



## **Katalyxys**

*Caracterización microbiológica de cepas resistentes a hidrocarburos y  
evaluación de su capacidad degradadora de combustibles fósiles.*

**Participantes:** Hillary Sánchez, Martina Garrido y Alejandra Cuervo.

**Profesora tutora:** Macarena Álvarez.

**Curso:** I° Medio STEM.

**Fecha de entrega:** 07 de noviembre de 2025.

## **Abstract**

The project - Katalyxys - is focused on the research and microbiological characterization of local bacterial strains that are capable of resisting and degrading hydrocarbons that are present on commercial fossil fuels like diesel, gasoline, and motor oils.

The contamination by fossil fuels of the automotive industry is making an alarming problem, for the reason that it is composed of hydrocarbons, which have a significant persistence in the environment. This contamination has a direct impact on agricultural sectors, ecosystems, and water resources.

In Chile, where the subterranean water sources are an essential source for the contribution of taking water for human consumption, irrigation, livestock, and agriculture, the infiltration of contaminating elements and overexploitation of aquifers represent critical threats to food security, public health, and the agricultural economy.

The main objective of this investigation is to identify, characterize, isolate, and evaluate bacterial strains with the capacity of resisting an environment with hydrocarbons present and degrade them as the only carbon source for them to survive, proposing their application in the bioremediation of contamination by leaks of fossil fuels.

The process includes recollection, characterization, and laboratory testing of the isolated strains. The methodology is based on different steps, like the recollection and non-selective culture of the found strains in specific situations. Therefore, the isolation of those pathogen agents grown in the plates specifies their characteristics that make them different from each other. Finally, with all the information collected, analyze the obtained results to generate the conclusions and the respective discussion about the work.

This investigation has the objective of looking for and offering a sustainable and efficient solution for the problem that was detected, starting from the region of Ñuble, a territory with high agricultural productivity and relevance, apart from the low control in the good management of derived hydrocarbons from petroleum.

## **Abstract en español**

El proyecto Katalyxys se centra en la búsqueda y caracterización microbiológica de cepas bacterianas locales con capacidad de resistencia y degradación de hidrocarburos presentes en combustibles fósiles comerciales como diésel, bencina y aceite de motor.

La contaminación por combustibles fósiles de la industria automotriz es un problema alarmante ya que al estar compuestos por hidrocarburos tienen una persistencia significativa en el medio ambiente, ya que esta contaminación impacta directamente en sectores agrícolas, ecosistemas y recursos hídricos.

En Chile, donde las napas subterráneas constituyen una fuente esencial de agua para consumo humano, riego y ganadería, la infiltración de contaminantes y la sobreexplotación de acuíferos representan amenazas críticas para la seguridad alimentaria, la salud pública y la economía agrícola.

El objetivo principal de esta investigación es identificar, caracterizar, aislar y evaluar cepas bacterianas con capacidad de resistir a un ambiente con hidrocarburos presentes y degradar hidrocarburos como fuente de carbono, proponiendo su aplicación en biorremediación de la contaminación por derrames de combustibles fósiles.

Para llevar a cabo todo este proceso de recolección, caracterización y otras pruebas. Se desarrollará la metodología basada en distintos pasos como la recolección y el cultivo no selectivo de las cepas encontradas en situaciones específicas. Posteriormente el aislamiento de aquellos agentes patógenos crecidos en las placas, especificando sus características que las diferencian entre sí. Finalmente, con la información recolectada, analizamos los resultados obtenidos para generar la conclusión y la discusión respectiva.

Esta investigación busca ofrecer una solución sostenible y eficiente para el problema que detectamos, comenzando en la región de Ñuble, un territorio de alta relevancia y productividad agrícola, aparte de poco control en el manejo adecuado de hidrocarburos derivados del petróleo.

## Introducción

Chile cuenta con una diversidad de suelos agrícolas altamente productivos, cuya conservación depende del equilibrio entre su uso intensivo y la protección ambiental. La fertilidad de estos suelos constituye un recurso crítico para la producción de alimentos y un factor determinante de la competitividad agrícola del país.

En este contexto, las napas subterráneas representan una fuente esencial de agua para el consumo humano, el riego agrícola y la ganadería, particularmente en zonas rurales. La calidad de estas aguas es indispensable para sostener la producción agrícola, actividad que constituye un pilar clave de la economía nacional. De este modo, la preservación de la integridad de los suelos fértiles y de los recursos hídricos subterráneos adquiere un carácter estratégico para garantizar la seguridad alimentaria, la sustentabilidad ambiental y el desarrollo económico sostenible del país (Ministerio del Medio Ambiente [MMA], 2013).

No obstante, estos recursos enfrentan crecientes presiones derivadas del crecimiento del comercio y del consumo de combustibles fósiles en Chile. Entre 2000 y 2020, el número de estaciones de servicio aumentó aproximadamente un 28%, acompañado de un incremento sostenido en la importación y el consumo de combustibles, que en 2022 superaron los 17,4 millones de metros cúbicos (Instituto Nacional de Estadísticas, 2021; Agencia Nacional de Energía, 2023). Esta expansión ha impulsado el desarrollo de infraestructura energética, como estaciones de servicio, talleres mecánicos y centros logísticos, que interactúa de manera directa con territorios agrícolas, incrementando la circulación de combustibles y exponiendo suelos y aguas subterráneas a posibles contaminaciones.

A nivel global, los hidrocarburos derivados de combustibles fósiles constituyen contaminantes persistentes de alto riesgo ambiental. Compuestos como el benceno, tolueno, etilbenceno y xileno (BTEx), junto con los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), presentan elevada persistencia química y toxicidad, lo que limita su degradación natural. Estos contaminantes tienen la capacidad de alterar la estructura del suelo, desplazar nutrientes esenciales y modificar la microbiota nativa, comprometiendo la calidad del agua subterránea y la productividad agrícola (U.S. Environmental Protection Agency [EPA], 2014).

