



UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AMBIENTAL
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Capacidad antioxidante del extracto orujo de uva y su efecto sobre el crecimiento de la bacteria *Acinetobacter radioresistens* DD78 en hidrocarburos en condiciones salinas

Tamara Alexandra Gallardo Vega

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERA CIVIL AMBIENTAL

Profesor Guía:

Dr. Michael Seeger Pfeiffer.

Profesoras Co-Guía:

Mag. Ximena Báez Matus.

Dra. Camila Mery Araya.

Dra. Alejandra Urtubia Urbina.

Valparaíso, 22 de enero del 2024



Agradecimientos

Agradecer a mi familia, por darme las libertades para estudiar en otra región y el apoyo para seguir aprendiendo. A mi hermano Sebastián, por siempre hacerse presente a pesar de la distancia y compartir tantos bellos momentos conmigo.

También a mis amigos Felipe, Milanka y Christian, que fueron parte desde largo y arduo proceso, entregando una palabra de apoyo en los momentos difíciles, mucho cariño y contención. De la misma forma, a mi compañero de vida, Diego, quien fue fundamental en este camino. Gracias por tu cariño, por tus palabras de aliento, por la comprensión y paciencia.

Agradecer a la Profesora Camila Mery, por creer en mí e incentivar en el amor por la microbiología desde diferentes aristas, motivándome a querer aprender más del área como alumna, a compartir mis conocimientos como ayudante y ahora a realizar una tesis relacionada al área para optar al título de ingeniera.

Agradezco al profesor Michael Seeger, por darme la oportunidad de realizar mi tesis en el Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental (LMMBA) y la oportunidad de conocer el ámbito de la investigación con mayor profundidad. A Ximena Báez, por su tiempo, por todo el apoyo y entendimiento, por sus consejos y ayuda. Gracias por ser mucho más que una tutora/compañera durante el desarrollo de mi tesis.

Finalmente, agradecer a todos los miembros del LMMBA, que siempre estuvieron dispuestos a ayudar, a resolver dudas, a compartir sus conocimientos y buscar la forma de contribuir en el avance de los experimentos. Agradezco la oportunidad de haber sido parte de un grupo humano tan cálido y cooperativo.



Resumen

En los ecosistemas, las bacterias pueden estar sometidas a estrés oxidativo tanto por la degradación de hidrocarburos como por la presencia de NaCl. Para la biorremediación de hidrocarburos de petróleo, se requieren microorganismos capaces de degradar los hidrocarburos de petróleo además de tolerar condiciones salinas. Los antioxidantes permiten reducir el estrés oxidativo. El orujo de uva, que está poco valorizado en Chile, se caracteriza por un alto contenido en diferentes compuestos antioxidantes. Considerando lo anterior, se plantea la siguiente hipótesis: “La bioestimulación con extracto de orujo de uva, que posee un alto contenido de antioxidantes, potencia la capacidad de *Acinetobacter radioresistens* DD78 para crecer en presencia de hidrocarburos de petróleo en condiciones salinas”.

El objetivo de este estudio fue determinar la capacidad antioxidante de un extracto de orujo de uva *Vitis vinifera* variedad *Cabernet sauvignon* y caracterizar el efecto sobre el crecimiento en hidrocarburos de *Acinetobacter radioresistens* DD78 en condiciones salinas. Ensayos para evaluar la capacidad antioxidante del orujo por método 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo conocido por las siglas DPPH, muestran un 82% de reducción a una concentración de 750 [mg/L] de extracto de orujo de uva a los 30 min. Para evaluar el efecto del orujo de uva en el crecimiento bacteriano, se estudiaron en medio líquido dos fuentes de carbono: acetato 20 mM y diesel 1%v/v en presencia y ausencia de NaCl 300 mM y de orujo 7,5%. Se observó un mayor crecimiento bacteriano (UFC/ml) en presencia de orujo de uva 7,5%, sugiriendo que la bioestimulación con extracto de orujo de uva potencia la capacidad de *Acinetobacter radioresistens* DD78 para crecer en presencia de hidrocarburos de petróleo en condiciones salinas. Además, que el orujo de uva podría presentar una o más fuentes de carbono, las que podrían ser utilizadas por *Acinetobacter radioresistens* DD78 para su crecimiento y que el orujo de uva contiene agentes antioxidantes, cuyo papel osmoprotector podría favorecer el fitness de la bacteria, permitiéndole resistir diversos factores de estrés como la presencia de sal. Lo anterior, podría ser de gran utilidad al aplicarse en procesos de biorremediación de suelos en mayor escala.



Abstract

In ecosystems, bacteria can be subjected to oxidative stress from both hydrocarbon degradation and the presence of NaCl.

For bioremediation of petroleum hydrocarbons, microorganisms capable of degrading petroleum hydrocarbons as well as tolerating saline conditions are required. Antioxidants help reduce oxidative stress. Grape pomace, which is little valued in Chile, is characterized by a high content of different antioxidant compounds. Considering the above, the following hypothesis is proposed: "Biostimulation with grape pomace extract, which has a high content of antioxidants, enhances the ability of *Acinetobacter radioresistens* DD78 to grow in the presence of petroleum hydrocarbons under saline conditions".

The objective of this study was to determine the antioxidant capacity of a grape pomace extract from *Vitis vinifera* grape variety *Cabernet sauvignon* and to characterize the effect on the growth of *Acinetobacter radioresistens* DD78 in hydrocarbons under saline conditions. Tests to evaluate the antioxidant capacity of grape pomace by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method showed an 82% reduction at a concentration of 750 [mg/L] of grape pomace extract after 30 min. To evaluate the effect of grape pomace on bacterial growth, two carbon sources were studied in liquid culture: 20 mM acetate and 1%v/v diesel in the presence and absence of 300 mM NaCl and 7.5% grape pomace. Higher bacterial growth (CFU/ml) was observed in the presence of 7.5% grape pomace, suggesting that biostimulation with grape pomace extract enhances the ability of *Acinetobacter radioresistens* DD78 to grow in the presence of petroleum hydrocarbons under saline conditions. Furthermore, that grape pomace could contain one or more carbon sources, which could be used by *Acinetobacter radioresistens* DD78 for its growth and that grape pomace also contains antioxidant agents, whose osmoprotective role could favor the fitness of the bacterium, allowing it to resist various stress factors such as the presence of salt. This could be very useful when applied in soil bioremediation processes on a larger scale.



Índice

Agradecimientos.....	1
Resumen.....	2
Abstract.....	3
Índice.....	4
1. Introducción.....	9
2. Marco teórico.....	11
2.1. El Petróleo.....	11
Alifáticos	11
Aromáticos.....	12
Resinas y Asfaltenos.....	12
2.1.1. Usos del petróleo.....	13
2.2. Contaminación ambiental por petróleo	14
2.3. Biorremediación de contaminantes derivados del petróleo	15
2.3.1. Bioestimulación.....	17
2.4. Cepas bacterianas biorremediadoras.....	19
2.4.1. Metabolismo microbiano de alcanos en la biorremediación de hidrocarburos del petróleo	19
2.4.1.1. <i>Acinetobacter radioresistens</i> DD78.....	20
2.5. Estrés salino y oxidativo	22
2.6. Fuentes de antioxidantes	23
2.6.1. Compuestos polifenólicos	23
2.7. Uva como fuente de antioxidantes polifenólicos en Chile.....	24
2.7.1. El principal subproducto de la vinificación: el orujo de uva.....	27
2.7.2. Compuestos polifenólicos en el orujo de uva.....	29
3. Hipótesis y objetivos	30
3.1. Hipótesis	30
3.2. Objetivo general.....	30
3.3. Objetivos específicos	30
4. Materiales y métodos.....	31
4.1. Materiales.....	31
4.1.1. Reactivos químicos	31



4.2.	Equipos	31
4.3.	Medios de Cultivo.....	34
4.4.	Cepa bacteriana.....	34
4.5.	Metodologías.....	35
4.5.1.	Diseño y desarrollo experimental.....	35
4.5.2.	Obtención de la solución de orujo de uva	37
4.5.3.	Determinación de actividad antioxidante	37
4.5.4.	Cálculo del área bajo la curva de las curvas de Reducción del radical DPPH en el tiempo en la presencia de α -tocopherol y extracto de orujo de uva.....	39
4.5.5.	Preparación de pre-inóculo.....	40
4.5.6.	Condiciones de crecimiento	40
4.5.7.	Análisis estadísticos	42
5.	Resultados.....	43
6.	Discusión	66
7.	Conclusiones.....	72
8.	Proyecciones y recomendaciones	73
9.	Bibliografía	74
10.	Anexos.....	83
11.	Participación en congresos.....	86
12.	Financiamiento	86



Índice de Figuras

Figura 1. Clasificación de los hidrocarburos del petróleo según su estructura química.....	11
Figura 2. Principales productos petrolíferos, intervalos de temperatura de ebullición y de número de átomos de carbono.	13
Figura 3. Posibles vías periféricas para la degradación aeróbica de n-alcanos en microorganismos.....	19
Figura 4. Crecimiento de <i>Acinetobacter radioresistens</i> DD78 en placa con TSA.....	21
Figura 5. Clasificación de los compuestos polifenólicos.	23
Figura 6. Proceso de elaboración del Vino tinto.	27
Figura 7. Esquema desarrollo experimental.	36
Figura 8. Proceso de preparación de solución de orujo de uva.	37
Figura 9. Proceso de obtención del extracto de orujo uva.....	38
Figura 10. Procedimiento de determinación del secuestro de radicales libres.	39
Figura 11. Condiciones de experimentación y metodología de determinación de crecimiento microbiano.	41
Figura 12. Comparación en Unidades Formadoras de Colonia de <i>A. radioresistens</i> DD78 a las 12h de crecimiento a 30°C a 147 rpm en presencia de Acetato. De izquierda a derecha y en orden descendente, se observan las condiciones de crecimiento en acetato; acetato más 7,5% de orujo de uva; acetato más 300mM de NaCl; acetato más 300mM de NaCl y 7,5% de orujo de uva; control sin fuente de carbono más 300mM de NaCl; control sin fuente de carbono más 300mM de NaCl y 7,5% de orujo de uva; control sin fuente de carbono y control sin fuente de carbono y 7,5% de orujo de uva.....	54
Figura 13. Comparación en Unidades Formadoras de Colonia de <i>A. radioresistens</i> DD78 a las 48h de crecimiento a 30°C a 147rpm en presencia de diésel. De izquierda a derecha y en orden descendente, se observan las condiciones de crecimiento en diésel; diésel más 7,5% de orujo de uva; diésel más 300mM de NaCl; diésel más 300mM de NaCl y 7,5% de orujo de uva; control sin fuente de carbono más 300mM de NaCl; control sin fuente de carbono más 300mM de NaCl y 7,5% de orujo de uva; control sin fuente de carbono y control sin fuente de carbono y 7,5% de orujo de uva.....	62



Índice de gráficos

Gráfico 1. Producción de uva fresca en principales países productores en 2022.	24
Gráfico 2. Evolución de la producción de Vinos en Chile entre los años 1998 -2022.	25
Gráfico 3. 10 variedades de uva más declaradas en Chile año 2022. (Litros).	26
Gráfico 4. Reducción del radical DPPH a diferentes concentraciones α -tocopherol en el tiempo; (n=3....	43
Gráfico 5. Relación entre el área bajo la curva de las curvas de Reducción del radical DPPH en el tiempo en la presencia de α -tocopherol.	44
Gráfico 6. Reducción del radical DPPH en el tiempo en la presencia de extracto de orujo de uva.; (n=3; α = 0,05).	45
Gráfico 7. Relación entre área bajo la curva de las curvas de Reducción del radical DPPH en el tiempo en la presencia de extracto de orujo de uva y de α -tocopherol.	47
Gráfico 8. Curvas de crecimiento de <i>A. radioresistens</i> DD78 en las condiciones de control sin fuente de carbono con 7,5% de orujo de uva (negra); control sin fuente de carbono más 7,5% de orujo de uva y 300mM de NaCl (rosada); acetato de Sodio 20mM más orujo de uva 7,5% (rojo) y acetato de sodio 20mM más orujo de uva 7,5% y 300mM de NaCl (celeste) expresado en turbidez en una longitud de onda de 600nm (n=3; α = 0,05).	50
Gráfico 9. Curvas de crecimiento de <i>A. radioresistens</i> DD78 en las condiciones de control sin fuente de carbono con 7,5% de orujo de uva (negra); control sin fuente de carbono más 7,5% de orujo de uva y 300mM de NaCl (rosado); acetato de sodio 20mM más orujo de uva 7,5% (rojo) y acetato de sodio 20mM más orujo de uva 7,5% y 300mM de NaCl (celeste) expresado en Unidades Formadoras de colonia por mL (UFC/mL) (n=3; α =0,05)	53
Gráfico 10. Curvas de crecimiento de <i>A. radioresistens</i> DD78 en las condiciones de control sin fuente de carbono más 7,5% de orujo de uva (negro); control sin fuente de carbono más 7,5% de orujo de uva y 300mM de NaCl (rosado); diésel 1%v/v más Orujo de Uva 7,5% (rojo) y diésel 1%v/v más Orujo de Uva 7,5% y 300mM de NaCl (celeste) expresado en turbidez en una longitud de onda de 600nm (n=3; α =0,05).	59
Gráfico 11. Curvas de crecimiento de <i>A. radioresistens</i> DD78 en las condiciones de control sin fuente de carbono más 7,5% de orujo de uva (negro); control sin fuente de carbono más 7,5% de orujo de uva y 300mM de NaCl (rosado); diésel 1%v/v más Orujo de Uva 7,5% (rojo) y diésel 1%v/v más Orujo de Uva 7,5% y 300mM de NaCl (celeste) expresado en Unidades Formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL). (n=3; α =0,05).	61
Gráfico 12. Curvas de crecimiento de <i>A. radioresistens</i> DD78 en las condiciones de control sin fuente de carbono (negro); control sin fuente de carbono más 300mM de NaCl (rosado); acetato de sodio 20mM (rojo) y acetato de sodio 20mM más 300mM de NaCl (celeste) expresado en turbidez a 600nm.	83
Gráfico 13. Curvas de crecimiento de <i>A. radioresistens</i> DD78 en las condiciones de control sin fuente de carbono (negro); control sin fuente de carbono más 300mM de NaCl (rosado); acetato de sodio 20mM (rojo) y acetato de sodio 20mM más 300mM de NaCl (celeste) expresado en Unidades Formadoras de Colonia por mililitro (UFC/mL).	83
Gráfico 14. Curvas de crecimiento de <i>A. radioresistens</i> DD78 en las condiciones de control sin fuente de carbono (negro); control sin fuente de carbono más 300mM de NaCl (rosado); diésel 1%v/v (rojo) y diésel 1%v/v más 300mM de NaCl (celeste) expresado en turbidez a 600nm.	84



Gráfico 15. Curvas de crecimiento de *A. radioresistens* DD78 en las condiciones de control sin fuente de carbono (negro); control sin fuente de carbono más 300mM de NaCl (rosado); diésel 1%v/v (rojo) y diésel 1%v/v más 300mM de NaCl (celeste) expresado en Unidades Formadoras de Colonia por mililitro (UFC/mL)..... 84

Índice de Tablas

Tabla 1. Estrategias de remediación de suelos contaminados con hidrocarburos y sus costos asociados...	15
Tabla 2. Bioestimulación utilizando nutrientes orgánicos para eliminar hidrocarburos totales del petróleo.	18
Tabla 3. Listado de equipos utilizados en laboratorio, marca, modelo, uso e imagen referencial	31
Tabla 4. Reducción del radical DPPH a diferentes concentraciones de α -tocopherol en el tiempo (%).....	43
Tabla 5. Concentraciones de extracto de orujo de uva utilizadas en la construcción de las curvas analizadas.	45
Tabla 6. Reducción del radical DPPH a diferentes concentraciones de Extracto de Orujo de Uva en el tiempo (%).....	46
Tabla 7. Equivalencias de capacidad antioxidante de orujo de uva en equivalentes de α -tocoferol	48
Tabla 8. Valores de turbidez a 600nm en 12h de experimentación en diferentes condiciones de crecimiento	49
Tabla 9. Significancia estadística según Test de Tukey HSD entre las diferentes curvas de crecimiento obtenidas desde medición de turbidez a 600 nm	51
Tabla 10. Valores de UFC/ml a las 12h de experimentación en diferentes condiciones de crecimiento	52
Tabla 11. Significancia estadística según Test de Tukey entre las diferentes curvas de crecimiento obtenidas desde UFC en Acetato 20mM.	55
Tabla 12. Valores de UFC/ml en 36 h de experimentación en diferentes condiciones de crecimiento	60
Tabla 13. Significancia estadística según Test de Tukey entre las diferentes curvas de crecimiento obtenidas desde UFC en diésel 1%v/v.....	63

1. Introducción

La contaminación por petróleo producto de derrames en el suelo y la presencia de sal en los suelos pueden coexistir en una misma zona (Benavides Lopez de Mesa, *et al.*, 2006).

La biorremediación ha sido una importante estrategia para la descontaminación de suelos con hidrocarburos de petróleo, ya que en general es más económica que las técnicas fisicoquímicas y es ambientalmente sostenible (Varjani, 2017), pero puede verse mermada por factores ambientales, como la temperatura, pH y la presencia de NaCl (Boopathy, 2000; Fuentes, 2014; Varjani, 2017; Durán, *et al.*, 2019). Una de estas estrategias, es la bioestimulación, que es la adición de nutrientes o biosurfactantes para estimular el metabolismo de los microorganismos (Adams *et al.*, 2015; Chan-Quijano *et al.*, 2015; Ossai *et al.*, 2020). Se ha observado que tanto la presencia de sal como la degradación de hidrocarburos al ser utilizados como fuente de carbono por las bacterias biorremediadoras, aumenta el estrés oxidativo propio de las mismas, mermando con ello su tasa de degradación al provocar daños en sus estructuras proteicas, lipídicas y en su material genético (Møller, *et al.*, 2007; Miller, *et al.*, 2010; Hossain, *et al.*, 2016). Por consiguiente, se requieren microorganismos que tengan la capacidad de degradar los hidrocarburos de petróleo y a su vez, resistir el estrés salino, como es el caso de *A. aquatilis* QD168 cuya adaptación fisiológica le permite crecer en zonas salinas contaminadas por petróleo (Durán, *et al.*, 2019).

Además, se deben buscar alternativas que permitan reducir el estrés oxidativo provocado por el metabolismo microbiano y las condiciones ya mencionadas, para potenciar la degradación de hidrocarburos y con ello, la descontaminación de los suelos. En este contexto, se presenta a los antioxidantes como sustancias de utilidad para reducir el estrés oxidativo generado.

Se han descrito diversas técnicas para evaluar la capacidad antioxidante de plantas y alimentos (Guija-Poma *et al.*, 2015). El 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo conocido por las siglas DPPH, posee una coloración violeta oscuro que, al añadir una sustancia donadora de átomos de hidrógeno, se reduce y se convierte en una solución amarilla pálida no radicalaria. Se ha escogido como método para cuantificar la capacidad antioxidante del extracto orujo de uva debido a que es uno de los más simples para medir la capacidad antioxidante *in vitro*; es rápido, pues se puede obtener resultados en un periodo corto de tiempo; porque el radical DPPH es muy estable, lo que facilita su manejo en el laboratorio (Kedare & Singh, 2011) y porque esta metodología se ha utilizado con anterioridad en el Laboratorio para la estandarización de la capacidad antioxidante de un extracto de bayas, de α -tocopherol y ácido ascórbico que fueron utilizados para evaluar el efecto de los compuestos antioxidantes sobre el crecimiento, la morfología y la degradación de PCB por *B. xenovorans* LB400 (Ponce, *et al.*, 2011)

La uva se muestra como una opción atractiva de obtención de fuentes de antioxidantes en Chile, ya que existe una alta producción de esta fruta, debido a la creciente industria del Vino. Entre los principales residuos o sub-productos que se obtienen de la producción de vino están los residuos orgánicos y los residuos líquidos. Entre los residuos orgánicos destaca el orujo, que corresponde a las pieles, semillas y pulpa residual, que ha significado el surgimiento de problemáticas ambientales debido a que genera malos olores y en grandes cantidades disminuye el pH del suelo (Christ y Burrit, 2013; Dwyer *et al.*,



2014). Sin embargo, este residuo que actualmente está poco valorizado en Chile se caracteriza por un alto contenido en diferentes compuestos bioactivos debido a la mala extracción durante el proceso de la vinificación, preservando una gran cantidad de compuestos antioxidantes que pueden ser de utilidad para fomentar los procesos de biorremediación (Boussetta *et al.*, 2009; Rockenbach *et al.*, 2011a, b; Ky *et al.*, 2014). Por esta razón, este trabajo busca determinar la capacidad antioxidante de un extracto de orujo de uva *Vitis vinifera* variedad *Cabernet sauvignon* y caracterizar el efecto sobre el crecimiento en hidrocarburos de *Acinetobacter radioresistens* DD78 en condiciones salinas, lo que podría ser de utilidad para procesos de biorremediación en mayor escala.

2. Marco teórico

2.1. El Petróleo

El petróleo es una mezcla heterogénea, insoluble en agua, compuesta principalmente por hidrocarburos y en menor cantidad de compuestos orgánicos de oxígeno, azufre, nitrógeno, vanadio, níquel, hierro, cobre y cromo (Murillo & Chirinos, 1994; Zhang *et al.*, 2019). La composición del petróleo varía con la ubicación y la edad del campo de petróleo, así como con la profundidad del pozo de petrolero (Macaya *et al.*, 2019). Los hidrocarburos presentes en esta mezcla se pueden clasificar según su estructura química en alifáticos, aromáticos y resinas y asfaltenos:

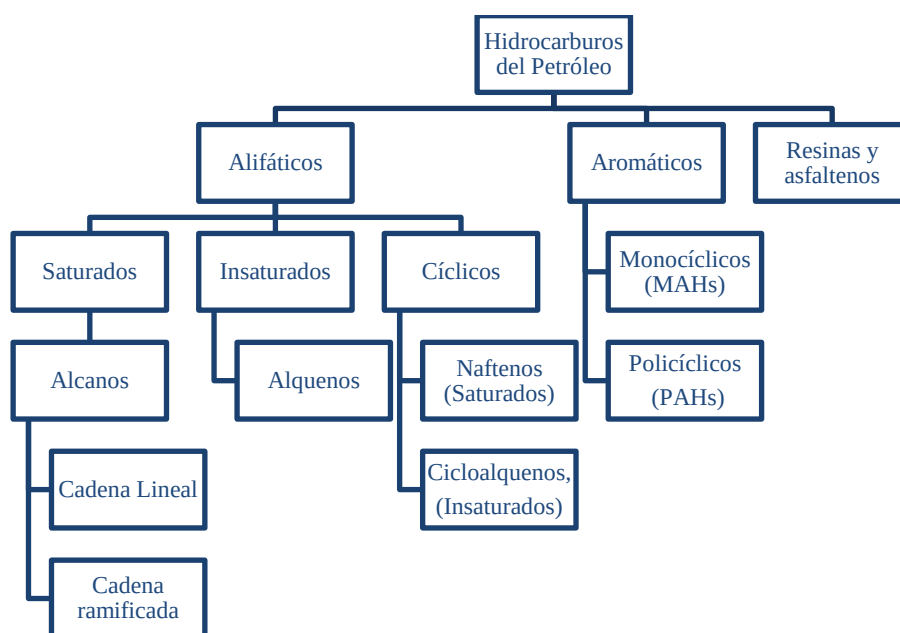


Figura 1. Clasificación de los hidrocarburos del petróleo según su estructura química.
Fuente: Elaboración propia, a partir de Macaya *et al.*, 2019

Alifáticos

Los hidrocarburos alifáticos son los más abundante en el petróleo crudo y pueden ser lineales o de cadena ramificada. Además, estas moléculas pueden ser saturadas, donde se encuentran los alcanos o parafinas; e insaturadas con enlaces dobles y/o cíclicas.

Parafinas o n-alcanos (saturados)

Su fórmula general es C_nH_{2n+2} . Se caracterizan por poseer átomos de carbono unidos mediante enlaces simples y los otros se encuentran saturados con átomos de hidrógeno (Gary & Handwerk, 2021).

Los n-alcanos se clasifican según su peso molecular en cuatro grupos:

1. Alcanos gaseosos, como el Metano (CH_4)
2. Alcanos de bajo peso molecular (C_8-C_{16}), como el n-octano (C_8H_{18}) y el n-hexadecano ($C_{16}H_{34}$).

3. Alcanos de peso molecular medio (C_{17} – C_{28}), como aquellos conformados por unidades de isopreno, siendo el Pristano (C_{19}) y el Fitano (C_{20}) los más abundantes en los petróleos.
4. Alcanos de peso molecular alto ($>C_{28}$), como algunos isoprenoides con 40 átomos de carbono (Botello,2005; Macaya *et al.*, 2019).

Alquenos (insaturados)

Su fórmula general es C_nH_{2n} . Los Alquenos, hidrocarburos etilénicos u olefinas son moléculas lineales o ramificadas que contienen un enlace doble de carbono, como el etileno (C_2H_2), propileno (C_3H_6), entre otros.

Alifáticos Cíclicos

Su fórmula general es C_nH_{2n} . Los alcanos cíclicos consisten en compuestos en los cuales todos o algunos de los átomos de carbono están arreglados molecularmente formando anillos (Wade, 2017).

Aromáticos

Los compuestos aromáticos se encuentran en menor proporción en el crudo que los compuestos alifáticos. Esta serie de hidrocarburos se caracterizan por poseer una estructura que contiene un anillo de seis carbonos con doble enlaces conjugados que no se encuentra saturado pero que es muy estable, denominado anillo bencénico. De acuerdo con de la cantidad de anillos se clasifican en monocíclicos (MAHs: *Monocyclic Aromatic Hydrocarbons*), que pueden ser sustituidos con cadenas laterales o no, y policíclicos (PHAs: *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*) que poseen dos o más anillos (Botello,2005; Macaya, *et al.*, 2019; Gary & Handwerk,2021)

Resinas y Asfaltenos

Son constituyentes polares del petróleo de alta complejidad (Pingping, *et. al*, 2019). Pueden ser agrupados en seis clases como: a) compuestos con azufre; b) compuestos con nitrógeno; c) porfirinas d) compuestos con oxígeno; e) asfaltenos y f) metales pesados; donde los compuestos azufrados comprenden al grupo más importante de los constituyentes polares y el vanadio y níquel son los elementos metálicos más abundantes en el petróleo y en ocasiones alcanzan concentraciones a las mil partes por millón (Posthuma, 1977; Botello, 2005).

