



UNIVERSIDAD DEL BÍO-BÍO

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BASICAS

**“EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DEGRADADORA DE
HIDROCARBUROS (HC) DE PETRÓLEO DE HONGOS Y BACTERIAS
AISLADOS DEL BORDE COSTERO DE LA REGION DEL BÍO-BÍO
PARA LA APLICACIÓN EN SUELOS CONTAMINADOS”**

Tesista: Carolina Paz Figueroa Suazo

Profesor guía: Dr. Jorge Castro.

Cotutor: Dra. Jeannette Vera

Cotutor: Dra. (c) Lorena Barra

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE INGENIERO EN RECURSOS
NATURALES**

CHILLÁN, 2017

Dedicatoria

A mi familia.

Agradecimientos

A todas las personas que creyeron en este proyecto, especialmente a los técnicos del Laboratorio INIA Quilamapu que sin su ayuda esto no habría sido posible.

INDICE

Contenido	Página
DEDICATORIA	2
AGRADECIMIENTOS	3
RESUMEN	6
CAPITULO I: INTRODUCCION	7
1.1. Antecedentes	7
1.2. Planteamiento del problema	8
1.3. Justificación	9
1.4. Objetivos	9
1.5. Pregunta de investigación	10
CAPITULO II: FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	11
2.1. El petróleo	11
2.2. Contaminación del suelo y técnicas de recuperación	14
2.3. Biorremediación	17
2.4. Microorganismos con capacidad de degradar HC	19
CAPITULO III: MATERIAL Y METODO	22
3.1. Lugar de estudio	22

3.2. Recolección de muestras de suelo	23
3.3. Tratamiento de las muestras de suelo	24
3.4. Obtención de cultivos puros	24
3.5. Evaluación de la degradación microbiana	25
3.6. Viabilidad de los microorganismos	26
3.7. Cuantificación de degradación de HC	26
3.8. Identificación molecular	27
3.9. Tinción de Gram	28
CAPITULO IV: RESULTADOS	30
4.1. Aislamiento de microorganismos en presencia de petróleo	30
4.2. Caracterización e Identificación molecular de microorganismos	32
4.3. Viabilidad de crecimiento en suelo contaminado	36
4.4. Degradación de HC totales de petróleo	36
CAPITULO V: DISCUSIÓN	37
CONCLUSIONES	41
REFERENCIAS	42

RESUMEN

Los productos a base de petróleo son el mayor recurso energético para la manufactura y la vida diaria, sin embargo el desarrollo industrial en las últimas décadas ha llevado a expulsar al ambiente diversos contaminantes como HC de petróleo, que han sido identificados como peligrosos debido a sus efectos tóxicos y cancerígenos. El petróleo es una mezcla compleja de HC que se reporta frecuentemente como contaminante del suelo y por lo tanto uno de los mejores métodos para la restauración de suelos contaminados, es hacer uso de microorganismos capaces de degradar compuestos tóxicos en un proceso denominado biorremediación.

En la presente investigación se evaluó la capacidad biorremediadora de microorganismos aislados del borde costero de la Región del Biobío. Se recolectaron muestras de suelos contaminados de 3 sitios aledaños al terminal portuario San Vicente y refinería Biobío de la misma Región. Se aislaron 12 cepas bacterianas y 1 fúngica, las cuales surgieron de medios de cultivo suplementados con petróleo. Se evaluó la viabilidad y capacidad degradativa de estos microorganismos, que fueron expuestos a condiciones de suelo contaminado con petróleo en el periodo de 1 mes. Se evaluó semanalmente la factibilidad para desarrollarse bajo estas condiciones y finalmente se cuantificó las fracciones de petróleo que fueron degradados.

Los microorganismos utilizados en la fase degradativa corresponden a *Methyobacterium* sp., *Phyllobacterium myrsinacearum*, *Penicillium brevicompactum* y *Microbacterium* sp. Estos microorganismos pueden ser una alternativa como potenciales biorremediadores de suelos contaminados con petróleo, ya que son capaces de degradar HC de manera parcial.

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

La región del Biobío, particularmente la zona de Concepción y Talcahuano, presenta a nivel nacional una gran importancia económica, centrándose en un activo desarrollo industrial (Chuecas, 1989).

Es así que la explotación de recursos naturales como diversos procesos productivos, junto con aportar al crecimiento económico y social del país, en algunos casos también han generado problemas e impactos ambientales, tales como suelos potencialmente contaminados (MMA, 2011).

En la actualidad, la contaminación por petróleo se ha vuelto un desastre común, sobre todo en regiones industriales debido a la extracción, transporte, refinación, almacenamiento, uso y disposición final de este material (Merkel y col., 2004; Kingston 2007), siendo la liberación de HC al ambiente la principal causa de contaminación, ya sea accidental o debido a la actividad humana (Holliger y col.,

1997). Además, la contaminación del suelo con HC causa un daño extenso al sistema local, ya que la acumulación de contaminantes en animales y plantas puede causar la muerte o mutaciones de estos (Alvarez y Vogel, 1991).

1.2 Planteamiento del problema

En Chile, empresas públicas y privadas son parte del historial de desastres ambientales, donde cabe señalar el derrame de 500.000 litros de petróleo en la Bahía de San Vicente en el año 2007. Este desastre tuvo graves consecuencias para los habitantes de la zona como para el medioambiente local, viéndose afectado la calidad de aguas marinas, el área de manejo de los pescadores y el deterioro de los recursos hidrobiológicos. Así mismo el humedal salino de Lenga y su estuario, los que forman parte del Santuario de la Naturaleza Península Hualpén y las aves que se alimentan y anidan en él (CDE, 2007).

Por esta razón que en países como México y Bolivia, existen normativas aplicables en cuanto a los límites máximos permisibles de HC en el suelo, sin embargo, en nuestro país la presencia de HC solamente está regulada para las aguas continentales y marinas a través de normas de emisión y normas secundarias de calidad ambiental, pero no para las matrices de suelo (Castro, 2007).

Uno de los mejores enfoques para la restauración de suelos contaminados es el uso de microorganismos capaces de degradar compuestos tóxicos en un proceso denominado biorremediación (Pala, De Carvalho, Pinto y Santa Anna, 2006). Este proceso es definido como el uso de microorganismos para eliminar y degradar diferentes tipos de compuestos en donde también se incluyen los contaminantes ambientales como metales pesados, pesticidas, desechos de basurales y productos de la industria del petróleo (Medina-Bellver, Marín, Delgado y col., 2005).

Por esa razón, la biorremediación se ha estudiado intensamente durante las últimas dos décadas, impulsado por la necesidad de obtener un método de bajo costo

sostenible con el entorno natural, y una alternativa *in situ* a las costosas tecnologías de remediación basadas en la ingeniería (Merkel y col., 2004; Chehregani y Malayeri, 2007; Chehregani y col., 2009).

Como ejemplo de biorremediación *in situ* fue la limpieza del vertido de petróleo Exxon Valdez (1989) en Alaska. En este caso se utilizaron fertilizantes nitrogenados para estimular el crecimiento de microorganismos autóctonos degradadores de HC y acelerar la biodegradación de estos (Atlas, 2011).

Además, se ha encontrado que las bacterias y hongos son los principales agentes de descomposición de petróleo y sus derivados (Madigan y col., 1999). Por ejemplo, en investigaciones realizadas por Christon y col. (1997), se logró una degradación de HC cercana al 95% con la adición de microorganismos al área de tratamiento, mientras que en los sitios que no fueron tratados la reducción fue del 14%.

Para Makkar y Rockne (2003), la biorremediación es un tratamiento rentable en la limpieza de HC de petróleo de la zona contaminada, ya que es fácil de mantener, aplicable a grandes áreas y conduce a la destrucción completa del contaminante.

1.3 Justificación

La necesidad de buscar métodos de recuperación de entornos naturales afectados por contaminantes de la industria petrolera, cuya operación pueda transformar completamente los contaminantes a componentes inocuos, en una técnica eficiente, rentable y poco invasiva.

1.4 Objetivos

El objetivo de esta investigación es coleccionar, aislar e identificar microorganismos de suelos contaminados por HC en la costa de la Región del Biobío y evaluar la capacidad de estos microorganismos de degradar los HC en condiciones de laboratorio.

En consecuencia el siguiente estudio pretende responder la siguiente pregunta de investigación:

Pregunta de investigación

¿Son capaces los hongos y bacterias del borde costero de la región del Biobío de degradar HC de petróleo en condiciones de laboratorio de suelo contaminado?

Para responder la pregunta de investigación se plantea la siguiente hipótesis.

Hipótesis:

- ✓ Hongos y bacterias aislados de la costa de la Región de Biobío pueden ser capaces de degradar HC de suelos contaminados en condiciones de laboratorio.

Objetivo general:

- ✓ Evaluar la capacidad degradadora de HC de petróleo de hongos y bacterias aislados del borde costero de la Región del Biobío para ser aplicados en suelos contaminados.

Objetivos específicos:

- ✓ Colectar y aislar microorganismos del borde costero de la Región del Biobío.
- ✓ Identificar la o las cepas con mayor crecimiento en medio de cultivo contaminado.
- ✓ Cuantificar *in vitro* la capacidad degradadora de HC de petróleo en condiciones experimentales de suelo contaminado.

CAPÍTULO II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.1 EL PETRÓLEO

El petróleo y las fracciones que provienen de él son una mezcla compleja de HC; como muestra la Tabla 1, principalmente compuesto de carbono e hidrogeno y en menor cantidad otros materiales orgánicos; nitrógeno, azufre y oxígeno (Higgins y Burns, 1975).

Tabla 1. Composición química del petróleo en porcentaje.

Componente	Petróleo Crudo
Carbono	84-87%
Hidrógeno	11-14%
Azufre	0,06-2%
Nitrógeno	0.1-2%
Oxígeno	0,1-2%

Fuente: Levorsen, 1980. Elaboración propia.

Dependiendo del número de átomos de carbonos y de la estructura de los HC, se tienen diferentes propiedades que definen y determinan su comportamiento (Montenegro, 2007), los HC con bajo peso molecular son gases, mientras los de alto peso molecular son líquidos o sólidos a temperatura ambiente (Madigan y col., 1999). Los HC policíclicos aromáticos componen la menor parte de los crudos, sin embargo son los más tóxicos para las plantas y animales (Atlas, 2011).