La proximidad de instalaciones petroleras a zonas agrícolas intensifica la exposición de suelos fértiles a hidrocarburos. La naturaleza física de estos compuestos favorece su migración a través del suelo, impulsada por factores como gravedad, presión hidráulica y permeabilidad edáfica. Esta movilidad incrementa la complejidad de la interacción entre contaminantes y sistemas agrícolas, dificultando la detección temprana y la prevención de impactos a largo plazo (EPA, 2014).

A ello se suma la influencia del cambio climático, que intensifica fenómenos extremos como lluvias torrenciales, sequías prolongadas y variaciones en los caudales subterráneos. Estas condiciones modifican la dinámica de infiltración y dispersión de contaminantes, aumentando la vulnerabilidad de los recursos hídricos y de los suelos agrícolas frente a procesos de degradación ambiental (Intergovernmental Panel on Climate Change [IPCC], 2022).

## **Planteamiento del problema**

La creciente expansión del comercio y consumo de combustibles fósiles en Chile, especialmente en zonas rurales como la región de Ñuble, ha impulsado el aumento de estaciones de servicio, talleres mecánicos y centros logísticos energéticos. Sin embargo, este desarrollo ha estado marcado por deficiencias en infraestructura y escasas medidas preventivas, lo que ha favorecido la contaminación subterránea persistente (Guía Metodológica MMA 2013). Esta situación afecta gravemente la calidad del suelo, las napas de agua y, en consecuencia, la salud humana y de los ecosistemas.

Incluso en pequeñas cantidades, los derrames repetitivos de combustibles pueden infiltrarse en suelos porosos y migrar por gravedad hacia capas profundas. La falta de pisos impermeables, bandejas de contención y protocolos de emergencia adecuados facilita la permanencia de estos compuestos. Sustancias como el benceno, tolueno y los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), altamente solubles y tóxicas, pueden alcanzar las napas utilizadas para consumo humano o riego. (EPA, 2014)

Los hidrocarburos derivados de combustibles fósiles son compuestos persistentemente contaminantes, capaces de permanecer durante décadas si no se aplican medidas de contención y remediación adecuadas (MMA, 2013). Casos como los ocurridos en Chonchi, Calbuco y Antofagasta demuestran que la falta de infraestructura y control ha permitido filtraciones que afectan napas y ecosistemas, generando consecuencias ambientales y sociales de alta complejidad. En Chonchi, Petrobras fue multada con casi \$45 millones por una fuga de combustible que alcanzó redes urbanas, debido a falta de contenedores y acción tardía de respuesta (Biobiochile, 2016)

A pesar de contar con un marco normativo que incluye la Ley N.º 19.300, la Ley N.º 20.417, el DS N.º 160/2008 y el DS N.º 105/2019, el cumplimiento efectivo de estas normativas es desigual. En zonas rurales como San Ignacio, El Carmen, Yungay o San Nicolás, muchas instalaciones operan sin fiscalización adecuada, exponiendo al entorno a contaminación crónica. La ausencia de supervisión permite que persistan focos de contaminación invisibles.

Los impactos de esta situación son amplios. Las napas subterráneas, vitales para el abastecimiento de agua en sectores rurales, pueden contaminarse sin detección inmediata. La exposición prolongada a estos compuestos puede provocar daños neurológicos, hepáticos, respiratorios y oncológicos. A nivel ecológico, se pierde biodiversidad, se afecta la estructura del suelo y se interrumpen los ciclos ecológicos esenciales para la agricultura. Además, los hidrocarburos pueden trasladarse mediante agua o viento y acumularse en la cadena alimentaria, afectando a largo plazo la salud humana y ambiental (EPA, 2021).

En una región como Ñuble, donde la agricultura y el uso de aguas subterráneas son fundamentales, este tipo de contaminación representa una amenaza directa a la seguridad alimentaria y la estabilidad ecológica. Es imprescindible avanzar hacia una fiscalización más rigurosa y descentralizada, junto con el desarrollo de sistemas de monitoreo y estrategias de remediación ambiental como la biorremediación con microorganismos nativos. Solo así se podrá prevenir una degradación invisible pero progresiva de las tierras agrícolas y los recursos hídricos que sostienen la vida rural en Ñuble y otras regiones del país.

Este proyecto se alinea con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de la ONU, particularmente con los ODS 12, 13 y 15, al promover la protección del agua y los suelos agrícolas, el desarrollo de soluciones biotecnológicas sostenibles, la educación científica y la innovación ambiental. De esta forma, contribuye directamente a la mitigación de la contaminación por hidrocarburos y al fortalecimiento de prácticas responsables en la relación entre industria y medio ambiente.

## **Pregunta de investigación**

¿Qué características microbiológicas tienen las cepas aisladas de superficies contaminadas con combustibles fósiles y cuál es su capacidad para degradar hidrocarburos en condiciones de laboratorio?

## **Hipótesis**

-Las cepas aisladas de superficies contaminadas presentan características morfológicas y fisiológicas compatibles con la resistencia a los hidrocarburos y evidencian una capacidad variable de degradar combustibles fósiles en condiciones de laboratorio.

## **Objetivo general**

Aislar y caracterizar microbiológicamente las cepas resistentes a hidrocarburos, evaluando su capacidad degradadora de combustibles fósiles en condiciones de laboratorio.

## **Objetivos específicos**

1. Recolectar muestras de superficies contaminadas con combustible, diésel o keroseno tales como suelos de talleres mecánicos, tapas de estanques de combustible, etc.
2. Aislar las cepas presentes en las muestras utilizando medios de cultivo selectivos.
3. Caracterizar morfológicamente y fisiológicamente las cepas aisladas mediante técnicas de laboratorio.
4. Evaluar la capacidad degradadora de las cepas seleccionadas mediante ensayos de laboratorio con combustibles fósiles como única fuente de energía.

## Revisión bibliográfica

Los hidrocarburos son compuestos orgánicos formados por carbono e hidrógeno, que se encuentran principalmente en el petróleo y el gas natural, y constituyen las fuentes de energía no renovables más demandadas a nivel mundial. Su explotación comercial comenzó en el siglo XIX y su uso es fundamental para la generación de combustibles, lubricantes y materias primas para la industria y el transporte (SAG, 2007).

