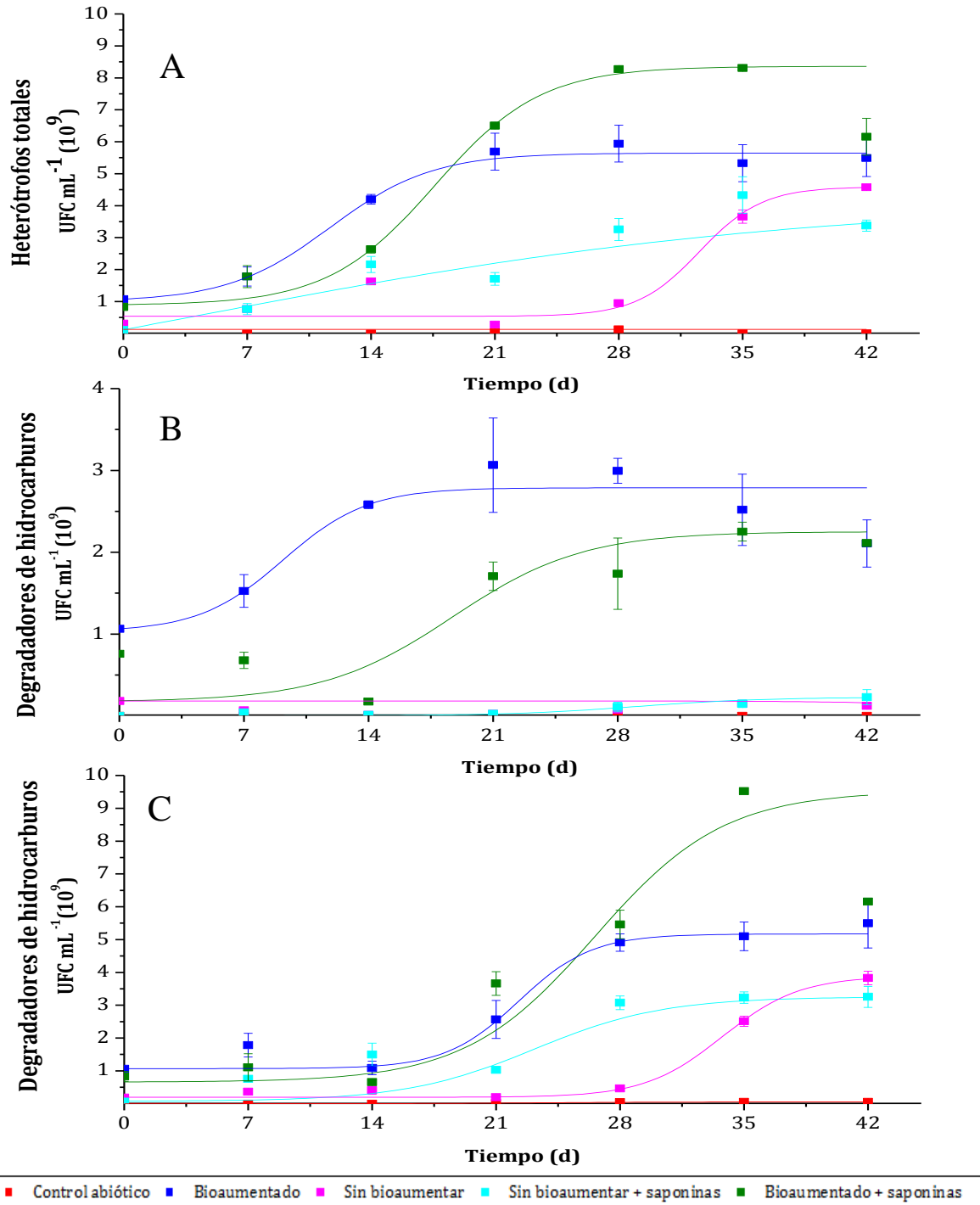


Figura 19. Recuento de heterótrofos cultivables totales y degradadores de hidrocarburos en estudios de microcosmos. Recuentos realizados en placas de cultivo con medio TSA para heterótrofos cultivables totales y con medio BHB con disco de papel filtro embebido en diésel para degradadores de hidrocarburos. A) Heterótrofos totales. B) Degradadores de hidrocarburos 12 h de cultivo. C) Degradadores de hidrocarburos 48 h de cultivo. Los valores presentados corresponden a la media de tres réplicas independientes \pm desviación estándar.

6. DISCUSIÓN

La contaminación causada por el petróleo y sus derivados es uno de los problemas más frecuentes en el medio ambiente (Millioli & Carvalho, 2009). La biorremediación es una tecnología atractiva de recuperación para los sitios contaminados (Seeger *et al.*, 2010). Diversos microorganismos son capaces de degradar hidrocarburos de petróleo y utilizarlos como fuente de carbono y energía. Sin embargo, la baja solubilidad de estos compuestos es una limitante para su degradación (Atlas & Philp, 2005).