2.1.1. Usos del petróleo

En la actualidad, el petróleo es una fuente importante de energía debido a sus importantes ventajas, pues posee un alto contenido energético por unidad de peso, además de que su almacenamiento y transporte poseen un menor costo en relación con otras fuentes energéticas (Wauquier, 2004; Botello, 2005). Además de lo anterior, del petróleo refinado se pueden obtener una amplia gama de productos, como ceras, aceites, gasolina y gas licuado; que lo transforman en una materia prima de interés para el ser humano. A continuación, se pueden apreciar algunos productos que se pueden obtener a partir del refinado del petróleo.

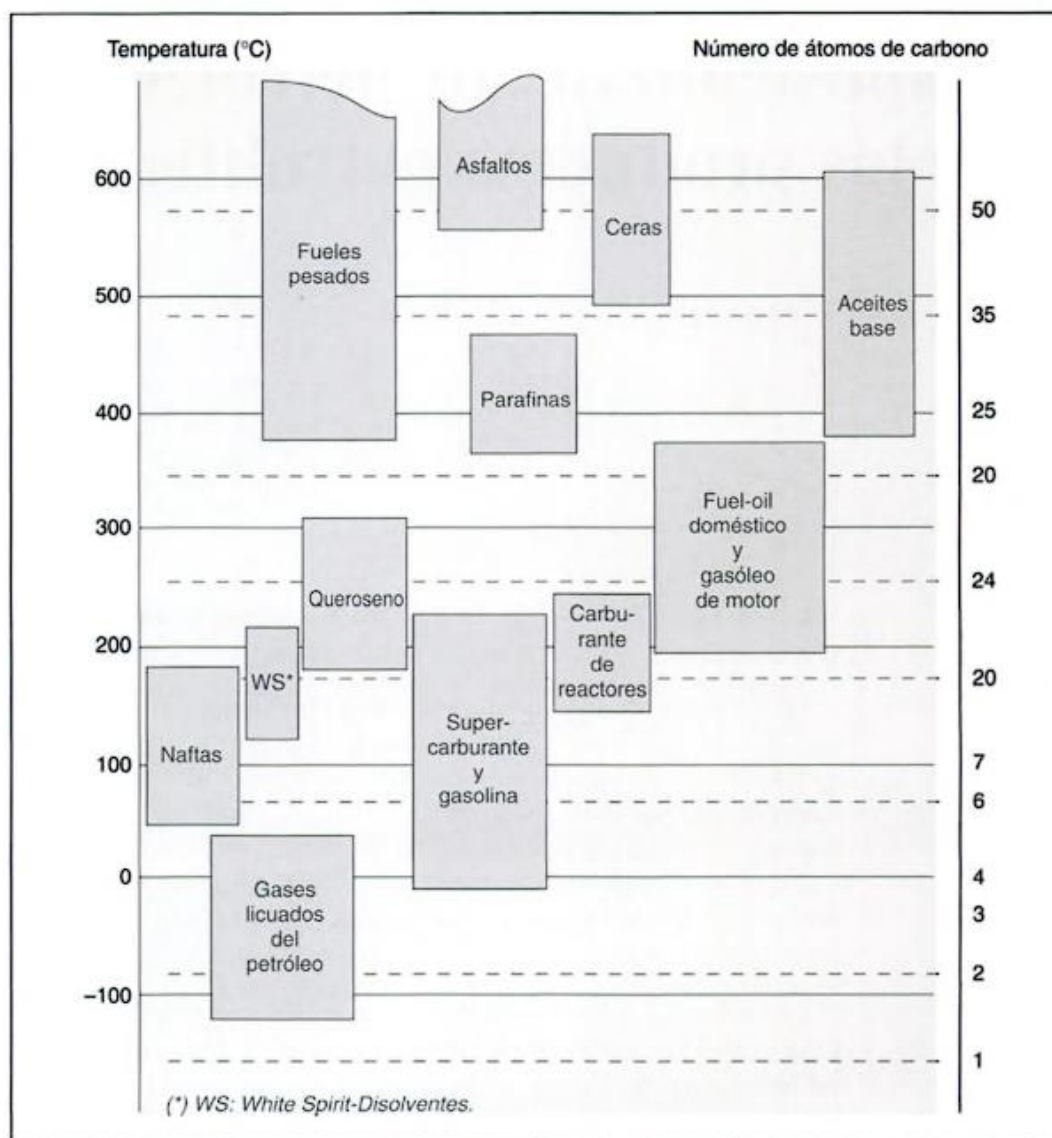


Figura 2. Principales productos petrolíferos, intervalos de temperatura de ebullición y de número de átomos de carbono.
Fuente: (Wauquier, 2004)



2.2. Contaminación ambiental por petróleo

El petróleo ha sido el responsable de numerosos desastres ambientales debido a que cantidades importantes de éste se han liberado al medioambiente en los procesos de extracción, refinado, transporte y almacenamiento, lo cual ha representado grandes problemas de contaminación en los ecosistemas del mundo (Lee *et.al*, 2016; Zhang *et.al*, 2019; Shipra & Praveen Dahiya, 2022).

Lo anterior, puede visualizarse en derrames ocurridos en el agua y en el suelo. Para el primer caso, el efecto negativo producido es el impedimento de la entrada de luz y el intercambio gaseoso provocando la solubilización de algunos compuestos y afectando inicialmente al plancton, para posteriormente perturbar a la macrofauna. Ello ocurre porque este contaminante flota por diferencia de densidad con el agua, creando una capa superficial que impide el paso de luz, afectando directamente a los organismos fotosintéticos y, en consecuencia, a toda la cadena trófica. Por su parte, en el caso del suelo, el principal efecto del petróleo se debe a que los hidrocarburos impiden el intercambio gaseoso del suelo con la atmósfera, provocando reacciones y procesos fisicoquímicos perjudiciales para la biota. Por tanto, el petróleo al igual que sus derivados se consideran contaminantes, ello a raíz de que sus componentes se mantienen persistentes en la matriz donde son liberados y, además, son altamente complejos, tóxicos y recalcitrantes (Loya & Rinkevich, 1980; Samiullah, 1985; Hidalgo, 2009).

Chile no es ajeno a esta realidad, pues 40.000 litros de diésel fueron derramados en el mar cerca de la isla de Guarello, una isla remota en la costa sur del país el año 2019 (CNN Chile, 2019). También, se han registrado derrames en la bahía de Quintero, región de Valparaíso, en los años 2014, 2015, 2016 y 2021; donde en el más reciente se liberaron cerca de 200 litros de petróleo que fueron vertidos a la bahía por la fisura del ducto de Puerto Ventanas (Dario La Tercera, 2016; CNN Chile, 2021; Diario UChile, 2021).

Por ello, es que en la actualidad se han buscado diversas alternativas para la limpieza de sitios contaminados con hidrocarburos del petróleo, aplicando tratamientos de tipo fisicoquímicos y de biorremediación.

2.3. Biorremediación de contaminantes derivados del petróleo

Para la eliminación de hidrocarburos del petróleo se utilizan estrategias de descontaminación fisicoquímicas, térmicas y biológicas (Saval, 1999). Estas pueden ser del tipo *in situ*, donde se busca neutralizar el contaminante en su lugar de origen; o *ex situ*, donde los contaminantes se tratan en un lugar diferente al sitio de origen (Fuentes, 2014; Khan, 2018; Ossai *et.al*, 2020).

Muchos métodos convencionales de descontaminación fisicoquímicos basados en la ingeniería tienen un alto costo debido a la excavación y transporte de la matriz contaminada para realizar tratamientos *ex-situ* (Varjani, 2017). A continuación, se puede apreciar una estimación de los costos de diferentes técnicas utilizadas para la remediación de suelos:

Tabla 1. Estrategias de remediación de suelos contaminados con hidrocarburos y sus costos asociados

Estrategia	Sitio de tratamiento	Costo (US \$/m ³)
Biológica		
Bioestimulación	<i>In situ</i>	30-100
Bioaumentación	<i>In situ</i>	30-100
Bioventeo	<i>In situ</i>	79-970
Biopilas	<i>Ex situ</i>	130-260
Compostaje	<i>Ex situ</i>	366-439
Landfarming	<i>Ex situ</i>	>100
Fisicoquímica		
Extracción con vapor	<i>In situ</i>	405-1485
Separación electrocinética	<i>In situ</i>	50-117
Solidificación/estabilización	<i>In situ</i>	50-330
Desorción térmica	<i>Ex situ</i>	44-252
Reducción/oxidación química	<i>Ex situ</i>	190-660
Lavado de suelo	<i>Ex situ</i>	70-187

Fuente: Adaptado de (Macaya *et.al*,2019)

Los costos crecientes y la eficacia limitada de estos tratamientos fisicoquímicos tradicionales han impulsado el desarrollo de tecnologías alternativas para aplicaciones *in situ*, basadas en las capacidades de remediación biológica principalmente de plantas y microorganismos (Singh & Jain, 2003; Farhadian *et al.*, 2008).

La biorremediación es un proceso biológico que puede ser natural o dirigido, en la que se utilizan microorganismos, como bacterias, hongos, protistas y levaduras, que degradan o neutralizan los contaminantes transformándolos en sustancias inocuas, tales como dióxido de carbono, agua o materia celular (Chan-Quijano *et al.*, 2015; Khan, 2018). Estos microorganismos son muy sensibles a su entorno de crecimiento, lo que influye en la tasa de biodegradación (Boopathy, 2000), por lo que el objetivo es disminuir los factores que la limitan o la retardan (Fuentes, 2014). Entre los factores que limitan o retardan la tasa de biodegradación, se tiene:

- a) **Características y disponibilidad de los contaminantes**, considerando la longitud y tipo de hidrocarburo presente, dispersión en fase acuosa y volatilización, pueden generar la baja biodisponibilidad de los hidrocarburos limitando el acceso de los microorganismos degradadores al contaminante y el exceso de fuente de carbono debido a la presencia de hidrocarburos resulta en una limitación de otros nutrientes inorgánicos.
- b) **Microorganismos autóctonos y vías metabólicas celulares**, debido a que las comunidades microbianas autóctonas pueden carecer de una maquinaria catabólica eficiente para la degradación (Fuentes, 2014).
- c) **Las condiciones ambientales**, como la temperatura, pH, la salinidad y el oxígeno disponible. La temperatura juega un rol crucial en la biorremediación, ya que puede ser un limitante en la tasa de crecimiento de los microorganismos y también de la degradación de los hidrocarburos. En general, la eficacia de la degradación es mayor cuando la temperatura es de 30-40 °C. Por su parte, el valor del pH del medio ambiente es uno de los factores clave para la biodegradación de los hidrocarburos del petróleo, porque afecta directamente en la supervivencia y reproducción de los microorganismos, así como en sus vías metabólicas y reacciones enzimáticas. Para el caso de la salinidad, se ha demostrado que la actividad metabólica y la diversidad de los microorganismos disminuyen con el aumento de la salinidad. Una elevada concentración de sal reduce el oxígeno disponible e inhibe la secreción de enzimas debido a la elevada presión osmótica del ambiente circundante; y también provoca la lisis celular (Hazaimh & Ahmed, 2021), por lo que la degradación de hidrocarburos de petróleo en suelos salino-alcálinos es uno de los obstáculos en la biorremediación, más aún porque los derrames de petróleo ocurren con frecuencia en suelos salinos costeros (Wartell *et al.*, 2021). Sin embargo, el descubrimiento de nuevos microorganismos halófilos y microorganismos recombinantes podría ser útil para desarrollar nuevas tecnologías que sean eficaces en un entorno salino (Chunyan *et al.*, 2023). Finalmente, el oxígeno disponible y factores nutricionales como las fuentes de carbono, nitrógeno y otros nutrientes; pueden ser limitantes a razón de que una baja disponibilidad de oxígeno provoca que la degradación esté limitada por la falta de este aceptor de electrones (Fuentes, 2014).
- d) **Propiedades fisicoquímicas del suelo**, como densidad, capacidad de retención de agua, humedad, textura, etc., que influyen en el metabolismo microbiano y en el acceso a los nutrientes (Boopathy, 2000; Varjani, 2017).

Las tecnologías de biorremediación tienen características comunes y pueden ser utilizadas de manera independiente o en combinación con otras. Entre las principales técnicas de biorremediación *ex situ* se puede mencionar el compostaje, el landfarming y las biopilas. El compostaje consiste en una degradación microbiana aerobia controlada de materiales orgánicos de desecho y su conversión en material orgánico estabilizado que puede utilizarse como acondicionador del suelo para la recuperación de suelos contaminados con compuestos orgánicos (Ren *et al.*, 2018). Por su parte, el proceso del landfarming consiste en la labranza, arado y esparcimiento del suelo en una capa delgada sobre la superficie del terreno. Lo anterior, para mejorar y estimular las actividades microbianas aeróbicas con la adición de nutrientes. Esta técnica es utilizada comúnmente para tratar suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo de bajo peso molecular y compuestos orgánicos volátiles (COV) (Guarino *et al.*, 2017).

Finalmente, las biopilas combinan las técnicas del landfarming y el compostaje en una celda ingenieril aireada con sopladores y bombas de vacío y que posee un sistema de inyección de nutrientes y de recolección de lixiviados (Ossai *et.al*, 2020).

Por su parte, para las técnicas *in situ* se tiene el bioventeo, que consiste en la inyección de aire (oxígeno) en el suelo contaminado con el fin de aumentar la degradación y minimizar los contaminantes volátiles a la atmósfera (Trulli *et al.*, 2016). La bioaumentación, donde se adicionan cultivos microbianos exógenos, autóctonos o genéticamente modificados, que presentan una actividad catabólica específica que ha demostrado degradar el contaminante de interés, buscando con ello, una mejora en la velocidad de biodegradación (Nwankwegu & Onwosi, 2017). Por último, la bioestimulación donde se adiciona cualquier material estimulante, como nutrientes, biosurfactantes y biopolímeros, con el fin de propiciar la actividad de los microorganismos autóctonos y así favorecer la biodegradación de los contaminantes (Adams *et. al*, 2015; Chan-Quijano *et.al*, 2015; Ossai *et.al*, 2020).

2.3.1. Bioestimulación

La bioestimulación implica la modificación del entorno para estimular las bacterias existentes capaces de degradar los contaminantes del petróleo. Esto puede hacerse añadiendo diversas formas de nutrientes limitantes y aceptores de electrones, como fósforo, nitrógeno, oxígeno o carbono, que de otro modo estarían disponibles en cantidades lo suficientemente bajas como para limitar la actividad microbiana autóctona (Morgan & Atlas, 1989; Margesin & Schinner, 2001; Perfumo *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2016)

La bioestimulación es uno de los métodos de biorremediación más exitoso y eficiente en comparación con otras técnicas de remediación *in situ* de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo (Simpanen *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2016), lo que la convierte en una tecnología atractiva de estudio al lograr un alto porcentaje de remoción de Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP o TPH en inglés). El desafío actual de la bioestimulación es buscar agentes estimulantes que sean sostenibles, más económicos y de fácil acceso. Por esta razón, es que se han probado diversos residuos orgánicos para estimular comunidades microbianas en la eliminación de contaminantes del petróleo. A continuación, pueden apreciarse diversos estudios que se han realizado buscando eliminar los HTP utilizando bioestimulación con materia orgánica:

Tabla 2. Bioestimulación utilizando nutrientes orgánicos para eliminar hidrocarburos totales del petróleo.

Nutriente añadido	Tipo de contaminante	Concentración inicial de HTP	Porcentaje removido	Duración	Comentario	Referencias
Compost hecho a partir de astillas de madera y lodo de alcantarillado	Hidrocarburos de petróleo- crudo del petróleo	38.000mg/kg	100% de remoción de 2-3 Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) dentro de los primeros 3 meses	570 días	Mostró una remoción del 100% en un periodo de 19 meses asociado a la población microbiana nativa y el crecimiento mejorado en el sistema	(Atagana, 2008)
Granos usados en fabricación de cerveza, cáscara de banana y compost de setas ya usado	Hidrocarburos de petróleo – aceite para lubricación usado	No indicado	79% y 92% para contaminación de petróleo del 5% ligado a la presencia de desechos orgánicos y baja contaminación mientras que la reducción inicialmente fue entre 17% y 24% en contaminación de petróleo del 15% p/p y 36% al 55% después de 84 días ligado a una alta concentración inicial	84 días	Mostró remoción significativa de HTP usando las fuentes de nutrientes orgánicos	(Abioye <i>et al</i> , 2012)
Excremento de aves de corral	Hidrocarburos de petróleo – sedimentos marinos contaminados	106,4ppm – 116ppm de HTP y 96,6ppm – 104ppm de HAP	95,35% para HTP y 98,92% para HAP	56 días	Degradación significativa de HAP y HTP en un biorreactor usando 20g de desechos de aves de corral y 1g de desechos de agua marina	(Chikere <i>et al</i> , 2012)
Estiércol bovino	Manglar con polución de hidrocarburos	14.103,02mg/kg	62,96%	70 días	Se observó reducción significativa al comparar con control usando estiércol bovino como agente bioestimulante	(Orji <i>et al</i> , 2012)
Hojas de té, alimento de soya y cáscara de papa	Hidrocarburos de petróleo – combustible diésel	100000mg/kg y 200000mg/kg de variación de concentración	Entre 25% y 82%	126 días	Mostró degradación significativa de HTP con el tratamiento con alimento de soya	(Dadrasnia y Agamuthu, 2013)
Residuo de la producción de aceite de palma y bagazo de caña de azúcar	Hidrocarburos de petróleo – crudo del petróleo	No indicado	100% para el bagazo de caña de azúcar y hasta 97% para el residuo de palma	20 días	Mostró biodegradación significativa usando estos suplementos para estimular el crecimiento microbiano	(Hamzah <i>et al</i> , 2014)

Fuente: Adaptado de (Adams *et. al*, 2015)

Al igual que la biorremediación, la bioestimulación puede verse mermada por factores que limitan o retardan la tasa de biodegradación. Además de los ya mencionados, se requiere de la presencia de los microorganismos adecuados, por lo que el estudio y selección de estos es de vital importancia para el éxito de la remediación. Sumado a lo anterior, se debe considerar la capacidad de estimular a los microorganismos objetivo y la de suministrar nutrientes al sistema. También mantener una razón C: N:P-30:5:1 para un crecimiento adecuado (Hazen, 2009).

2.4. Cepas bacterianas biorremediadoras

2.4.1. Metabolismo microbiano de alcanos en la biorremediación de hidrocarburos del petróleo

Las bacterias tienen la capacidad de oxidar y degradar hidrocarburos alifáticos y/o aromáticos, para utilizarlos como fuente de carbono en su crecimiento (Van Hamme *et al.*, 2003). Se ha identificado a bacterias de los géneros *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Brevibacterium*, *Cellulomonas*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Marinobacter*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomaonas*, *Rhodococcus* y *Vibrio* como potenciales degradadores de hidrocarburos del petróleo (Varjani & Upasani, 2015; Marchand, *et al.*, 2017; Carpena Istán, 2019; Otero *et al.*, 2021).

La biorremediación de hidrocarburos es posible gracias a la existencia de enzimas oxigenasas que son capaces de agregar o modificar grupos funcionales, al generar un momento dipolar en la molécula, que le permite transformar el hidrocarburo en intermediarios que pueden ingresar a alguna de las rutas metabólicas de los microorganismos (Rojo, 2009).

La degradación de los hidrocarburos puede ser de forma aeróbica o anaeróbica (Varjani, Microbial degradation of petroleum hydrocarbons, 2017). La degradación aeróbica de alcanos es la más común y puede ocurrir mediante oxidación terminal, oxidación sub-terminal e ingresar a la β -oxidación, o bien, di-terminal al tomar la ruta alternativa de la ω -oxidación (Salleh *et al.*, 2003; Abbasian *et al.*, 2015) como se aprecia en la Figura 3.

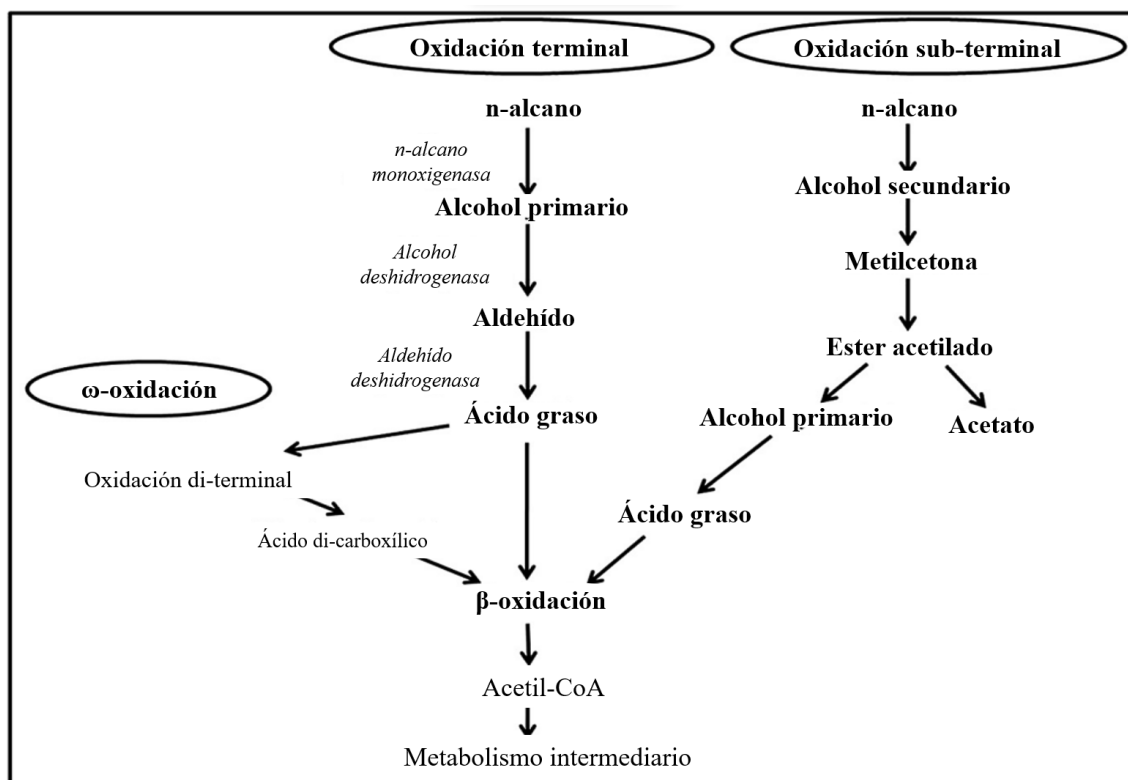


Figura 3. Posibles vías periféricas para la degradación aeróbica de n-alcanos en microorganismos.
Fuente: Adaptado de (Varjani, 2017).

La oxidación terminal comienza cuando una enzima alcano monooxigenasa oxida uno de los extremos del hidrocarburo alifático. De lo anterior, resulta un alcohol primario, que por acción de la enzima alcohol deshidrogenasa puede ser oxidado a un aldehído, el que posteriormente puede ser oxidado a un ácido carboxílico por la aldehído deshidrogenasa, para luego ingresar a la β -oxidación (Águila, 2014). En la oxidación sub-terminal, los alcanos se oxidan a alcohol secundario y luego a la correspondiente cetona y éster. El éster se hidroliza y genera un alcohol y posteriormente un ácido graso que ingresa a la β -oxidación (Rojo, 2009). En la vía di-terminal, a través de la ω -hidroxilación de los ácidos grasos (ω representa el metilo terminal), se produce la oxidación de ambos extremos de la molécula de alcano. Posteriormente, la molécula se convierte en un ácido dicarboxílico que ingresa a la β -oxidación. Para el caso de la degradación anaerobia, se utilizan nitrato, hierro, manganeso o sulfato como aceptores terminales de electrones y se logra la activación al acoplar una molécula de CO_2 (Abbasian *et al.*, 2015).

2.4.1.1. *Acinetobacter radioresistens* DD78

El género *Acinetobacter* se caracteriza por incluir bacterias de morfología cocobacilo, Gramnegativas, no móviles y no fermentadoras. Son aerobios estrictos, cuya temperatura de crecimiento se encuentra entre los 20 a 44°C, y su temperatura óptima es de 30-35°C (Salazar de Vegasa & Nieves, 2005). Su principal nicho ecológico es el agua y el suelo contribuyendo en su mineralización (Ron & Rosenberg, 2002), pero se ha reportado que también se han aislado de muestras clínicas (Jawad, 1998; Kämpfer, 2014). Existen variadas especies de *Acinetobacter* que son capaces de degradar hidrocarburos del petróleo y también de producir bioemulsificantes o biosurfactante como el alasan, que facilitan la disponibilidad de los hidrocarburos para otras cepas de bacterias (Navon-Venezia *et al.*, 1995; Águila, 2014).

La cepa *Acinetobacter radioresistens* DD78 fue aislada desde suelos contaminados con petróleo de la desembocadura del río Aconcagua, región de Valparaíso, Chile. Es una cepa catalasa positiva y sin movilidad, cuyas colonias al crecer en agar de soja tríptico (TSA) a 30°C por 24 horas, poseen una forma circular, una textura suave y un color crema, que se puede apreciar en la Figura 4. Posee resistencia a algunos antibióticos como la bacitracina, penicilina, ampicilina y la tetraciclina (Méndez *et al.*, 2017). Además, el genoma de *Acinetobacter radioresistens* DD78 proporciona datos esenciales sobre la degradación de alcanos, la resistencia a la sal, la producción de biosurfactantes y la resistencia a algunos metales pesados como el arsénico y el cobre. En su genoma, se ha visualizado que existen genes de rutas de degradación de hidrocarburos como *alkM*, que codifican una alcano monooxigenasa; también un sistema rubredoxina NAD(H) reductasa/rubredoxina; las vías catabólicas del catecol en el gen *catBCA* y del benzoato en *benABCDE*, que son cromosómicos. Además, se aprecian genes *alnA*, *alnB*, y *alnC* que codifican componentes de la proteína alasan. También, genes osmoprotectores como *betIBA* encargado de la síntesis del osmoprotector glicina betaína y transportadores osmoprotectores osmodependientes de colina, simportador de sodio/prolina y antiportador de aspartato/alanina. Sumado a ello, se pueden apreciar genes de resistencia al arsénico y a los metales pesados (cobre, cobalto y cadmio) en el gen *pAr1* (Macaya *et al.*, 2019). Todo lo expuesto, la convierte potencialmente para ser utilizada en consorcios bacterianos para biorremediar suelos contaminados con hidrocarburos.