Por otro parte, la industria de los hidrocarburos conlleva múltiples riesgos tales como incendios y explosiones, debido a la alta inflamabilidad de los hidrocarburos, principalmente durante las etapas de perforación, procesamiento, transporte y almacenamiento; al igual que en el ámbito medioambiental, representa un riesgo de contaminación latente como en el caso de derrames de petróleo que contaminan suelos, aguas superficiales y subterráneas, generando daños severos a ecosistemas terrestres y acuáticos como también afectando la flora y fauna; emisiones atmosféricas de compuestos orgánicos volátiles por evaporación de hidrocarburos, que contribuyen a la contaminación del aire y al cambio climático mediante gases de efecto invernadero.

Diversos estudios han evidenciado que en estaciones de servicio y talleres pequeños, como los ubicados en la región de Ñuble, el manejo inadecuado de hidrocarburos, particularmente petróleo y sus derivados, representa una fuente significativa de contaminación ambiental (G. Bellido, J. F., 2018). La acumulación y el vertido de hidrocarburos y solventes afectan negativamente la calidad del suelo, alterando sus propiedades fisicoquímicas. Asimismo, estos contaminantes pueden infiltrarse y comprometer la calidad de las aguas superficiales y subterráneas, generando riesgos para los ecosistemas. Por otra parte, la evaporación de compuestos orgánicos volátiles provenientes de estos hidrocarburos contribuye a la contaminación atmosférica, afectando la calidad del aire en entornos urbanos y rurales.

La contaminación del suelo por hidrocarburos altera significativamente sus propiedades químicas y microbiológicas. Estudios muestran que la presencia de hidrocarburos en el suelo disminuye el pH, la conductividad eléctrica y la capacidad de intercambio catiónico, a la vez que incrementa la saturación con aluminio, afectando de forma negativa la calidad química del suelo. Estos cambios crean un ambiente menos favorable para muchas especies microbianas, produciendo una disminución en la diversidad funcional de la comunidad bacteriana. Sin embargo, algunas cepas resistentes pueden proliferar, adaptándose y utilizando los hidrocarburos como fuente de carbono y energía. Así, aunque la estructura microbiana cambia y disminuye su diversidad, las funciones bioquímicas del suelo pueden mantenerse con resiliencia a largo plazo, permitiendo que los procesos ecológicos continúen a pesar de la contaminación (Zamora, Ramos & Arias, 2012).

La biorremediación aeróbica es una estrategia efectiva para la descontaminación de suelos afectados por hidrocarburos. Experimentos de laboratorio y piloto utilizando biosólidos (lodos residuales de plantas de tratamiento de aguas residuales) han demostrado que la incorporación de estos materiales ricos en materia orgánica, nitrógeno y fósforo mejora la degradación de hidrocarburos al restablecer el balance nutricional alterado por la alta carga de carbono. Además, mantener condiciones óptimas de humedad y aireación maximiza la biodegradación. Con estas prácticas, se han logrado tasas de remoción de hidrocarburos superiores al 90%, alcanzando niveles permisibles normativos (Martínez-Prado et al., 2011). No obstante, en la región de Ñuble no se han reportado estudios sobre cepas bacterianas resistentes a hidrocarburos en suelos de talleres mecánicos, lo que posiciona a este proyecto como un aporte novedoso al identificar y evaluar estas cepas en un contexto local. (Martínez-Prado et al., 2011).

## Metodología

### ***1. Recolección de muestras y cultivo no selectivo***

Selección de sitios con presencia de combustibles fósiles, tales como el conducto de combustible de un auto, la bayoneta que se utiliza para medir el aceite en el motor y la tapa del aceite en temperatura ambiente.

#### **1a. Muestreo.**

Uso de hisopos estériles para tomar la muestra de combustibles fósiles.

#### **1b. Preparación de agar nutritivo (medio no selectivo):**

Mezclar en matraz: 400 ml de agua destilada, 8 g de agar, 6 g de caldo nutritivo.

Esterilizar en autoclave.

Verter 15-20 ml en placas estériles dentro de una cámara de flujo laminar.

#### **1c. Cultivo.**

Se pasa la muestra del hisopo al agar nutritivo en un ambiente aséptico y luego se deja crecer de 5 a 7 días en la incubadora a 35 °C, con un monitoreo constante del crecimiento.

### ***2. Aislamiento en medios sólidos (placas de agar)***

#### **2a. Caracterización.**

Caracterizamos morfológicamente (color, forma, crecimiento) las distintas colonias que encontramos y las registramos.

#### **2b. Aislamiento de los microorganismos.**

Con una asa de siembra nos dirigimos hacia la bacteria y la cultivamos en una placa de agar nutritivo, previamente preparado y en un ambiente aséptico, por el método de cultivo en estrias.

#### **2c. Incubación.**

La llevamos a la incubadora a 35 °C por 5 a 7 días con un monitoreo de crecimiento constante.

Luego del crecimiento, volvemos a caracterizar y organizar por nombre de las placas las distintas colonias cultivadas.

### ***3. Cultivo selectivo y aislamiento de bacterias degradadoras de hidrocarburos.***

#### **3a. Reactivación de las colonias.**

Inocular en placas de agar nutritivo para revivir cepas puras.

Incubar 24-48 h a 30-37 °C para obtener colonias activas.

#### **3b. Preparación del medio selectivo enriquecido con hidrocarburos. (Metodología adaptada de Pacwa-Płociniczak, M et al. (2016))**

Preparar medio mineral Bushnell-Haas (BH) que contiene sales minerales esenciales pero sin fuente de carbono orgánico.