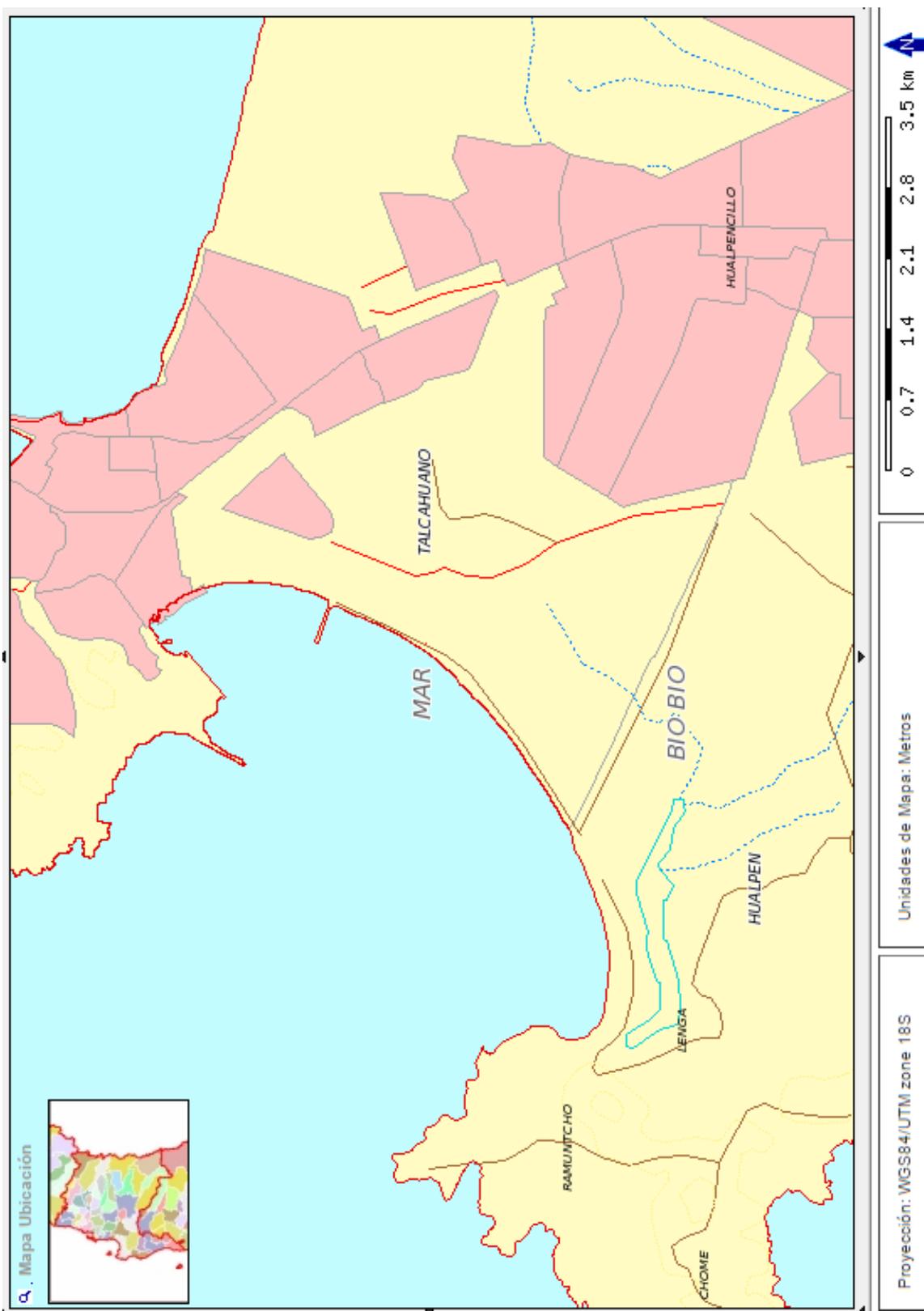
En la actualidad, el aumento de las actividades industriales y el progreso tecnológico han exigido un aumento excesivo en el uso de los HC de petróleo, donde se espera que cerca de 95 millones de barriles de petróleo se produzcan cada día, con el fin de satisfacer la demanda mundial de este recurso (Leblond, 2008).

La Refinería Biobío es en Chile la abastecedora del 32% de la demanda nacional del país, cuyas instalaciones de oleoductos transportan el petróleo crudo desde el Terminal Maritimito de San Vicente (ver Figura 1) a la refinería para el procesamiento en las plantas de crudos (ver Figura 2) (Betteley y col., 2013),

Además, se considera que en nuestro país del total de las principales sustancias peligrosas almacenadas a nivel nacional, más del 50% corresponde a productos de la actividad petrolera, 27% combustible para motores o gasolina, 17% gasóleo o combustible para motores diesel, 7% destilados de petróleo (Irrázabal, 2011). Por consiguiente se ha incrementado el interés científico en el comportamiento de la distribución, el destino del petróleo y sus derivados en el medio ambiente (Alexander, 1995, 2000; Semple, y col. 2001, 2003; Stroud, y col., 2007, 2009).

En Chile no existe un plan de regulación de las emisiones o derrames de petróleo al ambiente por parte de las empresas petroleras, en este sentido la contaminación ambiental con HC se ha reconocido como un problema grave

(Alexander, 1995, 2000) debido a que la mayoría de los componentes del petróleo son tóxicos para los seres humanos, la flora y la fauna.



y Refinería Bio Bío

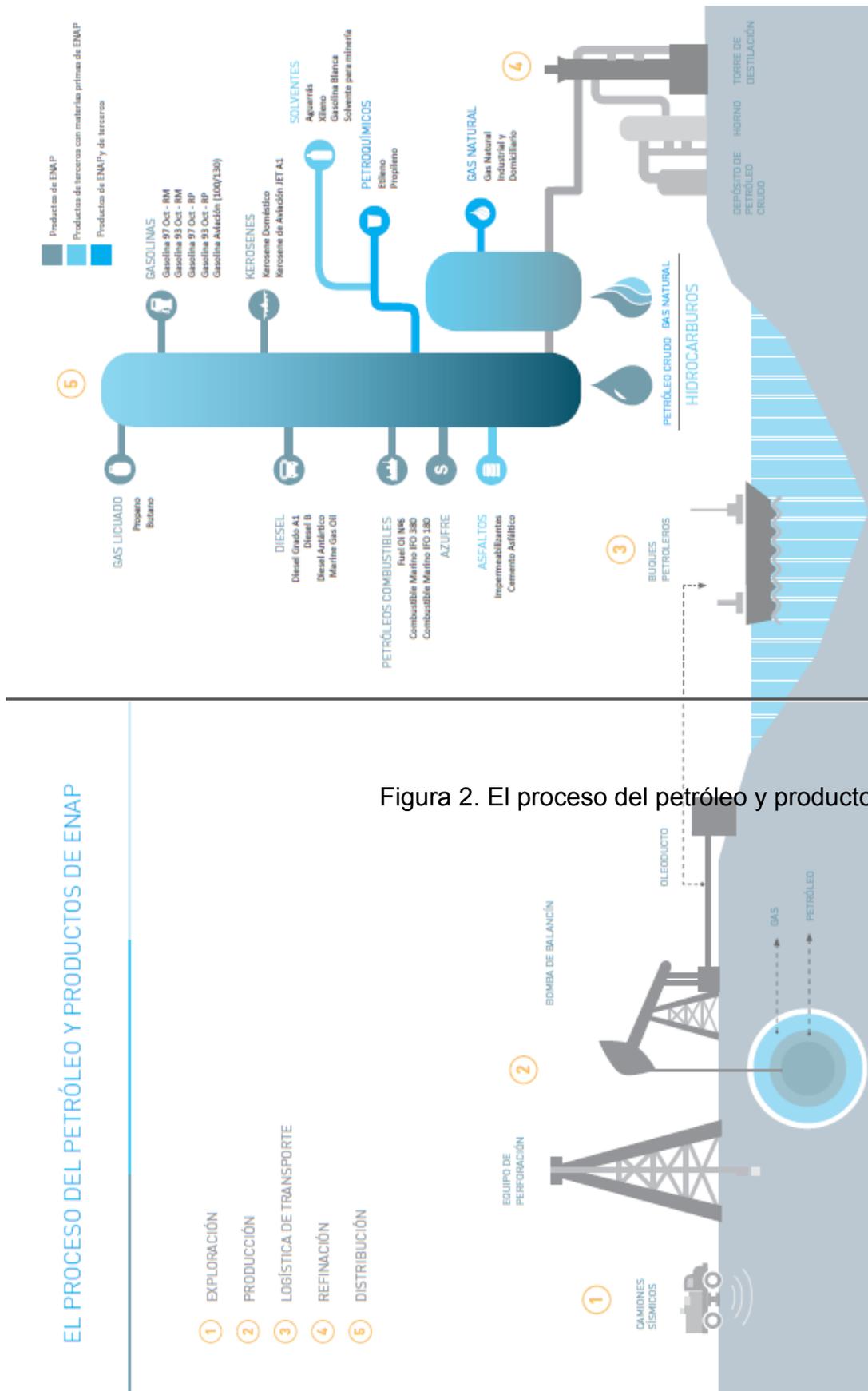


Figura 2. El proceso del petróleo y productos de ENAP (Fuente: ENAP)

2.2 CONTAMINACIÓN DEL SUELO Y TECNICAS DE RECUPERACIÓN

El suelo es la capa más superficial de la corteza terrestre, que constituye uno de los recursos naturales más importantes con el que contamos al ser el sustrato que sustenta la vida en el planeta (Ortiz y col., 2007). El suelo se caracteriza por ser un sistema complejo y dinámico. Está constituido por varias capas que difieren en relación a la física, química, mineralógica y la naturaleza biológica, que son influenciados por el clima y las actividades de los organismos vivos. Además de contribuir al mantenimiento de todas las formas de vida que se producen en la superficie terrestre, el suelo juega un importante tarea ya que actúa como protector de otros medios más sensibles, como un filtro colector de residuos orgánicos e inorgánicos, lo que ayuda en la acumulación de posibles compuestos tóxicos (Sousa y col., 2008).

Todas estas reacciones están estrechamente controladas por propiedades del suelo como su textura, estructura, porosidad, capacidad de intercambio iónico, acidez y la actividad microbiológica. En cualquier caso, hay que tener muy presente que el poder de amortiguación de un suelo es limitado y cuando se satura, el suelo deja de ser eficaz, llegando incluso a invertirse el proceso y a convertirse en una fuente de contaminación para los organismos del suelo y para el medio circundante (Ortiz y col., 2007).

La contaminación del suelo consiste en una degradación química que provoca la pérdida parcial o total de la productividad del suelo como consecuencia de la acumulación de sustancias tóxicas en unas concentraciones que superan el poder de amortiguación natural del suelo y que modifican negativamente sus propiedades. Esta acumulación se realiza generalmente como consecuencia de actividades humanas exógenas, aunque también se puede producir de forma natural o endógena (Macías, 1993).

Algunos productos químicos peligrosos pueden degradarse a productos inocuos en el suelo y los metales pesados pueden ser absorbidos. Cuando el contaminante llega al suelo, sufre la acción de fenómenos biológicos y

geoquímicos y se distribuye por el subsuelo en las fases vaporizados, residuales o adsorbidos, fase libre y fase disuelta. La distribución de tales fases dependerá de sus características físico-químicas y también del tipo de suelo (Silva y col., 2004).

Cabe señalar que los compuestos aromáticos se encuentran entre los contaminantes más frecuentes y persistentes en el medio ambiente (Seo y col., 2009). Los suelos y sedimentos contaminados con petróleo contienen comúnmente una mezcla de HC aromáticos policíclicos (Seo y col., 2009), que además se han descrito como cancerígenos para animales y humanos, algunos de ellos el benzopireno, antraceno, fluoranteno (Toxicological Profiles for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, 1990) y que provocan gran impacto en el medio ambiente como cambios ecológicos, toxicidad química en los animales y cambios indirectos como la pérdida del hábitat (ITOPF, 2011).

En la actualidad se dispone de amplia diversidad de tecnologías de recuperación de suelos contaminados, algunas de aplicación habitual y otras todavía en fase experimental, diseñadas para aislar o destruir las sustancias contaminantes alterando su estructura química mediante procesos generalmente químicos, térmicos o biológicos. Su aplicación depende de las características del suelo y del contaminante, de la eficacia esperada con cada tratamiento, de su viabilidad económica y del tiempo estimado para su desarrollo (Reddy y col., 1999).