Las saponinas son surfactantes de origen vegetal (Vincken *et al.*, 2007) que han utilizado en estudios de degradación de hidrocarburos (Soeder *et al.*, 1996; Kosaric, 2001; Kaczorek *et al.*, 2008). Sin embargo, se han realizado pocos estudios sobre la utilización de saponinas de quillay (Pijanowska *et al.*, 2006). Al ser las saponinas de quillay un recurso propio del país, su empleo resulta atractivo para la generación de nuevas estrategias de biorremediación mediante microorganismos.

En este trabajo de investigación se estudiaron las bacterias *Pseudomonas* sp. cepa 34, *Pseudomonas* sp. cepa 36B, *Acinetobacter* sp. cepa 53 y *Acinetobacter* sp. cepa 64. Estas cepas fueron aisladas desde suelos de la Región de Valparaíso con historial de contaminación con hidrocarburos. Las cuatro cepas se seleccionaron debido a su capacidad de utilizar diferentes hidrocarburos como única fuente de carbono. Esta capacidad las convierte en candidatos atractivos para aplicaciones biotecnológicas como la biorremediación de suelos.

6.1 Crecimiento de las cepas *Pseudomonas* sp. 34, *Pseudomonas* sp. 36B, *Acinetobacter* sp. 53 y *Acinetobacter* sp. 64 en distintas fuentes de carbono

Los ensayos de crecimiento muestran que las cepas *Pseudomonas* sp. 34 y *Pseudomonas* sp. 36B alcanzaron mayor crecimiento en succinato y piruvato como fuente de carbono. En glucosa el crecimiento fue menor, mientras que en sacarosa no se observó crecimiento. Las cepas *Acinetobacter* sp. 53 y *Acinetobacter* sp. 64 presentaron crecimiento en succinato y piruvato. Sin

embargo, no se observó crecimiento en glucosa y sacarosa. Succinato ($C_4H_6O_4$) y piruvato ($C_3H_4O_3$) son sustratos más simples en términos del número de carbonos, en comparación con glucosa ($C_6H_{12}O_6$) y sacarosa ($C_{12}H_{22}O_{11}$). En base a esto se ajustaron las concentraciones de cada compuesto para minimizar diferencias en la cantidad de carbono suministrada.

Piruvato es el producto final de la glicólisis, ruta catabólica de la glucosa ampliamente distribuida en la naturaleza. El piruvato es un compuesto clave en el metabolismo, el que puede ser metabolizado vía ciclo de Krebs (aerobiosis) o fermentación (anaerobiosis). Por su parte, el succinato es intermediario del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) o ciclo de Krebs, el corazón del metabolismo central en la mayoría de las especies descritas y probablemente la ruta metabólica más universal. No es sorprendente entonces que las cepas hayan sido capaces de utilizar estos compuestos como única fuente de carbono.

Las diferencias en los crecimientos utilizando glucosa y sacarosa como fuente de carbono se pueden explicar debido a las capacidades catabólicas de las cepas degradadoras, las cuales carecen de la maquinaria enzimática para catabolizar y emplear finalmente estas fuentes de carbono (Muñoz-Elías & McKinney, 2006). Esto imposibilita la opción de utilizar sustratos económicos como melaza, producto de desecho de la industria azucarera en Chile, la cual está principalmente compuesta por sacarosa. El desarrollo de los países debe considerar, entre otros aspectos, el avance tecnológico, científico y económico, lo que implica evaluar también la transformación de los residuos que se generan y utilizarlos para obtener productos útiles que contribuyan a disminuir su impacto sobre el ambiente.

En base a los resultados obtenidos y con el objetivo de conseguir una fuente de carbono en común para el crecimiento de las cuatro cepas, se escogió succinato por presentar mayor crecimiento y tener menor costo comparado con piruvato. En una segunda etapa, los crecimientos en medio mineral BHB concentrado ($5 \times$) muestran un aumento en el crecimiento de las cepas, evidenciado por el aumento de biomasa en las 4 cepas (Figura 10). Las concentraciones analizadas se establecieron limitando el carbono, según la fórmula de la composición química para células microbianas (Tabla 4), la cual presenta la relación entre los elementos C, H, O y N (Tabla 5) (Pepler, 1967; Naresh *et al.*, 2012). *Pseudomonas* sp. cepa 34 cultivada en medio

BHB (8 ×) (Figura 9) genera agregados celulares que impiden una lectura correcta de la turbidez. En base a los resultados obtenidos, se seleccionó la condición de crecimiento en medio mineral BHB (5 ×) para obtener la biomasa necesaria a ser inoculada en los ensayos en microcosmos de suelo. La obtención de una mayor cantidad de células representa un aumento de la eficiencia del proceso, ya que permite alcanzar la biomasa necesaria para inocular el suelo sin aumentar el volumen de cultivo y en consecuencia, el tamaño del biorreactor. Si se piensa en un escalamiento de la bioaumentación, el tamaño del biorreactor es directamente proporcional a los costos de operación.