○ Composición por litro de medio BH (aproximado):

- ★ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (fosfato monobásico de potasio) — 1 g
- ★ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (fosfato dibásico de potasio) — 1 g
- ★ NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (nitrato de amonio) — 1 g
- ★ MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (sulfato de magnesio heptahidratado) — 0.2 g
- ★ CaCl<sub>2</sub> (cloruro de calcio) — 0.02 g
- ★ FeCl<sub>3</sub> (cloruro férrico) — 0.05 g
- ★ Agua destilada — 1000 ml
- ★ Agar (para medio sólido) — 15 g (opcional)





### **3c. Procedimiento:**

- Pesar y disolver todos los sólidos (sales y nutrientes) en aproximadamente 900 ml de agua destilada.
- Ajustar el volumen final a 1 litro con agua destilada.
- Esterilizar en autoclave a 121 °C por 15-20 minutos.
- Enfriar el medio a 45-50 °C para agregar agar para placas o hidrocarburo para cultivo líquido.
- Para preparar medio sólido, añadir 15 g de agar antes de esterilizar.
- Mezclar suavemente y verter en placas (si es medio sólido) o usar directamente como caldo líquido.
- Esterilizar el medio por autoclave y enfriar a temperatura ambiente.
- Añadir asépticamente hidrocarburo puro (diésel, gasolina, queroseno, etc.) en concentración del 0,05-1 % (v/v), previamente esterilizado por filtración (membranas de 0,45 µm).

### **3d. Enriquecimiento y cultivo selectivo.**

Transferir colonias activas de agar nutritivo a 50 ml de medio BH con hidrocarburo.

Incubar en un agitador a 37 °C y 150 rpm durante 7-30 días.

Medir crecimiento bacteriano periódicamente.

### **3e. Aislamiento en medio sólido selectivo con hidrocarburos.**

- Preparar placas con BH agarizado.
- Extender uniformemente 0,1 ml de hidrocarburo esterilizado sobre la superficie para crear una película del hidrocarburo.
- Inocular 0,1 ml de cultivo enriquecido y extender con esparcidor.
- Incubar a 37 °C durante 7 días.
- Seleccionar colonias puras y representar distintas morfologías.

## ***4. Caracterización microbiológica de las cepas aisladas***

### **4a. Análisis.**

Tipos de análisis:

- ★ Morfológico. Basado en observación microscópica de las cepas puras para determinar forma celular, agrupación, presencia de esporas y motilidad.
- ★ Fisiológico y bioquímico:
- ★ Prueba de catalasa: libera burbujas si usa peróxido.
- ★ Prueba de oxidasa: identifica si es aeróbica.
- ★ Utilización de diferentes fuentes de carbono: confirmar el uso de glucosa o lactosa.
- ★ Resistencia a altas concentraciones de hidrocarburos o cambios de pH.
- ★ Realizar tinción de Gram, pruebas bioquímicas básicas.

### **4b. Uso de técnicas.**

Reducción de hidrocarburos en el medio, usando técnicas analíticas como cromatografía de gases (GC) o espectrofotometría.

### **4c. Evaluación cualitativa:**

Observación de emulsificación y producción de biosurfactantes (pruebas como el E24).

## ***5. Análisis y registro de resultados***

### **5a. Documentación de características en cada cepa.**

- a. Alta tolerancia a hidrocarburos
- b. Alta velocidad de degradación
- c. Producción de biosurfactantes
- d. Estabilidad en condiciones adversas (ph, temperatura)

### **5b. Discusión.**

Comparación y discusión de los resultados con información bibliográfica sobre bacterias degradadoras de hidrocarburos.

### 5c. Proyección.

Selección de cepas útiles con mayor potencial para futuras aplicaciones en biorremediación.

### Recursos a utilizar

Etapa del procedimiento	Materiales y recursos
Recolección de muestras y cultivo no selectivo	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Hisopos estériles para la toma de muestras.</li><li>2. Lugares de muestreo: conducto de combustible de auto, bayoneta para medición de aceite, tapa de aceite a temperatura ambiente.</li><li>3. Materiales para la preparación de agar nutritivo: agar, caldo nutritivo, agua destilada.</li><li>4. Matraz para mezclar los componentes del agar nutritivo.</li><li>5. Autoclave para esterilización.</li><li>6. Placas de Petri estériles para verter agar.</li><li>7. Cámara de flujo laminar para ambiente aséptico.</li><li>8. Incubadora con control de temperatura a 35 °C para cultivo.</li></ol>
Aislamiento en medios sólidos y cultivo selectivo	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Asa de siembra para aislamiento de bacterias.</li><li>2. Placas de agar nutritivo para aislamiento.</li><li>3. Medio mineral Bushnell-Haas (BH) para cultivo selectivo con hidrocarburos.</li><li>4. Agar para medio sólido selectivo (opcional).</li><li>5. Autoclave para esterilización del medio BH.</li><li>6. Hidrocarburos puros esterilizados (diésel, gasolina, queroseno) para enriquecimiento.</li><li>7. Filtros de membrana de 0,45 µm para esterilización del hidrocarburo.</li><li>8. Agitador para incubación a 37 °C y 150 rpm durante el cultivo selectivo.</li><li>9. Material para inoculación y extensión (pipetas, espátula o esparcidor).</li></ol>
Caracterización microbiológica	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Microscopio para observación morfológica.</li><li>2. Reactivos para pruebas bioquímicas:<ul style="list-style-type: none"><li>● Peróxido de hidrógeno para prueba de catalasa.</li><li>● Reactivos para prueba de oxidasa.</li><li>● Medios para pruebas de utilización de glucosa y lactosa.</li><li>● Material para tinción de Gram.</li></ul></li></ol>

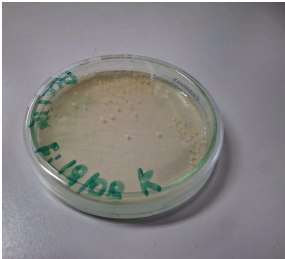

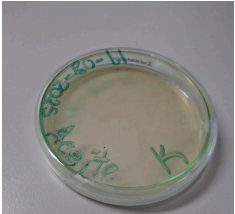
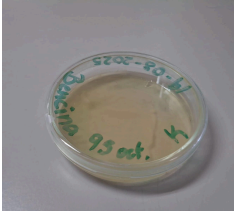
## Resultados preliminares

Se tomaron muestras en los siguientes lugares con presencia de combustibles fósiles:

1. Ducto de bencina
2. Bayoneta del aceite
3. Tapa del aceite

Se realizó cultivo en agar nutritivo en placas de Petri por 5 días en el horno a 35°

Después del tiempo de crecimiento en las placas de agar se pudo observar que:

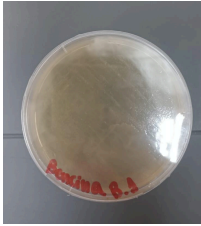

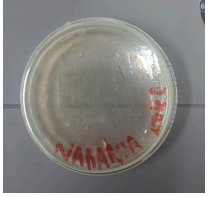
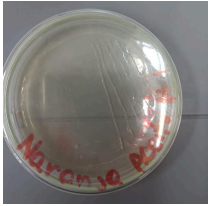
N° de Placa	De donde se tomo	Crecimiento	Morfología de la colonia	Imagen
Aceite #1	Bayoneta del aceite	Se observó crecimiento de 80 UFC	Se presentan de distintas colonias de distintos colores: -Blanco lechoso -Naranja Los dos de crecimiento regular	
Aceite #2	Bayoneta del aceite	Se observó crecimiento de 10 UFC	Se presentan de distintas colonias de distintos colores: -Blanco lechoso (regular y grande) -Naranja (regular y de menor tamaño) -Amarillo (regular y de menor tamaño) -Grisáceo (se sospecha que es un hongo)	
Aceite #3	Tapa de aceite	No se observó crecimiento	-	
Bencina #1	Ducto del auto	Se observó crecimiento, pero no se pudo documentar en UFC	Se presenta de un color blanco lechoso y de una manera irregular .	
Bencina #2	Ducto del	Se observó	-	-

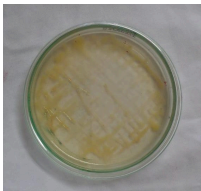

	auto	crecimiento, pero no se pudo documentar		
--	------	---	--	--

### ***Aislación de las distintas colonias:***

Al momento de caracterizar morfológicamente los distintos tipos de cepas que se observaron en el cultivo se separaron en placas individuales para cada tipo distinto de cepa:

*Tabla de crecimiento*

N° de placa	Crecimiento	Observaciones	Imagen
B.1	Se observa crecimiento	Se puede notar un crecimiento regular de una bacteria de un color blanco lechoso.	
A.b.2	Se observa crecimiento	Se puede observar un crecimiento regular de una bacteria de un color blanco lechoso.	
A.n.2	Se observa crecimiento	Se observa un crecimiento regular de colonias circulares naranjo oscuro.	
A.n.1	Se observa crecimiento	Se observa un crecimiento regular de colonias circulares de un color naranja claro se contaminó con una bacteria de color naranja oscuro.	

A.a.2	Se observa crecimiento	Se observa un crecimiento regular de un color amarillo.	
A.o.2	Se observa crecimiento	Se puede notar un crecimiento de un hongo de color oscuro grisáceo con esporas creciendo dentro y fuera del agar.	

## Discusión

Según lo observado en los resultados, las placas presentan una alta carga bacteriana; estas se diferencian morfológicamente y son visualmente distinguibles entre ellas (forma, color, tamaño, bordes). Teniendo en cuenta que dependiendo de la placa el crecimiento que se presentó en la mayoría de los medios de cultivo muestra una variedad de morfotipos distintos, sugerimos que estas representan diferentes tipos de cepas bacterianas. Además, se insinúa que las bacterias están adaptadas a las condiciones ambientales en presencia directa de hidrocarburos (aceite de motor y bencina), ya que su presencia indica la tolerancia o las posibles reacciones metabólicas que podrían llegar a desarrollar.

En los distintos lugares de los cuales se tomaron y cultivaron las muestras, se puede distinguir una diferencia en la morfología de las cepas según el sitio de origen. En el caso de la muestra tomada desde la tapa del aceite, no se obtuvo crecimiento de microorganismos en su respectiva placa. Esto podría indicar que, debido a que al momento de tomar la muestra el aceite del auto aún se encontraba caliente por la reciente actividad del motor, los microorganismos presentes en ese lugar no soportaron la temperatura alcanzada cuando el motor estaba encendido.

La muestra nos presenta que las bacterias poseen mecanismos de resistencia y afinidad por los hidrocarburos, incluso en un medio no selectivo, proporcionando características valiosas para su empleo dentro del objetivo del estudio.

Desde una perspectiva ecológica, estos resultados sugieren que los ecosistemas locales ya poseen mecanismos naturales de resiliencia frente a la contaminación por hidrocarburos. El hallazgo de cepas nativas resistentes y potencialmente degradadoras implica que los suelos contaminados mantienen comunidades microbianas adaptadas que podrían ser aprovechadas para procesos de biorremediación. En este sentido, la bioaumentación (la aplicación controlada de estas cepas) representa una estrategia biotecnológica sustentable capaz de restaurar el equilibrio microbiológico del suelo y acelerar la recuperación de zonas afectadas.

En el contexto nacional, la contaminación por hidrocarburos constituye un problema ambiental persistente, asociado principalmente a fugas en faenas industriales, transporte y almacenamiento de combustibles. Este tipo de contaminación puede afectar la calidad de los suelos agrícolas y, por consecuencia, influir en la productividad y calidad de los productos cultivados. Por lo tanto, el aislamiento de cepas bacterianas autóctonas con capacidad degradadora no solo tiene un valor experimental, sino que también ofrece una vía prometedora al momento de buscar una solución para mitigar impactos acumulativos y contribuir a la resiliencia ecológica de los ecosistemas chilenos.

Diversos estudios han demostrado la presencia y aislamiento exitoso de bacterias degradadoras de hidrocarburos en suelos contaminados, lo que coincide con los resultados encontrados en esta investigación. Martínez y Rabelo (2020) destacan la capacidad de bacterias nativas para degradar hidrocarburos, mientras que Abasolo y Morante (2019) y Narváez et al. (2008) reportan aislamientos efectivos de bacterias en ambientes similares. Esta capacidad microbiana es fundamental para la biorremediación de suelos contaminados, apoyando así la viabilidad de la descontaminación biotecnológica en estos casos.

## **Proyecciones**

Durante el desarrollo de esta investigación han surgido nuevas interrogantes vinculadas con la problemática inicial, lo que ha permitido ampliar la comprensión del fenómeno y orientar el trabajo hacia posibles aplicaciones prácticas. A partir de esta reflexión, se han definido diversas proyecciones con el objetivo de generar impactos positivos en ámbitos ambientales, tecnológicos y sociales. Las principales líneas de desarrollo proyectadas se describen a continuación.