En función de los objetivos que se quieren alcanzar a la hora de recuperar un suelo contaminado (Kaifer y col., 2004), se puede distinguir entre:

- Técnicas de contención, que aíslan el contaminante en el suelo sin actuar sobre él, generalmente mediante la aplicación de barreras físicas en el suelo.
- Técnicas de confinamiento, que reducen la movilidad de los contaminantes en el suelo para evitar su migración actuando directamente sobre las condiciones fisicoquímicas bajo las que se encuentran los contaminantes.

- Técnicas de descontaminación, dirigidas a disminuir la concentración de los contaminantes en el suelo.

Dentro de las técnicas de descontaminación de suelos se encuentran los tratamientos biológicos como la biorrecuperación, que se define como todos aquellos tratamientos de recuperación que degradan contaminantes orgánicos o disminuyen la toxicidad de otros contaminantes inorgánicos como metales tóxicos a través de la actividad biológica, principalmente de microorganismos, mediante reacciones que forman parte de sus procesos metabólicos. Estos tratamientos utilizan bacterias, hongos y plantas para desintoxicar las sustancias de riesgo para el hombre y el medio ambiente (Ortiz y col., 2007).

2.3 BIORREMEDIACION

La biorremediación se define como el uso de procesos biológicamente mediados para desintoxicar, degradar o transformar contaminantes a un estado inocuo (Azubuike y col., 2016). Este proceso es una herramienta de la biotecnología ambiental, que tiene por objetivo utilizar el potencial de los microorganismos (fundamentalmente bacterias y hongos) para transformar los contaminantes orgánicos en compuestos más simples, y de esta manera, recuperar suelos o aguas contaminadas (Glazer y Nikaido, 1995).

En las dos últimas décadas, se han producido avances recientes en las técnicas de biorremediación, con el objetivo de restablecer eficazmente los entornos contaminados en un enfoque ecológico y a un costo muy bajo. Los investigadores han desarrollado y modelado diferentes técnicas de biorremediación, sin embargo, debido a la naturaleza o tipo de contaminante, no existe una sola técnica de biorremediación que sirva para restaurar los ambientes contaminados (Azubuike y col., 2016). Los microorganismos autóctonos presentes en ambientes contaminados son la clave para resolver la mayoría de los desafíos asociados con la biodegradación y la biorremediación de sustancias contaminantes (Verma

y Jaiswal, 2016) siempre y cuando las condiciones ambientales sean adecuadas para su crecimiento y metabolismo.

Sin embargo, el éxito de la biorremediación *in situ* utilizando microorganismos autóctonos sigue siendo limitado por niveles inapropiados de nutrientes y condiciones fisicoquímicas (es decir, temperatura, pH, contenido de humedad, disponibilidad de nutrientes, etc.) que prevalecen en los sitios contaminados (Lu y col., 2014, Smith y col., 2015).

En la actualidad, hay un interés creciente por los métodos de recuperación biológicos ya que prometen tecnologías más sencillas, económicas y respetuosas con el medio ambiente que otros tratamientos en los que los contaminantes son simplemente extraídos y transportados a otros lugares (Ortiz y col., 2007).

Por esta razón, es que un importante número de empresas industriales están desarrollando procesos biotecnológicos en el contexto actual de los esfuerzos internacionales hacia una sociedad sostenible, siendo la biotecnología ambiental, un gran aporte para contribuir con nuevos productos con un menor impacto sobre el ecosistema (Zylstra, 2005).

La descomposición microbiana del petróleo y sus derivados es de considerable importancia económica y ambiental (Madigan y col. 2004) ya que representa uno de los principales mecanismos por los que el petróleo y otros contaminantes de HC pueden ser eliminados del medio ambiente (Ulrici, 2000) y además es económicamente más rentable que otras tecnologías de recuperación (Leahy y Colwell, 1990).

La biorremediación se considera actualmente como una tecnología emergente que se define como una herramienta para la bio-restauración de los ambientes naturales que han sido previamente contaminados con productos tóxicos a través de la eliminación o transformación de estos compuestos (Maier, 2000; Prasad, 2010) y se ha aplicado para eliminar el petróleo crudo (Wiltse y col., 1998; Radwan y col., 1998; Merkel y col., 2004; Mohsenzadeh y col., 2010), aceite de

motor (Dominguez-Rosado y Pichtel, 2004), y combustible diesel (Chaineau y col., 2000) en el suelo.

2.4 MICROORGANISMOS CON CAPACIDAD DE DEGRADAR HC

La biodegradación por poblaciones microbianas es el mecanismo más básico y fiable por el cual miles de contaminantes como el petróleo son eliminados del medio ambiente (Cappello y col., 2007), esto ya que las bacterias, hongos y levaduras son los principales microorganismos capaces de absorber HC de petróleo (Van Hamme y col., 2003).

Esta capacidad de los microbios para degradar componentes del petróleo es reconocida en el inicio del siglo XX, principalmente de bacterias que fueron aisladas de sitios contaminados con petróleo (Cerniglia y Heitkamp, 1987; Juhasz y Naidu, 1996; Wilson y Jones, 1993).

La biodegradación del petróleo es un proceso natural (Santiesteban, 1969; Atlas, 1973; Blackburn, 1993) que toma meses o años, según las condiciones prevalecientes en el sitio del derrame (Atlas, 1981) y que depende tanto de factores abióticos como la estructura del contaminante y las condiciones ambientales, tales como oxígeno y disponibilidad de nutrientes, así como factores bióticos, dependiendo del microorganismo específico, como la población, concentración y las interacciones microbianas.

Algunos microorganismos pueden convertir completamente los HC en biomasa, CO₂ y H₂O (Atlas, 2011) y pueden crecer rápidamente sobre la superficie del petróleo y la actividad llega a ser más extensa si las condiciones ambientales como temperatura y nutrientes son los adecuados (Madigan y col. 2004). Los microorganismos requieren para su crecimiento distintos elementos que el carbono; nitratos, fosfatos y hierro que pueden limitar la biodegradación del petróleo (Atlas, 2011).

El proceso de biorremediación implica la transformación de HC en unidades más pequeñas, lo que resulta en la reducción de la concentración de los HC de petróleo (Martins y col., 2012), algunas especies de microorganismos son capaces de degradar HC alifáticos, otras moléculas aromáticas, pero pocos son capaces de degradar las dos clases de moléculas (Whyte y col., 1996).

Hay un gran número de microorganismos dispersos en diferentes nichos ecológicos que utilizan HC como su única fuente de carbono, tal como se muestra en la Tabla 2. Algunos de ellos, sin embargo, sólo se encuentran en baja concentración en zonas no contaminadas, donde sus poblaciones aumentan sólo en respuesta a la contaminación crónica (Madigan y col., 1999).

La eficiencia reportada para los rangos de biodegradación para los hongos del suelo son del 6% (Jones y col., 1970) a 82% (Pinholt y col., 1979) y para las bacterias del suelo de 0,13% (Jones y col. 1970) a 50% (Pinholt y col., 1979). En los derrames donde se han llevado a cabo estudios, se ha visto que las bacterias oxidadoras de HC han aumentado su número de $10^3 - 10^6$ veces poco tiempo después de producirse el vertido (Madigan y col. 2004).

En la eliminación de vertidos de petróleo, los microorganismos actúan oxidando el petróleo a dióxido de carbono (CO_2). Cuando se producen grandes vertidos, las fracciones de HC volátiles se evaporan rápidamente quedando los HC aromáticos y alifáticos de cadena larga para ser eliminados por los microorganismos (Madigan y col. 2004).

Recordemos que los crudos de petróleo son HC formados por cuatro familias de compuestos: los HC alifáticos, los HC aromáticos, las resinas y los asfaltenos, y además cada uno de estos grupos contiene un gran número de compuestos (Karlsen y Larter, 1991). Los microorganismos degradan con facilidad los HC lineales de la fracción alifática, especialmente los que contienen menos de 28 carbonos, aunque se han llegado a describir biodegradaciones de HC de hasta 44 carbonos. Respecto a los HC aromáticos, a medida que aumenta el número

de anillos, por tanto su peso molecular, aumenta su resistencia a la biodegradación (Prince, 2005).

Tabla 2. Microorganismos con potencial para la degradación de HC

Group	Genus	
Bacterias	<i>Acinetobacter sp.</i>	<i>Lucila sp.</i>
	<i>Alcaligenes sp.</i>	<i>Marinobacter sp.</i>
	<i>Alcanivorax sp.</i>	<i>Metylophaga sp.</i>
	<i>Alcanivorax sp.</i>	<i>Micrococcus sp.</i>
	<i>Aquaspirillum sp.</i>	<i>Microscilla sp.</i>
	<i>Arthrobacter sp.</i>	<i>Mycobacterium sp.</i>
	<i>Azospirillum sp.</i>	<i>Neisseria sp.</i>
	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Nocardia sp.</i>
	<i>Beggiatoa sp.</i>	<i>Novospingobium sp.</i>
	<i>Cycloclasticus sp.</i>	<i>Oleiphilus sp.</i>
	<i>Cytophaga sp.</i>	<i>Planococcus sp.</i>
	<i>Corynebacterium sp.</i>	<i>Porpyrobactes</i>
	<i>Desulfotalea sp.</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>
	<i>Desulfovibrio sp.</i>	<i>Rhodoplanes sp.</i>
	<i>Erythrobacter sp.</i>	<i>Rubrivivax sp.</i>
	<i>Flavobacterium sp.</i>	<i>Sphingomonas sp.</i>
	<i>Geobacillus sp.</i>	<i>Staphylococcus sp.</i>
	<i>Geobacter sp.</i>	<i>Sulfitobacter sp.</i>
<i>Halochromatium sp.</i>	<i>Thioalcalovibrio sp.</i>	
<i>Halomonas sp.</i>	<i>Xanthomonas sp.</i>	
Fungi	<i>Alternaria sp.</i>	<i>Penicillium sp</i>
	<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Phanaerocheate sp.</i>
	<i>Chaetomium sp.</i>	<i>Pleurotus sp.</i>
	<i>Cladosporium sp.</i>	<i>Rhizopus sp.</i>
	<i>Fusarium sp.</i>	

(Fuente: San Martín, 2011).

CAPITULO III. MATERIALES Y METODO

3.1 Lugar de estudio

Las muestras de suelo utilizadas en el presente estudio corresponden a 3 sitios afectados por derrames de petróleo en la Región del Biobío, aledaños al Puerto de San Vicente y a la Empresa Nacional del Petróleo (ENAP), Refinería Biobío.

La primera muestra de suelo corresponde al Puerto de San Vicente ($36^{\circ}43'42''\text{S}$, $73^{\circ}7'40''\text{O}$) perteneciente a la comuna de Talcahuano. Este suelo se encuentra sometido al efecto del petróleo crudo por las emisiones de oleoductos que conecta al terminal portuario con la Refinería Biobío.

La segunda muestra de suelo se recolectó en Caleta Lengua ($36^{\circ}45'47''\text{S}$, $73^{\circ}9'13''\text{O}$) perteneciente a la comuna de Hualpén que se vio afectada por derrames de las grandes industrias portuarias.

La tercera muestra corresponde a Humedal de Lenga colindante a la Refinería Biobío ($36^{\circ}46'6''\text{S}$, $73^{\circ}10'6''\text{O}$), alterado por la contaminación y desechos de HC por parte de esta industria. La Figura 3 representa los tres puntos de recolección de muestras.



londe fueron extraídas

3.2 Recolección de muestras de suelo

En cada sitio de estudio se delimitó una transecta de 5 m y posteriormente con la ayuda de una pala a una profundidad aproximada de 15 cm, se recolectó 12 muestras alternadas al trazado. Cada muestra fue depositada de forma independiente en bolsas herméticas y luego fueron trasladadas a Laboratorio de Control Biológico en INIA.