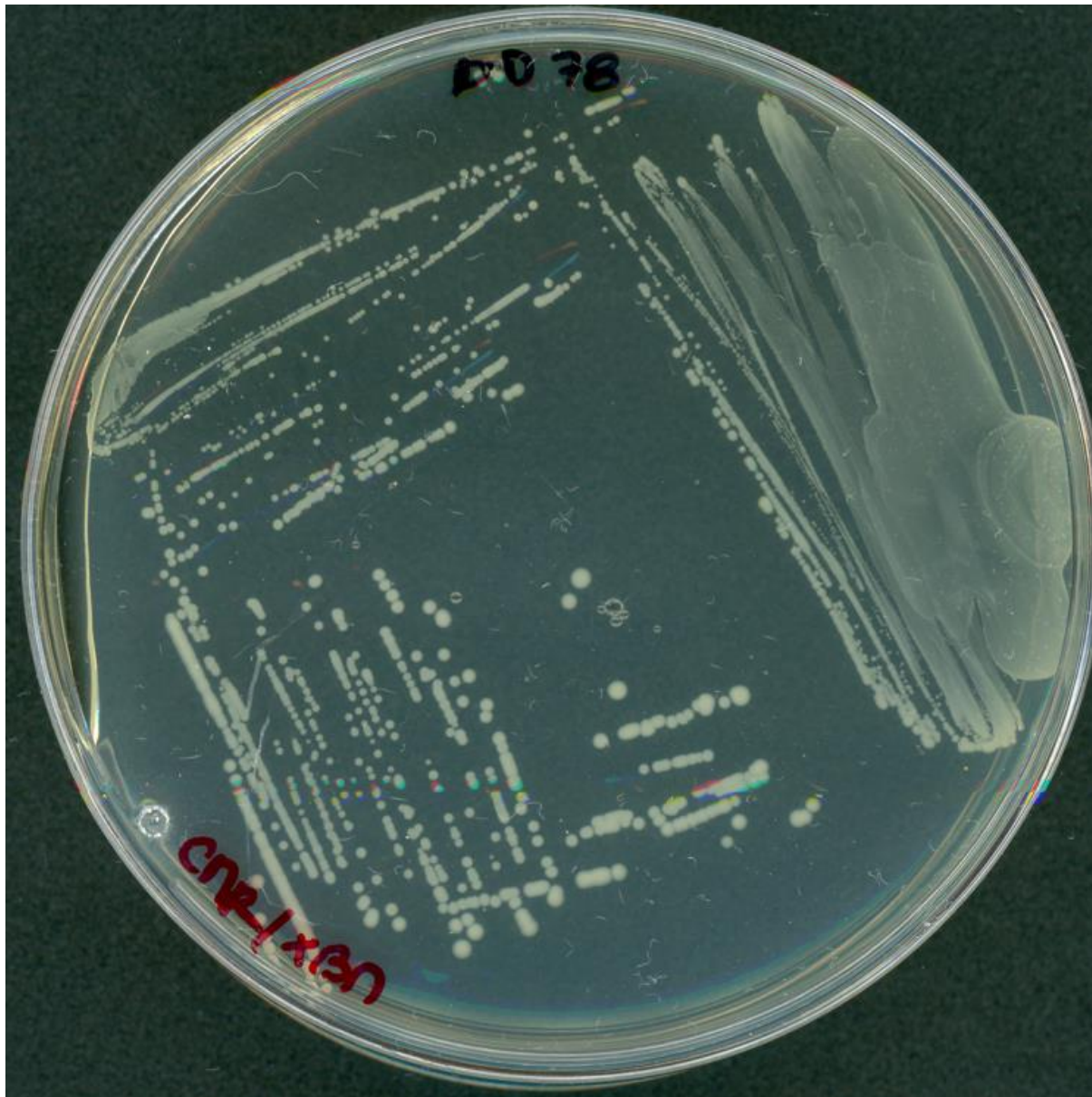


Figura 4. Crecimiento de *Acinetobacter radioresistens* DD78 en placa con TSA.

2.5. Estrés salino y oxidativo

La presencia de cloruro de sodio (NaCl) en una bacteria puede tener diferentes efectos, dependiendo de la cepa y la concentración de sal en el medio. El NaCl es un compuesto iónico que se encuentra en la mayoría de las células vivas y es esencial para el mantenimiento del equilibrio osmótico. Para sobrevivir en ambientes hipersalinos, los microorganismos poseen mecanismos de compensación de la presión osmótica, que les permiten sostener una turgencia positiva. Para ello, deben mantener una alta presión osmótica dentro de la célula, utilizando diferentes estrategias que se detallan a continuación:

1. La estrategia '*salt-in*', donde el equilibrio osmótico se logra mediante la acumulación de KCl como la principal sal intracelular.
2. La estrategia '*low-salt-in*', '*compatible solute*', donde compuestos de bajo peso molecular se acumulan no solo en respuesta al aumento de las concentraciones de sal, sino también como respuesta a otros cambios ambientales. Dichos compuestos son descritos como solutos compatibles y pueden ser polioles, azúcares, aminoácidos, betaínas, ectoínas, diaminoácidos N-acetilados, carboxamidas de glutamina derivadas de N, entre otros. (Oren,1999; Ramírez, *et al.*, 2004; Gunde-Cimerman,*et.al*,2018)

El estrés por salinidad tiende a propiciar la generación y acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que puede conducir a trastornos metabólicos y daño celular a nivel de ácidos nucleicos, proteínas y lípidos (Møller, *et al.*, 2007; Miller, *et al.*, 2010; Hossain, *et al.*, 2016). Las ROS incluyen moléculas no radicales como el oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno, así como radicales libres como el superóxido e hidroxilo (Azevedo Neto, *et al.*, 2008). El metabolismo celular genera en bajas tasas ROS como producto secundario normal de la respiración aeróbica. El estrés oxidativo ocurre cuando la velocidad con la que se generan las especies reactivas supera la velocidad con que dichas especies son removidas por los mecanismos de compensación y compuestos antioxidantes (Dennery, 2010).

Existen sistemas de defensa antioxidante, que les permite a los organismos aerobios protegerse de la producción de oxi-radicales. Estos sistemas de defensa se dividen en dos grupos: enzimáticos y no enzimáticos. Los enzimáticos forman parte intrínseca de la célula y la protegen frente a las ROS producidas durante el metabolismo. Dentro de éstos, destacan la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPX) que capturan y estabilizan los radicales libres. Por su parte, los sistemas no enzimáticos, son sustancias capaces de neutralizar un único radical libre por molécula, actúan en concentraciones elevadas y tienen un papel menos protagonista que el sistema de defensa enzimático. Estas sustancias pueden ser vitaminas liposolubles, como el α -tocopherol, vitamina E y α -caroteno; o moléculas reductoras de pequeño tamaño e hidrosolubles, como el ascorbato, vitamina C, glutatión reducido y flavonoides; que tienen un efecto antioxidante. (Montero,1996; Venereo Gutiérrez, 2002; Mayor Oxilia 2010)

2.6. Fuentes de antioxidantes

Una sustancia que comparada al sustrato se presenta en bajas concentraciones y que, a su vez, retrasa o previene la oxidación de éste, se define como un antioxidante (Montero,1996). Los antioxidantes disminuyen el estrés oxidativo, la mutación del ADN, la inactivación enzimática y otros parámetros de daño celular al prevenir la oxidación de otras moléculas, actuando como quelantes y atrapando los radicales libres (Godic A., *et al.*,2014). Se ha confirmado que antioxidantes exógenos de origen vegetal presentes en frutas y verduras refuerzan la acción de los antioxidantes endógenos. Algunos de los principales son: la vitamina C, que se puede encontrar en frutas cítricas como la naranja y el kiwi; la vitamina E, contenida en aceites vegetales, aceites de semilla, germen de trigo, maní y hortalizas; carotenoides, presentes en verduras y frutas amarillas y anaranjadas; y compuestos polifenólicos (estilbenos, ácidos fenólicos, flavonoides, entre otros) presentes en el café, cebollas, té verde y uvas. (Avello & Suwalsky, 2006). Por tanto, los antioxidantes son sustancias de utilidad para reducir el estrés oxidativo generado por el metabolismo celular (Corrales & Muñoz A, 2012).

2.6.1. Compuestos polifenólicos

Existen metabolitos secundarios en las plantas que poseen al menos un anillo aromático en su estructura y que tienen unidos uno o más grupos hidroxilo. Dichas moléculas son conocidas como Compuestos Polifenólicos (CPF) y se clasifican en Ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, curaminas, taninos y lignanos (Garrido & Borges, 2013; Mercado-Mercado, *et al.*, 2013)

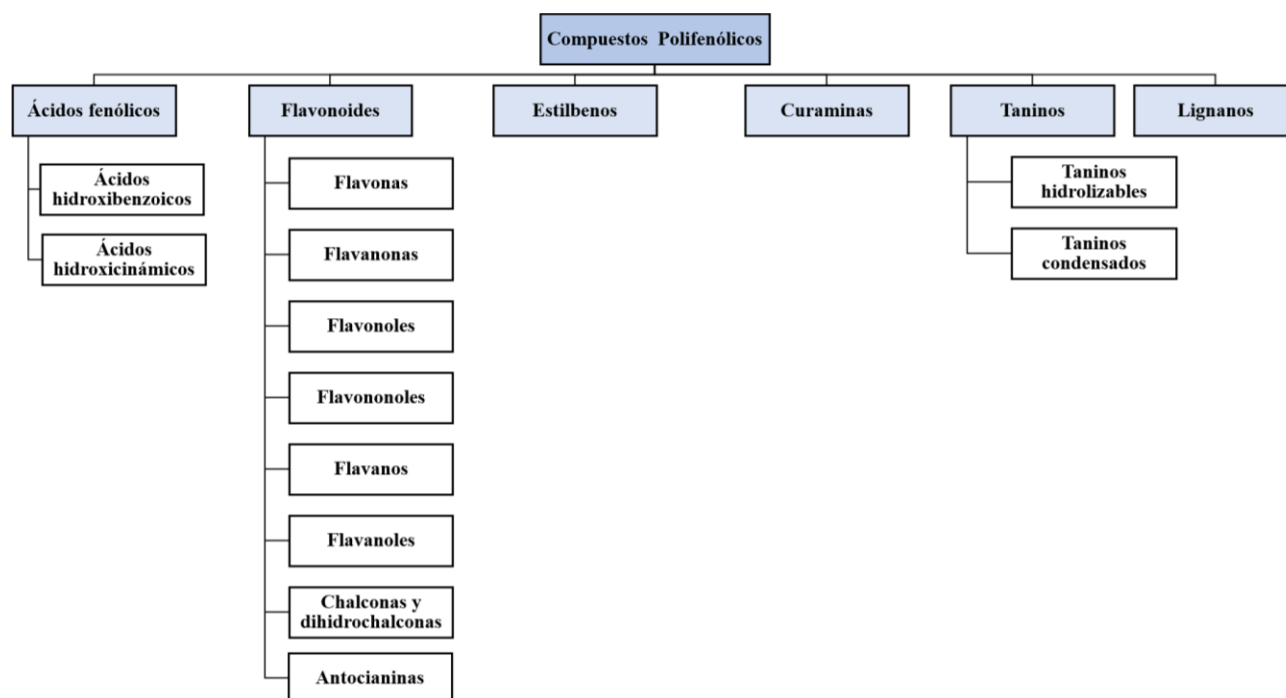


Figura 5. Clasificación de los compuestos polifenólicos.
Fuente: (Garrido & Borges, 2013)

2.7. Uva como fuente de antioxidantes polifenólicos en Chile

Se ha demostrado que las uvas y los vinos pueden contener altos niveles de antioxidantes fenólicos que reducen el estrés oxidativo (Bagchi, *et al.*, 2000; Ky, *et al.*, 2014), por lo que la uva se muestra como una opción atractiva de obtención de antioxidantes.

Chile es el octavo productor de uva fresca y el sexto de vinos en el mundo (OIV, 2022). De acuerdo con datos de la International Organisation of Vine and Wine (OIV), en 2022 se han producido alrededor de 2,6 millones de toneladas (mt) de uva fresca, y de estas, 0,6mt se han destinado a fruta de consumo (23,07%), 0,2mt a producción de uva seca o pasas (7,7%) y 1,8mt a la producción de vinos (69,23%), por lo que se puede apreciar que en Chile el mayor porcentaje de la producción de uvas frescas se destina a la industria vitivinícola.

Fresh grape production in major countries in 2022

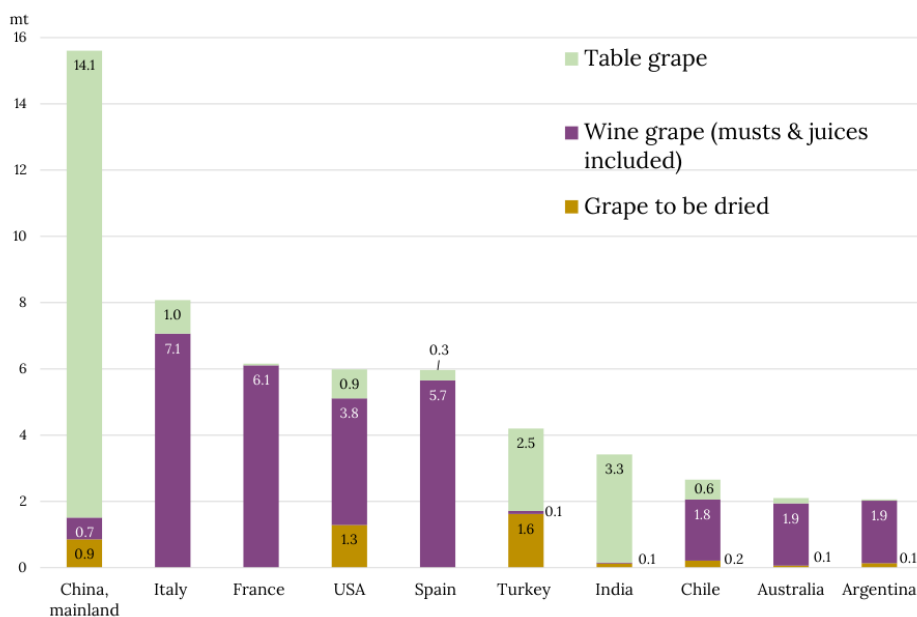


Gráfico 1. Producción de uva fresca en principales países productores en 2022.

Fuente: (OIV, 2022)

Además, de acuerdo con datos del Servicio Agrícola Ganadero (SAG) en el Informe Final de Producción de Vinos 2022, se aprecia que el sector vitivinícola chileno presenta una tendencia al aumento en su producción.

Evolución de la Producción de Vinos años 1998–2022 (Hl.)

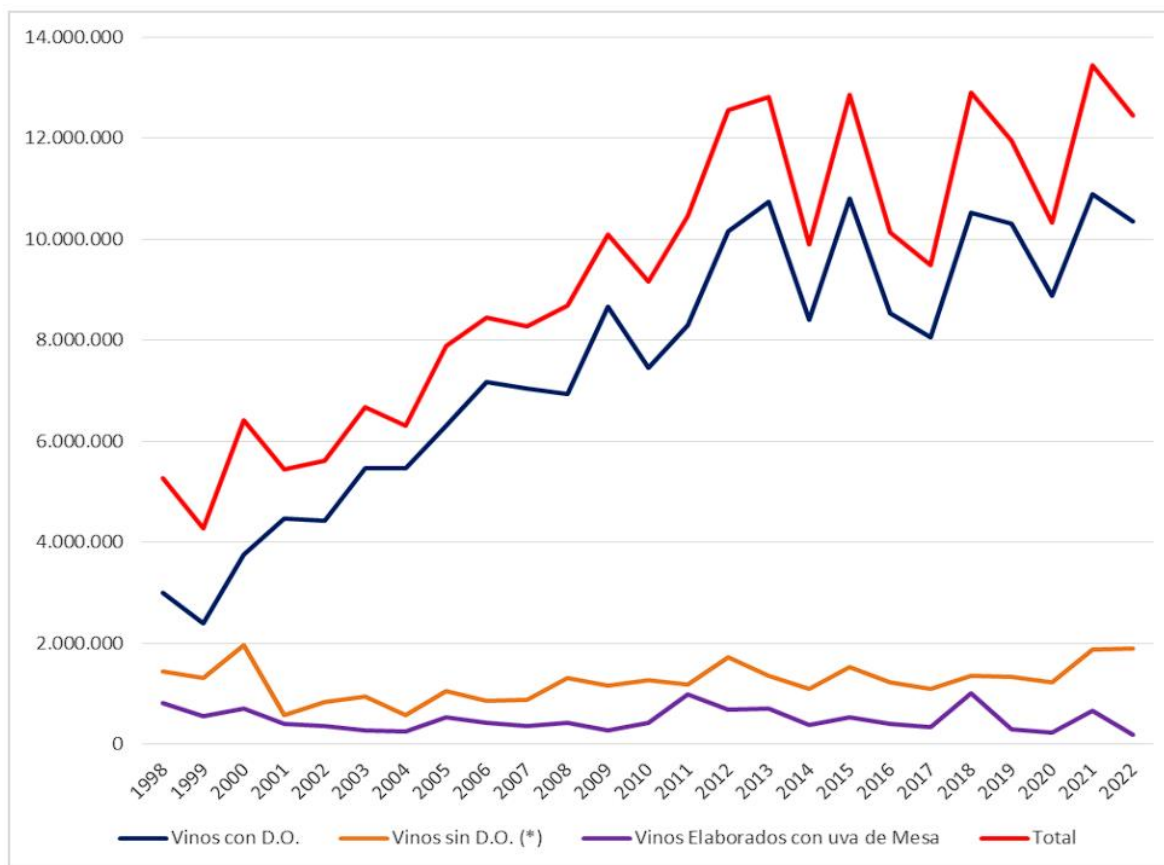


Gráfico 2. Evolución de la producción de Vinos en Chile entre los años 1998 -2022.
Fuente: (SAG, 2022)

Las mayores producciones de vinos se localizan en las regiones del Maule, Libertador Bernardo O'Higgins y Metropolitana respectivamente, totalizando el 92,2 % del total, concentrando en la Región del Maule el 50,2% de la totalidad de vino producido en el país. En relación con la producción de vinos, el 69% correspondió a vinos provenientes de cepajes tintos y el 31% a vinos de cepajes blancos. Al analizar las producciones con relación a los tipos de cepajes, el *Cabernet Sauvignon* alcanza el 32,9% de la producción total de vinos, seguido de *Sauvignon Blanc* con un 13,6%, *Merlot* con el 11,9%, *Chardonnay* con un 10%, *Carmenere* con un 8,5 % y la variedad *Syrah* con un 5,9% (SAG, 2022). De acuerdo con lo anterior, se observa que la cepa más utilizada para la producción de vinos en Chile corresponde a la *Cabernet Sauvignon*.

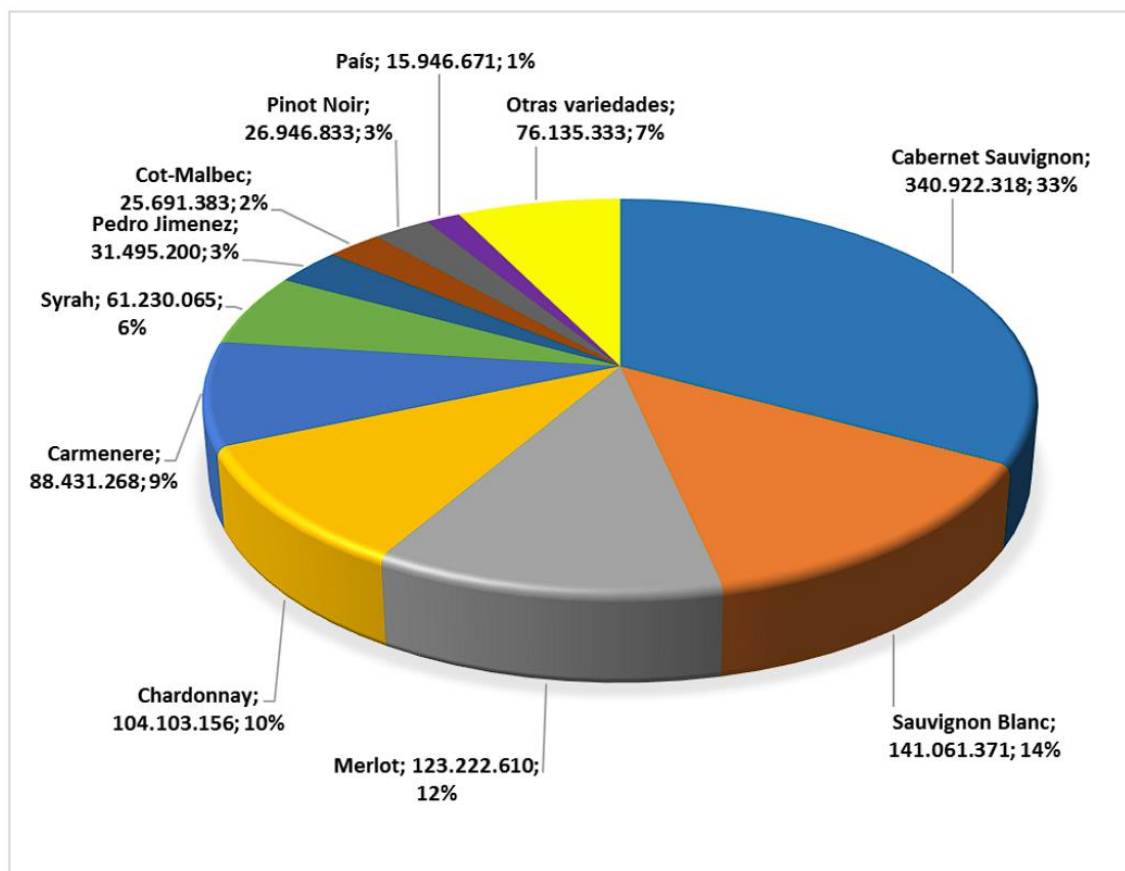


Gráfico 3. 10 variedades de uva más declaradas en Chile año 2022. (Litros).
Fuente: (SAG, 2022)

2.7.1. El principal subproducto de la vinificación: el orujo de uva

La elaboración del vino tinto considera la recepción de la uva en la etapa de vendimia, luego el despalillado y estrujado, teniendo como producto el mosto y como residuo de esta etapa el escobajo. Luego se somete el mosto a un proceso de fermentación y maceración, donde existe una etapa de separación de la fase líquida y la sólida. La parte sólida que fue separada en el descube se somete a un prensado, en donde se extrae el vino de prensa, que corresponde al líquido remanente en el orujo que queda de la fermentación. De esta última etapa se obtiene orujo de uva como desecho. Por su parte, la fase líquida que se obtuvo de la primera fermentación se somete a fermentación maloláctica, para luego pasar a la etapa de clarificación y crianza en madera o en botella según el tipo de vino que quiera producirse de acuerdo con el tiempo de maduración al que fue sometido. A continuación, se presenta un esquema que resume lo anteriormente expuesto (Grainger & Tattersall, 2005).

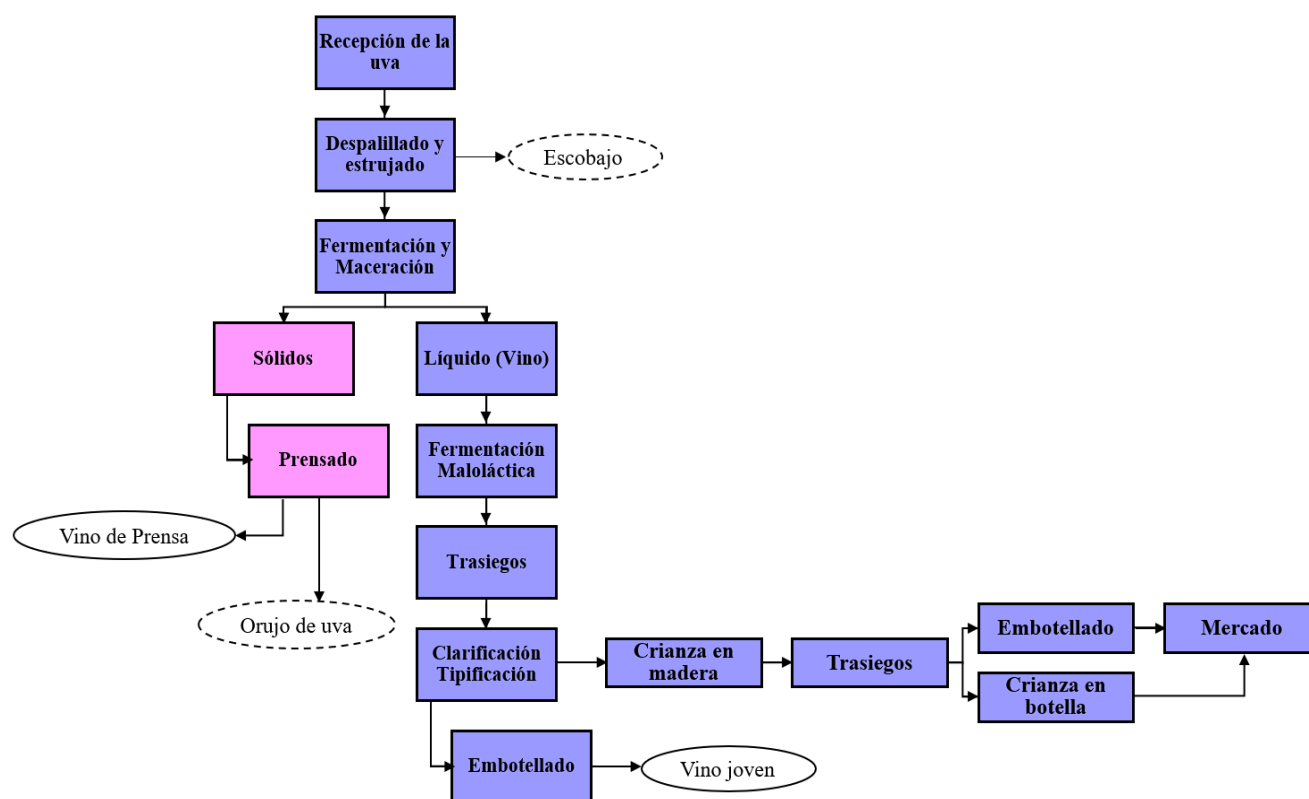


Figura 6. Proceso de elaboración del Vino tinto.
Fuente: Adaptado de (Grainger & Tattersall, 2005)



Tradicionalmente, la producción de vino se ha asumido como un proceso respetuoso con el medio ambiente. Sin embargo, requiere una cantidad considerable de recursos (por ejemplo, agua, fertilizantes y enmiendas orgánicas) y, al mismo tiempo, produce una gran cantidad de residuos y subproductos (Bordiga, *et al.*, 2019). Entre los principales residuos o sub-productos que se obtienen en la producción de vino están los residuos orgánicos y residuos líquidos. Entre los residuos orgánicos destaca el orujo de uva, que corresponde a las pieles, semillas, pulpa residual y minoritariamente las ramas de la uva que se retiran en la etapa de despalillado (Canett Romero, *et al.*, 2004). El orujo de uva corresponde a alrededor del 20% de la masa total de uvas procesadas (Panouillé *et al.*, 2007; Boussetta *et al.*, 2009) y presenta un problema sustancial de gestión de residuos debido a su alta carga de contaminación y un costo operativo no despreciable, ya que actualmente la mayoría de las bodegas eliminan este gran volumen de residuos y luego lo vierten o depositan en estanques (Meini *et al.*, 2019, Saha *et al.*, 2020).