### ***1. Aplicación en procesos de biorremediación de ambientes contaminados.***

De acuerdo con Manushevich (2022), la biorremediación constituye una estrategia poco invasiva que utiliza organismos biológicos principalmente bacterias, hongos y plantas para eliminar, transformar o reducir la concentración de contaminantes en el ambiente. Este proceso se caracteriza por ser seguro, natural y altamente compatible con los ecosistemas, lo que lo convierte en una herramienta clave para la restauración ecológica.

En concordancia, Benavides et al. (2006) sostienen que la biorremediación es una alternativa saludable y sostenible frente al deterioro ambiental ocasionado por las actividades humanas, ya que permite recuperar suelos y cuerpos de agua sin incorporar agentes químicos adicionales.

Considerando estos antecedentes, los microorganismos aislados y caracterizados en el marco de nuestra investigación podrían emplearse como agentes biorremediadores para la degradación de hidrocarburos derivados del petróleo en suelos o aguas contaminadas. Esta aplicación resulta de interés para áreas como la ingeniería ambiental, la biotecnología aplicada, y la industria petrolera, donde la búsqueda de métodos ecológicamente seguros y económicamente viables es una prioridad creciente.

Además, el desarrollo de bioensayos que evalúen la capacidad degradadora de estas cepas permitiría su futura implementación en sistemas piloto o en programas de recuperación ambiental a escala local o regional.

### ***2. Optimización de soluciones biotecnológicas existentes***

Una segunda proyección se centra en la optimización y mejora de tecnologías de biorremediación ya existentes. A partir de la caracterización genética, fisiológica y metabólica de las bacterias estudiadas, sería posible identificar enzimas específicas o rutas metabólicas que potencien los procesos de degradación de hidrocarburos.

La incorporación de estos conocimientos permitiría diseñar consorcios microbianos más eficientes, capaces de adaptarse a distintas condiciones ambientales o tipos de contaminantes. Asimismo, los resultados obtenidos podrían ser de utilidad para empresas o centros de investigación que actualmente trabajan en el desarrollo de productos biotecnológicos con fines ecológicos, promoviendo la transferencia tecnológica entre la investigación científica y la industria.

### ***3. Contribución al conocimiento microbiano nacional con potencial biotecnológico***

Esta investigación también busca contribuir al avance de la caracterización microbiana en Chile, especialmente en la Región de Ñuble, donde los estudios sobre biodiversidad microbiana con potencial biotecnológico aún son limitados.

La identificación de cepas bacterianas con capacidad para degradar hidrocarburos constituye un aporte relevante al conocimiento científico nacional, pues permite reconocer y valorar los recursos biológicos locales como fuentes de innovación y desarrollo sostenible.

El establecimiento de una base de datos regional o colección de cepas con potencial biotecnológico podría servir de referencia para futuras investigaciones en áreas como la biorremediación, la biocatálisis, la producción de bioenergía y la agricultura sustentable, fortaleciendo así las capacidades científicas de la región y del país.

### ***4. Integración con soluciones medioambientales existentes***

Finalmente, se proyecta la adaptación de las bacterias aisladas a tecnologías medioambientales ya implementadas para la contención de derrames de hidrocarburos. Algunas empresas actualmente utilizan estructuras absorbentes, como mallas o barreras compuestas por fibras orgánicas (por ejemplo, cabello humano o fibras vegetales), con el fin de retener el petróleo y evitar su dispersión en cuerpos de agua.

La incorporación de consorcios bacterianos con capacidad degradadora en estos sistemas podría aumentar su eficacia, generando un doble mecanismo de acción: la retención física del contaminante y su degradación biológica in situ. Este enfoque integrador podría reducir significativamente el impacto ambiental de los derrames y constituir un modelo replicable en programas de gestión ambiental y respuesta ante emergencias ecológicas.



## Referencias bibliográficas:

- Abasolo, F. & Morante, L. (2019). *Bacterias degradadoras de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con hidrocarburos*. <https://colloquiumbiblioteca.com>
- Acosta, I., Moctezuma, M., Tovar, J. & Cárdenas, J. (2011). *Aislamiento e identificación de bacterias y levaduras resistentes al petróleo*. <https://www.scielo.cl>
- Arias, J. & Universidad Nacional Abierta y a Distancia (2017). *Contaminación de suelos y aguas por hidrocarburos en Colombia. Análisis de la fitorremediación como estrategia biotecnológica de recuperación* <https://doi.org/10.22490/21456453.1846>
- Bellido, G, Francisca. J & Universidad Nacional de San Agustín (2018). *Estudio de la contaminación de suelos por residuos de hidrocarburos y propuesta de manejo ambiental de los talleres de mecánica automotriz del Distrito de San Jerónimo-Cusco* <https://alicia.concytec.gob.pe>
- Benavides, J. Quintero, G, Guevara, A, Jaimes, D, Gutiérrez, S. & Miranda, J. (2006). *Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo*. <https://doi.org/10.22490/24629448.351>
- British Broadcasting Corporation (BBC) News World (2023). ¿Cuál es el origen del petróleo (y no, no viene de los dinosaurios)? <https://www.bbc.com/mundo/noticias>.
- Caballero, C. M. (2022). *Expertos analizaron la forma en que se pueden recuperar terrenos contaminados mediante la biorremediación — País Circular*. País Circular. <https://www.paiscircular.cl/ciudad/expertos-analizaron-la-forma-en-que-se-pueden-recuperar-terrenos-contaminados-mediante-la-biorremediacion/>
- Canadian Environmental Protection Act (CEPA) (2024). *Federal environmental quality guidelines - Benzene, toluene, ethylbenzene, xylene (BTEX)* <https://www.canada>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2009) *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)* <https://www.epa.gov>
- Flores, E., Gutiérrez, R., Alvarado, J., Ruiz de Chávez, D. & Lazalde, B. (2023) *Efectos en la salud ante exposición a hidrocarburos*. <https://revistas.uaz.edu.mx/index.php/ibnsina/article/view/2079/1753>
- Instituto Nacional de Estadística (INE). (2021). *Encuesta Estructural de Servicios (ESERV)* <https://datos.gob.cl/dataset/encuesta-estructural-de-servicios-eserv>
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) & Climate Governance Initiative (2022). *IPCC February 2022: Impacts, Adaptation and Vulnerability*. <https://climate-governance.org/ipcc-february-2022-summary/>
- Madrid, M. (2011) *Origen de los Hidrocarburos* <https://portaldelpetroleo.com>
- Martínez, D. & Rabelo, R. (2020) *Bacterias biodegradadoras de hidrocarburos*. <https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/Biociencias/article/view/4331/4>
- Martínez, A, Pérez, M. E. Pinto, J. Gurrola, B., & Osorio, A. (2011). *Biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos empleando lodos residuales como fuente alterna de nutrientes*. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0188-49992011000300009](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992011000300009)