Tabla 4. Composición química para células microbianas

Elemento	% en peso. Base seca.	
	A	B
Carbono	46 – 53	47,1
Hidrógeno	6,5 - 7,5	7,8
Oxígeno	18 – 32	31,4
Nitrógeno	10 - 14	13,7

^A Datos de Peppler (1967), Microbial technology. p.421, citado por Libro de Ing. Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

^B Naresh *et al.*, (2012). The chemical formula of a Magnetotactic Bacterium $\text{CH}_2\text{O}_{0,5}\text{N}_{0,25}$.

Tabla 5. Limitación por Carbono en base a la composición química para células microbianas

Elemento	BHB 1 g L ⁻¹			Succinato disódico	Total mM L ⁻¹	Limitación por Carbono	*Exceso respecto a $\text{CH}_3\text{O}_{0,75}\text{N}_{0,375}$
	K ₂ HPO ₄	KH ₂ PO ₄	NH ₄ NO ₃	Na ₂ C ₄ H ₄ O ₄		Razón	
C	-	-	-	32	32	1	0
H	5,8	14,7	50	32	102,5	3,2	1,1
O	23,0	29,4	37,5	32	121,9	3,8	5,1
N	-	-	25	-	25	0,8	2,13

*Para limitar por carbono los otros elementos deben estar en una cantidad mínima de 50% más ($\text{CH}_2\text{O}_{0,5}\text{N}_{0,25} \times 1,5 = \text{CH}_3\text{O}_{0,75}\text{N}_{0,375}$).

En el estudio de tolerancia a diésel se presentó que para las cepas *Pseudomonas* sp. 34 y *Pseudomonas* sp. 36B el crecimiento no se ve afectado a concentraciones de 5 a 15 % p/p de diésel. En la cepa *Acinetobacter* sp. 53 se observó que concentraciones menores de diésel (5-10 % p/p) no afectan su crecimiento. Sin embargo a concentraciones mayores de diésel (15 % p/p) las cepas generan un mayor crecimiento en la etapa exponencial. Entre 0 y 2 días se evidenció un mayor crecimiento en comparación con el control. A concentraciones menores de diésel (0 y 5 % p/p) se observan procesos de adaptación evidenciándose una leve baja en la población. *Acinetobacter* sp. cepa 64 mostró un aumento en la población en 5 % de diésel en comparación con el control. Sin embargo, en concentraciones mayores de diésel (10 y 15 %) se evidencia un mayor aumento de la población, entre el primer y segundo día de ensayo. Posterior a los 2 días de incubación presenta un decaimiento. Los resultados obtenidos a partir de este ensayo muestran claramente que la viabilidad de las cuatro cepas no se ve afectada por altas concentraciones de diésel. La mayor concentración probada fue de 15 % p/p (150.000 ppm), lo que representa un alto contenido de hidrocarburos si lo comparamos con los rangos de concentración reportados en casos de derrames de petróleo (Bragg *et al.*, 1994). Por esto, las cepas se perfilan como razonables candidatas para ser utilizadas en bioaumentación.

6.2 Efecto de saponinas de quillay en la emulsificación de diésel

La actividad emulsificante es una de las propiedades importantes de un potencial biosurfactante. Debido a la naturaleza anfifílica del surfactante, este puede solubilizar compuestos de baja solubilidad en agua como son los hidrocarburos (Balakrishnan *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos en ambas pruebas de emulsificación demuestran la capacidad emulsificadora de las saponinas en un rango de concentraciones amplio (0,39 - 62,5 mg mL⁻¹). Este ensayo permitió determinar la concentración a utilizar en los ensayos de microcosmos. La concentración que presentó una mayor emulsificación (72,2 %) fue 1,56 mg mL⁻¹. Este valor comparado con los reportados para otros surfactantes fitogénicos como *Sapindus mukorossi* muestra tener gran potencial como biosurfactante. Para *Sapindus mukorossi* se reportó un 67% de actividad emulsificante, llegando a la misma emulsificación que la realizada por surfactantes sintéticos como SDS (Ghagi *et al.*, 2011). Se puede explicar la variación de emulsificación según

su concentración en base a otro criterio de evaluación de un surfactante, la concentración micelar crítica (CMC). La CMC es la mínima concentración requerida para que los surfactantes formen micelas y con ello disminuyan la tensión superficial (Soeder *et al.*, 1996). CMC depende del surfactante, de las cepas que se estén utilizando y del compuesto que se quiera solubilizar. Para saponinas de quillay se ha descrito una CMC de 87,6 mg L⁻¹ en la degradación de hexadecano y dodecano por cepas del género *Pseudomonas* spp. y *Bacillus* spp. (Pijanowska *et al.*, 2006). La CMC reportada por Pijanowska *et al.*, (2006) es similar a la mínima concentración en la cual se observó emulsificación (0,1 mg mL⁻¹). Si bien esta columna no fue estable durante el tiempo, en las primeras horas del ensayo se mantuvo emulsificada.