3.3 Tratamiento de las muestras de suelo

Cada una de las muestras fue tratada de manera independiente. Para ello las 12 muestras de suelo de cada sector se mezclaron para tener una muestra representativa de cada lugar. Se pesaron 10 g de suelo de cada zona y se depositó a un matraz que contenía 100 mL de agua destilada, luego la dilución se agitó en un vortex hasta obtener una mezcla homogénea obteniendo una primera dilución denominada 10^{-1} , a partir de la cual se realizaron otras cuatro diluciones (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5}).

Una vez obtenidas las diluciones 10^{-5} de cada sector, se procedió a la siembra en placas de Petri que contenían medios de cultivos agar nutriente y agar patata dextrosa (PDA), suplementados con 0, 1, 2, 4, 6, 8 y 10 % de Diésel Ultra. Bajo una cámara de flujo laminar, se extrajo 200 μ L de la dilución 10^{-5} y se depositó en el centro de la placa de Petri, la cual fue distribuida con un rastrillo de siembra por toda la placa. Una vez realizada la siembra, las placas fueron incubadas a 25°C por 2 a 7 días en una cámara de incubación.

3.4 Obtención de cultivos puros

Terminado el periodo de incubación se procedió a replicar por separado las colonias de hongos y bacterias que proliferaron en placas de Petri con agar nutriente para bacterias y los hongos en placas con PDA suplementado con la misma concentración de petróleo en que crecieron los microorganismos.

3.5 Evaluación de la degradación microbiana en suelo contaminado

En esta etapa se utilizaron recipientes de vidrio donde se mezcló 500 g de suelo de la marca Armony con 5 mL de diésel, es decir suplementado al 1%. Se inocularon 8 cepas bacterianas y 1 cepa fúngica con igual cantidad de esporas. Para este proceso se inoculó la misma cantidad de microorganismos (Tabla 3) obtenido por el conteo de células en Cámara de Neubauer, correspondientes a los organismos C1, C2, C3, C4, C5, C13 y C14. Se obtuvo una concentración que contuviera la misma cantidad de microorganismos, unidades formadoras de colonias (UFC) y esporas. Cada microorganismo si inoculó por triplicado (en 3 frascos distintos) y además tres muestras control en donde no se inoculó microorganismos.

Tabla 3. Recuento de células y concentración utilizada con misma cantidad de microorganismos.

Tipo	Cepa	UFC	Volumen para 1 exp7 microorganismos (ml)
Bacteria	C1	61	0,66
	C2	70	0,57
	C3	49	0,82
	C4	148	0,27
	C5	109	0,37
	C13	66	0,61
N° esporas			
Hongo	C14	24	1,6
Concentración	=	N° células * 250000	= NN exp7  1 exp7/ NN exp7= X

Las muestras se dejaron a temperatura ambiente por 150 días en el Laboratorio de Recursos Naturales, Universidad del Bio-Bio como se muestra en la Figura 4, y para mantener la humedad las muestras fueron regadas con 10 mL de agua cada 7 días.



Figura 4. Muestras de suelo suplementado con petróleo.

3.6 Viabilidad de los microorganismos

Se introdujo un asa plástica en el centro del recipiente con suelo donde se había sembrado el microorganismo, el contenido del asa fue dispersado en placas de Petri con medio agar nutriente en el caso de las muestras con bacterias y PDA

para el hongo. Se incubó en cámara por 48 horas y morfológicamente se identificó la cepa en estudio que fue aislada para corroborar su viabilidad.

3.7 Cuantificación de degradación de HC

El método utilizado para la cuantificación de HC totales en las muestras de suelo está regido por la norma ISO 9377-2 en donde se utiliza un método de extracción por solvente y cromatografía gaseosa, el cual reporta átomos de carbono a partir de n-decano ($C_{10}H_{24}$) hasta ($C_{40}H_{82}$). La cantidad de petróleo adicionada por muestra de suelo fue de 8350 mg/kg, correspondiente a Diesel Ultra, que contiene HC parafínicos, olefínicos, cicloparafínicos y aromáticos con número de átomos de carbono en el rango $C_{14} - C_{20}$ (Copec, 2013). Para la cuantificación de HC degradados se realizó el análisis por Cromatografía de gases con detector ionización de llama utilizando la metodología DIN EN ISO 9377-2 (2001) (DEV H53), en el laboratorio de análisis GLU CHILE.

3.8 Identificación molecular

Hongos:

La identificación de hongos se realizó a partir de cultivos esporulados en medio PDA, formados a partir de una espora que se traspasó a un matraz con 50 mL de caldo de papa (PDB), los cuales se dejaron a 25°C en agitación 100 rpm durante 4 a 5 días. Transcurrido dicho tiempo se procedió a filtrar el micelio presente en cada matraz, donde se empleó una bomba de vacío, dejando el micelio en tubos de eppendorf los que fueron almacenados a -20°C en oscuridad para su posterior extracción de ADN.

Bacterias:

Con un asa plástica se traspasó esporas de cada cepa en estudio a un matraz previamente esterilizado con 50 mL de caldo tripticasa de soya, los cuales se dejaron a 30 °C en agitación 100 rpm durante 1 a 2 días. Transcurrido dicho tiempo se extrajo una alícuota de 700 µL la cual fue llevada a un tubo de eppendorf que fueron almacenados a -20°C en oscuridad para su posterior extracción de ADN.

Para la extracción de ADN se utilizó el kit Ultra Clean Microbial DNA isolation (MO BIO), empleando el protocolo descrito por el proveedor. Y una vez efectuada la extracción de ADN, se evaluará la integridad de este en un gel de agarosa al 0,8%.

Luego se empleó la técnica de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) en un termociclador Mastercycler gradient Eppendorf™ para los partidores:

En el caso de hongos ITS4-5 forward: (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') y reverse: (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'), teniendo como programa una desnaturalización inicial de 95°C por 2 min, luego 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 s; alineamiento a 50°C por 30 s; extensión a 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C por 10 min (White y col., 1990).

En el caso de bacterias 16S forward: (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y reverse primer (5'-AAGGAGGTGATCCANCCRCA-3'), teniendo como programa una desnaturalización inicial de 4,5 min a 95°C, 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 min, alineamiento a 55°C por 1 min, extensión a 72°C por 2 min y una extensión final de a 72°C por 5 min (Hogg y Lehane, 1999).

Para la secuenciación, los productos de PCR de hongos y bacterias serán purificados empleando el Kit Cycle pure (OMEGA) como lo describe el proveedor y entonces los amplicones purificados serán enviados a MacroGen Inc. Sur Korea.

Las secuencias se limpiarán en los extremos empleando el *software* Chromas 2.4.3, para luego ser llevadas a la herramienta BLAST disponible en

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para su alineamiento y comparación con las secuencias presentes en el Gen Bank.

3.9 Tinción de Gram

Se hizo crecer las bacterias aisladas en placas individuales con medio agar nutriente por 48 horas. Se preparó los frotis bacterianos y se fijaron con calor. A cada frotis se le adicionó 3 gotas de cristal violeta de manera tal que cubriera todo el frotis por 1 min, finalizado el tiempo se lavó con agua destilada para eliminar el exceso de colorante. Posteriormente se le agregó lugol suficiente para cubrir todo el frotis y se dejó actuar por 1 min, luego se lavó con agua destilada para eliminar el exceso de mordiente. Luego se adicionó alcohol acetona hasta que el efluente salía incoloro, se lavó con agua destilada para eliminar el exceso de disolvente. Se agregó safranina hasta cubrir todo el frotis, 3 gotas aproximadamente y se dejó actuar por 1 minuto. Se lavó con agua destilada y se dejó secar. Finalmente se agregó aceite de inmersión y se observó en el microscopio para indicar si son Gram positivos o Gram negativos.

CAPITULO IV. RESULTADOS

4.1 Aislamientos de microorganismos en medio de cultivo contaminado

De acuerdo al procesamiento de las muestras de suelo y a la siembra de las diluciones en medios de cultivo con y sin petróleo, los resultados muestran que la mayor parte de los organismos aislados en este estudio corresponde a bacterias (11)

y solo 1 hongo, cuyo listado de la distribución y porcentaje de petróleo en que se aislaron los organismos se encuentran detallados en la tabla 4.

De las 13 cepas aisladas se obtuvo que siete corresponden a microorganismos aislados de medio de cultivo contaminado con HC, cuyas siglas corresponden a C1, C2, C3, C4, C5, C13 y C14. Los microorganismos que fueron aislados en medio de cultivo sin suplemento de petróleo corresponden a las siglas C6, C7, C8, C9 y C11.

Tabla 4. Sigla de las cepas aisladas, tipo de organismo, porcentaje de proliferación y localidad de muestreo en la región del Biobío.

Cepa	Organismo	Sector	% Petróleo Aislamiento
C1	Bacteria	Caleta Lenga	4 y 8 %
C2	Bacteria	Humedal de Lenga	1%
C3	Bacteria	Humedal de Lenga	1%
C4	Bacteria	San Vicente	2%
C5	Bacteria	Humedal de Lenga	1%
C6	Bacteria	Humedal de Lenga	0%
C7	Bacteria	Caleta Lenga	0%
C8	Bacteria	Humedal de Lenga	0%
C9	Bacteria	Caleta Lenga	0%
C11	Bacteria	Humedal Lenga	0%
C13	Bacteria	Caleta Lenga	10%
C14	Hongo	Humedal de Lenga	1%

En la Figura 5 se puede apreciar el crecimiento de una de las bacterias aisladas en el borde costero de San Vicente, medio que ha sido afectado por este contaminante orgánico y fueron cultivados en medios suplementados con diferentes porcentajes de

petróleo, lo cual posiblemente favorece la expresión de las enzimas involucradas en el metabolismo y selección de individuos tolerante al contaminante (Narváez-Flores y col., 2008).