Durante décadas, la utilización del orujo de uva ha sido ineficiente y subestimada. En los últimos años, se estima que el 3% del orujo de uva producido se reutiliza para la alimentación animal (Fontana *et al.*, 2013; Dwyer *et al.*, 2014; Brenes *et al.*, 2016), otras aplicaciones son como compost (Santos *et al.*, 2016) y una posibilidad de mejorar el aislamiento térmico en la construcción de edificios (Muñoz *et al.*, 2014; Beres *et al.*, 2014). Otras alternativas son la incineración o el descarte en terreno, pero pueden ser perjudiciales para el medio ambiente, debido a la generación de contaminantes en el aire para el caso de la incineración; y a que los compuestos fenólicos disminuyen el pH del orujo, aumentando así la resistencia a la degradación biológica al realizar un descarte en terreno. Otros problemas medioambientales son: contaminación de las aguas superficiales y subterráneas por los taninos y otros compuestos, agotamiento del oxígeno en el suelo, malos olores, moscas y plagas que pueden propagar enfermedades (Christ y Burrit, 2013; Dwyer *et al.*, 2014). Por ello, se deben buscar alternativas sostenibles que permitan aprovechar las propiedades intrínsecas del orujo y a la vez, reducir la acumulación de este desecho en el medioambiente.

2.7.2. Compuestos polifenólicos en el orujo de uva

El orujo de uva se caracteriza por un alto contenido en diferentes compuestos bioactivos debido a la mala extracción durante el proceso de la vinificación. Se compone principalmente de agua (50 a 72%), aceites y compuestos lipofílicos, fibra dietética, vitaminas y minerales y compuestos polifenólicos (López-Astorga *et al.*, 2022). Las sustancias pépticas, la celulosa y la lignina están presentes en cantidades importantes en el orujo de uva (Nerantzis y Tataridis, 2006; González-Centeno *et al.*, 2010). Considerando el contenido fenólico, el orujo de uva ha demostrado una alta capacidad antioxidante y, por lo tanto, es una valiosa fuente de antioxidantes naturales (Boussetta *et al.*, 2009; Rockenbach *et al.*, 2011a, b). De hecho, de los fenoles extraíbles totales en la uva, se observa que se distribuyen en aproximadamente un 10 % en la pulpa, alrededor de un 60 % en las semillas y un 30 % en los hollejos (Ky *et al.*, 2014). Por tanto, casi el 90% de los antioxidantes presentes en la uva están contenidos en el orujo. Para el caso del orujo de uva tinta los fenoles representan unos 9 kg por tonelada y poseen una cantidad considerable de taninos condensados (hasta un 52% de peso seco) (Rondeau *et al.*, 2013). Se ha determinado que el ácido protocatéquico es el ácido hidroxibenzoico más dominante en el orujo de uva de algunas variedades tintas (Teixeira *et al.*, 2014) y que el principal flavonol en el orujo de uva seco es la quercetina-3-O-glucurónido. Para el caso del orujo de uva de la cepa *Cabernet Sauvignon*, se ha determinado que las antocianinas más abundantes son la Malvidina 3-O-glucósido y la Malvidina 3-O-(6"-O-acetil)-glucósido y los flavonoles mayoritarios son la quercetina, la laricitrina y la isorhamnetina (Ruberto *et al.*, 2007).

De acuerdo con los antecedentes presentados anteriormente, la biorremediación es una técnica utilizada para la recuperación de suelos contaminados con petróleo, y, tanto la presencia de NaCl en los ecosistemas como la degradación de hidrocarburos genera estrés oxidativo en las bacterias hidrocarbonoclásticas, mermando con ello su tasa de degradación al provocar daños en sus estructuras proteicas, lipídicas y en su material genético. Estas condiciones pueden coexistir, por lo que se requieren microorganismos que tengan la capacidad de degradar los hidrocarburos de petróleo y tolerar condiciones salinas. *Acinetobacter radioresistens* DD78 posee genes de rutas de degradación de hidrocarburos, genes osmoprotectores y productores de biosurfactantes que la convierten en una bacteria atractiva para procesos de biorremediación en suelos salinos.

Por lo anterior, se deben buscar alternativas que permitan reducir el estrés oxidativo provocado por el metabolismo microbiano y las condiciones ya mencionadas, para potenciar la degradación de hidrocarburos y con ello, la descontaminación de los suelos. Los antioxidantes se presentan como sustancias de utilidad para reducir el estrés oxidativo generado y potenciar el crecimiento microbiano y los procesos de biorremediación. El orujo de uva, residuo poco valorizado en Chile, se caracteriza por un alto contenido en diferentes compuestos antioxidantes y se presenta como una alternativa sostenible para potenciar el crecimiento de bacterias hidrocarbonoclásticas como *Acinetobacter radioresistens* DD78 en hidrocarburos y condiciones salinas.

Lo anterior permite plantear la interrogante sobre cuál sería el efecto de bioestimar a *Acinetobacter radioresistens* DD78 con un extracto de orujo de uva en presencia de hidrocarburos de petróleo en condiciones salinas.



3. Hipótesis y objetivos

3.1. Hipótesis

La bioestimulación con extracto de orujo de uva, que tiene un alto contenido antioxidante, potencia la capacidad de *Acinetobacter radioresistens* DD78 para crecer en hidrocarburos de petróleo en condiciones salinas.

3.2. Objetivo general

Determinar la capacidad antioxidante del extracto de orujo de uva y caracterizar el efecto sobre el crecimiento en hidrocarburos de *A. radioresistens* DD78 en condiciones salinas.

3.3. Objetivos específicos

1. Determinar capacidad antioxidante del extracto orujo de uva cepa *Cabernet Sauvignon*.
2. Caracterizar el efecto del extracto de orujo de uva sobre el crecimiento en hidrocarburos de *A. radioresistens* DD78 en condiciones salinas.

4. Materiales y métodos

4.1. Materiales

4.1.1. Reactivos químicos

Las fuentes de carbono utilizadas en los experimentos de medio de cultivo corresponden a Acetato de Sodio 20mM como fuente convencional; marca: Merck KGaA; N° de serie/lote: A0346568223 y Diésel (1%v/v) obtenido de una estación de servicio bencinero y esterilizado utilizando una unidad de filtración con tamaño de poro de 0,22 μm .

Para la determinación de la capacidad antioxidante del orujo de uva, se utilizó etanol absoluto; marca: Merck KGaA; N° de serie/lote: K50322783826; 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) 200 μM ; marca: Sigma Aldrich; N° de serie/lote: D9132-G y α -tocopherol 5mM, cuya pureza es $\geq 95,5\%$; marca: Sigma; N° de serie/lote: MKCG1370.

4.2. Equipos

Para el desarrollo de esta memoria se utilizaron los siguientes equipos de laboratorio:

Tabla 3. Listado de equipos utilizados en laboratorio, marca, modelo, uso e imagen referencial

Equipo	Marca	Uso	Imagen referencial
Estufa/ Incubador	Incubador Heraeus/T5050 Incubador memmert	Utilizado en el secado de orujo de uva y crecimiento microbiano a temperatura constante.	
Centrífuga	Zentrifugen/ Rotina 380R	Utilizado en lavado celular y en preparación de solución de orujo de uva en separación de fases líquida y sólida.	
pHmetro	Edge pH con electrodo Hanna	Ajuste de pH de la solución de orujo de uva.	
Autoclave	Wisd Laboratory Instruments/ CE 0470	Esterilización de material y de los distintos medios de cultivo utilizados.	

Espectrofotómetro	Jenway/ 6320D	Medición de absorbancia en determinación de capacidad antioxidante el orujo de uva por metodología de DPPH y de turbidez en curvas de crecimiento.	
Molinillo de café	Sindelen/Mol-165	Utilizado para moler el orujo de uva seco.	
Rotovapor y baño termostático:	Büchi rotovapor/R-205 Büchi heating bath/B-490	Utilizado en la extracción de compuestos antioxidantes y reducción del volumen de extracto de orujo de uva.	
Lector de microplacas	Tecan/ Infinite M200 pro	Lector de turbidez utilizado para estimar el crecimiento microbiano en el tiempo para distintas condiciones de cultivo.	
Shaker	New brunswick scientific / C24 incubator Infors HT/ AGGH-4015	Crecimiento microbiano con agitación y temperatura constante.	

Campana de flujo laminar	Heraeus / HLB 2472 Heraeus/ HBL 2472	Utilizada en mantener la esterilidad en preparación y medición curvas de crecimiento y preparación de soluciones estériles.	
Agitador de tubo (Vórtex)	Labnet Vx100	Utilizado en la homogenización de soluciones previo a la medición de turbidez en el espectrofotómetro.	
Placas calefactoras con agitación	Heidolph MR Hei-Standard	Utilizada en la preparación de solución de orujo de uva.	
Refrigeradores	MADEMSA/ Nordik MR 480 Consul/ CVU27 Consul/ CVU27 Electrolux/ EFUP085YSKW Öko-SantoSuper electronic AEG Daewoo/ RF-421S Thermoscientific Revco	Utilizado en el almacenamiento de soluciones (4°C); de DPPH (-20°C) y de glicerol (-50°C)	

4.3. Medios de Cultivo

Para la preparación de todos los medios de cultivo se utilizó agua de grifo proveniente de la región de Valparaíso, Chile; cuyos parámetros fisicoquímicos y biológicos correspondientes a los requisitos y muestreo sanitario, se rigen por lo indicado en las Normas Chilenas 409/1 y 409/2. Ello incluye cuatro criterios generales: 1. Presencia de químicos y metales; 2. Turbidez y presencia de microorganismos; 3. Características físicas detectables por los sentidos (color, olor y sabor) y 4. Desinfección y ausencia de bacterias (ESVAL, 2023).

Para la realización de placas de cultivo microbiano se utilizó Agar Triptona-Soya (TSA, marca: Neogen Culture Media; N° de serie/lote: US113375B; compuesto de digerido pancreático de caseína 15 g/L; digerido pancreático de soya 5 g/L; NaCl 5 g/L y agar 15 g/L; pH= 7,3) Para los experimentos en medio líquido en matraces, se utilizó el medio de cultivo mínimo Bushnell-Haas (Bushnell & Haas, 1941) (BHB, compuesto de NH_4NO_3 : 1g/L; Marca: Regon Chem Group; N° Serie /Lote: desconocido; KH_2PO_4 : 1 g/L; Marca: Merck KGaA; N° Serie /Lote: AM1703373112; K_2HPO_4 : 1g/L; Marca: Winkler LTDA; N° Serie /Lote: CAS7758-1-4; pH=7,0±0.2; las trazas requeridas para este medio están compuestas por: MgSO_4 0,2 g/L (P.A. Nacional; sin lote o serie); CaCl_2 0,02 g/L (P.A. Nacional, Marca: Vimaroni, pureza de 95%; sin lote o serie); FeCl_3 0,05 g/L Marca: Merck N° de serie/lote: 1039431000, pureza (ensayo yodo métrica) 99/102 %). Para el crecimiento microbiano de pre-inóculos destinados a experimentos en medio líquido en matraces, se utilizó caldo soya tripticaseína (TSB, marca: Neogen Culture Media; N° de serie/lote: UK301622/303; que contiene digerido pancreático de caseína 17 g/L; digerido enzimático de soya 3 g/L; dextrosa 2,5 g/L; NaCl 5 g/L y K_2HPO_4 2,5 g/L; pH= 7,3). Se utilizó Cloruro de sodio (NaCl, marca: Merck KGaA; N° de serie/lote: K5222680416) al 3,5% para la preparación de medios salinos y cloruro de sodio al 0,85% para realizar lavados celulares y en diluciones en la técnica de UFC.

4.4. Cepa bacteriana

Acinetobacter radioresistens DD78 ha sido aislada de la zona de la desembocadura del río Aconcagua (Coordenadas geográficas 32° 55'4.40'' latitud sur y 71° 30' 31.49'' longitud oeste), desde suelos contaminados con hidrocarburos (Águila, 2014) (Macaya, *et.al*, 2019).



4.5. Metodologías

4.5.1. Diseño y desarrollo experimental

El desarrollo de esta memoria se centró en dos objetivos principales. Por un lado, determinar la capacidad antioxidante por método DPPH de un extracto de orujo de uva *Vitis vinifera* variedad *Cabernet sauvignon* y de α -tocopherol de forma paralela, como curva de calibración. Luego se procedió a caracterizar el efecto del orujo de uva en el crecimiento en hidrocarburos de *A. radioresistens* DD78 en condiciones salinas por medio de experimentos en medio líquido en matraces. Se estudió dos fuentes de carbono: una convencional e hidrocarburo en presencia y ausencia de NaCl; de orujo de uva y de orujo de uva más NaCl. En la Figura 7 se puede apreciar un esquema del desarrollo experimental que se llevó a cabo:

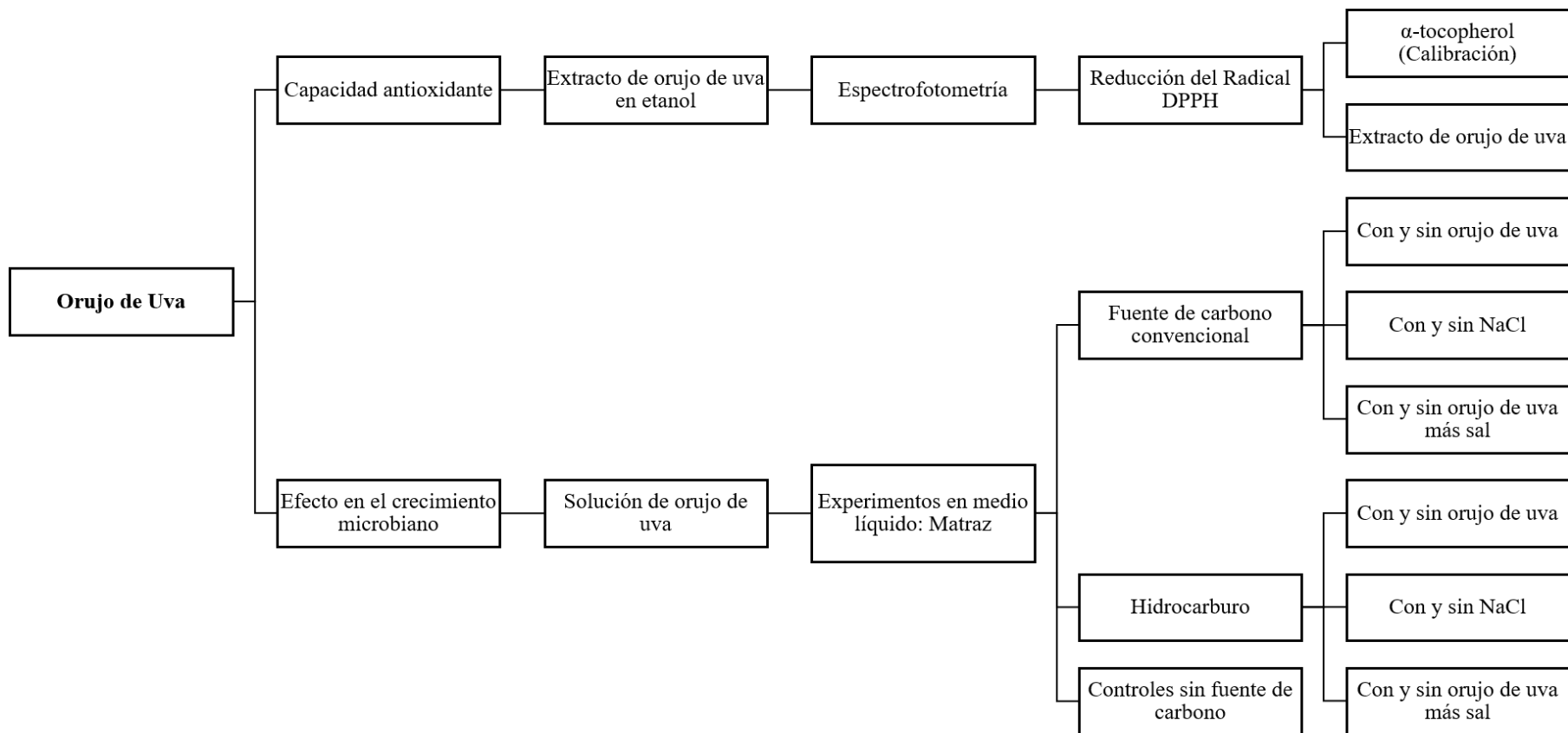


Figura 7. Esquema desarrollo experimental.

4.5.2. Obtención de la solución de orujo de uva

La solución de orujo de uva 300 g/L que se utilizó en los experimentos en medio líquido en matraces, se preparó con la piel y semillas de uva *Vitis vinifera* variedad *Cabernet sauvignon* obtenida de la Viña San Miguel de Curicó; siguiendo un protocolo modificado de (Alvarez-Santullano, 2018). El orujo fresco se secó durante 4 días a 55°C y se molió hasta obtener un polvo fino. El polvo obtenido se suspendió en agua de grifo, dejándose macerar durante una hora. Posteriormente se filtró utilizando gasa, luego se centrifugó a 5000 rpm por 15 minutos a 4°C. A continuación, el sobrenadante se recuperó y se agregó metabisulfito 30 ppm para evitar crecimiento de levaduras. Posteriormente, se ajustó el pH a 7,0 con una solución 6M de NaOH. Finalmente, la solución se esterilizó utilizando autoclave durante 15 min y se almacenó en alícuotas protegidas de la luz a -20°C. A continuación, en la Figura 8 se muestra un diagrama del proceso de preparación de la solución de orujo de uva 300 g/L.

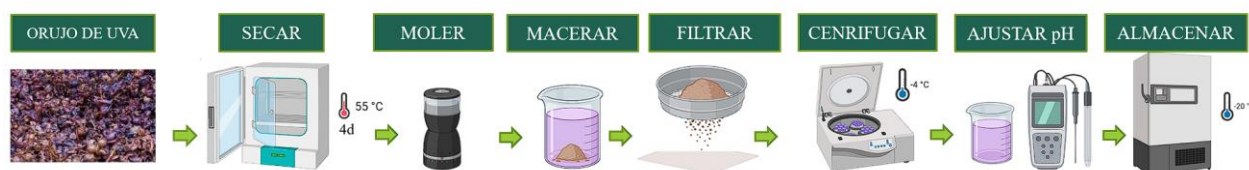


Figura 8. Proceso de preparación de solución de orujo de uva.

4.5.3. Determinación de actividad antioxidante

Se han descrito diversas técnicas para evaluar la capacidad antioxidante de plantas y alimentos (Guija-Poma *et al.*, 2015). El 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo conocido por las siglas DPPH, posee una coloración violeta oscuro que, al añadir una sustancia donadora de átomos de hidrógeno, se reduce y se convierte en una solución amarilla pálida no radicalaria. Además, presenta absorción a $\lambda=515$ nm, razón por la que las mediciones se realizaron en esta longitud de onda. Se ha escogido como método para cuantificar la capacidad antioxidante del extracto orujo de uva debido a que es uno de los más simples para medir la capacidad antioxidante in vitro; es rápido, pues se puede obtener resultados en un periodo corto de tiempo; porque el radical DPPH es muy estable, lo que facilita su manejo en el laboratorio (Kedare & Singh, 2011) y porque esta metodología se ha utilizado con anterioridad en el Laboratorio para la estandarización de la capacidad antioxidante de un extracto de bayas, de α -tocopherol y ácido ascórbico que fueron utilizados para evaluar el efecto de los compuestos antioxidantes sobre el crecimiento, la morfología y la degradación de PCB por *B. xenovorans* LB400 (Ponce, *et al.*, 2011)

Se elaboró un extracto de orujo de uva para determinar la capacidad antioxidante presente en el orujo. Se utilizó 10 g de orujo de uva que se secó durante 4 días a 55°C y se molió hasta obtener un polvo fino. Se agregó 200 mL de etanol absoluto y se incubó por 24 h a 30 °C a 180 rpm (Zhu *et al.*, 2019). Luego se filtró al vacío usando filtros Whatman rápido (número 1) y se redujo el volumen de la solución al vacío en un

rotavapor a 55 °C y 100 rpm hasta alcanzar un décimo del volumen. Posteriormente se filtró la solución con filtros de PTFE de 0,22 µm. El solvente remanente se retiró en estufa a 37°C durante 1h en un tubo de ensayo de 10mL de masa conocida. Se obtuvo una solución concentrada de 30 [mg/mL] que provenía de 15 g de orujo seco. Posteriormente, se elaboraron soluciones de extracto con concentración conocidas y se almacenó a -20°C.

En la Figura 9, se esquematiza el proceso de obtención del extracto de orujo de uva.

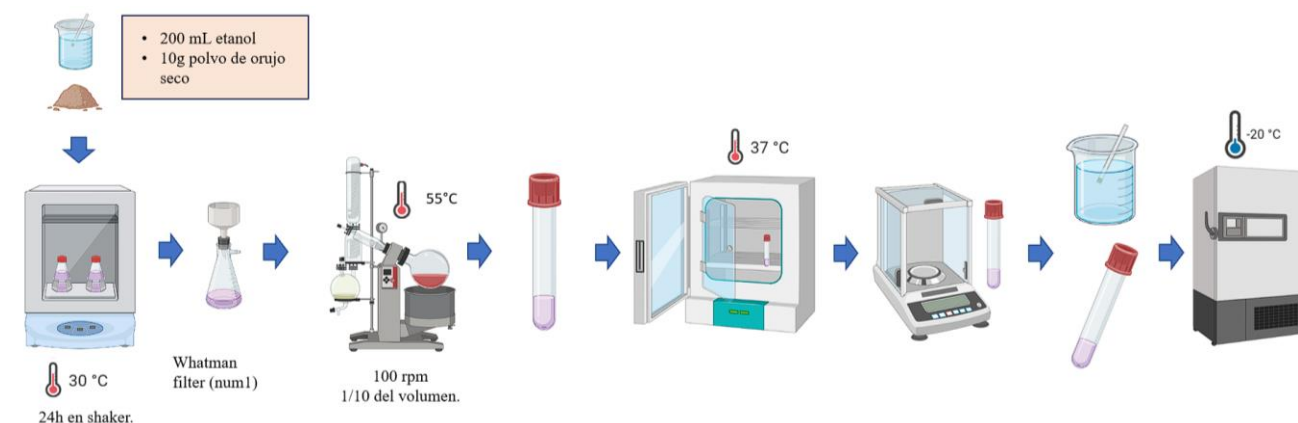


Figura 9. Proceso de obtención del extracto de orujo uva.

Para determinar el secuestro de radicales libres, se siguió un protocolo modificado de (Molyneux, 2004) donde se analizó el extracto de orujo de uva obtenido a concentraciones en cubeta de 750; 250; 75; 62,5; 50; 37,5; 25 y 12,5 [mg/L]. En paralelo se realizó la curva de calibrado con α -tocopherol en concentraciones de cubeta de 56,7; 28,3; 14,2; 7,1; 3,5 y 1,8 [mg/L] para comparar la capacidad antioxidante entre una muestra conocida y una por conocer.

Para llevar a cabo lo anterior, se utilizó una solución 200 µM de 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) que fue preparada utilizando etanol grado analítico como solvente. Esta solución se almacenaba a -20°C y tenía como duración 1 semana desde su preparación.

Tras preparar la solución de DPPH 200 µM, se agregó 1 mL de esta con 950 µL de etanol grado analítico en una cubeta para medición en espectrofotómetro y se homogenizó suavemente, quedando a una concentración final de DPPH en la cubeta de 100 µM. Se registró la absorbancia base que entregó la solución inicial a 515 nm.

Posteriormente, se agregó 50 µL de muestra y se homogenizó cuidadosamente durante 20 segundos, y se comenzó con la medición al minuto 1, 5, 10, 15, 20, 25 y 30, tanto para el extracto de orujo de uva como para el α -tocopherol. El procedimiento se repitió tres veces de forma independiente con un duplicado técnico para cada concentración mencionada de extracto de orujo de uva y de α -tocopherol.

A continuación, en la Figura 10 se puede apreciar un diagrama del procedimiento que se ha descrito con anterioridad:

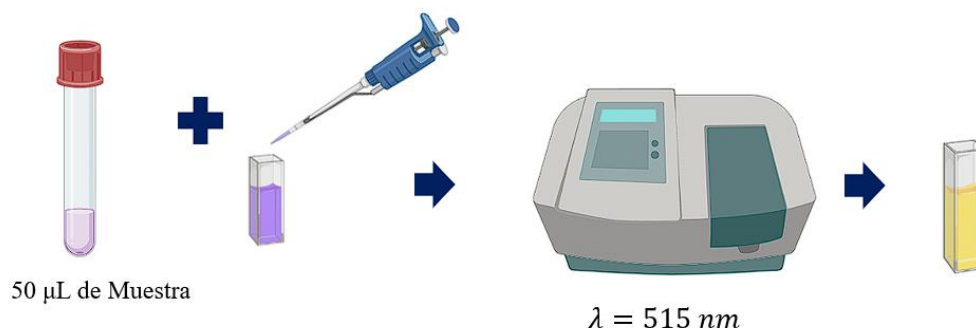


Figura 10. Procedimiento de determinación del secuestro de radicales libres.

Finalmente, con los datos obtenidos, se procedió a graficar los resultados de disminución de absorbancia en el tiempo y se determinó el porcentaje de reducción de DPPH de acuerdo con la siguiente ecuación:

Ecuación 1. Porcentaje de reducción de DPPH

$$\% \text{ reducción} = \frac{A_0 - A_c}{A_0} \times 100$$

Donde:

- A_0 es la absorbancia base que entregó la solución inicial de DPPH 100 µM.
- A_c es la absorbancia de la solución con la muestra al tiempo que se mida.

Cabe mencionar que las concentraciones que se observan en las gráficas corresponden a las de cubeta, que son 40 veces menor que las iniciales y se expresaron en [mg/L] con motivo de que fueran comparables con las obtenidas de las curvas de extracto de orujo de uva.

4.5.4. Cálculo del área bajo la curva de las curvas de Reducción del radical DPPH en el tiempo en la presencia de α -tocopherol y extracto de orujo de uva

El área bajo la curva se obtuvo al aplicar regresión a cada curva de reducción del radical DPPH utilizando Excel, procurando que el valor estadístico R^2 fuera lo más cercano a 1 y que el comportamiento de la ecuación de la curva obtenida fuera el más parecido al de la curva original. Tras obtener la ecuación de la curva asociada, se calculó el valor de la integral de dicha ecuación utilizando Wolfram Alpha, y con ello, el área bajo la curva.