Ministerio de Energía, Superintendencia de Electricidad y Combustibles (SEC), Agencia de Sostenibilidad Energética, Comisión Nacional de Energía (CNE) & Comisión Chilena de Energía Nuclear (CCHEN). (2025). *Balance Nacional de Energía 2023 confirma la caída de la participación del carbón en la generación de electricidad*. <https://energia.gob.cl/>

Miogas (s.f.) *Gas natural: obtención, composición y creación*. <https://miogas.com>.

Moreno, C. González, A., & Blanco, M. J. (2004). *Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación*. <https://www.reviberoammicol.com>

Narváez, S., Gómez, M., Martínez, M. & INVEMAR (Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras) (2008). *Selección de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos aisladas a partir de sedimentos del Caribe colombiano*. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0122-97612008000100004&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0122-97612008000100004&script=sci_arttext)

Ondarse, D. (2024). *Hidrocarburos. Enciclopedia Concepto*. <https://concepto.de/hidrocarburos/>

Pacwa-Płociniczak, M., Płociniczak, T., Iwan, J., Żarska, M., Chorążewski, M., Dzida, M. & Piotrowska-Seget, Z. (2016). *Isolation of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing bacteria and assessment of their plant growth-promoting traits* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26708648>

Rabelo, R. (2023). *Bacterias y hongos utilizados en la biodegradación de hidrocarburos. Una revisión de literatura y un análisis bibliométrico*. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8721230>

Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), Castro, G. & Proyectos y Asesorías Ambientales (PRASA) (2007). *Informe final: Diseño y monitoreo frente a derrames de hidrocarburos*. <https://www.sag.gob.cl>

Sierralta, L., & Ministerio del Medio Ambiente (MMA). (2013). *Guía de muestreo y de análisis químicos para la investigación confirmatoria y evaluación de riesgo de suelos/sitios con presencia de contaminantes*. <https://gestionsc.mma.gob.cl/wp-content/uploads/2024/07/Guia-Muestreo-y-Analisis-de-Suelo-Background.pdf>

Ugaz, J., Hilda, H. & UNPRG (Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo). (2016). *Rendimiento de surfactantes producidos por Pseudomonas spp. Degradadoras de hidrocarburos de petróleo*. <https://repositorio.unprg.edu.pe/handle/20.500.12893/777>

Ulises, N. & Aguirre, L. (2014). *Biodegradación de petróleo por bacterias: Algunos casos de estudio en el Golfo de México*. <https://www.researchgate.net>

Universidad de Chile (UCHile) (s.f.) *Hidrocarburos alifáticos*. <https://aprendizaje.uchile.cl>

Windevoxhel, R., Sánchez, N., Subero, N., Bastardo, H., Malaver, N. & UC (Universidad de Carabobo) (2009). *Grupos funcionales de bacterias con potencial para biodegradación de hidrocarburos*. <https://www.redalyc.org/pdf/707/70717292009.pdf>

Zamora, A., Ramos, J., & Arias, M. (2012). *Efecto de la contaminación por hidrocarburos sobre algunas propiedades químicas y microbiológicas de un suelo de sabana*. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1316-33612012000100002](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612012000100002)

## Anexos

### Anexo 1. Superficie agrícola nacional por tipo de uso (2010–2020)

Año	Cultivos anuales (ha)	Frutales (ha)	Praderas y forrajes (ha)	Total superficie agrícola (ha)
2010	781.500	304.200	1.462.700	2.548.400
2012	769.800	322.600	1.451.300	2.543.700
2015	755.400	347.800	1.438.900	2.542.100
2018	743.900	365.100	1.421.800	2.530.800
2020	732.500	384.600	1.409.000	2.526.100

**Fuente:** Instituto Nacional de Estadísticas (INE), 2021.

**Descripción:** Tabla que muestra la estabilidad del uso agrícola del suelo en Chile durante la última década, reflejando la importancia de su conservación frente al crecimiento industrial y urbano.

### Anexo 2. Consumo Nacional de Combustibles Fósiles (2000-2022)

Año	Gasolina (m³)	Diésel (m³)	Total combustibles líquidos (m³)	Variación porcentual anual (%)
2000	5.820.000	7.900.000	13.720.000	—
2005	6.480.000	9.200.000	15.680.000	+14,3
2010	6.910.000	10.050.000	16.960.000	+8,2
2015	7.300.000	10.940.000	18.240.000	+7,5
2020	7.850.000	11.430.000	19.280.000	+5,7
2022	8.100.000	12.250.000	20.350.000	+5,5

**Fuente:** Agencia Nacional de Energía (ANE), 2023.

**Descripción:** El consumo total de combustibles líquidos en Chile superó los 20 millones de m³ en 2022, evidenciando una tendencia sostenida al alza que incrementa la presión sobre los ecosistemas y las fuentes subterráneas

Anexo 3. Crecimiento de estaciones de servicio en Chile (2000–2020)

Año	Número de estaciones	Variación (%)	Regiones con mayor concentración
2000	1.110	–	Metropolitana, Valparaíso, Biobío
2005	1.230	+10,8	Metropolitana, Valparaíso, Maule
2010	1.340	+8,9	Metropolitana, O’Higgins, Ñuble
2015	1.400	+4,5	Metropolitana, Ñuble, Los Lagos
2020	1.420	+1,4	Metropolitana, Ñuble, Maule

**Fuente:** Instituto Nacional de Estadísticas (INE), 2021.

**Descripción:** El aumento en el número de estaciones de servicio refleja la expansión de la infraestructura energética, la cual interactúa directamente con zonas agrícolas y rurales, generando potenciales riesgos de contaminación de suelos y aguas subterráneas.