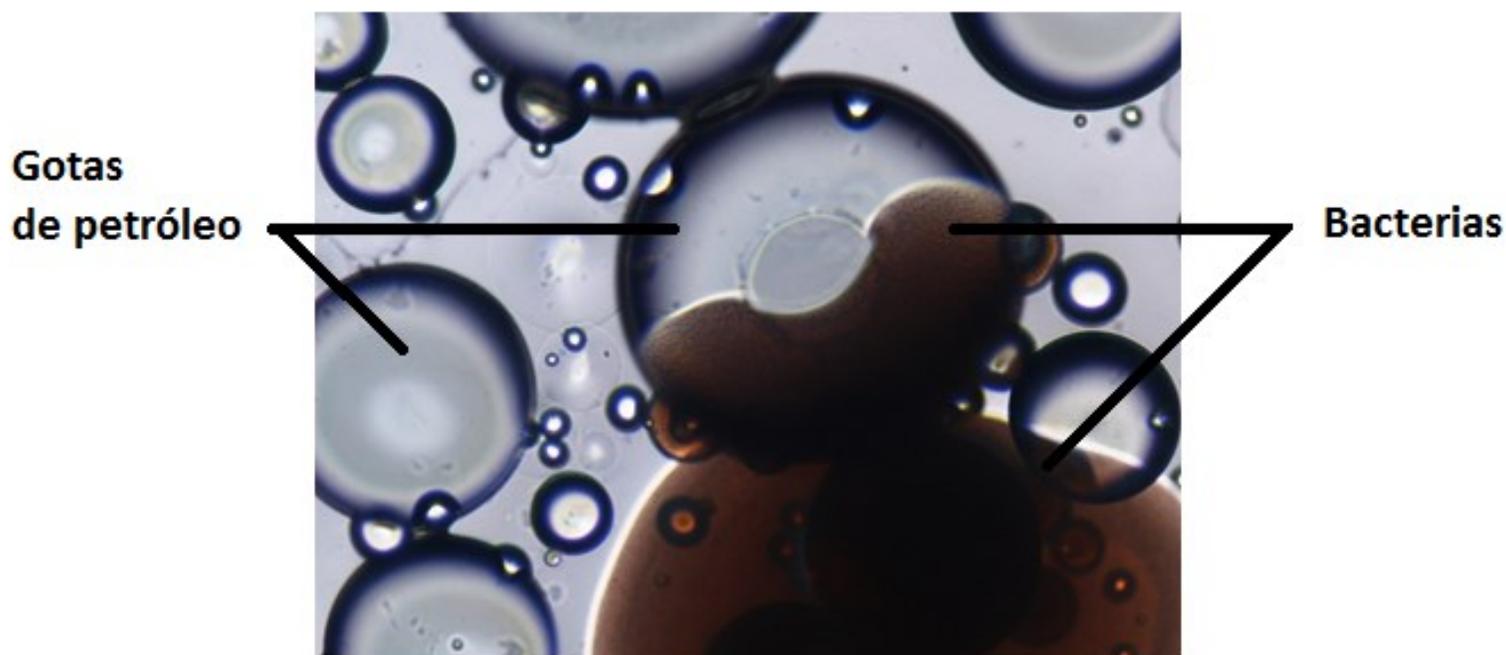


Figura 5. Crecimiento de la cepa C4 asociada a gotas de petróleo.

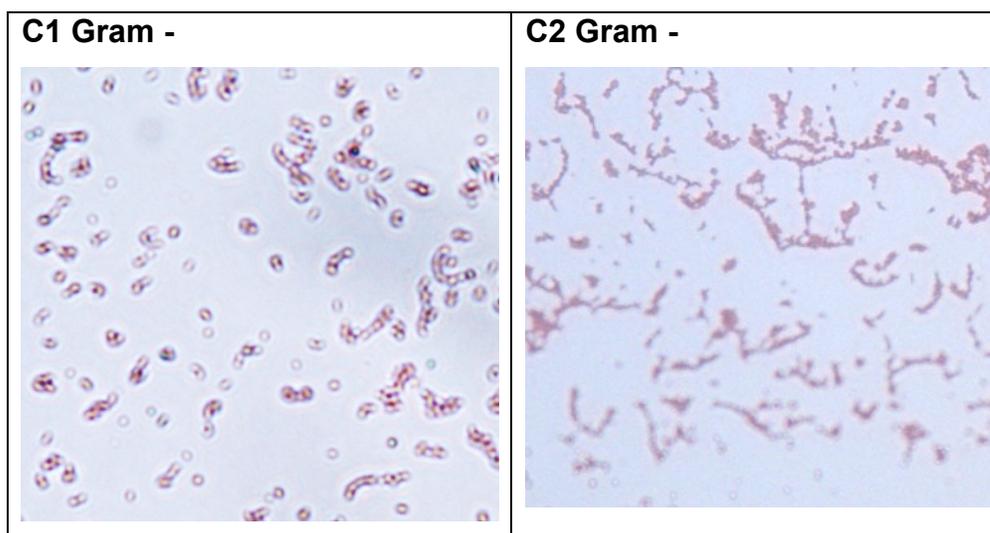
4.2 Caracterización e Identificación molecular de microorganismos

Los microorganismos fueron identificados como *Methylobacterium* sp., *Microbacterium* sp., *Phyllobacterium myrsinacearum*, y 1 cepa fúngica perteneciente a *Penicillium brevicompactum*, como se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Resultados de identificación molecular y tinción de gram de las cepas aisladas.

Cepa	Taxa	Gram	Código accesión	% similitud
C1	<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i>	-	<u>JX512224.1</u>	99
C2	<i>Microbacterium</i> sp.	-	<u>HQ018858.1</u>	99
C3	<i>Methylobacterium</i> sp.	+	<u>KJ184956.1</u>	99
C4	<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i>	-	<u>LN867225.1</u>	99
C5	<i>Microbacterium</i> sp.	-	<u>LN623621.1/HF585018.1</u>	99
C13	<i>Methylobacterium</i> sp.	+	<u>KJ184956.1</u>	98
C14	<i>Penicillium brevicompactum</i>	No figura	<u>JQ781717.1</u>	99

De las cepas bacterianas caracterizadas por tinción de Gram, dos de ellas corresponden a Gram positivas; C3, C13 y cuatro Gram negativas C1, C2, C4, C5 como se muestra en la Figura 6.



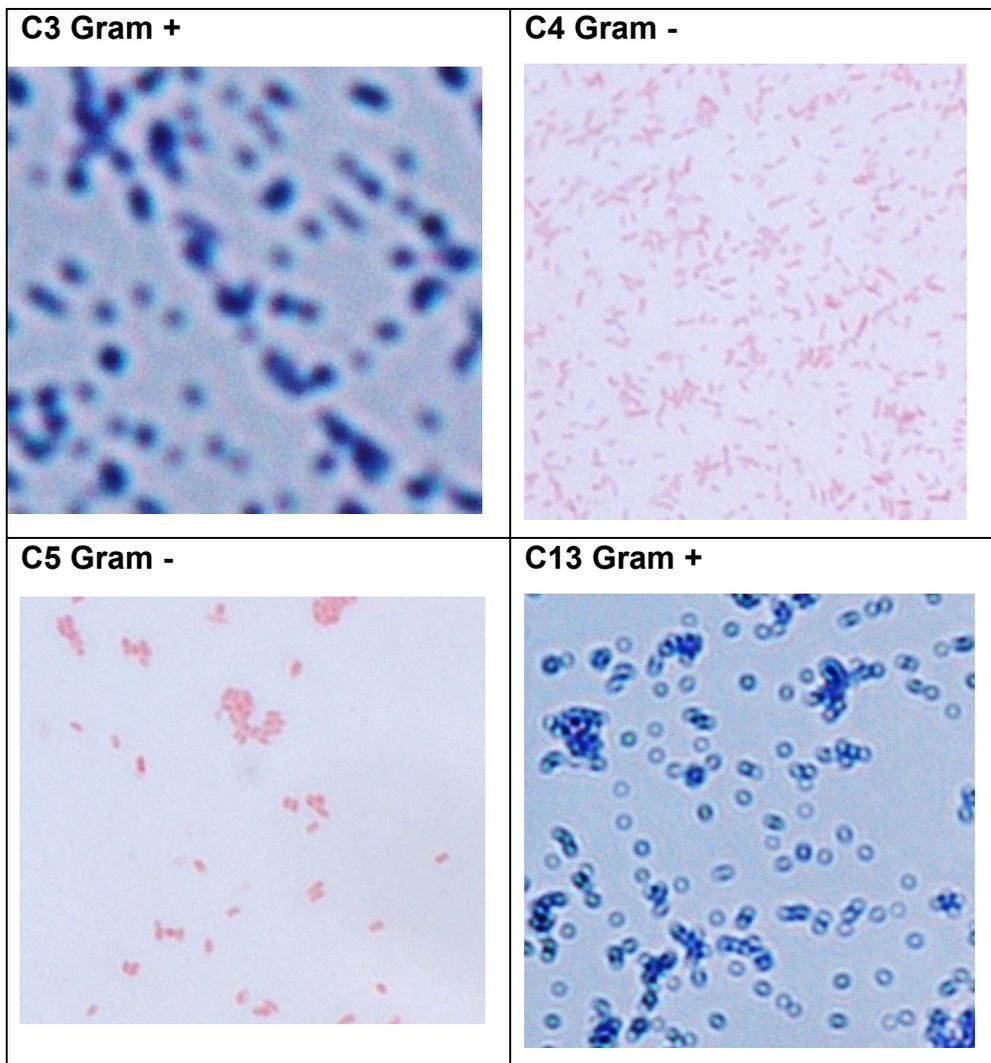


Figura 6. Resultados tinción de Gram. (Aumento 40x).

4.3 Viabilidad de los microorganismos en suelo contaminado.

En esta etapa se evaluó la capacidad de los microorganismos para sobrevivir bajo condiciones de suelo contaminado con HC de petróleo, es decir que pueden crecer a expensas de la utilización de estos componentes químicos.

La Figura 7 detalla las cepas que fueron viables durante los 3 periodos de evaluación de viabilidad, correspondientes a C1V3; C3V3; C4V3; C5V3; C14V1.

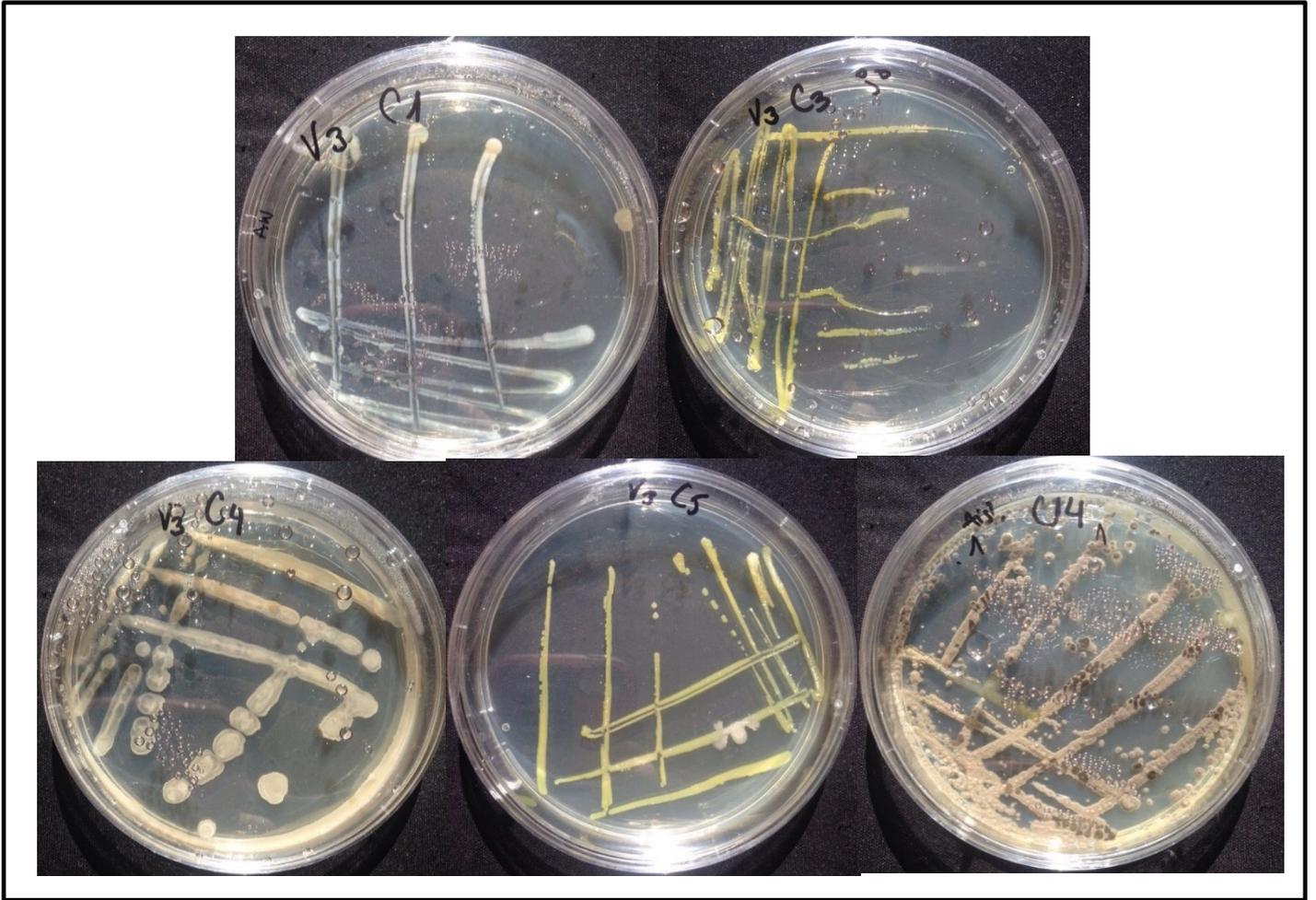


Figura 7. Resultados de viabilidad en el periodo de 1 mes.