4.5.5. Preparación de pre-inóculo

Las bacterias fueron sembradas en placas con TSA bajo campana de flujo laminar. Tras sembrar, se incubaron durante 24 horas a 30°C o bien, a temperatura ambiente por un periodo de 2 días. Luego, bajo campana de flujo laminar, se inoculó una única colonia en 3 ml de medio líquido TSB en tubo de ensayo de 15 ml a 30 °C, con agitación constante a 147 rpm, por un periodo de 12 a 14 horas.

Para el caso del Acetato de Sodio, se preparó el pre-inóculo directamente ajustando turbidez a 0.6, para posteriormente agregar 500 µL a los matraces que se indican en **4.5.6. Condiciones de Crecimiento**.

Para la condición con Diesel 1%v/v, se realizó un lavado celular, utilizando el siguiente protocolo:

1. Centrifugar el pre-inóculo a 4000 rpm por 5 minutos a 4°C.
2. Retirar cuidadosamente el sobrenadante y conservar el pellet.
3. Agregar 3 ml de NaCl 0,85% y resuspender el pellet cuidadosamente.
4. Repetir el paso 1, 2 y 3 dos veces más.
5. Medir turbidez de la solución obtenida a 600 nm y luego ajustar a OD a 0.6
6. Agregar 500 µL a los matraces que se indican en **4.5.6. Condiciones de Crecimiento**.

4.5.6. Condiciones de crecimiento

Los crecimientos bacterianos se realizaron a un volumen final de 50 ml (utilizando matraces de 250 mL), a 30 °C, con agitación constante a 147 rpm. Se utilizó dos fuentes de carbono: una convencional, correspondiente a Acetato de Sodio 20mM por un periodo de 30 horas y Diesel 1%v/v durante 60 horas. Se realizaron medios de cultivo de 50 ml que tenían como base BHB 1X con sus respectivas trazas, NaCl 300 mM para el caso de los experimentos en condiciones salinas, un porcentaje de 7,5% de solución de orujo de uva 300 g/L obtenida como se describe en sección **4.5.2 Obtención de la solución de orujo de uva** y 500 µL de pre-inóculo como se describe en sección **4.5.5 Preparación de pre-inóculo**.

De esta forma, se llevó a cabo curvas de crecimiento en triplicado biológico y en duplicado técnico en las siguientes condiciones:

1. Acetato de sodio 20mM
 - a. Acetato 20mM+ 7,5% de Orujo de Uva.
 - b. Acetato 20mM+ NaCl 300mM + 7,5% de Orujo de Uva.
 - c. 7,5% de Orujo de Uva.
 - d. 7,5% de Orujo de Uva + NaCl 300mM.
 - e. Acetato 20mM
 - f. Acetato 20mM+ NaCl 300mM
 - g. Control sin fuente de carbono.
 - h. Control sin fuente de carbono + NaCl 300mM.
2. Diesel 1%v/v:
 - a. Diesel 1%v/v + 7,5% de Orujo de Uva.
 - b. Diesel 1%v/v + NaCl 300mM + 7,5% de Orujo de Uva.
 - c. 7,5% de Orujo de Uva.
 - d. 7,5% de Orujo de Uva + NaCl 300mM.

- e. Diesel 1%v/v
- f. Diesel 1%v/v + NaCl 300mM
- g. Control sin fuente de carbono.
- h. Control sin fuente de carbono + NaCl 300mM.

En la Figura 11 se pueden apreciar las condiciones de experimentación indicadas anteriormente y la metodología de determinación de crecimiento microbiano.

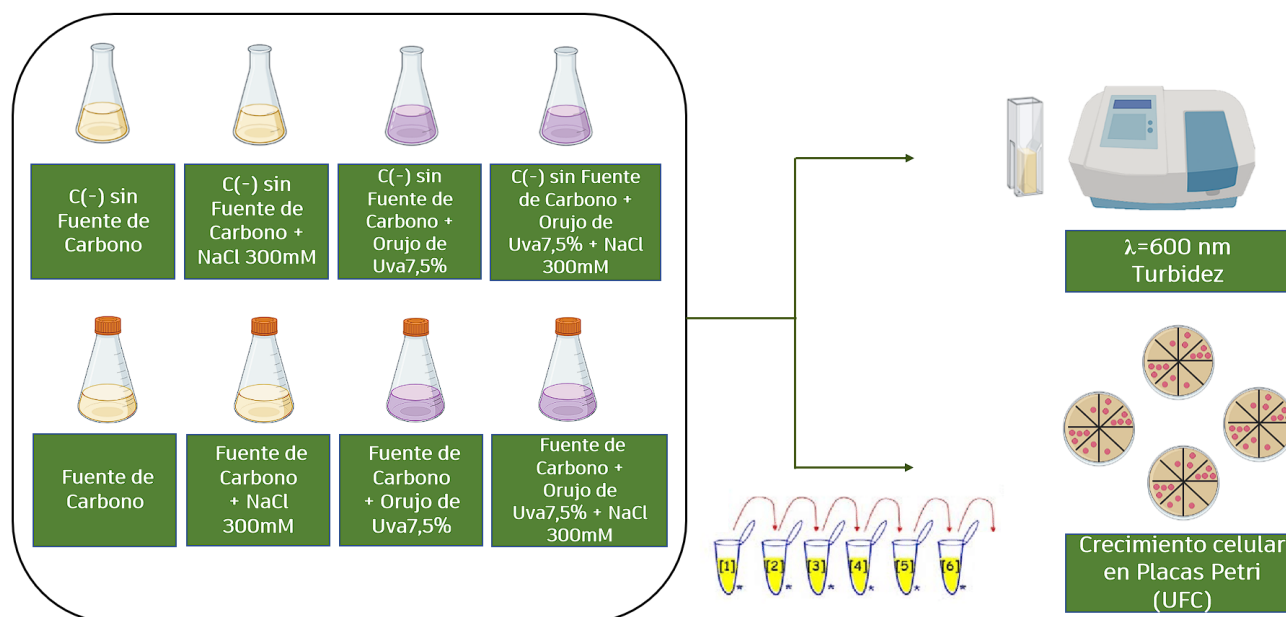


Figura 11. Condiciones de experimentación y metodología de determinación de crecimiento microbiano.

Como se puede visualizar en la Figura 11, se determinó el crecimiento de la cepa en el tiempo mediante medición de turbidez a 600 nm y se realizó el conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Para el recuento en placa, se sembraron diferentes diluciones en agar TSA (desde la -3 a la -6) y se realizó el conteo tras 24 h de incubación a 30 °C.

Para determinar el valor de UFC/mL a graficar por condición de crecimiento, se escogió una única dilución, cuyos valores de número de colonias fueran mayor a cero y también menores a un valor que no pudiera cuantificarse con claridad. Con la dilución seleccionada, se determinó el promedio de las colonias, y se obtuvo el valor de UFC/ml como se muestra en la Ecuación 2 (Madigan, Martinko, & Parker, 2003).

Ecuación 2. UFC/mL por condición de crecimiento

$$\frac{UFC}{ml} = \bar{X} \cdot f_d \cdot f_i$$

Donde:

- $\bar{X}$: Promedio de conteo de colonias.
- f_d : Factor de dilución
- f_i : Factor Inóculo.

Para fines de esta memoria se llevó a cabo el desarrollo de solo las curvas de crecimiento que incluyen orujo de uva, pues aquellas que no lo contienen fueron realizadas de forma paralela a estos experimentos como parte del desarrollo de la tesis doctoral “Caracterización de la respuesta al estrés salino de *Acinetobacter radioresistens* DD78 y *Rhodococcus* sp. ICBD2 durante la degradación de hidrocarburos de petróleo” de la candidata a doctora e investigadora Ximena Báez Matus. Sin embargo, se tuvo acceso a los datos obtenidos de las curvas que no contienen orujo de uva y que pertenecen a dicho trabajo de título, las que se pueden visualizar en el **Anexo 1**. Por tanto, fue posible realizar análisis comparativos a nivel estadístico de las condiciones con y sin orujo de uva.

4.5.7. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando ANOVA unidireccional y la Prueba de Tukey HSD (*Honest Significant Difference*: diferencia honestamente significativa) para evaluar las diferencias en los valores medios obtenidos en cada experimento. Los análisis se realizaron considerando un $\alpha = 0,05$.

5. Resultados

1. Determinar capacidad antioxidante del extracto orujo de uva cepa Cabernet Sauvignon.

El Gráfico 4 muestra el porcentaje de reducción de radicales DPPH en el tiempo por α -tocopherol a distintas concentraciones.

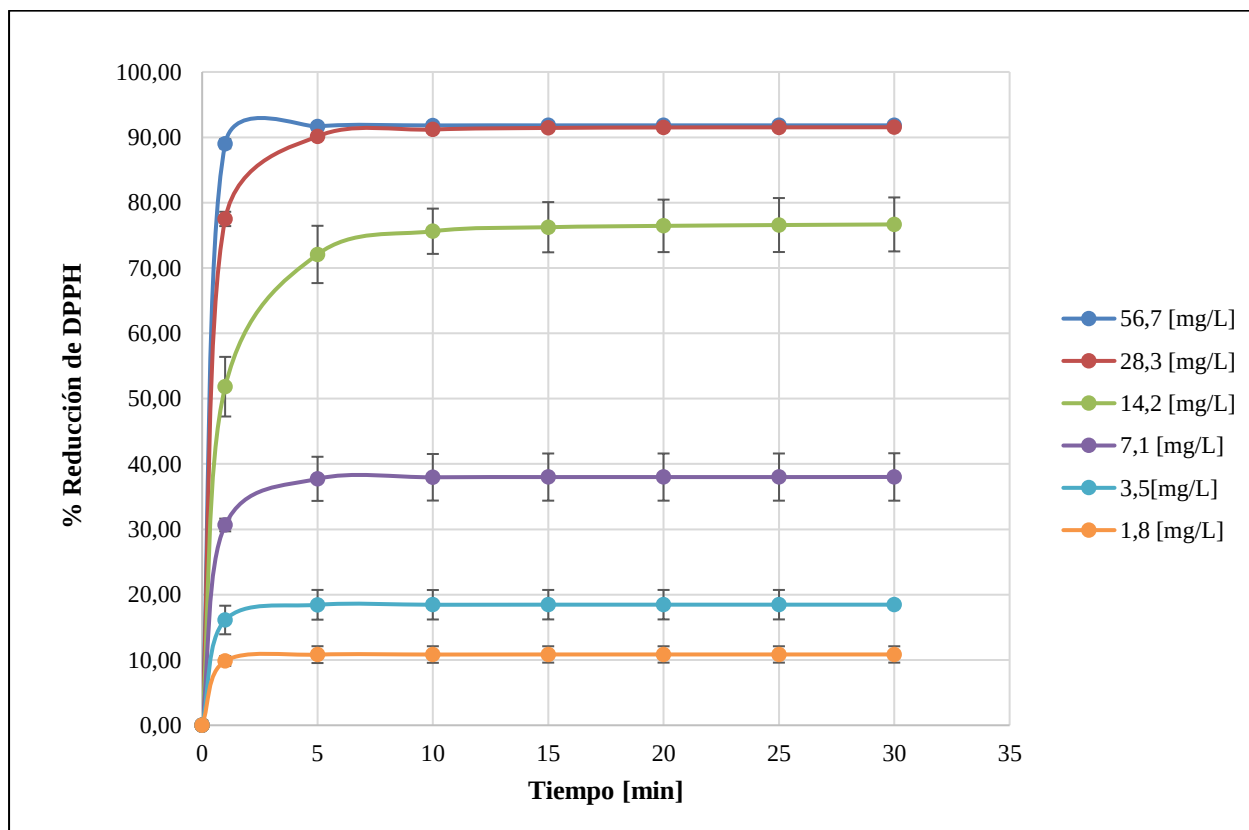


Gráfico 4. Reducción del radical DPPH a diferentes concentraciones α -tocopherol en el tiempo; (n=3 $\alpha = 0,05$).

Se observa que existe un porcentaje de reducción del radical DPPH significativamente mayor a medida que la concentración de α -tocopherol es mayor, llegando hasta un $91,83 \pm 0,26$ % de reducción en la concentración de 56,7 [mg/L] a los 30 minutos, mientras que en la concentración de 1,8 [mg/L] a un $10,84 \pm 1,25$ % en el mismo tiempo. A continuación, pueden observarse porcentajes de reducción del radical DPPH a diferentes concentraciones de α -tocopherol en el tiempo de 1, 15 y 30 minutos:

Tabla 4. Reducción del radical DPPH a diferentes concentraciones de α -tocopherol en el tiempo (%)

Concentración de α -tocopherol [mg/L]	1 min	15 min	30 min
1,8	9,84	10,84	10,84
14,2	51,83	76,24	76,66
56,7	89,02	91,83	91,83

Las diferencias entre las medias del porcentaje máximo de reducción del radical DPPH en la presencia de α -tocopherol se evaluaron mediante la prueba de ANOVA unidireccional con un análisis a posteriori de Tukey HSD. Para lo anterior, fue considerando un $\alpha = 0,05$.

Los ensayos con α -tocopherol fueron realizados para estandarizar las condiciones del método y como compuesto antioxidante de referencia. Por ello, con los valores de concentración de α -tocopherol en cubeta y del área bajo la curva obtenida, se procedió a realizar la curva control del Gráfico 5.

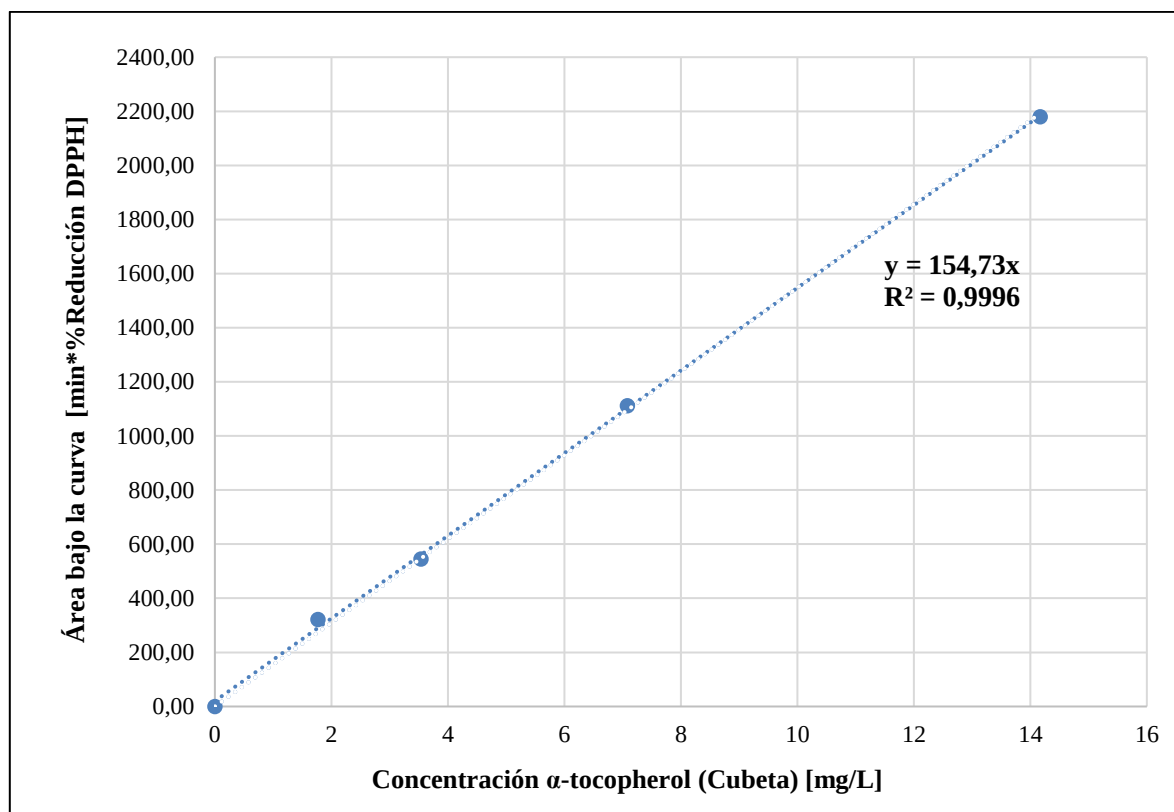


Gráfico 5. Relación entre el área bajo la curva de las curvas de Reducción del radical DPPH en el tiempo en la presencia de α -tocopherol.

En el Gráfico 5 se observa la relación entre el área bajo la curva obtenida y el valor de concentración de α -tocopherol en cubeta, obteniéndose la ecuación $y = 154,73x$ con un valor de R^2 equivalente a 0,9996. En la ecuación, el parámetro “x” indica el valor de la concentración de α -tocopherol y el de “y” el área bajo la curva asociada a este.

Para determinar la actividad antioxidante en el orujo se realizaron soluciones con las concentraciones indicadas en la Tabla 5. Estas soluciones se elaboraron a partir del extracto concentrado inicial de 30 [mg/mL] que provenía de 15 [g] de orujo inicial.

Tabla 5. Concentraciones de extracto de orujo de uva utilizadas en la construcción de las curvas analizadas.

Punto	Concentración Cubeta[mg/L]
1	750
2	250
3	75
4	62,5
5	50
6	37,5
7	25
8	12,5

En la Gráfica 6, se aprecian los resultados de reducción del radical DPPH a diferentes concentraciones de extracto de orujo de uva en el tiempo, obtenidos de tres curvas independientes a partir de una solución inicial.

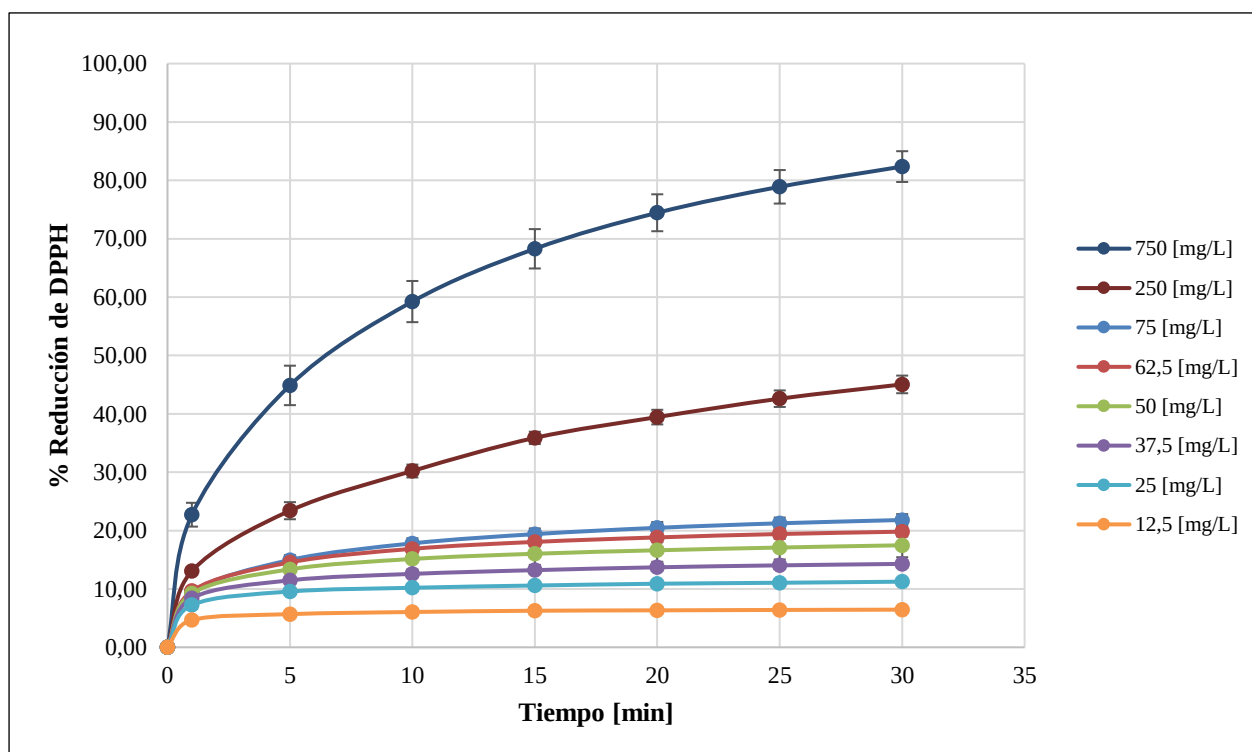


Gráfico 6. Reducción del radical DPPH en el tiempo en la presencia de extracto de orujo de uva.; (n=3; $\alpha = 0,05$)

En el Gráfico 6 se observa que existe un mayor porcentaje de reducción del radical DPPH a medida que la concentración de extracto de orujo de uva es mayor, llegando hasta un $82,36 \pm 2,64\%$ de reducción en la concentración de 750 [mg/L] a los 30 minutos, mientras que para la concentración de 12,5 [mg/L] a un $6,45 \pm 0,37\%$ al tiempo de 30 minutos de ensayo. Estas diferencias mostraron tener significancia estadística de acuerdo con los análisis de varianza mencionados en la sección materiales y métodos.

Además, se observa que a los 15 minutos el extracto de orujo de uva deja de estabilizar significativamente el radical DPPH en el caso de las concentraciones entre 12-75 [mg/L]. Se puede apreciar que entre las concentraciones de extracto de orujo de 62,5 y 50 [mg/L] no existen diferencias significativas en el porcentaje de reducción del radical DPPH a los 30 min. De igual manera, para las concentraciones entre 75 y 62,5 mg/L.

Para el caso de las concentraciones de 250-750 mg/L, se observa que existe una tendencia a continuar con la estabilización hasta los 30 min de experiencia.

A continuación, pueden observarse porcentajes de reducción del radical DPPH a diferentes concentraciones de extracto de orujo de uva en el tiempo de 1, 15 y 30 minutos:

Tabla 6. Reducción del radical DPPH a diferentes concentraciones de Extracto de Orujo de Uva en el tiempo (%)

Concentración [mg/L]	1 min	15 min	30 min
12,5	4,67	6,27	6,45
37,5	8,42	13,22	14,29
750	22,72	68,27	82,36

Los valores de concentración de extracto de orujo de uva y del área bajo la curva, se muestran en el Gráfico 7.

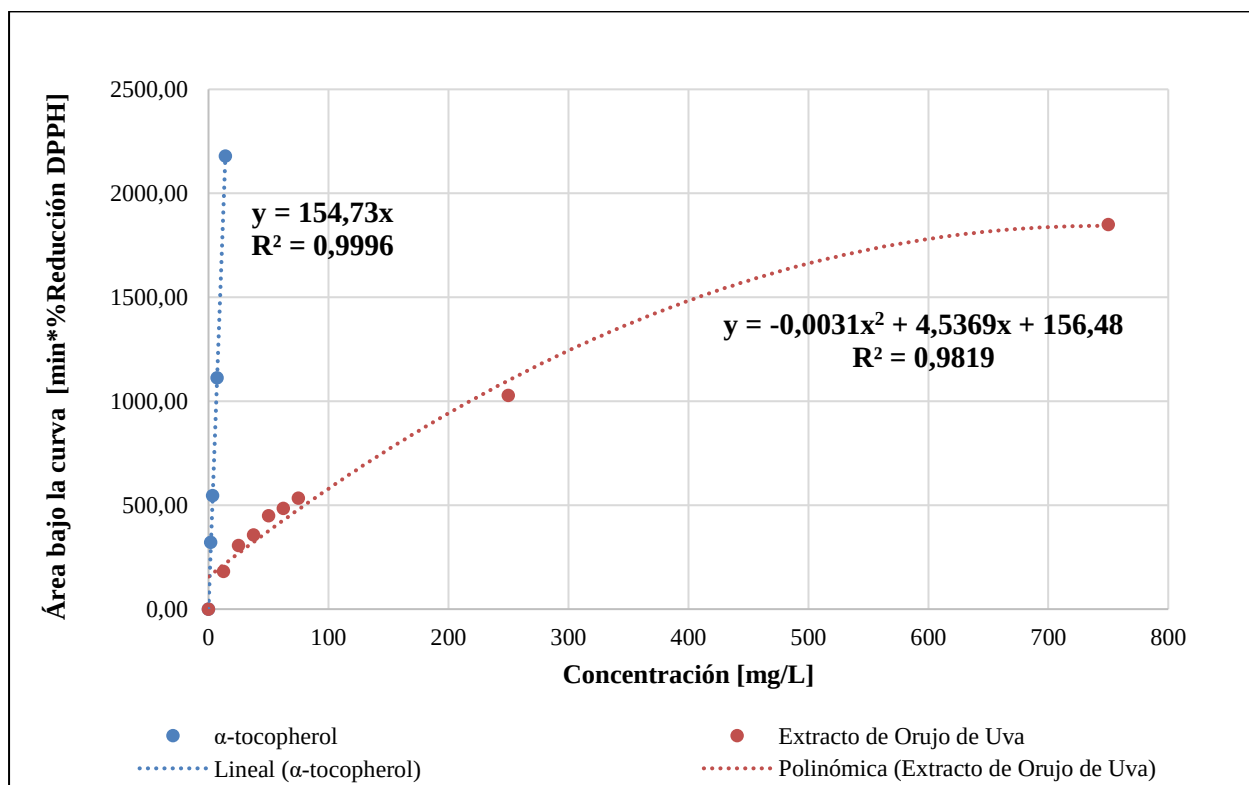


Gráfico 7. Relación entre área bajo la curva de las curvas de Reducción del radical DPPH en el tiempo en la presencia de extracto de orujo de uva y de α -tocopherol.

De acuerdo con el Gráfico 7, se puede observar que el extracto de orujo de uva presenta una menor capacidad antioxidante que el α -tocopherol en concentraciones de 12,5-750 [mg/L] de extracto. Lo anterior, porque se requiere de una mayor concentración de extracto de orujo de uva para lograr un porcentaje de reducción del radical DPPH similar al de una concentración de α -tocopherol determinada. Además, se puede apreciar que la cinética de reacción es mayor para el caso de la curva de α -tocopherol.

Con el valor de concentración de α -tocopherol se determinó la equivalencia de $\left[\frac{mg_{at \text{ equivalentes}}}{mg_{\text{Extracto de Orujo de Uva}}} \right]$ asociado a cada concentración de extracto de orujo de uva que se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7. Equivalencias de capacidad antioxidante de orujo de uva en equivalentes de α -tocoferol

Concentración de Extracto de Orujo de Uva [mg/L]	$\left[\frac{mg_{at \text{ equivalentes}}}{mg_{\text{Extracto de Orujo de Uva}}} \right]$
750	0,016
250	0,027
75	0,046
62,5	0,050
50	0,058
37,5	0,061
25	0,079
12,5	0,093
0	0,000

*at: α -tocoferol.

