



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO
UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
PROGRAMA CONJUNTO DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA

EFFECTO DE LA BIOESTIMULACIÓN CON SAPONINAS DE *Quillaja saponaria*
Molina Y LA BIOAUMENTACIÓN CON UN CONSORCIO BACTERIANO SOBRE
LA DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS Y LAS COMUNIDADES
MICROBIANAS EN AGUA MARINA CONTAMINADA

Tesis presentada para la obtención del Grado Académico
DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

Bárbara Belén Barra Sanhueza

Dr. Michael Seeger Pfeiffer
Profesor Guía

Julio, 2019

RESUMEN

La contaminación por hidrocarburos en ambientes marinos es una problemática mundial. La necesidad de remediar los sitios contaminados ha llevado al desarrollo de nuevas tecnologías que permitan atenuar el daño y colaborar con la estabilidad del medio ambiente. Las estrategias de biorremediación constituyen una tecnología alternativa a los métodos físico-químicos de remediación, que también generan un impacto negativo en las zonas afectadas. La biorremediación utiliza las capacidades catabólicas de los microorganismos para la remoción de compuestos contaminantes. Un factor limitante en el proceso de degradación de 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 nativa del ambiente impactado. La utilización de biosurfactantes es una alternativa para aumentar la biodisponibilidad de los hidrocarburos. Las saponinas son surfactantes sintetizados por diversas especies vegetales. En esta tesis se propuso como hipótesis que la bioestimulación con saponinas de *Quillaja saponaria* Molina y la bioaumentación con un consorcio bacteriano incrementa la degradación de hidrocarburos y la abundancia de bacterias hidrocarbonoclasticas en las comunidades bacterianas en agua marina contaminada. Los objetivos específicos fueron: (1) aislar y caracterizar cepas hidrocarbonoclasticas desde sedimentos marinos de Chile central, (2) establecer un consorcio bacteriano hidrocarbonoclastico y estudiar el efecto de su inmovilización sobre la efectividad de la degradación de hidrocarburos de petróleo, (3) evaluar el efecto de la bioestimulación con saponinas de *Quillaja saponaria* Molina y de la bioaumentación con el consorcio bacteriano sobre la degradación de hidrocarburos en agua marina contaminada a escala de microcosmos y (4) determinar el efecto de la bioestimulación con saponinas de *Quillaja saponaria* Molina y de la bioaumentación con el consorcio bacteriano sobre la degradación de hidrocarburos y las comunidades microbianas en agua marina contaminada a escala de mesocosmos. Se obtuvieron 167 aislados genotipificados a partir de sedimentos marinos contaminados por hidrocarburos de petróleo de la caleta Lengua y la bahía de Quintero. Cuatro cepas bacterianas fueron seleccionadas para ser empleadas en ensayos de biorremediación en agua de mar, debido a su capacidad de

utilizar diferentes hidrocarburos como única fuente de carbono en condiciones salinas. Las cepas bacterianas *Pseudarthrobacter* sp. LD52b, *Micrococcus* sp. LD135, *Alcaligenes* sp. QD168 y *Dietzia* sp. LD181, están filogenéticamente relacionados a *Pseudarthrobacter equi*, *Micrococcus aloeverae*, *Dietzia kunjomensis* y *Alcaligenes aquatilis* corroborado mediante análisis de la secuencia del gen ARNr 16S. Se evaluó el efecto de la bioestimulación con saponinas de *Quillaja saponaria* Molina y la bioaumentación con el consorcio bacteriano hidrocarbonoclástico sobre la degradación de hidrocarburos y la abundancia de las comunidades bacterianas en agua marina contaminada a escala de micro- y mesocosmos. Se probaron las cuatro cepas bacterianas inmovilizadas en perlas de quitosano y libres a escala de microcosmos en sistemas de 1,5 L con medio mínimo Bushnell-Haas con agua de mar artificial y diésel 1% vv⁻¹. La degradación de hidrocarburos fue evaluada mediante GC-FID. Se observó un 90,7% de degradación de hidrocarburos (C10-C25) a los 31 d en el sistema inoculado con células libres y bioestimulado con saponinas de quillay, alcanzando 10⁹ UFC mL⁻¹ hasta los 31 d. Por su parte, el sistema inoculado con el consorcio inmovilizado y bioestimulado con saponinas mostró una disminución equivalente a un 40% de degradación de hidrocarburos (C10-C25), alcanzando 10⁹ UFC mL⁻¹ a los 13 d. Se realizó un ensayo a escala de mesocosmos, mediante sistemas de 15 L de agua de mar contaminada con diésel 1% vv⁻¹ durante 30 días a 14°C. La evaluación de la dinámica de las comunidades, se realizó mediante secuenciación masiva MiSeq. La relación C18/fitano en el sistema bioaumentado y bioestimulado disminuyó en el tiempo, alcanzando un 58 y 82% de biodegradación de hidrocarburos a los 30 y 158 d, respectivamente. En el sistema bioaumentado y bioestimulado se observó que el género *Alcanivorax* aumentó de 0,5 a 36,5%, en tanto *Alcaligenes* perteneciente al consorcio aumentó a 84% después de inocular, disminuyendo la última semana a 27%. La bioestimulación con saponinas de quillay aumentó la biodisponibilidad de los hidrocarburos y su degradación, favoreciendo la diversidad bacteriana en sistemas a escala de mesocosmos. La bioestimulación con saponinas de quillay y la bioaumentación con el consorcio bacteriano hidrocarbonoclástico, aumentó la degradación de hidrocarburos y la abundancia de bacterias hidrocarbonoclásticas en las comunidades bacterianas en agua marina contaminada.