6.3 Efecto de las saponinas de quillay sobre el crecimiento y viabilidad de las cepas *Pseudomonas* sp. 34, *Pseudomonas* sp. 36B, *Acinetobacter* sp. 53 y *Acinetobacter* sp. 64

Los crecimientos de las cuatro cepas en presencia de saponinas (1,56 mg mL⁻¹) demostraron que saponinas no son utilizadas como fuente de carbono y no afectan la viabilidad celular (Figuras 14 y 15). Por otra parte se observó que en presencia de succinato hubo un aumento en el crecimiento. Esto se puede explicar debido a la capacidad adyuvante que poseen las saponinas, las cuales al disminuir la tensión superficial de un medio líquido, generan un aumento en el potencial osmótico, lo que permite el ingreso de compuestos a la célula. Para vacunas se ha utilizado las saponinas como adyuvante (San Martín & Briones, 1999). En el caso de los cultivos con succinato es posible que las saponinas estimulen el metabolismo celular o que se constituyan como sustrato secundario siendo metabolizadas solamente cuando hay una biomasa suficiente la cual se genera por la presencia de succinato en el medio.

Por otra parte, se evaluó el efecto de las saponinas sobre el crecimiento de las cuatro cepas, con el fin de determinar si inhiben su crecimiento. En las 12 concentraciones de saponinas hubo crecimiento. Se observó un efecto similar al caso anterior, con una correlación positiva entre el crecimiento y la concentración de saponinas. En este ensayo el crecimiento se midió a través de la turbidez, por lo que este aumento puede deberse a que las saponinas a estas concentraciones pueden estar generando agregación celular y por ende un aumento en la turbidez. Esto podría

explicar que se observe un aumento en relación a la cantidad de saponinas presentes en el medio. No obstante, se desprende de estos resultados que las saponinas no inhiben el crecimiento en las concentraciones evaluadas.

6.4 Efecto de saponinas de *Quillaja saponaria* Molina sobre el crecimiento bacteriano en un suelo contaminado con diésel

En los ensayos en microcosmos realizados se observó un aumento del crecimiento bacteriano de degradadores de hidrocarburos en los suelos contaminados. En los microcosmos bioaumentados se observó un aumento en el número de microorganismos degradadores de hidrocarburos, llegando a 9×10^9 UFC g^{-1} a las 12 h de incubación en placas. Sin embargo, al repetir la lectura de las placas a las 48 horas de incubación, se evidenció un aumento de degradadores de hidrocarburos en los microcosmos bioaumentados y bioestimulados. Se observó un aumento en el recuento de degradadores a partir de los 21 y 28 días en los suelos suelo sin bioaumentar, con y sin saponinas, respectivamente. El aumento en el recuento de degradadores en los suelos sin bioaumentar indica que el suelo posee una microbiota nativa capaz de adaptarse y degradar hidrocarburos. A los 35 días, ambos tratamientos sin bioaumentar con las cepas degradadoras, alcanzaron igual crecimiento de degradadores de hidrocarburos evidenciando una adaptación de la microbiota nativa. La presencia de saponinas, sin embargo, adelantó este aumento en el recuento de degradadores en 7 días en relación al suelo sin tratamiento. Por otra parte los crecimientos de degradadores de hidrocarburos en aquellos tratamientos bioaumentados se vieron favorecidos a partir de los 28 días del ensayo en presencia de saponinas de quillay, generando un aumento en el número de bacterias degradadoras de hidrocarburos. La hipótesis del presente estudio propone que la bioestimulación mediante la adición de saponinas de *Quillaja saponaria* Molina favorece el crecimiento de bacterias degradadoras de hidrocarburos en suelo contaminado con diésel. Efectivamente, al comparar las series experimentales con y sin saponinas se observa un aumento en el número de degradadores, corroborando la hipótesis planteada. En los microcosmos de suelo sin bioaumentar, la presencia de saponinas adelantó el incremento de degradadores. Por su parte, en los suelos bioaumentados la respuesta no fue la misma, observándose un aumento en el número de degradadores. El

aumento de la biodisponibilidad de los hidrocarburos producto de la adición de las saponinas es probablemente la explicación detrás de este efecto. Otros estudios describen la capacidad de las saponinas de solubilizar hidrocarburos y aumentar la tasa de degradación por distintas cepas estudiadas (Soeder *et al.*, 1996; Pijanowska *et al.*, 2006; Owsianiak *et al.*, 2009). Se observó un efecto favorable de la adición de saponinas de quillay para los microorganismos y la degradación de hidrocarburos en medios líquidos (Kaczorek *et al.*, 2008).