Se puede apreciar que las soluciones con concentraciones de 12,5 – 750 [mg/L] de extracto de orujo de uva, poseen la capacidad secuestradora de radicales DPPH de 0,016 – 0,093 mg de α -tocoferol equivalentes. Esto indica que, en estos rangos de concentración, los extractos de orujo presentan capacidades antioxidantes 100 veces menores al control con α -tocoferol. Además, se muestra que las soluciones de extracto más diluidas presentan mayor cantidad de equivalentes de α -tocoferol por miligramo de extracto.

2. Caracterizar el efecto del extracto de orujo de uva sobre el crecimiento en hidrocarburos de *A. radioresistens* DD78 en condiciones salinas.

Para ello, se evaluó el crecimiento de *A. radioresistens* DD78 mediante cultivo líquido a través de UFC y turbidez.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos para cada fuente de carbono:

a. Fuente de Carbono: Acetato de sodio 20mM

El Gráfico 8 es el resultado de la medición de turbidez por espectrofotometría a 600nm de curvas de crecimiento realizadas en triplicado biológico y duplicado técnico. Se puede apreciar que existe mayor turbidez en aquellas condiciones que incluyen Acetato de Sodio 20mM respecto a los controles que no contienen fuente de carbono:

Tabla 8. Valores de turbidez a 600nm en 12h de experimentación en diferentes condiciones de crecimiento

Condición	Valor de Turbidez a 600nm en 12 h
Orujo de uva 7,5%,	0,48 ± 0,03
Orujo de uva 7,5% + NaCl 300mM	0,72 ± 0,18
Acetato 20mM + Orujo de uva 7,5%;	2,13 ± 0,18
Acetato 20mM + Orujo de uva 7,5% + NaCl 300mM	2,53 ± 0,04

En relación con las fases de crecimiento, se puede apreciar que para las curvas de Acetato 20mM + Orujo de uva 7,5% (rojo) y Acetato 20mM + NaCl 300mM + Orujo de uva 7,5% (celeste), la fase de latencia o adaptación se presenta en las primeras 4 horas de iniciado el experimento. Luego, se puede visualizar la fase exponencial hasta aproximadamente las 12 horas de crecimiento, comenzando a su vez la fase estacionaria que perdura hasta las 30 horas de iniciada la experiencia. Por su parte, la fase de muerte no se aprecia durante el tiempo que transcurrió el ensayo.

Para el caso de las curvas control sin presencia de Acetato 20mM, se puede observar que la fase de latencia o adaptación se presenta en las primeras 4 horas. Luego, se puede visualizar la fase exponencial hasta aproximadamente las 8 horas de iniciado el experimento, comenzando a su vez la fase estacionaria que perdura hasta las 30 horas de iniciada la experiencia para ambas curvas. Por su parte, la fase de muerte no se aprecia durante el tiempo que transcurrió el ensayo.

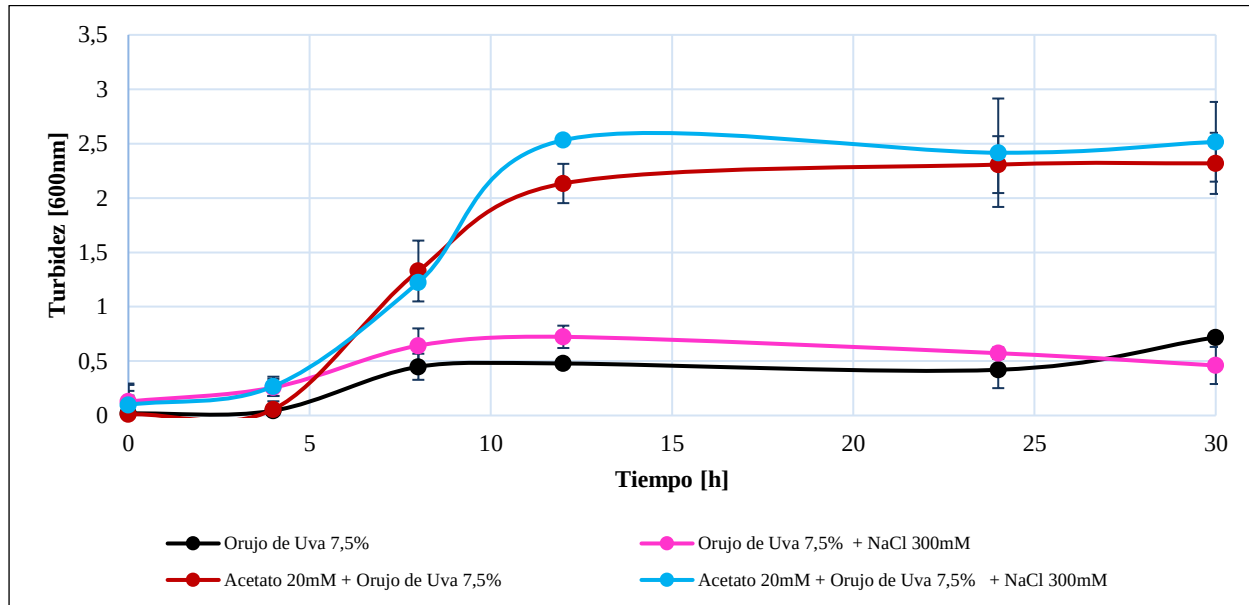


Gráfico 8. Curvas de crecimiento de *A. radioresistens* DD78 en las condiciones de control sin fuente de carbono con 7,5% de orujo de uva (negra); control sin fuente de carbono más 7,5% de orujo de uva y 300mM de NaCl (rosada); acetato de Sodio 20mM más orujo de uva 7,5% (roja) y acetato de sodio 20mM más orujo de uva 7,5% y 300mM de NaCl (celeste) expresado en turbidez en una longitud de onda de 600nm (n=3; $\alpha = 0,05$).

Para establecer si existen diferencias significativas entre las medias de crecimiento de las condiciones experimentales, se realizó la prueba de ANOVA unidireccional, planteando como hipótesis nula que todas ellas son iguales. En caso de rechazar la hipótesis nula, se procedió a aplicar la prueba de Tukey HSD para determinar entre que medias la diferencia es realmente significativa a nivel estadístico. Lo anterior, fue considerando un $\alpha = 0,05$. Es importante señalar que, para estos análisis, se tomaron en cuenta los datos obtenidos para las condiciones de crecimiento que no contienen orujo de uva al 7,5% y que forman parte de la tesis doctoral de (Báez-Matus, Tesis doctoral en preparación). De esta forma, se analizaron los datos por intervalo de tiempo de cada condición con sus respectivas replicas biológicas (n=3) y técnicas (n=2), obteniendo la significancia concerniente que se indica en la tabla adjunta, donde si existe una real significancia estadística en el intervalo de tiempo analizado, se indica “SI”, en caso contrario, se señala “NO”.

Tabla 9. Significancia estadística según Test de Tukey HSD entre las diferentes curvas de crecimiento obtenidas desde medición de turbidez a 600 nm

Condiciones analizadas (medias poblacionales)	0	4	8	12	24	30
O-OS	NO	SI	NO	NO	NO	NO
O-AO	NO	NO	SI	SI	SI	SI
O-AOS	NO	SI	SI	SI	SI	SI
O-C	NO	NO	NO	SI	NO	NO
O-A	NO	NO	SI	SI	SI	SI
O-CS	NO	NO	NO	SI	NO	NO
O-AS	NO	NO	NO	NO	SI	SI
OS-AO	NO	SI	SI	SI	SI	SI
OS-AOS	NO	NO	SI	SI	SI	SI
OS-C	NO	NO	SI	SI	NO	NO
OS-A	NO	NO	NO	SI	SI	SI
OS-CS	NO	NO	SI	SI	NO	NO
OS-AS	NO	NO	SI	NO	SI	SI
AO-AOS	NO	SI	NO	SI	NO	NO
AO-C	NO	NO	SI	SI	SI	SI
AO-A	NO	NO	NO	SI	NO	NO
AO-CS	NO	NO	SI	SI	SI	SI
AO-AS	NO	NO	SI	SI	SI	SI
AOS-C	NO	NO	SI	SI	SI	SI
AOS-A	NO	NO	NO	SI	SI	SI
AOS-CS	NO	NO	SI	SI	SI	SI
AOS-AS	NO	NO	SI	SI	SI	SI
A-AS	NO	NO	SI	SI	NO	NO
A-C	NO	NO	SI	SI	SI	SI
A-CS	NO	NO	SI	SI	SI	SI
CS-AS	NO	NO	NO	SI	SI	SI
C-CS	NO	NO	NO	NO	NO	NO
C-AS	NO	NO	NO	SI	SI	SI

Leyenda de tabla: Condiciones analizadas (medias poblacionales)

O: Control sin fuente de carbono más 7,5% de orujo de uva; **OS:** Control sin fuente de carbono más 300mM de NaCl y 7,5% de orujo de uva; **AO:** Acetato 20mM más 7,5% de orujo de uva; **AOS:** Acetato 20mM más 300mM de NaCl y 7,5% de orujo de uva; **C:** Control sin fuente de carbono; **CS:** Control sin fuente de carbono más 300 mM de NaCl; **A:** Acetato 20mM; **AS:** Acetato 20mM más 300 mM de NaCl.

El Gráfico 9 es el resultado del análisis de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml) de curvas de crecimiento realizadas en triplicado biológico y duplicado técnico. En él, se puede apreciar que existe mayor crecimiento en aquellas condiciones que incluyen Acetato de Sodio 20mM respecto a los controles sin fuente de carbono. También, que existe crecimiento en dichos controles. Además, se puede distinguir que las condiciones que presentan NaCl muestran un menor crecimiento en UFC/ml respecto a la condición equivalente que no la posee. A las 12 horas de crecimiento, se puede visualizar lo siguiente:

Tabla 10. Valores de UFC/ml a las 12h de experimentación en diferentes condiciones de crecimiento

Condición	Valor de UFC/ml en 12 h
Orujo de uva 7,5%,	$4,81 \times 10^9 \pm 1,46 \times 10^9$
Orujo de uva 7,5% + NaCl 300mM	$4,11 \times 10^9 \pm 8,55 \times 10^8$
Acetato 20mM + Orujo de uva 7,5%;	$9,83 \times 10^9 \pm 2,20 \times 10^8$
Acetato 20mM + Orujo de uva 7,5% + NaCl 300mM	$7,67 \times 10^9 \pm 8,82 \times 10^8$

Respecto a las fases de crecimiento, para el caso de las curvas que presentan Acetato 20mM, se puede apreciar que la fase de latencia o adaptación se presenta hasta aproximadamente las 4 horas de iniciada la experiencia. Luego la fase exponencial se muestra hasta aproximadamente las 12 horas. Seguido de ello, se puede visualizar la fase exponencial hasta las 30 horas, donde finalizó la experiencia. En lo que concierne a la fase de muerte, no fue posible de apreciar en la duración total del experimento. Para el caso de las curvas que no contienen la fuente de carbono, se puede apreciar que presentan su fase de adaptación durante las primeras 4 horas de iniciada la experiencia. Luego, se puede notar la fase exponencial hasta la hora 8 para el caso de la curva Orujo + 7,5% (negra) y hasta la hora 12 para la curva de Orujo de uva 7,5% + NaCl 300mM (rosada). Respecto a la fase de muerte, no fue posible de apreciar en la duración total del experimento.

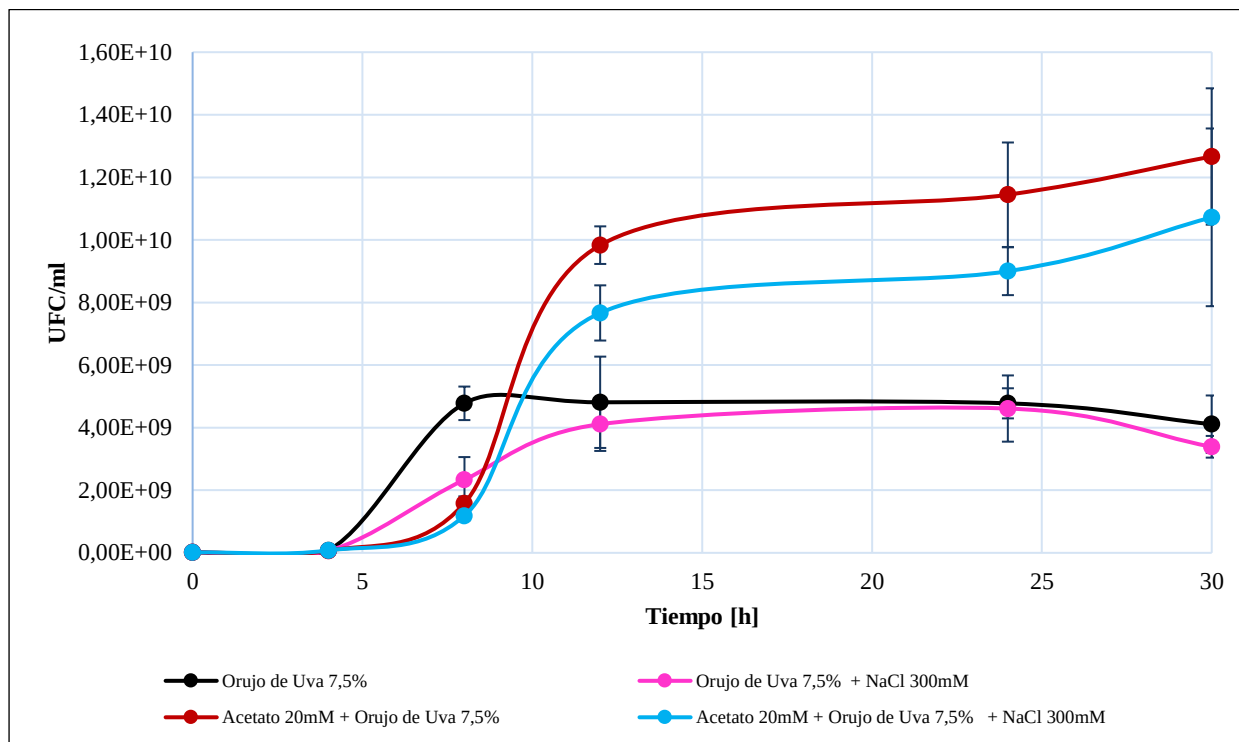


Gráfico 9. Curvas de crecimiento de *A. radioresistens* DD78 en las condiciones de control sin fuente de carbono con 7,5% de orujo de uva (negra); control sin fuente de carbono más 7,5% de orujo de uva y 300mM de NaCl (rosado); acetato de sodio 20mM más orujo de uva 7,5% (rojo) y acetato de sodio 20mM más orujo de uva 7,5% y 300mM de NaCl (celeste) expresado en Unidades Formadoras de colonia por mL (UFC/mL) (n=3; α=0,05)

De las imágenes obtenidas de las placas de experimentación, se aprecia que existe mayor crecimiento en aquellas condiciones que incluyen la fuente de carbono y el 7,5% de Orujo de uva. Además, se observa que al comparar las colonias en las condiciones que han crecido en presencia de orujo de uva respecto a las que no lo contienen, estas presentan mayor definición y tamaño.

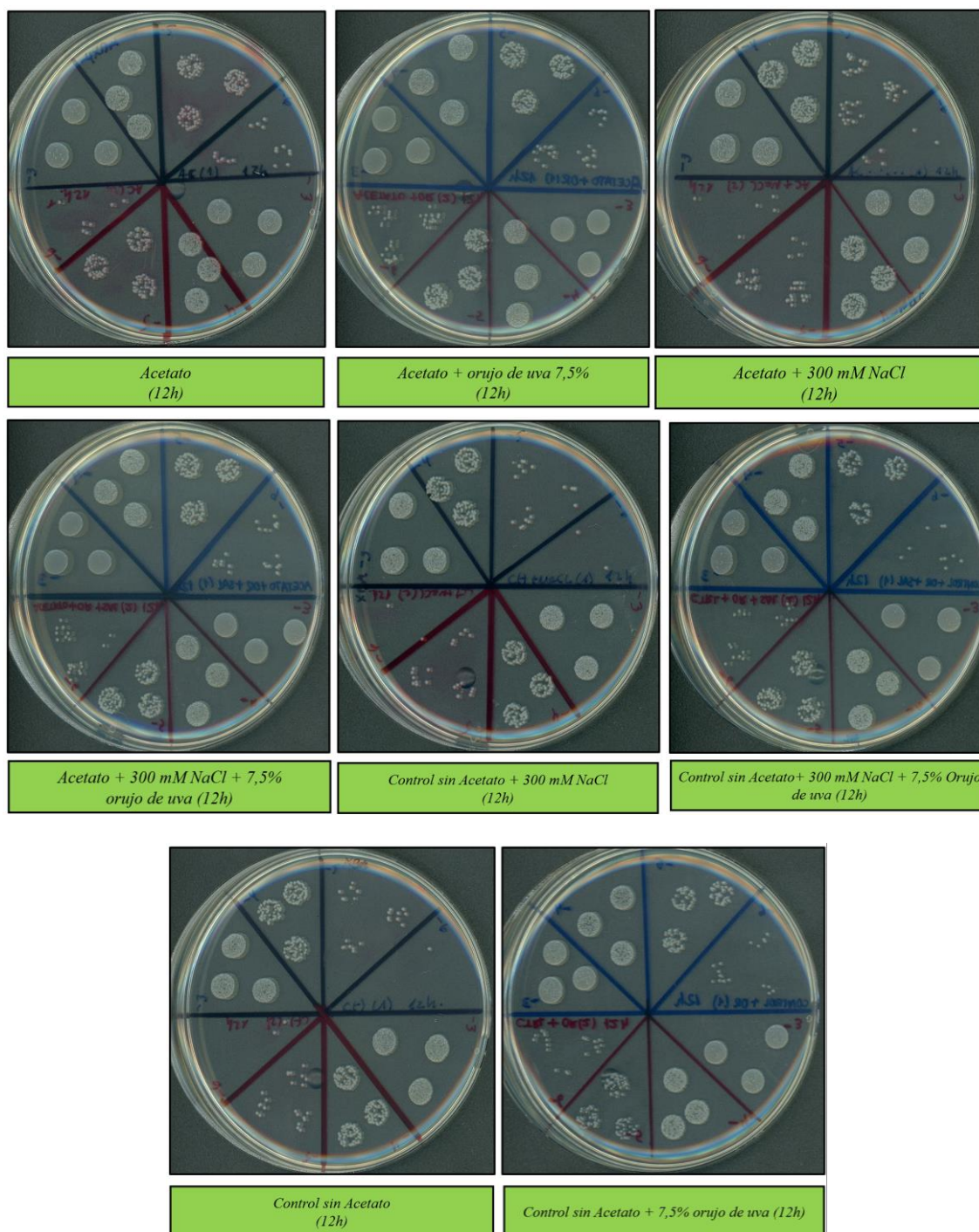


Figura 12. Comparación en Unidades Formadoras de Colonia de *A. radioresistens* DD78 a las 12h de crecimiento a 30°C a 147 rpm en presencia de Acetato. De izquierda a derecha y en orden descendente, se observan las condiciones de crecimiento en acetato; acetato más 7,5% de orujo de uva; acetato más 300mM de NaCl; acetato más 300mM de NaCl y 7,5% de orujo de uva; control sin fuente de carbono más 300mM de NaCl; control sin fuente de carbono más 300mM de NaCl y 7,5% de orujo de uva; control sin fuente de carbono y control sin fuente de carbono y 7,5% de orujo de uva.

De igual manera que para la turbidez, se analizó la significancia estadística de las diferencias de las medias de cada curva de crecimiento mediante la prueba de ANOVA unidireccional y posteriormente realizando la prueba de Tukey HSD, considerando los datos de las gráficas del **Anexo 1**, que corresponden a las condiciones sin orujo de uva y que son parte de los experimentos de (Báez-Matus, Tesis doctoral en preparación). A continuación, se presentan los resultados obtenidos para cada intervalo de tiempo. Cabe mencionar que se ha adjuntado un ejemplo de los cálculos efectuados de (UFC/ml) para Acetato 20mM a las 8h de experimentación en el **Anexo 2**.

Tabla 11. Significancia estadística según Test de Tukey entre las diferentes curvas de crecimiento obtenidas desde UFC en Acetato 20mM.

Condiciones analizadas (Medias Poblacionales)	0	4	8	12	24	30
O-OS	NO	NO	SI	NO	NO	NO
O-AO	NO	NO	SI	SI	SI	SI
O-AOS	NO	NO	SI	NO	SI	SI
O-C	NO	NO	SI	SI	SI	NO
O-A	NO	NO	SI	NO	NO	NO
O-CS	NO	NO	SI	SI	SI	NO
O-AS	NO	NO	SI	SI	NO	NO
OS-AO	NO	NO	NO	SI	SI	SI
OS-AOS	NO	NO	SI	SI	SI	SI
OS-C	NO	NO	SI	SI	SI	NO
OS-A	NO	NO	NO	NO	NO	NO
OS-CS	NO	NO	SI	SI	SI	NO
OS-AS	NO	NO	SI	NO	NO	NO
AO-AOS	NO	NO	NO	NO	NO	NO
AO-C	NO	NO	SI	SI	SI	SI
AO-A	NO	NO	NO	SI	SI	SI
AO-CS	NO	NO	SI	SI	SI	SI
AO-AS	NO	NO	SI	SI	SI	SI
AOS-C	NO	NO	NO	SI	SI	SI
AOS-A	NO	NO	NO	NO	NO	NO
AOS-CS	NO	NO	SI	SI	SI	SI
AOS-AS	NO	NO	NO	SI	NO	NO
A-AS	NO	NO	SI	SI	NO	NO
A-C	NO	NO	SI	SI	SI	SI
A-CS	NO	NO	SI	SI	SI	SI
CS-AS	NO	NO	NO	NO	SI	SI
C-CS	NO	NO	NO	NO	NO	NO
C-AS	NO	NO	NO	NO	SI	SI

Leyenda de tabla: Condiciones analizadas (Medias Poblacionales)

O: Control sin fuente de carbono más 7,5% de orujo de uva; **OS:** Control sin fuente de carbono más 300mM de NaCl y 7,5% de orujo de uva; **AO:** Acetato 20mM más 7,5% de orujo de uva; **AOS:** Acetato 20mM más 300mM de NaCl y 7,5% de orujo de uva; **C:** Control sin fuente de carbono; **CS:** Control sin fuente de carbono más 300 mM de NaCl; **A:** Acetato 20mM; **AS:** Acetato 20mM más 300 mM de NaCl.

Al comparar los resultados estadísticos obtenidos de la prueba de ANOVA y de Tukey HSD de las curvas de crecimiento se tiene lo siguiente:

Considerando el criterio **presencia de orujo de uva**, se tiene lo siguiente:

- **Controles con y sin orujo de uva (O-C):** al comparar los controles sin fuente de carbono (sin acetato de sodio) se aprecia que existen diferencias significativas a partir de las 8h hasta las 24h de crecimiento, luego de ello, no existen diferencias significativas debido a que ambas curvas se encuentran iniciando la fase de muerte. A las 12 horas, se puede visualizar que ambas curvas ya se encuentran en la fase estacionaria, por lo que es posible comparar el valor de UFC/ml de ambas condiciones. Para el caso del control con orujo de uva, se tiene un valor de $4,81 \times 10^9$ UFC/ml, mientras que, para la condición sin orujo se tiene un valor de $5,28 \times 10^8$ UFC/ml, lo que sugiere un crecimiento 9,1 veces mayor para el control con orujo de uva.
- **Control más NaCl con y sin orujo de uva (CS-OS):** al comparar los controles con NaCl, se aprecia que existen diferencias significativas a partir de las 8h hasta las 24h de iniciado el experimento, luego de ello, no existen diferencias significativas. A las 12 horas, se aprecia que ambas curvas ya se encuentran en la fase estacionaria, por lo que es posible comparar el valor de UFC/ml de ambas condiciones. Para el caso del control con orujo de uva y NaCl, se tiene un valor de $4,11 \times 10^9$ UFC/ml, mientras que, para la condición sin orujo de uva se tiene un valor de $3,52 \times 10^8$ UFC/ml, lo que sugiere un crecimiento 11,7 veces mayor para el control con orujo de uva y NaCl.
- **Acetato con y sin orujo de uva (AO-A):** al comparar ambas curvas, se aprecia que existen diferencias significativas a partir de las 12h de crecimiento hasta finalizar el experimento a las 30h. A partir de las 12h, se observa que ambas curvas ya se encuentran en la fase estacionaria, por lo que es posible comparar el valor de UFC/ml de ambas condiciones. Para el caso de la curva de Acetato con orujo de uva, se tiene un valor de $9,83 \times 10^9$ UFC/ml, mientras que, para la condición sin orujo se tiene un valor de $5,14 \times 10^9$ UFC/ml, lo que sugiere un crecimiento 1,9 veces mayor para la condición con orujo de uva.
- **Acetato más NaCl con y sin orujo de uva (AS-AOS):** Al comparar ambas curvas de crecimiento, se aprecia que solo existen diferencias significativas a las 12h de crecimiento, mostrándose un crecimiento 7 veces mayor de la condición que posee orujo de uva. Esto se debe a que la curva que contine orujo presenta una fase de adaptación o latencia y una fase exponencial más corta que la curva que no lo contiene, alcanzando la meseta a las 12 horas de crecimiento, mientras que la condición sin orujo la alcanza a las 24 horas. Sin embargo, cuando ambas curvas alcanzan la fase estacionaria, no existen diferencias significativas en el crecimiento microbiano.

El segundo criterio, fue la **presencia de NaCl** y al comparar los resultados estadísticos obtenidos de la prueba de ANOVA y de Tukey HSD de las curvas de crecimiento se tiene lo siguiente:

- **Controles con y sin NaCl (C-CS):** se puede observar que no existen diferencias significativas en las 30 horas de experiencia. No existe crecimiento microbiano en estas curvas.
- **Controles con orujo de uva con y sin NaCl (O-OS):** se puede apreciar que solo existen diferencias significativas a las 8 horas de crecimiento, donde la condición sin NaCl ($4,78 \times 10^9$ UFC/ml) presenta un crecimiento 2 veces mayor que la condición que lo contiene ($2,33 \times 10^9$ UFC/ml). Esto se debe a que la curva que posee NaCl presenta una fase de adaptación o latencia y una fase exponencial más duradera que la curva sin NaCl, alcanzando la fase estacionaria a las 12 horas de crecimiento, mientras que la condición sin NaCl la alcanza a las 8 horas. A partir de las 12 horas, no existen diferencias significativas.
- **Acetato con y sin NaCl (A-AS):** se puede apreciar que solo existen diferencias significativas entre las 8 y 12 horas de crecimiento, donde la condición sin NaCl ($1,45 \times 10^9$ UFC/ml) a las 8 horas presenta un crecimiento 3,9 veces mayor que la condición que lo contiene ($3,72 \times 10^8$ UFC/ml). Esto se debe a que la curva que posee NaCl presenta una fase de adaptación o latencia y una fase exponencial más larga que la curva sin NaCl, alcanzando la meseta a las 24 horas de crecimiento, mientras que la condición que no lo contiene la alcanza a las 12 horas.
- **Acetato con orujo de uva con y sin NaCl (AO-AOS):** se puede observar que no existen diferencias significativas en las 30 horas de experiencia, apreciándose similitudes en la duración de las fases de latencia, exponencial y estacionaria.