ABSTRACT

Hydrocarbon pollution in marine environments is a worldwide problem. The urge to remedy polluted sites have led to the development of new technologies to mitigate the damage and contribute to the environment stability. Bioremediation strategies constitute an alternative technology to physical-chemical methods of remediation, which also generate a negative impact in the affected areas. Bioremediation uses the catabolic capacities of microorganisms for the removal of contaminating compounds. A limiting factor in the degradation process of petroleum hydrocarbons is their bioavailability. The hydrophobicity of hydrocarbons prevents them from being available to be captured and metabolized by the native microbiota of the impacted environment. Biosurfactant usage is an alternative to increase the bioavailability of hydrocarbons. Saponins are surfactants synthesized by various plant species. The hypothesis of this work states that the biostimulation with saponins of *Quillaja saponaria* Molina and the bioaugmentation with a bacterial consortium increases the hydrocarbons-degradation and the abundance of hydrocarbonoclastic bacteria in bacterial communities in polluted seawater. The aims of this thesis were: (1) to isolate and characterize hydrocarbonoclastic strains from marine sediments of central Chile, (2) to establish a hydrocarbonoclastic bacterial consortium and to study the effect of its immobilization on the effectiveness of the degradation of petroleum hydrocarbons, (3) to evaluate the effect of the biostimulation with saponins of *Quillaja saponaria* Molina and the bioaugmentation with the bacterial consortium on the degradation of hydrocarbons in polluted seawater at the microcosm scale and (4) to determine the effect of the biostimulation with saponins of *Quillaja saponaria* Molina and the bioaugmentation with the bacterial consortium on the degradation of hydrocarbons and microbial communities in polluted seawater at the mesocosm scale. 167 genotyped isolates were obtained from marine sediments polluted by petroleum hydrocarbons from the Lenga creek and the Quintero bay. Four bacterial strains were selected to be used in bioremediation trials in seawater, due to their ability to use a wide range of hydrocarbons as sole carbon source in saline conditions. Bacterial strains *Pseudarthrobacter* sp. LD52b, *Micrococcus* sp. LD135, *Alcaligenes* sp. QD168 and *Dietzia* sp. LD181, are phylogenetically related to *Pseudarthrobacter equi*, *Micrococcus aloeverae*, *Dietzia kunjamensis* and *Alcaligenes aquatilis* by 16S

rRNA sequence analysis. The effect of the biostimulation with saponins of *Quillaja saponaria* Molina and the bioaugmentation with the hydrocarbonoclastic bacterial consortium on the degradation of hydrocarbons and the abundance of the bacterial communities in polluted seawater were evaluated at the micro- and mesocosm scale. A bacterial consortium composed of four bacterial strains immobilized in chitosan beads or as free cells were tested at microcosm scale in 1.5 L systems with Bushnell-Haas minimum medium with artificial seawater and 1% vv⁻¹ diesel. The degradation of hydrocarbons was evaluated by GC-FID. A 90.7% degradation of hydrocarbons (C10-C25) was observed at 31 d in the system inoculated with free cells and biostimulated with quillay saponins, reaching 10⁹ CFU mL⁻¹ until 31 d. On the other hand, the system inoculated with the immobilized and biostimulated consortium with saponins showed a decrease equivalent to 40% of hydrocarbon degradation (C10-C25), reaching 10⁹ CFU mL⁻¹ at 13 d. A mesocosm scale test was carried out using systems of 15 L of seawater spiked with 1% vv⁻¹ diesel for 30 days at 14 °C. The evaluation of bacterial community dynamics was carried out through 16S rRNA amplicon sequencing by Illumina Miseq. The C18-phytane relationship in the bioaugmented and biostimulated system decreased over time, reaching 58 and 82% of biodegradation of hydrocarbons at 30 and 158 d, respectively. In the bioaugmented and biostimulated systems, the genus *Alcanivorax* increased from 0,5 to 36.5%, while *Alcaligenes* belonging to the hydrocarbonoclastic consortium increased to 84% after inoculation, decreasing to 27% by the last week. Biostimulation with quillay saponins increased the bioavailability of hydrocarbons and their degradation, favoring bacterial diversity in mesocosm scale systems. Biostimulation with quillay saponins and bioaugmentation with the hydrocarbonoclastic bacterial consortium increased the degradation of hydrocarbons and the abundance of hydrocarbonoclastic bacteria in bacterial communities in polluted seawater.