7. CONCLUSIONES

El desarrollo de este estudio se centró en tres objetivos principales: i) caracterizar el crecimiento de las cepas degradadoras de hidrocarburos en glucosa, piruvato, sacarosa y succinato como fuentes de carbono, ii) evaluar el efecto de saponinas de *Quillaja saponaria* Molina sobre las bacterias degradadoras de hidrocarburos y iii) determinar el efecto de la adición de saponinas de *Quillaja saponaria* Molina sobre el crecimiento bacteriano en un suelo contaminado con diésel. De acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir:

- *Pseudomonas* sp. cepa 34, *Pseudomonas* sp. cepa 36B, *Acinetobacter* sp. cepa 53 y *Acinetobacter* sp. cepa 64 cultivadas con succinato como fuente de carbono muestran un mayor crecimiento que con piruvato. El crecimiento en glucosa y sacarosa como fuente de carbono y energía fue menor, por lo que son sustratos no metabolizados por estas cepas.
- Las cuatro cepas bacterianas poseen la capacidad catabólica de hidrocarburos y la tolerancia a altos niveles de diésel.
- La alta capacidad de emulsificación de diésel de las saponinas de quillay sugiere que pueden ser empleadas como surfactantes en procesos de degradación de hidrocarburos.
- Las saponinas facilitan el ingreso de compuestos como los hidrocarburos a la célula, dado que disminuyen la tensión superficial del medio.
- Las saponinas en una concentración $\leq 50 \text{ mg mL}^{-1}$ no tienen efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las cepas *Pseudomonas* sp. 34, *Pseudomonas* sp. 36B, *Acinetobacter* sp. 53 y *Acinetobacter* sp. 64.
- El suelo utilizado en el estudio posee una microbiota nativa capaz de adaptarse y degradar hidrocarburos.
- La bioaumentación con las cepas *Pseudomonas* sp. 34, *Pseudomonas* sp. 36B, *Acinetobacter* sp. 53 y *Acinetobacter* sp. 64 aumentó el número de microorganismos

degradadores hidrocarburos en el suelo. Se evidenció un aumento del número de bacterias degradadoras de hidrocarburos en los microcosmos bioaumentados y bioestimulados.

- La adición de saponinas favorece el crecimiento bacteriano de degradadores de hidrocarburos en ensayos en microcosmos de suelos contaminados con diésel tanto bioaumentados como bioestimulados.
- Debido al positivo efecto de las saponinas sobre el crecimiento de microorganismos degradadores de hidrocarburos en los ensayos de microcosmos de suelos contaminados, se propone cuantificar la degradación de hidrocarburos en este suelo.

8. LITERATURA CITADA

- Alexander, M.** 1999. Biodegradation and biorremediation. Academic Press. 2 Ed. San Diego, California. 323 p.
- Atlas, R. & Philp, J.** 2005. Bioremediation: Applied microbial solutions for real-world environmental cleanup. ASM Press. Washington, DC. Ix-xi p.
- Balakrishnan, S., Varuguese, S. & Deshpande, A.** 2006. Micellar characterisation of saponin from *Sapindus mukorossi*. Tenside, surfactants, detergents. 43(5): 262–268.
- Bragg, J., Prince, R., Harner, E. & Atlas, R.** 1994. Effectiveness of bioremediation for the Exxon Valdez oil spill. Nature. 368: 413–418.
- Blomberg, J., Schoenmakers, P., Beens, J., & Tijssen, R.** 1997. Comprehensive two-dimensional Gas Chromatography (GC x GC) and its applicability to the characterization of complex (petrochemical) mixtures. Journal of High Resolution Chromatography. 20(10): 539–544.
- Bushnell, L. & Haas, H.** 1941. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. Journal of Bacteriology. 41(5): 653–673.
- Cámara, B., Herrera, C., González, M., Couve, E., Hofer, B. & Seeger, M.** 2004. From PCBs to highly toxic metabolites by the biphenyl pathway. Environmental microbiology. 6(8): 842–850.
- Carls, M., Babcock, M., Harris, P., Irvine, G., Cusick, J. & Rice, S.** 2001. Persistence of oiling in mussel beds after the Exxon Valdez oil spill. Marine Environmental Research. 51(2): 167–190.
- Castillo, F., Roldán, M., Blasco, R., Huertas, M., Caballero, F., Moreno-Vivián, C. & Martínez, M.** 2005. Biotecnología ambiental. Tébar. Madrid. 616 p.
- Cheeke, P.** 2000. Actual and potential applications of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* saponins in human and animal nutrition. American Society of Animal Science. 77: 1-10.
- Clark, R. & Brown, D.** 1977. Petroleum: properties and analyses in biotic and abiotic systems. Malins. 1-89 p.
- Copaja, S., Blackburn, C., & Carmona, R.** 2003. Variation of saponin contents in *Quillaja saponaria* Molina. Wood Science Technology. 37: 103–108.