4.4 Determinación de HC totales

Los resultados presentados a continuación son del análisis de HC totales, para las muestras de suelo que fueron suplementadas con 1% de petróleo. Como se puede observar en el Gráfico 1 los valores representan la cantidad de cadenas de HC por muestra de suelo para cada microorganismo.

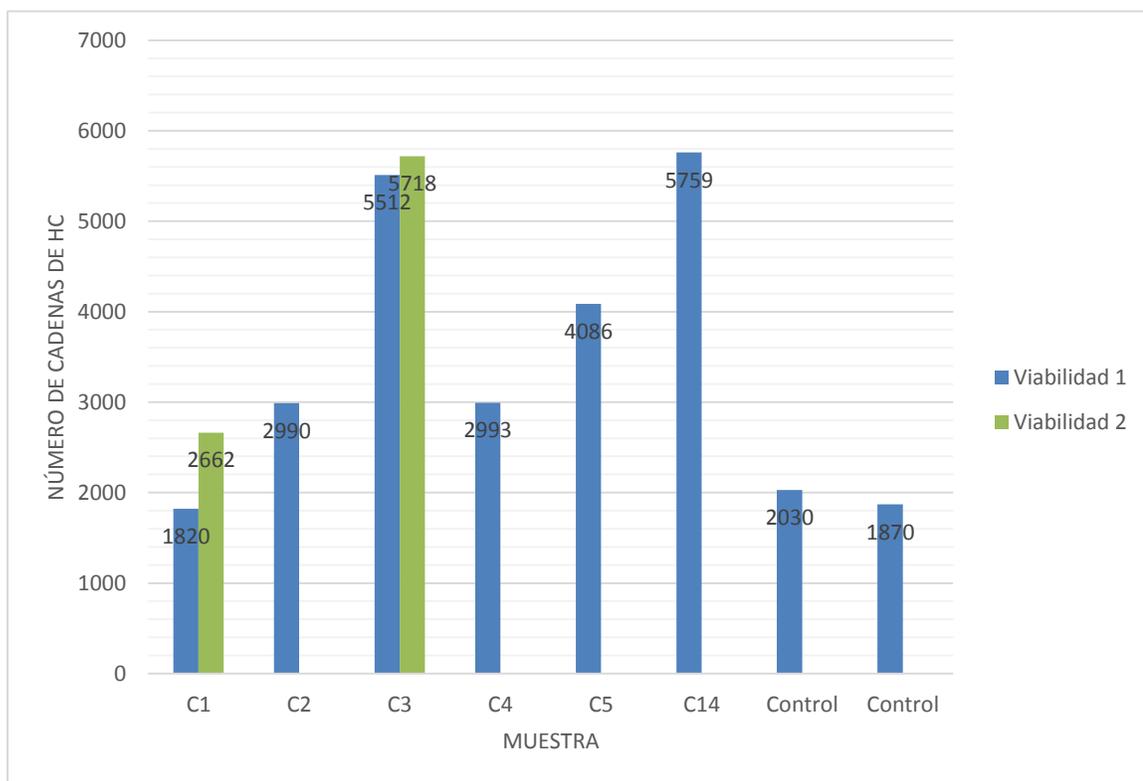


Gráfico 1. Representa el número de cadenas de HC para cada microorganismo. El color azul representa a C1, C2, C3, C4, C5 y C14 que proliferaron en una sola muestra de suelo y el color verde indica que C1 y C3 creció en una segunda muestra. Todas estas muestras fueron evaluadas por cromatografía de gases para la cuantificación de HC.

CAPITULO V. DISCUSION

Los resultados en este trabajo demostraron que las cuatro especies (*Phyllobacterium myrsinacearum*, *Microbacterium* sp., *Methylobacterium* sp., *Penicillium brevicompactum*) aisladas del borde costero de la región del Biobío son capaces de proliferar en medios contaminados con petróleo y posiblemente tienen el potencial de degradarlo. Además los resultados de esta investigación coinciden con trabajos obtenidos por otros investigadores, en donde Van Aken y col. (2004) demostraron que *Methylobacterium* sp. estaba involucrada en la biodegradación de HC policíclicos aromáticos. Posteriormente en un estudio realizado por Sirvastva y col. (2017) se aisló *Methylobacterium* sp. de suelo de arroz para ver su capacidad de crecer y degradar metano y compuestos orgánicos, donde se observó una degradación óptima de 80% de isopreno.

De la misma manera Chaineau y col. (1999) determinaron que los porcentajes de degradación para *Penicillium brevicompactum* en un periodo de 30 días es un 23% HC aromáticos. Pero hasta lo que se sabe no existe reporte de degradación

para las resinas y asfaltenos. Este hongo también ha sido aislado de suelos de talleres mecánicos y ha demostrado que puede emplearse para biorremediación ya sea individualmente o como un consorcio de degradadores (Makut y col., 2014).

Además, *Phyllobacterium myrsinacearum* fue aislada de aguas marinas donde se perforan pozos de petróleo y se demostró la capacidad de acelerar el proceso de degradación de HC (Russianpatents, 2016). En este estudio este microorganismo fue aislado desde el Puerto San Vicente y Caleta Lenga, en cuyo fondo marino se encuentran cañerías donde se realizan descargas de petróleo crudo y petróleo para combustible.

En contraste, *Microbacterium* sp. no ha sido aislada con frecuencia de nichos contaminados con petróleo (Hassanshahian y col., 2013; Mahjoubi y col., 2013), sino más bien desde hojas de leguminosas (Ali y col., 2012). En un estudio realizado por Rajei y col. (2011) esta cepa fue aislada de la rizósfera de la avena silvestre que estaba cultivada en suelo contaminado con petróleo y se determinó que en comunidad bacteriana tiene el potencial de biodegradar los alcanos y compuestos petroquímicos aromáticos.

En este estudio *Penicillium brevicompactum* y *Microbacterium* sp. fueron aislados desde el Humedal de Lenga. Igualmente *Methylobacterium* sp. que además fue aislada desde Caleta Lenga, aquí los ecosistemas son totalmente distintos donde el suelo por una parte es lodo y por otra parte es arena, donde el único factor en común es la presencia de HC.

Los microorganismos son el sistema biológico más pequeño y abundante del suelo y que por lo tanto, pueden adaptarse a cualquier condición. No obstante el tamaño de partícula de suelo tiene un gran impacto sobre la diversidad microbiana que el pH y cantidad de compuestos orgánicos (Sessitsch y col., 2001). Estudios en suelos con un tamaño de partícula pequeño como la arcilla, se han encontrado una gran diversidad de bacterias, pero en suelos con tamaño

de partícula mayores como la arena hubo una baja diversidad bacteriana (Sessitsch y col., 2001).

Lo que sustenta nuestro trabajo ya que el 58% de los microorganismos aislados fue desde el Humedal de Lenga con condiciones de suelo arcillosa y el 42% fue aislado de San Vicente y Caleta Lenga con condiciones de suelo arenosos. Si bien la calidad y pH del suelo a las que se evaluaron (7- 8,5) son totalmente distinto al que fueron aisladas, las cepas C1, C3, C4, C5 y C14 demostraron su capacidad de crecer bajo estas condiciones, en consecuencia estos organismos tienen mayor facilidad de adaptarse a condiciones adversas y masificarse en otro tipo de suelo.

En su gran mayoría las bacterias degradadoras de HC se encuentran en el grupo de Gram negativas (Ruberto y col., 2003), tal como las bacterias aisladas en este trabajo; *Phyllobacterium myrsinacearum* y *Microbacterium* sp. y que tuvieron mayor porcentaje de degradación.

Los resultados obtenidos demuestran que las cepas que están por sobre las muestras control son mejores degradadoras de HC, ya que estos microorganismos realizan una degradación parcial de los HC transformándolos en cadenas más pequeñas, por lo tanto en vez de tener una cadena larga de 40 carbonos, podemos encontrar dos o tres cadenas más cortas de carbonos. En cambio la cepa que se encuentra por debajo de la muestra control demuestra que no tiene potencial de degradar ya que su destrucción de HC sería nula.

Con esta técnica de CG solamente se obtuvieron datos de HC totales lo cual no permitió profundizar en qué tipos de HC se degradaron, ya sea para saber cuántas cadenas de N carbonos existen por muestra experimental. No obstante existen técnicas mucho más precisas como la Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas que en conjunto dan lugar a un método combinado permitiendo separar los componentes complejos de una mezcla teniendo la oportunidad de determinar las cantidades específicas de dichos componentes (Gutiérrez y Droguet, 2002).

Si bien los microorganismos pueden degradar una parte importante de petróleo, tienen preferencias por algunos HC, Cooney y col., (1985) reportaron diferentes factores que influyen en la degradación de HC, uno de los más importantes que limita la degradación de estos contaminantes de petróleo en el medio ambiente es su limitada disponibilidad de organismos, donde los compuestos de los HC del petróleo se unen a las partículas del suelo y son difíciles de ser eliminados. La degradación microbiana es posible debido a que los microorganismos tienen sistemas de enzimas para degradar y utilizar diferentes HC como fuentes de carbono y energía (Das y Chandran, 2011).

En consecuencia, los HC son susceptibles a la degradación microbiana, cuya susceptibilidad puede ser clasificada de la siguiente manera: alcanos lineales > alcanos ramificados > aromáticos de bajo peso molecular > cicloalcanos, (Ulrici, 2000; Perry, 1984). Algunos compuestos, tales como los HC policíclicos aromáticos de alto peso molecular, no se pueden degradar en absoluto (Atlas y Bragg, 2009).

Por lo tanto, si consideramos que estos microorganismos pese a que no son capaces de degradar completamente los HC, si lo hacen parcialmente, de esta manera pueden contribuir al proceso de eliminación de estos contaminantes. Además si estos microorganismos son asociados con otros que degraden HC más pequeños se genera un consorcio de biodegradación, el cual es más efectivo que un microorganismo individual.

Esto sería un gran aporte a la localidad ya que constantemente se encuentra propenso a ser contaminados por HC, no solo el nicho ecológico donde se aislaron los microorganismos, sino además puede ser utilizado en suelos de cultivo experimental al que fueron expuestos.

Cabe señalar que existen otras metodologías para aislar microorganismos degradadores de HC más estrictos, sin embargo la utilidad de este trabajo ha sido aislar microorganismos autóctonos que puedan cultivarse en medios tradicionales y que además tienen la capacidad de degradar HC, esto los hace

más factible para su manipulación, conservación y distribución (Houpikian y Raoult, 2002).