Además de analizar los criterios anteriormente mencionados, fue posible observar otros resultados estadísticos obtenidos de la prueba de ANOVA y de Tukey HSD de las curvas de crecimiento, que se detallan a continuación:

- **Acetato con orujo de uva más NaCl y Acetato (AOS-A):** se puede observar que no existen diferencias significativas en las 30 horas de experiencia, apreciándose similitudes en la duración de las fases de latencia, exponencial y estacionaria.
- **Control con orujo de uva más NaCl y Acetato más NaCl (OS-AS):** al comparar estas condiciones, se puede apreciar que existen diferencias significativas solo en la octava hora de crecimiento, debido a que, en este punto, la curva control con orujo de uva más NaCl se encuentra en la fase exponencial, mientras que la de Acetato más NaCl aún se encuentra en la fase de latencia. Luego de las 12 horas no se aprecian diferencias significativas.

- **Control con orujo de uva más NaCl y Acetato (OS-A):** se puede apreciar que no existen diferencias significativas en las 30 horas de experiencia, observándose similitudes en la duración de las fases de latencia, exponencial y estacionaria a pesar de la presencia de NaCl en el caso del control con orujo de uva.
- **Control con orujo de uva y Acetato (O-A):** al quitar el NaCl del control con orujo de uva, se puede apreciar que existen diferencias significativas con la curva de acetato solo en la octava hora de crecimiento, debido a que la curva control de orujo de uva alcanza la fase estacionaria a las 8 horas, mientras que la de acetato a las 12 horas de iniciada la experiencia. Además, se puede visualizar que, a partir de las 12 horas, cuando ambas curvas se encuentran en la meseta, no se aprecian diferencias significativas en el crecimiento microbiano.
- **Control con orujo de uva y Acetato más NaCl (O-AS):** Al agregar NaCl a la condición de acetato, se puede apreciar que solo existen diferencias significativas con el control con orujo de uva entre las 8 y 12 horas de crecimiento. A pesar de que se están evaluando condiciones cuya diferencia radica en la presencia de fuente de carbono y NaCl, se puede visualizar que el NaCl genera estrés en la bacteria y por tanto, se visualiza una fase de adaptación y una fase exponencial más larga que la curva sin NaCl, alcanzando la meseta a las 24 horas de crecimiento para el caso de la curva Acetato más NaCl, mientras que la condición control la alcanza a las 8 horas.

b. Fuente de Carbono: Diesel 1%v/v:

En el Gráfico 10, es el resultado de la medición de turbidez por espectrofotometría a 600nm de curvas de crecimiento realizadas en triplicado biológico y duplicado técnico en presencia de Diesel 1%v/v. Se observa que no es posible determinar un comportamiento claro del crecimiento microbiano, dado a que se han obtenido valores de turbidez negativos:

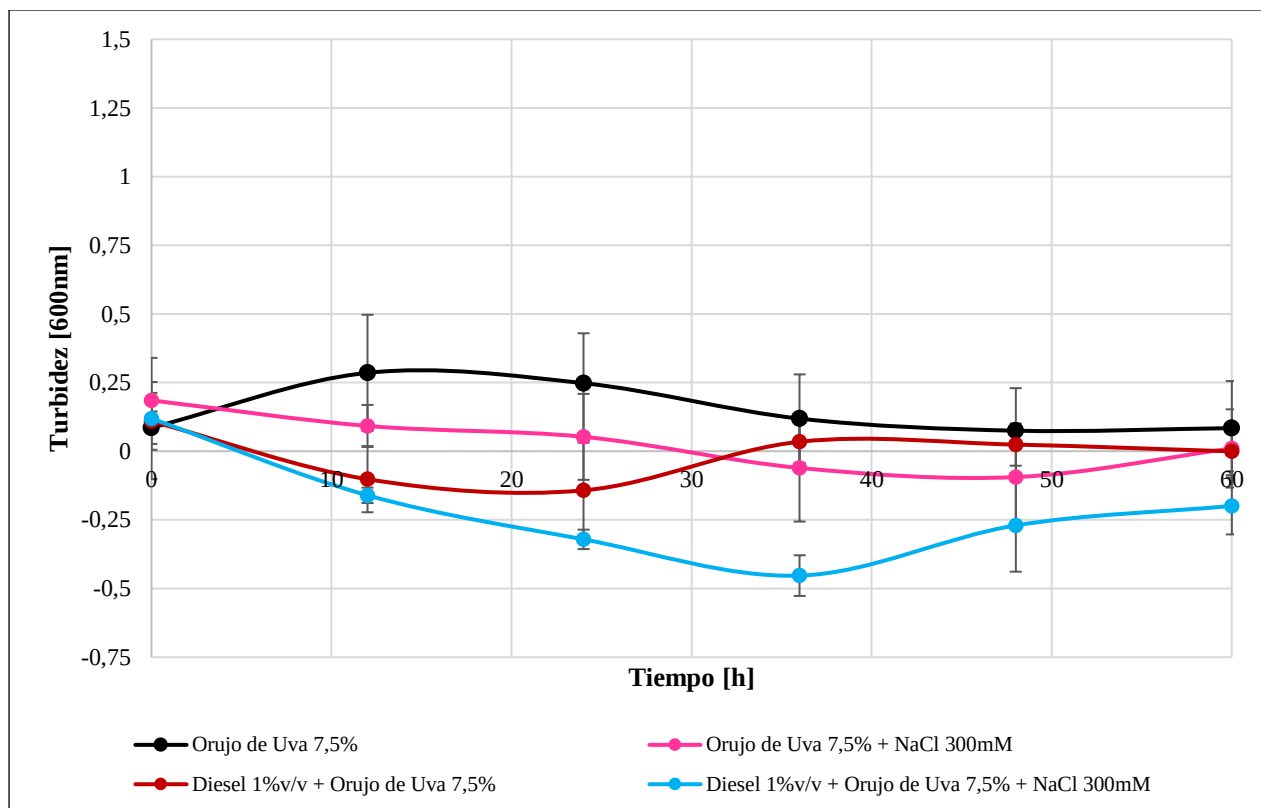


Gráfico 10. Curvas de crecimiento de *A. radioresistens* DD78 en las condiciones de control sin fuente de carbono más 7,5% de orujo de uva (negro); control sin fuente de carbono más 7,5% de orujo de uva y 300mM de NaCl (rosado); diésel 1%v/v más Orujo de Uva 7,5% (rojo) y diésel 1%v/v más Orujo de Uva 7,5% y 300mM de NaCl (celeste) expresado en turbidez en una longitud de onda de 600nm (n=3; $\alpha=0,05$).

El Gráfico 11 es el resultado del análisis de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml) de curvas de crecimiento realizadas en triplicado biológico y duplicado técnico en presencia de Diesel 1%v/v. En él, se puede apreciar que existe crecimiento en los controles sin fuente de carbono y que en aquellas condiciones que contienen Diesel 1% v/v se presenta un menor valor de UFC/ml respecto a los controles. Además, se puede distinguir que las condiciones que presentan NaCl muestran un menor crecimiento respecto a la condición equivalente que no la posee. A las 36 horas de crecimiento, se puede visualizar lo siguiente:

Tabla 12. Valores de UFC/ml en 36 h de experimentación en diferentes condiciones de crecimiento

Condición	Valor de UFC/ml en 36 h
Orujo de uva 7,5%,	$7,61 \times 10^9 \pm 1,21 \times 10^9$
Orujo de uva 7,5% + NaCl 300mM	$6,11 \times 10^9 \pm 2,50 \times 10^9$
Diesel 1%v/v + Orujo de uva 7,5%;	$5,78 \times 10^9 \pm 1,84 \times 10^8$
Diesel 1%v/v + Orujo de uva 7,5% + NaCl 300mM	$1,11 \times 10^6 \pm 1,92 \times 10^6$

En lo que atañe a las fases de crecimiento, se puede apreciar que la curva Diesel 1%v/v + orujo de uva 7,5%+ NaCl 300mM (morado) presenta una fase de latencia o adaptación de aproximadamente 36 horas. Posterior a ello, puede apreciarse la fase exponencial hasta las 60 horas, donde finalizó esta experiencia. Para el caso de la curva Diesel 1%v/v + orujo de uva 7,5% (verde), se observa una fase de latencia o adaptación de aproximadamente 24 horas. Luego, se aprecia la fase exponencial hasta las 36 horas, iniciando la fase estacionaria hasta finalizar las 60 horas de duración de esta experiencia. Los controles sin fuente de carbono presentan una fase exponencial hasta hora 12. Luego se observa un decrecimiento hasta la hora 24 y posteriormente retomando el crecimiento hasta la hora 36. Para el caso de la curva de Orujo de uva 7,5% (azul), se observa una meseta hasta finalizar las 60 de experiencia. Por su parte, para el caso de la curva Orujo de uva 7,5% + NaCl 300mM (roja), se observa una disminución de la biomasa hasta finalizar las 60 horas.

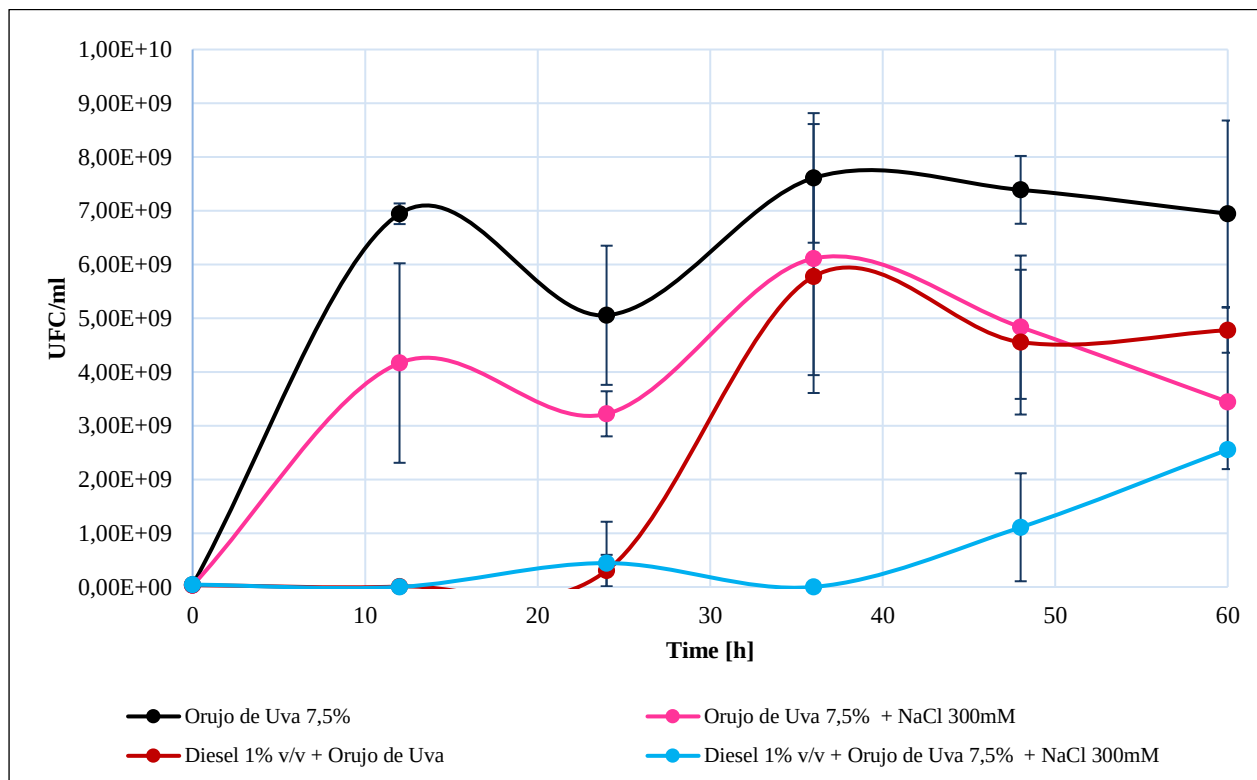


Gráfico 11. Curvas de crecimiento de *A. radioresistens* DD78 en las condiciones de control sin fuente de carbono más 7,5% de orujo de uva (negro); control sin fuente de carbono más 7,5% de orujo de uva y 300mM de NaCl (rosado); diésel 1%v/v más Orujo de Uva 7,5% (rojo) y diésel 1%v/v más Orujo de Uva 7,5% y 300mM de NaCl (celeste) expresado en Unidades Formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL). (n=3; $\alpha=0,05$)

De las imágenes obtenidas de las placas de experimentación, se aprecia que a las 48 de horas de iniciada la experiencia, es posible observar que el crecimiento bacteriano es mayor en aquellas condiciones que presentan orujo de uva 7,5% y que las colonias presentan un mayor fitness respecto a las condiciones que carecen de este.

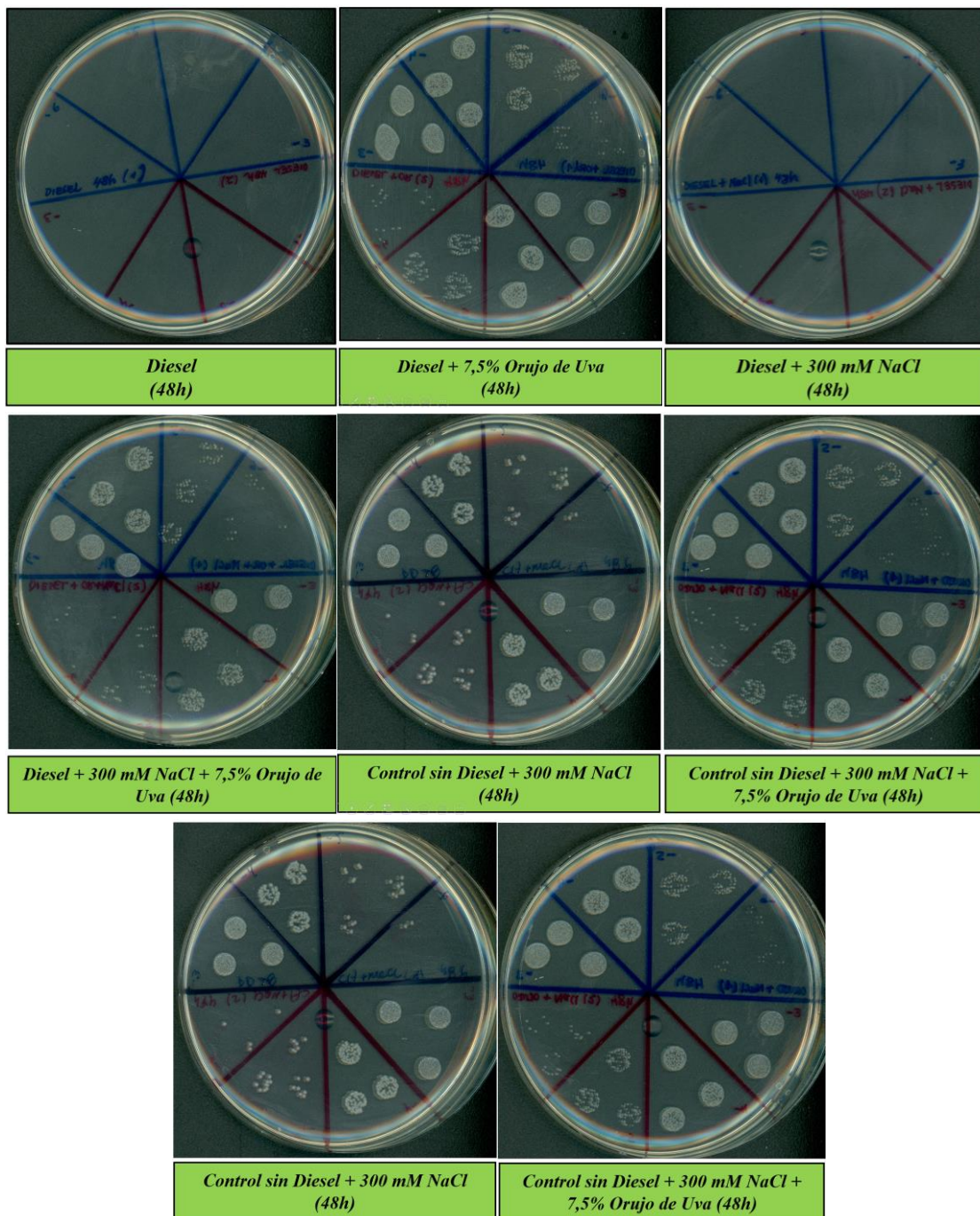


Figura 13. Comparación en Unidades Formadoras de Colonia de *A. radioresistens* DD78 a las 48h de crecimiento a 30°C a 147rpm en presencia de diésel. De izquierda a derecha y en orden descendente, se observan las condiciones de crecimiento en diésel; diésel más 7,5% de orujo de uva; diésel más 300mM de NaCl; diésel más 300mM de NaCl y 7,5% de orujo de uva; control sin fuente de carbono más 300mM de NaCl; control sin fuente de carbono más 300mM de NaCl y 7,5% de orujo de uva; control sin fuente de carbono y control sin fuente de carbono y 7,5% de orujo de uva.

De igual manera que para el Acetato 20 mM, se analizó la significancia estadística de las diferencias de las medias de cada curva de crecimiento mediante la prueba de ANOVA unidireccional y posteriormente aplicando la prueba de Tukey HSD. A continuación, se presentan los resultados obtenidos para cada intervalo de tiempo.

Tabla 13. Significancia estadística según Test de Tukey entre las diferentes curvas de crecimiento obtenidas desde UFC en diésel 1%v/v.

Diferencia Poblacional (media)	0 h	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h
O-OS	NO	SI	NO	NO	SI	SI
O-DO	NO	SI	SI	NO	SI	NO
O-DOS	NO	SI	SI	SI	SI	SI
OS-DO	NO	SI	SI	NO	NO	NO
OS-DOS	NO	SI	SI	SI	SI	NO
DO-DOS	NO	NO	NO	SI	SI	NO
C-O	NO	SI	SI	SI	SI	SI
C-OS	NO	SI	SI	SI	SI	NO
C-DO	NO	NO	NO	SI	SI	SI
C-DOS	NO	NO	NO	NO	NO	NO
C-CS	NO	NO	NO	NO	NO	NO
CS-O	NO	SI	SI	SI	SI	SI
CS-OS	NO	SI	SI	SI	SI	SI
CS-DO	NO	NO	NO	SI	SI	SI
CS-DOS	NO	NO	NO	NO	NO	NO

Leyenda de tabla: Condiciones analizadas (Medias Poblacionales)

O: Control sin fuente de carbono más 7,5% de orujo de uva; **OS:** Control sin fuente de carbono más 300mM de NaCl y 7,5% de orujo de uva; **DO:** Diesel 1%v/v más 7,5% de orujo de uva; **DOS:** Diesel 1%v/v más 300mM de NaCl y 7,5% de orujo de uva; **C:** Control sin fuente de carbono; **CS:** Control sin fuente de carbono más 300 mM de NaCl.

El primer criterio de comparación fue la **presencia de orujo de uva** y al analizar los resultados estadísticos obtenidos de la prueba de ANOVA y de Tukey HSD de las curvas de crecimiento se tiene lo siguiente:

- **Controles con y sin orujo de uva (O-C):** al comparar los controles sin fuente de carbono (sin diésel) se aprecia que existen diferencias significativas durante las 60 horas de experimentación, observándose que existe mayor crecimiento en la condición que contiene orujo de uva. Además, se aprecia que existen dos máximos de crecimiento en la curva que contiene orujo: a las 12 y 30 horas, presentándose un crecimiento con características de diaúxico.
- **Control más NaCl con y sin orujo de uva (CS-OS):** para el caso de los controles con NaCl, se aprecia que existen diferencias significativas entre ellos durante todo el desarrollo de la experiencia. Al igual que en el análisis anterior, se observa que existe mayor crecimiento en la condición que contiene orujo de uva. Además, también se aprecia que existen dos máximos de crecimiento en la curva que contiene orujo de uva: a las 12 y 30 horas, presentándose un crecimiento con características de diaúxico.

El segundo criterio, fue la **presencia de NaCl** y al comparar los resultados estadísticos obtenidos de la prueba de ANOVA y de Tukey HSD de las curvas de crecimiento se tiene lo siguiente:

- **Controles con y sin NaCl (C-CS):** se puede observar que no existe crecimiento en estas curvas. Además, no se observan diferencias significativas en las 30 horas de experiencia.
- **Controles con orujo de uva con y sin NaCl (O-OS):** se puede apreciar que existen diferencias significativas a las 12 horas de experiencia, donde la condición sin NaCl presenta un crecimiento mayor que la condición que lo contiene. Luego, no existen diferencias significativas hasta la hora 36 y se retoman a las 48 horas, donde la curva que contiene NaCl parece iniciar su fase de muerte, mientras que la curva sin NaCl se mantiene en fase estacionaria.
- **Diesel con orujo de uva con y sin NaCl (DO-DOS):** se puede apreciar que solo existen diferencias significativas entre las 36 y 48 horas de crecimiento, donde la condición sin NaCl ($4,56 \times 10^9$ UFC/ml) a las 48 horas presenta un crecimiento 4,1 veces mayor que la condición que contiene NaCl ($1,11 \times 10^9$ UFC/ml). Esto se debe a que la curva que posee NaCl presenta una fase de adaptación o latencia y una fase exponencial más larga que la curva sin NaCl, alcanzando la meseta más allá de las 60 horas de crecimiento, mientras que la condición que no lo contiene la alcanza a las 36 horas.

El tercer criterio, fue la **presencia de diésel 1% v/v** y al comparar los resultados estadísticos obtenidos de la prueba de ANOVA y de Tukey HSD de las curvas de crecimiento se tiene lo siguiente:

- **Curva de diésel con orujo de uva y control con orujo de uva (DO-O):** al comparar ambas curvas, se observa que existe un menor crecimiento en la condición que contiene diésel. Además, se puede apreciar que entre estas curvas no existen diferencias significativas a las 36 horas de crecimiento.
- **Curva de diésel con orujo de uva más NaCl y curva de orujo de uva más NaCl (DOS-OS):** Al igual que en el caso anterior, se puede observar que existe un menor crecimiento en la curva que contiene diésel, quien tiene el rol de fuente de carbono. Además, se puede apreciar que entre estas curvas existen diferencias significativas durante las primeras 48 horas de experiencia.

Tras analizar las curvas de crecimiento realizadas con medición de turbidez y de Unidades Formadoras de Colonia (UFC), se descartaron los resultados obtenidos a partir de la turbidez a 600nm tanto para acetato de sodio como para diésel. Lo anterior, debido a que la solución de orujo de uva utilizada presentaba sólidos suspendidos que no se pudieron eliminar a pesar de todos los tratamientos indicados en **4.5.2. Obtención de la solución de orujo de uva** y provocaron ruido en las mediciones, arrojando incluso valores de turbidez negativos al utilizar diésel como fuente de carbono, por lo que los resultados no son representativos del crecimiento microbiano. De esta forma, se consideraron solo las curvas de crecimiento obtenidas a partir de los valores de UFC.

6. Discusión

La biorremediación se presenta como una alternativa sostenible para recuperar suelos salinos contaminados con petróleo, por lo que la búsqueda de microorganismos capaces de degradar los hidrocarburos de petróleo y tolerar condiciones salinas es crucial para llevar a cabo estos procesos de remediación (Boopathy, 2000; Fuentes, 2014; Varjani, 2017).

La presencia de NaCl ralentiza el proceso de degradación de los microorganismos debido a que acelera la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) a nivel celular (Møller, *et al.*, 2007; Miller, *et al.*, 2010; Hossain, *et al.*, 2016). Las células poseen mecanismos antioxidantes endógenos y exógenos para estabilizar las ROS, pero cuando la generación de ROS sobrepasa la capacidad de estos sistemas para estabilizarlas, causan estrés oxidativo, lo que deteriora la maquinaria celular a nivel de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Los antioxidantes son un mecanismo exógeno que permite estabilizar las ROS y con ello, reducir el estrés oxidativo (Montero, 1996; Venereo Gutiérrez, 2002; Mayor Oxilia 2010).

Una fuente de obtención de antioxidantes son diferentes frutas, entre ellas las uvas, la que se produce abundantemente en Chile, debido a la creciente industria del vino, siendo la cepa *Cabernet Sauvignon* la más demandada.

La industria del vino genera residuos líquidos y sólidos, destacando el orujo de uva entre estos últimos. Este residuo que se compone principalmente de las semillas y la piel de la uva posee una alta concentración de compuestos fenólicos extraíbles, debido a la mala extracción fenólica en el proceso de vinificación (López-Astorga *et al.*, 2022).

Por esta razón, el orujo de uva se presenta como una posible fuente de obtención de antioxidantes que permitiría reducir el estrés oxidativo generado por el metabolismo microbiano en la degradación de hidrocarburos en presencia de NaCl y, a su vez, reducir la acumulación de este desecho que ocasiona malos olores, generación de plagas, problemas de contaminación de aguas, entre otros (Christ & Burrit, 2013; Dwyer *et al.*, 2014).

Por lo tanto, el orujo de uva de la cepa *Cabernet Sauvignon* se muestra como el sujeto de estudio, dado a la alta producción de esta materia prima en Chile, por la alta demanda de vino de esta variedad y a su gran capacidad antioxidante y contenido fenólico (Rockenbach *et al.*, 2011; Hornedo-Ortega *et al.*, 2020).

Para llevar a cabo este trabajo, se utilizó orujo de uva cepa *Cabernet Sauvignon* proveniente de la Viña San Miguel de Curicó y se ha buscado caracterizar esta materia prima al evaluar su capacidad antioxidante.

1. Determinación de la capacidad antioxidante del extracto orujo de uva cepa *Cabernet Sauvignon*.

El extracto de orujo de uva logró hasta un 82% de reducción del radical DPPH a los 30 minutos; sugiriendo que posee capacidad antioxidante. Además, ensayos por método ORAC demuestran un valor de 23.461,3 $\mu\text{mol ET}/100 \text{ ml mta}$ y se determinó que el orujo de uva tiene niveles de polifenoles totales de 2.322,9 mg EAG/100 mg mta y niveles de Vitamina C y E de 1,7 y 1,9 mg/100g de orujo (INTA,2022; Báez-Matus,Tesis en preparación).