De Conchard, P. 1997. Estudio de mercado de la corteza y saponina de quillay (*Quillaja saponaria* Mol.) y perspectivas de desarrollo futuro. Tesis Ingeniería Forestal. Universidad de Chile. Santiago, Chile. 85 p.

De Geyter, E., Smagghe, G., Rahbé, Y. & Geelen, D. 2012. Triterpene saponins of *Quillaja saponaria* show strong aphicidal and deterrent activity against the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Pest Management Science*. 68(2): 164–169.

Desai, J. & Banat, I. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbial and Molecular Biology Reviews*. 61(1): 47–64.

Díaz, E. 2004. Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *International Microbiology*. 7(3): 173–180.

Díaz, E., Ferrández, A., Prieto, M., Garci, L. & Ferra, A. 2001. Biodegradation of aromatic compounds by *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 65(4): 523-569.

Díaz, I., Escalante, E., Favela, E., Gutiérrez, M. & Ramírez, H. 2008. Design of bacterial defined mixed cultures for biodegradation of specific crude oil fractions, using population dynamics analysis by DGGE. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 62(1): 21–30.

Dirección General del Territorio Marítimo y Marina Mercante. DIRECTEMAR. 2010. Análisis de informes ambientales relacionados con el derrame de la M/N EIDER en la localidad de Antofagasta. Disponible en: <http://www.directemar.cl/>. Consultado en: 05 de Julio de 2012.

El Fantroussi, S. & Agathos, S. 2005. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation?. *Current Opinion in Microbiology*. 8(3): 268–275.

EL MERCURIO. 2010. Las desconocidas historias de los tres principales derrames de petróleo en Chile. Disponible en: http://4.bp.blogspot.com/_WnpPnGCbzjw/TFr8WlqdOwI/AAAAAAAAAFI4/co2nwnMzp4s/s1600/3+grandes+derrames+petroleo.jpg. Consultado: 27 de Octubre de 2012.

EL MERCURIO. 2012. Derrame de combustible en Valparaíso genera emergencia. Disponible en: <http://www.emol.com/noticias/nacional/2012/10/30/567332/derrame-de-petroleo-en-valparaiso-genera-emergencia.html>. Consultado: 30 de Octubre de 2012.

Fan, C. & Krishnamurthy, S. 1995. Enzymes for enhancing bioremediation of petroleum-contaminated soils: a brief review. *Journal of the Air & Waste Management Association*. 45(6): 453–460.

Gautam, K. & Tyagi, V. 2006. Microbial Surfactants: A Review. *Journal of Oleo Science*. 55(4): 155–166.

- Geick, K. & Ternes, S.** 1999. Surfactants: Definitions, applications, analysis. 49(71): 1-8.
- Ghagi, R., Satpute, S., Chopade, B. & Banpurkar, A.** 2011. Study of functional properties of *Sapindus mukorossi* as a potential bio-surfactant. Indian Journal of Science and Technology. 4(5): 530–533.
- Ghazali, F., Rahman, R., Salleh, & Basri, M.** 2004. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. International Biodeterioration & Biodegradation. 54(1): 61–67.
- Guo, S. & Kenne, L.** 2000. Structural studies of triterpenoid saponins with new acyl components from *Quillaja saponaria* Molina. Phytochemistry. 55(5): 419–428.
- Hernández, R., Lugo, E., Díaz, L. & Villanueva, S.** 2005. Extracción y cuantificación indirecta de las saponinas de *Agave lechuguilla* Torrey. e-Gnosis. 3: 3–12.
- Higgins, I. & Burns, R.** 1975. The chemistry and microbiology of pollution. 8 Ed. Academic Press. London. 248 p.
- Hoffmann, A.** 1998. Flora Silvestre de Chile, Zona Central. 4 Ed. Fundación Claudio Gay. Santiago, Chile. 254 p.
- Hoffmann, A., Farga, C., Lastra, J. & Veghazi, E.** 1992. Plantas medicinales de uso común en Chile. 2 Ed. Fundación Claudio Gay. Santiago, Chile. 190 p.
- Höök, M., Bardi, U., Feng, L. & Pang, X.** 2010. Development of oil formation theories and their importance for peak oil. Marine and Petroleum Geology. 27(9): 1995–2004.
- Islas, D., Medina, S., Noel, J., Rodríguez, G., Santa, E., Pachuca, C. & Sahagún, C.** 2010. Propiedades, aplicaciones y producción de biotensoactivos. Revista Internacional de Contaminación Ambiental. 26(1): 65–84.
- Kaczorek, E., Chrzanowski, L., Pijanowska, A. & Olszanowski, A.** 2008. Yeast and bacteria cell hydrophobicity and hydrocarbon biodegradation in the presence of natural surfactants: rhamnolipides and saponins. Bioresource Technology. 99(10): 4285–4291.
- Kiliç, E., Font, J., Puig, R., Colak, S. & Celik, D.** 2011. Chromium recovery from tannery sludge with saponin and oxidative remediation. Journal of Hazardous Materials. 185(1): 456–462.
- Kosaric, N.** 2001. Biosurfactants and their application for soil bioremediation. Food Technology Biotechnology. 39(4): 295–304.