CAPITULO V. CONCLUSIONES

De las muestras de suelo de la Región del Biobío se aislaron 11 cepas bacterianas y una fúngica, de las cuales 5 de ellas proliferaron en medio de cultivo suplementado con petróleo. Estas cinco cepas fueron seleccionadas para la cinética degradativa del petróleo, donde algunos microorganismos tuvieron mayor potencial de degradación, identificados como *Methyobacterium* sp., *Phyllobacterium myrsinacearum* y *Penicillium brevicompactum*. Estos microorganismos degradan HC de manera parcial y en conjunto con un consorcio microbiano se pueden obtener mejores resultados de degradación de HC. Por lo tanto este trabajo entrega una herramienta de posibles microorganismos degradadores de petróleo autóctonos del borde costero de la Región del Biobío. Estos resultados son importantes para la localidad dado que existen pocas investigaciones de microorganismos tolerantes al petróleo en la zona. Considerando además que el Puerto de San Vicente y su entorno se encuentran en constante riesgo a sufrir vertidos de petróleo, hace que estos antecedentes sean un aporte para que puedan ser utilizados en futuras investigaciones de biorremediación en la zona de estudio. Aunque es importante comprobar con métodos más precisos qué tipo de HC pueden llegar a degradar estos microorganismos, los resultados obtenidos en este estudio nos permiten concluir que las cepas identificadas son capaces de degradar parcialmente los HC de petróleo.

CAPITULO VI. REFERENCIAS

1. Abalos, A., Viñas, M., Sabaté, J., Manresa, M. y Solanas, A. (2004). Enhanced biodegradation of Casablanca crude oil by a microbial consortium in presence of a rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. *Biodegradation*, 15,249-60.
2. Alexander, M. (1995). How toxic are toxic chemicals in soil?. *Environmental Science and Technology*, vol. 29, n°11, 2713–2717.
3. Alexander, M. (2000). Aging, Bioavailability, and Overestimation of Risk from Environmental Pollutants. *Environmental Science and Technology*, vol. 34, n° 20, 4259–4265.
4. Ali, N., Dashti, N., Al-Maillem, D., Eliyas, M. y Radwan, S. (2012). Indigenous soil bacteria with the combined potential for hydrocarbon consumption and heavy metal resistance. *Environ Sci Pollut Res Int* 19: 812-820.
5. Alvarez P.J., Vogel, T.M. (1991). Substrate interactions of benzene, toluene, and para-xylene during microbial degradation by pure cultures and mixed culture aquifer slurries. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 2981–2985.
6. Atlas RM. (1981), Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbial Rev.* 1981; 45:180-209.
7. Atlas, R. y Bragg, J. (2009). Bioremediation of marine oil spills: when and when not—the Exxon Valdez experience. *Microbial Biotechnology*, vol. 2, n°2, 213–221.

8. Atlas RM (2011). Oil Biodegradation and Bioremediation: A Tale of the Two Worst Spills in U.S. History. *Environ. Sci. Technol.* 2011, 45, 6709–6715.
9. Azubuike, C. C., Chikere, C. B., & Okpokwasili, G. C. (2016). Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 32(11), 180.
10. Barrios, Y. (2011). Biorremediación: a tool for the management of oil pollution in marine ecosystems. *Biotecnología aplicada* 2011;28:69-67.
11. Blackburn JW, Hafker WR. The impact of biochemistry, bioavailability and bioactivity on the selection of bioremediation techniques. *Trends Biotechnol.* 1993; 11:328-33.
12. Bragg J, Prince R, Harner E. y Atlas R. (2004). Effectiveness of bioremediation for the Exxon Valdez oil spill. Recuperado a partir de file:///C:/Users/Toshiba/Downloads/Effectiveness_of_bioremediation_for_the_Exxon_Vald.pdf
13. Bunster, J. (2013). ENAP. Memoria anual 2013. Recuperado a partir de file:///C:/Users/Toshiba/Downloads/MEMORIA%20(1).pdf
14. Cappello, S., Caruso, G., Zampino, D., Monticelli, L.S., Maimone, G., Denaro, R., Tripodo, B., Troussellier, M., Yakimov, M.M., Giuliano, L., 2007. Microbial community dynamics during assays of harbour oil spill bioremediation: a microscale simulation study. *J. Appl. Microbiol.* 102 (1), 184–194.
15. Cerniglia CE, Heitkamp ME. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) in the aquatic environment. In: Vaanasi U, editor. *Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon in the Aquatic Environment*. CRC Press Inc; Boca Raton: 1987. pp. 41–68.
16. Castro, G. (2007). Informe final, diseño monitoreo frente derrames de hidrocarburos.
17. CDE (2007). Consejo de defensa del estado. [En Línea] <www.cde.cl>.
18. Chaîneau, C., Morel, J., Dupont, J., Bury, E. y Oudot, J. (1999). Comparison of the fuel oil biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating

- microorganisms isolated from a temperate agricultural soil. *Sci. Total Environ.* 227:237–247.
19. Chaîneau, C., More, J. y Oudot, J. (2000). Biodegradation of fuel oil hydrocarbons in the rhizosphere of maize. *J Environ Quality.* 29:568–578.
 20. Chehregani, A., Malayeri, B., (2007). Removal of heavy metals by native accumulator plants. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 9, 462–465
 21. Chehregani, A., Mohsenzade, F., Vaezi, F., (2009). Introducing a new metal accumulator plant and the evaluation of its ability in removing heavy. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 72, 1349–1353.
 22. Christon, J., Hurst, G., y Knudeen, R. (1997). Manual of environmental microbiology. American Society for Microbiology. ASM Press., Washington. 1138 p.
 23. Chuecas, L. (1989). Contaminación por metales pesados en el litoral de la región del Bío-Bío, Concepción, Chile: el caso del mercurio y el cadmio. *Amb. y Des.*, vol. 1, páginas 137-145.
 24. Cooney, J., Silver, S., y Beck, B. (1985). “Factors influencing hydrocarbon degradation in three freshwater lakes,” *Microbial Ecology*, vol. 11, n°2, 127–137.
 25. Das, N. y Chandran, P. (2011). Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International*, vol. 2011, 13.
 26. Deng, M.C., Li, J., Liang F., Yi, M., Xu, X.M., Yuan, J.P., Peng, J., Wu, CF., Wang, JH (2014). Isolation and characterization of a novel hydrocarbon-degrading bacterium *Achromobacter* sp. HZ01 from the crude oil-contaminated sea water at the Daya Bay, southern China. *Marine Pollution Bulletin* 83, 79–86.
 27. Dominguez-Rosado, E., Pichtel, J. (2004). Phytoremediation of soil contaminated with used motor oil: II. Greenhouse studies. *Environmental Engineering Science.* 21:169–180.

28. Espinoza, C. (2014, Octubre 12). Los peores desastres ambientales del país. [En línea]. La Tercera. <<http://www.latercera.com/noticia/tendencias/2014/10/659-599814-9-los-peores-desastres-ambientales-del-pais.shtml>>. [2015, Marzo 14].
29. Gkorezis P, Daghighi M, Franzetti A, Van Hamme JD, Sillén W and Vangronsveld J (2016) The Interaction between Plants and Bacteria in the Remediation of Petroleum Hydrocarbons: An Environmental Perspective. *Front. Microbiol*
30. Glazer, A., Nikaido, H., (1995). *Microbial Biotechnology – Fundamentals applied of microbiology*. New York: WH Freeman and Company Editors.
31. Guidance for Remediation of Petroleum Contaminated Sites 2016. Department of Ecology State of Washington. Recuperado a partir de <https://fortress.wa.gov/ecy/publications/SummaryPages/100957.html>
32. Gutiérrez, M.C, Droguet, M (2012). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes del mal olor.
33. Hassanshahian, M., Ahmadinejad, M., Tebyanian, H., Kariminik, A. (2013) Isolation and characterization of alkane degrading bacteria from petroleum reservoir waste water in Iran (Kerman and Tehran provenances). *Mar Pollut Bull* 73: 300-305.
34. Higgins, I. y Burns, R. (1975). *The chemistry and microbiology of pollution*. Academic Press, London, UK. VIII edition. 248 p.
35. Hogg, J. y Lehane, M. (1999). Identification of bacterial species associated with the sheep scab mite (*Psoroptes ovis*) by using amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:4227–9.
36. Holliger, C., Gaspard, S., Glod, G., Heijman, C., Schumacher, W., Schwarzenbach, R.P. y Vazquez, F. (1997). Contaminated environments in the subsurface and bioremediation: organic contaminants, *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 20, no. 3-4, pp. 517–523.

37. Houpikian, P., & Raoult, D. (2002). Traditional and Molecular Techniques for the Study of Emerging Bacterial Diseases: One Laboratory's Perspective. *Emerging Infectious Diseases*, 8(2), 122–131.
38. Iffis, B., St-Arnaud, M. y Hijri, M. (2014). *Bacteria* associated with arbuscular mycorrhizal fungi within roots of plants growing in a soil highly contaminated with aliphatic and aromatic petroleum hydrocarbons. *FEMS Microbiology Letters*, 358(1), 44–54.
39. Instituto Mexicano del Petróleo (2006). Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. México, D.F.
40. Irrázabal, R. (2011). Informe del estado del medio ambiente. Informe ejecutivo. Recuperado a partir de http://www.mma.gob.cl/1304/articles-52016_resumen_ejecutivo2011.pdf
41. ITOPF, 2011. Efectos de la contaminación por hidrocarburos en el medio marino; pp. 1-11.
42. Jafari, B., Hanifehzadeh, M., Jalali, M. y Habibi, E. (2011). Molecular Detection of Petroleum Bacteria from Kaleybar Soils by PCR Method. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*, 1(11)507-511.
43. Jones, J., Knight, M. y Byron, J. (1970). Effect of gross population by kerosene hydrocarbons on the microflora of a moorland soil. *Nature*, vol. 227, p. 1166.
44. Juhasz AL, Naidu R. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International J of Biodet Biodeg*. 1996;45:57–88.
45. Kaifer, M., Aguilar, A., Arana, A., Balseiro, C., Torá, I., Caleyá, J. y Pijls, C. (2004). Guía de Tecnologías de Recuperación de Suelos Contaminados. Comunidad de Madrid, Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio. Madrid. 175 pp.
46. Karlsen, D. y Larter, S. (1991). Analysis of petroleum fractions by TLC-FID: applications to petroleum reservoir description. *Org. Geochem*. 17: 603-617.
47. Kingston, P. (2007). Long-term environmental impact of oil spills. *Spill Sci Technol Bull*, 7:53–61