Anexo 4. Información específica sobre los hidrocarburos y sus propiedades.

Concepto	Descripción
Definición de hidrocarburos	Compuestos orgánicos formados únicamente por átomos de carbono (C) e hidrógeno (H). Son la base de la Química Orgánica.
Estructura y propiedades	Cada hidrocarburo posee una configuración estructural específica que determina sus propiedades físicas, químicas y su nombre.
Ejemplos comunes	Metano (CH <sub>4</sub> ), Etano (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> ), Propano (C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> ), Butano (C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> ), Benceno (C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> ), Tolueno, Xileno, Naftaleno y Antraceno.
Importancia industrial	Son esenciales en diversas industrias, especialmente en la generación de energía eléctrica y en la producción de combustibles y materiales derivados.
Clases de hidrocarburos en el petróleo	<b>1. Saturados:</b> Hidrocarburos con enlaces simples. <b>2. Aromáticos:</b> Hidrocarburos con anillos bencénicos. <b>3. Asfaltenos:</b> Contienen fenoles, ácidos grasos, cetonas, ésteres y porfirinas. <b>4. Resinas:</b> Contienen piridinas, quinolinas y amidas.

**Fuentes:** British Broadcasting Corporation (BBC) News World (2023), Canadian Environmental Protection Act (CEPA) (2024), Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2009), Ondarse, D. (2024),

## Glosario

**Aeróbica:** Que requiere oxígeno para llevar a cabo sus procesos vitales.

**Aséptico:** Que está libre de microorganismos contaminantes.

**Autoclave:** Dispositivo que utiliza vapor a alta presión y temperatura para esterilizar materiales.

**Biodiversidad:** Variedad de organismos vivos que habitan un ecosistema o el planeta.

**Biocatálisis:** Uso de enzimas o microorganismos para acelerar reacciones químicas.

**Bioaumentación:** Introducción de microorganismos específicos para mejorar la degradación de contaminantes.

**Bioenergía:** Energía obtenida de la biomasa o materia orgánica.

**Bioensayos:** Pruebas biológicas que evalúan la toxicidad o efecto de una sustancia sobre organismos vivos.

**Bioquímico:** Relativo a las reacciones químicas que ocurren en los seres vivos.

**Biodegradación:** Descomposición de materia orgánica por acción de microorganismos.

**Biorremediación:** Uso de organismos vivos para eliminar o reducir contaminantes del ambiente.

**Biosólidos:** Residuos orgánicos tratados provenientes de plantas de tratamiento de aguas residuales.

**Biosurfactantes:** Sustancias producidas por microorganismos que reducen la tensión superficial entre líquidos o fases.

**Biotechnológico:** Relativo al uso de organismos o procesos biológicos con fines industriales o científicos.

**Bushnell Haas:** Medio de cultivo utilizado para evaluar la capacidad degradadora de hidrocarburos por microorganismos.

**Carga bacteriana:** Cantidad de bacterias presentes en una muestra o superficie.

**Cámara de flujo laminar:** Equipo que proporciona un ambiente estéril mediante flujo de aire filtrado.

**Caracterización:** Descripción y análisis de las propiedades o componentes de una muestra.

**Contaminación crónica:** Presencia prolongada de contaminantes en un medio ambiente.

**Cultivo en estrías:** Técnica de laboratorio para aislar colonias bacterianas en una placa.

**Degradación:** Descomposición o deterioro de una sustancia, ya sea natural o inducido.

**Edáfico:** Relativo al suelo y sus características.

**Emulsificación:** Proceso de mezclar dos líquidos inmiscibles mediante un agente emulsificante.

**Esterilizar:** Eliminar todos los microorganismos de un material o superficie.

**Fisiológico:** Relativo a las funciones y procesos vitales de los organismos.

**Genética:** Ciencia que estudia la herencia y variación de los organismos.

**Inflamabilidad:** Capacidad de una sustancia para encenderse y arder fácilmente.

**Inocular:** Introducir microorganismos en un medio de cultivo para su crecimiento.

**Intercambio catiónico:** Proceso por el cual el suelo retiene y libera iones positivos (cationes).

**Microbiano:** Relativo a los microorganismos.

**Microbiológico:** Se relaciona con el estudio de los microorganismos.

**Microbiota:** Conjunto de microorganismos presentes en un ambiente o ser vivo.

**Microscópico:** De tamaño tan pequeño que solo puede observarse con un microscopio.

**Mitigación:** Reducción del impacto negativo de un fenómeno o actividad.

**Morfotipos:** Variaciones en la forma o aspecto de organismos del mismo grupo.

**Morfológico:** Relativo a la forma o estructura de los organismos.

**Motilidad:** Capacidad de movimiento de un microorganismo.

**Napas subterráneas:** Capas de agua que se encuentran bajo la superficie del suelo.

**pH:** Medida del grado de acidez o basicidad de una sustancia.

**Propiedades fisicoquímicas:** Características físicas y químicas de una sustancia (densidad, solubilidad, etc.).

**Proliferar:** Multiplicarse o reproducirse rápidamente.

**Remediación:** Conjunto de acciones para eliminar o reducir contaminantes en un sitio afectado.

**Restauración ecológica:** Proceso de recuperación de un ecosistema degradado a su estado natural.

**Saturación:** Grado en que un medio (como el suelo) está ocupado por agua o solutos.

**Solventes:** Sustancias que disuelven a otras, formando soluciones.

**Sustentabilidad:** Uso responsable de los recursos para satisfacer necesidades presentes sin comprometer las futuras.

**UFC (Unidades Formadoras de Colonias):** Medida del número de microorganismos viables capaces de formar colonias.

**Volátil:** Sustancia que se evapora fácilmente a temperatura ambiente.