- Liu, Z., Laha, S. & Luthy, R.** 1990. Surfactant solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds in soil-water suspensions. *Water Science & Technology*. 23(1): 475–485.
- Lord, R.** 2010. Resource recovery and reduction of oily hazardous wastes via biosurfactant washing and bioremediation. *Trends in Bioremediation and Phytoremediation*. 661(2): 157–172.
- Luna, M., Esparza, F. & Salazar, J.** 2005. La producción de un biosurfactante y remoción de fenantreno por *Penicillium* sp. VI Congreso de la Sociedad Cubana de Bioingeniería. 2–5 p. Habana.
- Madigan, M., Martinko, J. & Parker, J.** 2003. Brock Biología de los Microorganismos. 10 Ed. Pearson Educación, Madrid. 137-161 p.
- Margesin, R. & Schinner, F.** 2001. Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an Alpine glacier skiing area. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(7): 3127.
- Millioli, V. & Carvalho, D.** 2009. Bioremediation of crude oil-bearing soil: Evaluating the effect of rhamnolipid addition to soil toxicity and to crude oil biodegradation efficiency. *Journal Global Nest*. 11(2): 181–188.
- Miralles, P.** 2007. Estrategias de bioaumentación para la biorremediación de herbicidas s-triazinas en suelo. Memoria Ingeniero Civil Químico e Ingeniero Ambiental. Universidad Técnica Federico Santa María. Valparaíso, Chile. 51 p.
- Montenegro, G.** 2002. Chile: Nuestra flora útil. Guía de uso apícola, medicinal folclórica, artesanal y ornamental. Ediciones Universidad Católica, Santiago. 267 p.
- Moya, E., San Martín, R., Gamboa, M. & Apablaza, G.** 2010. Evaluation of a *Quillaja saponaria* saponin extract for control of powdery mildew of wheat and squash. *Agro Sur*. 38(2): 87–96.
- Muñoz-Elías, E. & McKinney, J.** 2006. Carbon metabolism of intracellular bacteria. *Cellular Microbiology*. 8(1): 10–22.
- Naresh, M., Das, S., Mishra, P. & Mittal, A.** 2012. The chemical formula of a magnetotactic bacterium. *Biotechnology and Bioengineering*. 109(5): 1205–1216.
- Navia, R. & Seeger, M.** 2006. Biorremediación de suelos contaminados con compuestos orgánicos persistentes (COPs). 1 Ed. Universidad de La Frontera. Temuco, Chile. 87-126 p.
- Nitschke, M. & Pastore, M.** 2002. Biosurfactantes: Propiedades e aplicações. *Quimica Nova*. 25(5): 772–776.

Nord, L., Kenne, L. & Jacobsson, S. 2001. Multivariate analysis of NMR spectra for saponins from *Quillaja saponaria* Molina. *Analytica Chimica Acta*. 446(1-2): 197–207.

Owsianiak, M., Szulc, A., Chrzanowski, Ł., Cyplik, P., Bogacki, M., Olejnik, A. & Heipieper, H. 2009. Biodegradation and surfactant-mediated biodegradation of diesel fuel by 218 microbial consortia are not correlated to cell surface hydrophobicity. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 84(3): 545–553.

Palazuelos, E. 2008. El petróleo y el gas en la geoestrategia mundial. Akal. Madrid, España. 9-12 p.

Peppler, H. 1967. Microbial technology. p.421. Citado por Acevedo, F. & Gentina, J. Libro de Ing. Bioquímica. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Valparaíso, Chile. 103 p.

Perfumo, A., Banat, I., Canganella, F. & Marchant, R. 2006. Rhamnolipid production by a novel thermophilic hydrocarbon-degrading *Pseudomonas aeruginosa* AP02-1. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 72(1): 132–138.

Philip, J., Bamforth, S., Singleton, I. & Atlas, R. 2005. Environmental pollution and restoration: a role for bioremediation. *Bioremediation. Applied microbial solutions for real-world environmental cleanup*. ASM Press. Washington, DC. 1–48 p.

Pieper, D. & Seeger, M. 2008. Bacterial metabolism of polychlorinated biphenyls. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 15(2-3): 121–138.

Pijanowska, A., Kaczorek, E., Chrzanowski, Ł., & Olszanowski, A. 2006. Cell hydrophobicity of *Pseudomonas* spp. and *Bacillus* spp. bacteria and hydrocarbon biodegradation in the presence of *Quillaja* saponin. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 23(5): 677–682.

Ponce, B. 2010. Biorremediación de contaminantes orgánicos persistentes en suelos: Efecto de compuestos antioxidantes sobre la degradación de policlorobifenilos por *Bukholderia xenovorans* LB400. Memoria Ingeniero Civil Ambiental e Ingeniero Ambiental. Universidad Técnica Federico Santa María. Valparaíso, Chile. 29 p.