48. Kovalchuk, I. (2010). Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International*, vol. 2011, páginas 1-13.
49. Leahy, J. y Colwell, R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*, vol. 54, n° 3, 305–315.
50. Leblond, D. (2008). Total world oil output to reach 95 million b/d by 2020. *Oil Gas J*, 106, 32–33.
51. López, L., Hernandez, M., Colín, C., Ortega, S., Cerón, G. y Franco, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación de Discapacidad Vol. 3*, 10-18.
52. Lu, L., Huggins, T., Jin, S., Zuo, Y., and Ren, Z. J. (2014). Microbial metabolism and community structure in response to bioelectrochemically enhanced remediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil. *Environ. Sci. Technol.* 48, 4021–4029. doi: 10.1021/es405790
53. Macías, F. (1993). Contaminación de suelos: algunos hechos y perspectivas. *Problemática Geoambiental y Desarrollo*, Tomo I, pp. 53-74. V Reunión Nacional de Geología Ambiental y Ordenación del Territorio. Murcia.
54. Madigan, M., Martinko, J. y Parker, J. (1999). *Brock Biología de los microorganismos*. Octava edición. Prentice may Iberia, Madrid. 1064 p
55. Madigan, M., Martinko, J. y Parker, J. (2004). *Brock. Biología de los microorganismos*. Decima edición. PEARSON EDUCACIÓN, S.A., Madrid, 2004.
56. Mahjoubi, M., Jaouani, A., Guesmi, A., Ben Amor, S., Jouini, A., Cherif, H., Najjari, A., Boudabous, A., Koubaa, N. y Cherif, A. (2013). Hydrocarbonoclastic bacteria isolated from petroleum contaminated sites in Tunisia: isolation, identification and characterization of the biotechnological potential. *N Biotechnol* 30: 723-733.
57. Maier, R. (2000). Microorganisms and organic pollutants. *Environmental Microbiology*. San Diego, CA: Academic Press, 363-400.
58. Makkar, R. y Rockne, K. (2003). Comparison of Synthetic Surfactants and Biosurfactants in Enhancing Biodegradation of Polycyclic Aromatic

- Hydrocarbons. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 22, No. 10, pp. 2280–2292, 2003.
59. Makut y col., (2014). Utilization of petroleum products by fungi isolated from the soil environment of Keffi Metropolis, Nasarawa State Nigeria. *International Journal of Security and Networks*, 5 (2) : 222-225.
60. Maletić, S., Dalmacija, B. y Roncevic, S. (2013). Petroleum Hydrocarbon Biodegradability in Soil – Implications for Bioremediation. *University of Novi Sad Faculty of Sciences, Department of Chemistry*.
61. Martins, A., Dinardi, A., Formagi, V., Lopes, T., Barros, R., Coneglian, C., Brito, N., Sobrinho, G., Tonso, S. y Pelegrini, R. (2012). Biorremediação. III Fórum de Estudos Contábeis, Faculdades Integradas Claretianas, Rio Claro, SP. Recuperado a partir de www.ceset.unicamp.br/lte/artigos/3fec2401.
62. McGenity, TJ, Folwell, BD., McKew, BA. y Sanni, GO. (2012). Marine crude-oil biodegradation: a central role for interspecies interactions. *Aquatic Biosystems* 8:10. Recuperado a partir de <http://www.aquaticbiosystems.org/content/8/1/10>
63. Medina-Bellver, JI., Marin, P., Delgado, A., Rodriguez, A., Reyes, E., Ramos, JL. y Marqués, S. (2005). Evidence for *in situ* crude oil biodegradation after the *Prestige* oil spill. *Environmental microbiology* vol 7, pp 757-908.
64. Mercado, F. Contaminantes orgánicos volátiles.
65. Merkel, N., Schultze-Kraft, R., Infante, C. (2005). Assessment of tropical grasses and legumes for phytoremediation of petroleum-contaminated soils. *Water Air Soil Pollut*, 165:235–242.
66. Merkel, N., Schultze-Kraft, R., Infante, C., (2004). Phytoremediation of petroleum-contaminated soils in the tropics—preselection of plant species from eastern Venezuela. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 78, 185–192.
67. Mohsenzadeh, F., Nasser, S., Mesdaghinia, A., Nabizadeh, R., Zafari, D., Khodakaramian, G. y Chehregani, A. (2010). Phytoremediation of petroleum-polluted soils: application of *Polygonum aviculare* and its root-associated (penetrated) fungal strains for bioremediation of petroleum-polluted soils. *Ecotox Environ Saf.* 73:613–619.

68. Mohsenzadeh, F., Chehregani Rad, A. y Acabari, M. (2012). Evaluation of oil removal efficiency and enzymatic activity in some fungal strains for bioremediation of petroleum-polluted soils. *Iranian Journal of Environmental Health Sciences Engineering* 2012 9:26.
69. Montenegro, F. (2007). Aislamiento y selección de cepas bacterianas nativas de suelos de las XII región de Chile, para la degradación de crudos de petróleo.
70. Moreno, P. (2014). Nuestro mar. Recuperado a partir de <http://www.revistanuestromar.cl/nm/wp-content/uploads/2014/10/PDF-NUESTRO-MAR-OCTUBRE-en-baja.pdf>.
71. Narváez-Flores, S., Gomez, L., y Martinez, M. (2008). Selección de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos aisladas a partir de sedimentos del caribe colombiano. *Boletín de investigaciones marinas y Costeras*, vol.37, n.1, 61-75.
72. N
73. Ortiz, I., Snaz, J., Dorado, M. y Villar, S. (2007). Técnicas de recuperación de suelos contaminados. Informe de vigilancia tecnológica. Biblioteca virtual de la consejería de educación de la comunidad de Madrid.
74. Pala, D.M., de Carvalo, D.D, Pinto, JC., Sant Anna, JR. (2006). A suitable model to described bioremediation of a petroleum-contaminated soil. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 58(3-4), 254-260.
75. Perry, J. (1984). Microbial metabolism of cyclic alkanes, in *Petroleum Microbiology*, R. M. Atlas, Ed., 61–98, Macmillan, New York, NY, USA.
76. Petti, C. (2007). Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *CID*, 44: 1108-14.
77. Pinholt, Y., Struwe, S. y Kjoller, A. (1979). Microbial changes during oil decomposition in soil. *Holarctic Ecology*, vol. 2, pp. 195–200.
78. Prasad, K., Kumar, N., Sharma, S. (2010). Bioremediation: Developments, current practices and perspectives. *Genet Eng Biotechnol J.*, 1-20.
79. Prince, R. (2005). *Petroleum Microbiology*, 317-336. American Society of Microbiology Press, Washington DC.

80. Radwan, S., Al-Awadhi, H., Sorkhoh, N. y El-Nemer, I. (1998). Rhizospheric hydrocarbon-utilizing microorganisms as potential contributors to phytoremediation for the oily Kuwait desert. *Microbiol Res.* 153:247–251.
81. Reddy, K., Admas, J. y Richardson, C. (1999). Potential technologies for remediation of Brownfield. *Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management*, 3 (2): 61-68.
82. Reid, G. y Wong, P. (2005). Soil bacteria. Profitable and sustainable primary industries. *Soil Biology basics*.
83. Reyes, C. (2015). Biobiochile.cl. Recuperado a partir de <http://www.biobiochile.cl/2015/10/21/rotura-de-manguera-provoco-derrame-de-diesel-en-bahia-de-san-vicente-en-talcahuano.shtml>
84. Rodicio, M. y Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 22: 238-45.
85. Ruberto, L., Vázquez, S. y Mac Cormack, W. (2003). Effectiveness of the natural bacterial flora. Biostimulation and bioaugmentation on the bioremediation of a hydrocarbon contaminated Antarctic soil. *Internat. Biodeter. Biodegr.*, 52: 115-125.
86. Sánchez, J. y Rodríguez, J. (S.F). Biorremediación. Fundamentos y aspectos microbiológicos.
87. Santiesteban, A. (1969). Qué es el petróleo. La Habana: Instituto del Libro.
88. Semple, K., Morris, A. y Paton, G. (2003). Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: fundamental concepts and techniques for analysis. *European Journal of Soil Science*, vol. 54, 809-818.
89. Semple, K., Reid, B. y Fermor, T. (2001). Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Environmental Pollution*, vol. 112, n° 2, 269-283.
90. Seo, JS., Keum, YS., Li, QX. (2009). Bacterial degradation of aromatic compounds. *International Journal Environmental Research Public Health*.

91. Sessitsch, A., Weilharter, A., Gerzabek, M., Kirchmann, H. y Kandeler, E. (2001). Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4215-4224.
92. Silva, D., Zagatto, P., Guardani, R., Nascimento, C. (2004). Remediação de Solos Contaminados com Linear Alquil Benzenos Usando Reagentes de Fenton. COBEQ.
93. Smith, A. y Hussey, M. (2013). Los protocolos de tinción de Gram. *American society for microbiology*. Recuperado a partir de <http://www.microbelibrary.org/component/resource/gram-stain/2886-gram-stain-protocols> .
94. Smith, E., Thavamani, P., Ramadass, K., Naidu, R., Srivastava, P., and Megharaj, M. (2015). Remediation trials for hydrocarbon-contaminated soils in arid environments: evaluation of bioslurry and biopiling techniques. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 101, 56–65.
95. Soil Bioremediation. EPA Guidelines 2005. Environment Protection Authority. Recuperado a partir de www.epa.sa.gov.au
96. Solanas, A. M. (2009). La biodegradación de hidrocarburos y su aplicación en la biorremediación de suelos. Estudios en la Zona no Saturada del Suelo. Vol IX.
97. Solís, L. (2005). Degradación de petróleo por hongos aislados desde suelos de la XII región de Chile contaminados con hidrocarburos. Recuperado a partir de <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2005/fcs687d/pdf/fcs687d.pdf>.
98. Sousa, A., Pereira, R., Antunes, S.C., Cachada, A., Pereira, E., Duarte, A.C., Gonçalves, F. (2008) Validation of avoidance assays for the screening assessment of soils under different anthropogenic disturbances. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71,661-670.
99. Stroud, J., Paton, G. y Semple, K. (2007). Microbe–aliphatic hydrocarbon interactions in soil: implications for biodegradation and bioremediation. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 102, n° 5, 1239–1253.

100. Stroud, J., Paton, G. y Semple, K. (2009). Predicting the biodegradation of target hydrocarbons in the presence of mixed contaminants in soil. *Chemosphere*, vol. 74, n° 4, 563–567.
101. Tanda, J. y Abbott, S. (2007). 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *J Clin Microbiol*, 45: 2761-4.
102. Toxicological Profiles for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. TP-90-20, 1990.
103. Ulrici, W. (2000). Contaminant soil areas, different countries and contaminant monitoring of contaminants in Environmental Process II. Soil Decontamination Biotechnology, Rehm, H. y Reed, G., vol. 11, 5–42.
104. Van Aken, B., Peres, C., Doty, S., Yoon, J., Schnoor, J., (2004). *Methylobacterium populi* sp. nov., a novel aerobic, pink-pigmented, facultatively methylotrophic, methane-utilizing bacterium isolated from poplar trees (*Populus deltoides*xnigra DN34). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 1191-1196.
105. Van Hamme, Singh A, Ward O (2003). Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiological and molecular biology reviews*. 67:503-549.
106. Varnero, T. (2006). Bacterias en ambiente terrestre. Diversidad de especies: Patrimonio y desafíos. Cap. 2, CONAMA primera edición, 383-385.
107. Whyte, L., Greer, C. y Inniss, W. (1996). Assessment of the biodegradation potential of psychrotrophic microorganisms. *Can. J. Microbiol.*, 42: 99-106.
108. Wilson SC, Jones KC. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Env Pollut*. 1993;81:229–249.
109. White, T.J, Bruns, T., Lee, S. y Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH. And White T.J. (ed.) PCR protocols. Academic Press San Diego, CA, USA, pp. 315-322.

110. Wiltse, C., Rooney, W., Chen, Z., Schwab, A. y Banks, M. (1998). Greenhouse evaluation of agronomic and crude oil-phytoremediation potential among alfalfa genotypes. *J Environ Quality*. 27:169–173.
111. Zylstra, G., Kukor, J. (2005). What is environmental biotechnology? *Curr Opin Biotech*, 16(3), 243-5.