Potter, T. & Simmons, K. 1998. Composition of petroleum mixtures. Total petroleum hydrocarbon criteria working group series. 1 Ed. Amherst Scientific Publishing. 102 p.

Ribera, A. 2007. Evaluación y caracterización de la actividad antifúngica de la especie *Quillaja saponaria* Mol. cultivada *in vitro* en *Botrytis cinerea* Pers. Tesis Magister en Recursos Naturales. Universidad de La Frontera. Temuco, Chile. 49 p.

- Riojas, H., Torres, L., Mondaca, I., Balderas, J. & Gortáres, P.** 2010. Efectos de los surfactantes en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Química Viva*. 9(3): 120–145.
- Rojo, F.** 2009. Degradation of alkanes by bacteria. *Environmental Microbiology*. 11(10): 2477–2490.
- Ron, E. & Rosenberg, E.** 2002. Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*. 13(3): 249–252.
- San Martín, R. & Briones, R.** 1999. Industrial uses and sustainable supply of *Quillaja saponaria* (Rosaceae) saponins. *Economic Botany*. 53(3): 302–311.
- Santos, A., Jiménez, H. & Cano, A.** 2005. Efecto in vitro de extractos ricos en saponinas de *Pithecellobium saman* y *Sapindus saponaria* sobre el crecimiento de dos bacterias celulolíticas ruminales. *Revista Corpoica*. 6(1): 20–25.
- Seeger, M., Hernández, M., Méndez, V., Ponce, B., Córdova, M. & González, M.** 2010. Bacterial degradation and bioremediation of chlorinated herbicides and biphenyls. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 10(3): 320–332.
- Semple, K., Reid, B. & Fermor, T.** 2001. Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)*. 112(2): 269–283.
- Sen, S., Makkar, H., Muetzel, S. & Becker, K.** 1998. Effect of *Quillaja saponaria* saponins and *Yucca schidigera* plant extract on growth of *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*. 27(1): 35–38.
- SIGWEB.** 2010. Portal de Prevención de Riesgo. Derrames de petróleo en Chile. Disponible en: <http://www.sigweb.cl/biblioteca/DerramesPetroleoChile.pdf>. Consultado: 27 de Octubre de 2012.
- Soeder, C., Papaderos, A., Kleespies, M., Kneifel, H., Haegel, F. & Webb, L.** 1996. Influence of phytogenic surfactants (quillaya saponin and soya lecithin) on bio-elimination of phenanthrene and fluoranthene by three bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 44(5): 654–659.
- Sparg, S., Light, M. & van Staden, J.** 2004. Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*. 94(2-3): 219–243.
- Stoyanov, S., Rehage, H. & Paunov, V.** 2003. Novel surface tension isotherm for surfactants based on local density functional theory. *Physical Review Letters*. 91(8): 86-102.
- Timmis, K. & Pieper, D.** 1999. Bacteria designed for bioremediation. *Trends in Biotechnology*. 17(5): 201–204.

- Van Beilen, J., Li, Z., Duetz, W., Smits, T., & Witholt, B.** 2003. Diversity of alkane hydroxylase hystems in the environment. *Oil & Gas Science and Technology*. 58(4): 427–440.
- Vincken, J., Heng, L., Groot, A. & Gruppen, H.** 2007. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*. 68(3): 275–297.
- Viñas, M., Grifoll, M., Sabaté, J. & Solanas, A.** 2002. Biodegradation of a crude oil by three microbial consortia of different origins and metabolic capabilities. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 28(5): 252–260.
- Wackett, L. & Bruce, N.** 2000. Environmental biotechnology towards sustainability. *Current Opinion in Biotechnology*. 11(3): 229–231.
- Weininger, S. & Stermitz, F.** 1988. *Química orgánica*. 1 Ed. Reverte. Barcelona, España. 68-69 p.
- Wentzel, A., Ellingsen, T., Kotlar, H., Zotchev, S. & Throne, M.** 2007. Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 76(6): 1209–1221.
- Xu, Q., Nakajima, M., Liu, Z. & Shiina, T.** 2011. Biosurfactants for microbubble preparation and application. *International Journal of Molecular Sciences*. 12(1): 462–475.
- Zanaroli, G., Toro, S. Di Todaro, D., Varese, G., Bertolotto, A. & Fava, F.** 2010. Characterization of two diesel fuel degrading microbial consortia enriched from a non acclimated complex source of microorganisms. *Microbial cell factories*. 9: 10.
- Zrafi, I., Guermazi, S., Chouari, R., Safi, N., Pelletier, E., Bakhrouf, A., Saidane, D. & Sghir, A.** 2009. Molecular diversity analysis and bacterial population dynamics of an adapted seawater microbiota during the degradation of Tunisian zarzatine oil. *Biodegradation*. 20(4): 467–486.