Se tiene conocimiento de que el orujo de uva contiene una amplia gama de compuestos bioactivos, como los compuestos fenólicos, que se caracterizan por tener gran capacidad antioxidante. Se estima que más de un 70% del contenido de compuestos fenólicos presentes en la uva permanecen en el orujo después del proceso de elaboración del vino (Ky, *et al.*, 2014). Por tanto, la capacidad antioxidante del orujo de uva variedad *Cabernet Sauvignon* se debe a que este contiene compuestos como el ácido protocatecuico, epigallocatequina, resveratrol, miricetina-3-O-ramnósido y antocianinas (cianidina-3-glucósido, malvidina-3-glucósido, petunidina-3-glucósido) que tienen propiedades antioxidantes y que son ampliamente reportados en orujo de uva tinta (López-Astorga,2022).

Por otro lado, se observa que a medida que la concentración de α -tocopherol y de extracto de orujo de uva aumentan, se incrementó el porcentaje de reducción de DPPH. Sin embargo, se puede apreciar que el α -tocopherol es un mejor antioxidante que el orujo de uva, llegando hasta un 89,02 % de reducción en la concentración de 56,7 [mg/L] a los 5 minutos; mientras que el orujo de uva logra un 82,36 % de reducción en la concentración de 750 [mg/L] a los 30 minutos. Por tanto, se requiere de mayor tiempo y concentración de extracto de orujo de uva para lograr un porcentaje de reducción de radical DPPH similar.

Ello, se puede deber a que el α -tocopherol (sustancia de alta pureza >95%), reacciona con el DPPH en una estequiometría de 2:1, como el glutatión, las aminas aromáticas (como la p-fenilendiamina y el p-aminofenol) y los compuestos polihidroxí aromáticos (como la hidroquinona y el pirogalol) (Molyneux,2004). Ello, propicia a que la estabilización de este radical sea más expedita que para el caso del orujo de uva, que es una solución heterogénea compleja, que presenta una distribución de los compuestos fenólicos variable (López-Astorga,2022).

Por tanto, en el orujo existen diversos compuestos bioactivos que tienen propiedades antioxidantes y que podrían reaccionar con el radical DPPH al donar un átomo de hidrógeno, lo que podría interferir en la medición de la capacidad antioxidante, en la disponibilidad de moléculas para reaccionar y estabilizar al DPPH y en la velocidad de reacción dependiendo de la posición en que los distintos compuestos puedan ir reaccionando. Lo anterior, podría explicar que el rango de 12,5 a 750 [mg/L] de extracto de orujo presentó una actividad de 0,093 – 0,016 mg de α -tocopherol equivalentes por miligramo de extracto y no un valor único. Finalmente, debido a que se encontraron estas equivalencias a partir de un extracto concentrado inicial de 30 [mg/mL] que provenía de 15 [g] de orujo, se puede plantear que esta relación de orujo-extracto puede ser de utilidad para un escalamiento en procesos de biorremediación.

2. Caracterización del efecto del extracto de orujo de uva sobre el crecimiento en hidrocarburos de *A. radioresistens* DD78 en condiciones salinas.

Para analizar el efecto de la presencia de orujo de uva en el crecimiento de *A. radioresistens* DD78 en hidrocarburos en condiciones salinas, se realizaron curvas de crecimiento con dos fuentes de carbono: acetato de sodio 20mM que es una fuente de carbono convencional (Báez-Matus, Tesis en preparación); y diésel, una mezcla líquida de hidrocarburos utilizada como combustible que se obtiene principalmente de la destilación del petróleo a una temperatura entre los 200 y 380°C (Wauquier, 2004). En la preparación de los medios de cultivo se consideró un 7,5% de orujo de uva, debido a que se ha observado que a este porcentaje existe crecimiento microbiano sin una variación importante de pH, que pueda perjudicar el desarrollo de las bacterias (Báez-Matus, Tesis en preparación).

De acuerdo con el primer criterio de comparación de las curvas de crecimiento, donde se evaluó la presencia de orujo de uva, se pudo observar que este favorecía el crecimiento de *A. radioresistens* DD78.

Al comparar las curvas de acetato y acetato con orujo de uva, donde no existe presencia de NaCl, que es un agente estresor externo que propiciaría la generación de ROS y por tanto a un mayor estrés oxidativo en la bacteria; se sugieren tres posibles escenarios que explicarían el mayor crecimiento de *A. radioresistens* DD78 en presencia de orujo de uva y en ausencia de un estresor externo: a) Que la capacidad antioxidante del orujo de uva propicie el crecimiento celular al contribuir como mecanismo de defensa antioxidante exógeno frente a las ROS generadas por el metabolismo basal de las bacterias, otorgando así un mayor fitness a la célula, permitiéndole un mejor desarrollo y reproducción; b) que el orujo de uva presente componentes que puedan ser aprovechados como fuente de carbono simultánea con el acetato de sodio, debido a que no se presenta un crecimiento diaúxico que plantee la utilización secuencial de distintas fuentes de carbono (Wang *et al.*, 2019) y que al presentarse una mayor disponibilidad de nutrientes, el crecimiento microbiano sea mayor; c) que ambos escenarios coexistan dada la complejidad del orujo de uva.

Se tiene certeza de que la solución de orujo de uva utilizada en los medios de cultivo contiene antioxidantes. Ello, gracias a las pruebas de DPPH anteriormente realizadas, y ensayos por método ORAC. Además, se determinó que el orujo de uva tiene niveles de polifenoles totales de 2.322,9 mg EAG/100 mg mta y niveles de Vitamina C y E de 1,7 y 1,9 mg/100g de orujo (Báez-Matus, Tesis en preparación). Sin embargo, es necesario realizar otro tipo de pruebas que permitan caracterizar el efecto del orujo de uva como antioxidante a nivel celular y enzimático. Por ejemplo, para evaluar su rol a nivel celular, ya sea en la preservación de sus estructuras proteicas y lipídicas, se requiere de pruebas como determinación de la actividad enzimática (catalasa, SOD), carbonilación de proteínas y lipoperoxidación (Céspedes Miranda *et al.*, 1996; González-Torres *et al.*, 2000; Díaz-Acosta & Membrillo-Hernández, 2006; Aguilar-Paredes *et al.*, 2018). Una comparativa de estas pruebas en condiciones con y sin orujo de uva, permitiría obtener mayores conclusiones del rol antioxidante de este.

Respecto al rol como fuente de carbono de co-utilización del orujo de uva, puede observarse que esta proposición es factible, puesto a que se aprecia crecimiento en los controles que contienen orujo de uva. Además, en las condiciones que se presenta acetato y orujo de uva, no se aprecia un crecimiento diaúxico, que plantee la utilización por etapas de distintas fuentes de carbono disponibles. Por tanto, el orujo de uva podría presentar una o más fuentes de carbono que serían aprovechadas por *A. radioresistens* DD78. Se ha identificado que el orujo de uva contiene glucosa y fructosa (Báez-Matus, Tesis en preparación). Sin embargo, se ha observado por ensayos preliminares que estas azúcares no generan un crecimiento mayor al

del acetato de sodio, por lo que este crecimiento se puede deber a otras azúcares no analizadas u otros componentes capaces de ser metabolizados por *A. radioresistens* DD78.

En lo que concierne al tercer escenario, no es posible concluir la coexistencia de dichos efectos, mientras no se realicen pruebas adicionales como las mencionadas anteriormente para evaluar el rol antioxidante a nivel celular.

En el segundo criterio evaluado, se tiene que, la presencia de NaCl genera que la adaptación y fase exponencial de crecimiento de las bacterias al medio tenga una mayor duración. Esto ocurre porque las células al estar inmersas en un medio con alta concentración salina se deshidratan por efecto de osmosis, y los microorganismos se ven obligados a recuperar la homeostasis celular. Esto es realizado mediante la producción o acumulación de osmolitos en el interior de la célula, que inducen una adaptación intracelular, lo que consume energía y retrasa el crecimiento celular (Rath & Rousk, 2015). Lo anterior, se pudo apreciar de manera experimental en la comparativa de las curvas de acetato y acetato más NaCl y en las curvas control con orujo de uva con y sin NaCl; donde se ha utilizado la misma condición respecto a la fuente de carbono. Cabe mencionar que, cuando ambas condiciones (con y sin NaCl) alcanzan la fase estacionaria, se presenta un crecimiento similar, pues no existen diferencias significativas a nivel estadístico. Ello, sugiere que el NaCl se comporta como un estresor externo que no perjudica el número máximo de células viables que se puede alcanzar en una muestra líquida, si no que solo ralentiza el momento en el que este número puede ser alcanzado.

Finalmente, se puede sugerir el rol osmoprotector del orujo de uva, debido a que este se compone de aminoácidos, ácidos grasos y otros (López-Astorga *et al.*, 2022) que podrían comportarse como solutos compatibles que las células acumulan para mantener su turgencia frente a la alta presión osmótica provocada por la salinidad. La presencia de estos solutos permitiría a las células activar el mecanismo “*low-salt in, compatible solute*” (Oren, 1999; Ramírez, *et al.*, 2004; Gunde-Cimerman, *et al.*, 2018), utilizar menos energía en adaptarse al medio y acortar la duración de sus fases de adaptación y crecimiento. Esto se ha podido observar principalmente al comparar las curvas de acetato orujo y acetato orujo sal, donde no se aprecian diferencias significativas en las 30 horas de experiencia, mientras que, al compararlas con sus equivalentes sin orujo de uva, es decir, las curvas de acetato y acetato sal, se pueden apreciar diferencias en el tiempo en que ambas curvas alcanzan su fase estacionaria.

En lo que concierne a las curvas de crecimiento con diésel, el cual es una fuente de carbono que podría ser aprovechada por *A. radioresistens* DD78, dado a que presenta genes de rutas de degradación de hidrocarburos y además, genes que codifican compuestos que ayudan a su biodisponibilidad como la proteína alasan, un bioemulsificante (Macaya *et al.*, 2019), se observó que, en las 60 horas destinadas a experimentación, las curvas de diésel y diésel NaCl no presentaron crecimiento, pues se observa un valor de turbidez menor a 0,2 (**Anexo 1.b**). Esto plantea que, para observar crecimiento en estas condiciones, se debe ampliar el tiempo de experimentación. Por ello, se ha decidido no considerar estos valores en los análisis estadísticos realizados, por lo que solo se consideraron seis condiciones de crecimiento para estos: controles con y sin NaCl, controles con orujo de uva con y sin NaCl; diésel con orujo de uva con y sin NaCl. Sin embargo, estos resultados a nivel cualitativo han sido claves para determinar el efecto de la presencia de orujo en el crecimiento de *A. radioresistens* DD78.

Considerando la presencia de orujo se uva en los controles, se pudo apreciar que existía un mayor crecimiento en los que contenían orujo de uva y que, además, presentaban un crecimiento diaúxico. Esto

sugiere que el orujo de uva posee más de una fuente de carbono que podría ser aprovechada por *A. radioresistens* DD78.

Para el segundo criterio, la presencia de NaCl ralentizó el crecimiento de la bacteria, debido a que es un agente estresor para su crecimiento. Sin embargo, cuando las curvas de crecimiento llegaron a fase estacionaria, alcanzaron valores de UFC/ml similares. Por tanto, el NaCl se comporta como un estresor externo que no perjudica el número máximo de células viables que se puede alcanzar en una muestra líquida, sino que ralentiza el crecimiento.

Asimismo, se observó que al comparar las curvas control con orujo con y sin NaCl, con las curvas diésel con orujo con y sin NaCl, existía un menor crecimiento en las condiciones que contenían diésel, sugiriendo que es una fuente de carbono más compleja para *A. radioresistens* DD78, debido a su compleja composición (Wauquier, 2004). Por lo que, para el crecimiento microbiano, se genera una fase de adaptación más larga, existe un mayor gasto energético y posiblemente mayor estrés oxidativo para la bacteria. El observar un mayor crecimiento en las curvas control con orujo con y sin NaCl, reafirma el hecho de que el orujo de uva puede ser aprovechado como fuente de carbono y que podría contener componentes menos complejos y más accesibles para la bacteria.

Por otra parte, se observó que tanto la curva de diésel con orujo de uva y diésel con orujo de uva más NaCl no presentan un crecimiento diaúxico como sus respectivas curvas control, que pueden sugerir la utilización por etapas de diferentes fuentes de carbono disponibles. Por tanto, se puede proponer que: (a) el diésel está siendo aprovechado como fuente de carbono por la bacteria y la gran capacidad antioxidante del orujo de uva propicia el crecimiento celular al contribuir como mecanismo de defensa antioxidante exógeno frente a las ROS generadas por el metabolismo basal de estas; (b) el orujo de uva posee una o más fuentes de carbono de co-utilización con el diésel, lo que explicaría que no se aprecie un crecimiento diaúxico; (c) Solo el orujo de uva fue utilizado como fuente de carbono; (d) que (a) y (b) coexistan.

Debido a que en los ensayos no se determinó la degradación de diésel por parte de la bacteria, se desconoce la cinética de degradación por *A. radioresistens* DD78. Se requiere evaluar el rol del orujo de uva como antioxidante mediante pruebas de estrés oxidativo celular.

Para el caso del escenario (c), se ha visualizado que el orujo de uva puede ser aprovechado como fuente de carbono por *A. radioresistens* DD78. Sin embargo, el comportamiento de la curva de crecimiento difiere mucho del control con orujo de uva, por tanto, no se desconoce si el orujo de uva fue utilizado en los matraces. Esto también se podría subsanar con una medición en el tiempo de la degradación de diésel por parte de las bacterias.

Por tanto, para determinar qué es lo que realmente ocurre en estas condiciones, se sugiere la medición de la degradación de diésel en presencia de orujo de uva, para determinar cuál es el rol del orujo en el medio de cultivo: si como fuente de carbono, como fuente exógena de antioxidantes o ambos.

Si bien los ensayos con diésel no son del todo concluyentes, debido a que se requiere de la realización de otras pruebas para ello, han permitido dilucidar el efecto de bioestimular a *A. radioresistens* DD78 en presencia de hidrocarburos, donde los resultados han sido favorables.

Además, estos ensayos han permitido analizar el efecto bioestimulador en la presencia de dos agentes estresores (NaCl y diésel), donde a pesar de que se requieren de más de 60 horas para alcanzar la fase estacionaria, los resultados han sido positivos, puesto a que en la condición de diésel más NaCl, no se apreció crecimiento, incluso en un mayor tiempo (Báez-Matus, Tesis en preparación).

Sin embargo, si se comparan las condiciones de acetato con orujo de uva más NaCl y diésel con orujo de uva más NaCl, donde se difiere en la fuente de carbono utilizada, se puede apreciar que a pesar de que ambas condiciones contienen orujo de uva, el estrés ocasionado por la presencia de dos agentes estresores (diésel y NaCl) se hace presente al comparar el crecimiento de ambas curvas, ya sea a nivel de tiempo en el que alcanzan la fase estacionaria, como de la cantidad de células viables observados en dicha fase. A pesar de ello, la diferencia en órdenes de magnitud en crecimiento es de 1 (10^9 para diésel vs 10^{10} para acetato), lo cual es un resultado positivo al comparar las condiciones que no poseen orujo, (acetato más NaCl y diésel más NaCl) donde se aprecia una diferencia de orden de magnitud de 4 (10^9 para acetato vs 10^5 para diésel). Ello, reafirma el que se pueda sugerir el rol osmoprotector del orujo de uva, debido a que este se compone de aminoácidos, ácidos grasos y otros (López-Astorga *et al.*, 2022) que podrían comportarse como solutos compatibles que las células acumulan para mantener su turgencia frente a la alta presión osmótica provocada por la salinidad. Además de que los antioxidantes contenidos en el orujo puedan favorecer el fitness de la célula, permitiéndole resistir de mejor manera el estrés oxidativo al que se expone y, por tanto, presentar crecimiento.

Finalmente, estos resultados se condicen con lo obtenido por (Báez-Matus, Tesis en preparación), en su escalamiento en núcleos con suelos contaminados, donde se bioaumentó con un consorcio bacteriano compuesto por *A. radioresistens* DD78, *Rhodococcus* sp. ICBD2, *Acinetobacter* sp. AA 64 y *Pseudomona* sp. DN36 y bioestimuló con orujo de uva, donde se observó un aumento en el número de heterótrofos totales y bacterias hidrocarbonoclasticas contenidas en el suelo, alcanzando una tasa de remoción del 77% hidrocarburos alifáticos (C16-C34) presentes en el suelo.

Por lo tanto, la bioestimulación con antioxidantes provenientes de fuentes vegetales puede ser de gran utilidad para potenciar procesos de biorremediación de suelos con hidrocarburos en condiciones salinas, de una manera más económica y amigable con el medio ambiente, debido a que la fuente utilizada para la obtención de estos antioxidantes ha sido un desecho que genera problemáticas medioambientales. De esta forma, aprovechar el potencial bioactivo de este residuo y además revalorizarlo para que contribuya a otros procesos, como de remediación ambiental es un resultado positivo a considerar. Además, invita a analizar otros desechos orgánicos ricos en compuestos bioactivos que puedan ser de utilidad para potenciar los distintos procesos de remediación.



7. Conclusiones

- El orujo de uva que es un desecho agroindustrial presenta una capacidad antioxidante que podría ser aprovechada por *A. radioresistens* DD78.
- El orujo de uva contiene una o más fuentes de carbono, las que podrían ser utilizadas por *A. radioresistens* DD78 para su crecimiento.
- La presencia de orujo de uva favorece el crecimiento de *A. radioresistens* DD78.
- La presencia de NaCl ralentiza el crecimiento de *A. radioresistens* DD78 aumentando su latencia y extendiendo su fase exponencial.
- La presencia de orujo de uva favorece el crecimiento de *A. radioresistens* DD78 en condiciones salinas.
- La presencia de orujo de uva favorece el crecimiento de *A. radioresistens* DD78 en hidrocarburos en condiciones salinas.



8. Proyecciones y recomendaciones

- Evaluar el efecto del orujo de uva al nivel del estrés oxidativo celular (proteínas, lípidos y ADN).
- Visualizar a través de microscopia electrónica de barrido si la presencia de orujo de uva favorece a la bacteria a nivel de estructura celular.
- Evaluar la degradación de diésel mediante GC-FID.
- Evaluar el efecto del orujo de uva en el crecimiento en otras bacterias que podrían formar consorcios con *A. radioresistens* DD78.

9. Bibliografía

- Abbasian, F., Lockington, R., Mallavarapu, M., & Naidu, R. (2015). A Comprehensive Review of Aliphatic Hydrocarbon Biodegradation by Bacteria. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 670-699. doi:10.1007/s12010-015-1603-5
- Abioye, O., Agamuthu, P., & Abdul-Aziz, R. (2012). Biodegradation of used motor oil using organic waste amendment. *Hindawi Publishing Corporation*.
- Adams, G. O., Fufeyin, P. T., Okoro, S. E., & Ehinomen, I. (2015). Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A Review. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, 28-39. doi:10.12691/ijebb-3-1-5
- Águila, P. (2014). *Efecto de la bioaumentación con un consorcio bacteriano nativo y la bioestimulación con un biosurfactante sobre suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo*. Valparaíso.
- Alvarez-Santullano, N. (2018). *Producción de poli (3-hidroxibutirato) por la cepa Burkholderia xenovorans LB400*. Valparaíso.
- Atagana, H. I. (2008). Compost bioremediation of hydrocarbon-contaminated soil inoculated with organic manure. *African Journal of Biotechnology*, 1516-1525.
- Avello, M., & Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*. doi:http://dx.doi.org/10.4067/S0718-04622006000200010
- Azevedo , N., A. D. , Gomes Filho, E., & Prisco , J. (2008). Salinity and oxidative Stress. *Abiotic stress and Plant Responses*, 58-82.
- Báez-Matus, X. (Tesis doctoral en preparación). *Caracterización de la respuesta al estrés salino de Acinetobacter radioresistens DD78 y Rhodococcus sp. ICBD2 durante la degradación de hidrocarburos de petróleo*. Valparaíso: Tesis no publicada.
- Bagchi, D., Bagchi, M., J Stohs, S., K Das, D., D Ray, S., A Kuszynski , C., . . . G Pruess, H. (2000). Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology*, 187-197. doi:https://doi.org/10.1016/S0300-483X(00)00210-9
- Barrios, Q. E. (s.f.). *UNIDAD II HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS*.
- Benavides Lopez de Mesa, J., Quintero, G., Guevara Vizcaino, A., Jaimes Caceres, D., Gutierrez Riaño, S., & Miranda Garcia, J. (2006). *Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petroleo*.
- Beres, C., Costa, G. N., Cabezudo, I., Silva-James, N. K., Teles, A. S., Cruz, A. P., . . . Freitas, S. P. (2017). Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. *Waste Management*, 581-594.
- Boopathy, R. (2000). Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*, 63-67. doi:https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00144-3



- Bordiga, M., Travaglia, F., & Locatelli, M. (2019). Valorisation of grape pomace: an approach that is increasingly reaching its maturity – a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(4), 933-942.
- Botello, A. V. (2005). *Características, Composición y Propiedades Fisicoquímicas del Petróleo*.
- Boussetta, N., Lanoisellé, J., Bedel-Cloutour, C., & Vorobiev, E. (2009). Extraction of soluble matter from grape pomace by high voltage electrical discharges for polyphenol recovery: Effect of sulphur dioxide and thermal treatments. *Journal of Food Engineering*, 95(1), 192-198. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.04.030>
- Brenes, A., Viveros, A., Chamorro, S., & Arija, I. (2016). Use of polyphenol-rich grape by-products in monogastric nutrition. A review. *Animal Feed Science and Technology*, 1-17. doi:<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.09.016>
- Bushnell, L. D., & Haas, H. F. (1941). The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. *Journal of bacteriology*, 41(5), 653-673.
- Campos, D., Gómez-García, R., Vilas-Boas, A., Madureira, A., & Pintado, M. (2020). Management of fruit industrial by-products—A case study on circular economy approach. *Molecules*, 25(2), 320.
- Canett Romero, R., Ledesma Osuna, A., Robles, R., Morales Castro, S., León Martínez, L., & León-Gálvez, R. (2004). Caracterización de galletas elaboradas con cascarilla de orujo de uva. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*.
- Carpén Istán, V. (2019). Búsqueda de microorganismos con capacidad biorremediadora aislados de hábitats contaminados con hidrocarburos.
- Chan-Quijano, J. G., Jarquín-Sánchez, A., Ochoa-Gaona, S., Martínez-Zurimendi, P., López-Jiménez, L. N., & Lázaro-Vázquez, A. (2015). Directrices para la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Teoría y Praxis*, 123-144.
- Chikere, C. (2012). Culture-Independent Analysis of Bacterial Community Composition during Bioremediation of Crude Oil-Polluted Soil. *British Microbiology Research Journal*, 187-211.
- Chimbarongo, I. M. (s.f.). *La Comuna de Chimbarongo*. Obtenido de <https://www.la-municipalidad.cl/municipalidad-chimbarongo.html>
- Christ, K. L., & Burritt, R. L. (2013). Christ, K. L., & Burritt, R. L. (2013). Critical environmental concerns in wine production: an integrative review. *Journal of Cleaner Production*, 53, 232-242.
- Chunyan, X., Qaria, M. A., Qi, X., & Daochen, Z. (2023). The role of microorganisms in petroleum degradation: Current development and prospects. *Science of The Total Environment*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.161112>
- CNN Chile. (29 de Julio de 2019). *40.000 litros de petróleo se han derramado en el mar desde una isla remota en la prístina Patagonia de Chile*. Obtenido de <https://cnnespanol.cnn.com/2019/07/29/40-000-litros-de-petroleo-se-han-derramado-en-el-mar-desde-una-isla-remota-en-la-pristina-patagonia-de->

- chile/#:~:text=%28CNN%29%20--
%20La%20Armada%20de%20Chile%20se%20despleg%C3%B3,que%20constituye%20l
a%20punta%20de%2
- CNN Chile. (22 de Diciembre de 2021). *Derrame de petróleo afecta a bahía de Quintero: Armada y SMA trabajan en el lugar*. Obtenido de https://www.cnnchile.com/pais/derrame-petroleo-quintero-armada-sma_20211222/
- Corrales, L., & Muñoz A, M. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova*.
- Cotacallapa-Sucapuca, M., Vilca-Curo, R., & Coaguila, M. (2020). El orujo de uva Italia como fuente de compuestos bioactivos y su aprovechamiento en la obtención de etanol y compost. *Sección ciencias agrarias*, 19(1), 17-32.
- Dadrasnia, A., & Agamuthu, P. (2013). Potential biowastes to remediate diesel contaminated soils. *Global NEST Journal*, 474-484.
- Dario La Tercera. (15 de mayo de 2016). *Los derrames de petróleo que han marcado la costa de Quintero*. Obtenido de <https://www.latercera.com/noticia/los-derrames-de-petroleo-que-han-marcado-la-costa-de-quintero/>
- Dennerly, P. A. (2010). Oxidative stress in development: Nature or nurture? *Free Radical Biology and Medicine*, 1147-1151.
- Diario UChile. (22 de Diciembre de 2021). *Derrame de petróleo en Quintero: Organizaciones medioambientales condenan nuevo episodio de contaminación*. Obtenido de <https://radio.uchile.cl/2021/12/22/derrame-de-petroleo-en-quintero-organizaciones-medioambientales-condenan-nuevo-episodio-de-contaminacion/>
- Durán, R., Méndez, V., Rodríguez-Castro, L., Barra-Sanhueza, B., Salvà-Serra, F., Moore, E., . . . Seeger, M. (2019). *Genomic and Physiological Traits of the Marine Bacterium *Alcaligenes aquatilis* QD168 Isolated From Quintero Bay, Central Chile, Reveal a Robust Adaptive Response to Environmental Stressors*.
- Dwyer, K., Hosseinian, F., & Rod, M. (2014). The Market Potential of Grape Waste Alternatives. *Journal of Food Research*, 3(2), 91-106.
- ESVAL. (29 de junio de 2023). *El proceso del agua*. Obtenido de Calidad del agua: <https://www.esval.cl/personas/agua-y-comunidad/proceso-del-agua/calidad-del-agua/>
- Farhadian, M., Vachelard, C., Duchez, D., & Larroche, C. (2008). In situ bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater: A review. 5296-5308. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.10.025>
- Fuentes, S. A. (2014). Bioaumentación de suelos contaminados con hidrocarburos y su efecto sobre las comunidades microbianas. *Tesis doctoral PUCV-UTFSM*.
- Garrido, J., & Borges, F. (2013). Wine and grape polyphenols — A chemical perspective. *Food Research International*, 1844-1858. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.08.002>
- Gary, J. H., & Handwerk, G. E. (2021). *Refino de petróleo: Tecnología y Economía*. Barcelona: Reverté. Recuperado el 2023



- Geankoplis, C. (s.f.). *Procesos de Transporte y Operaciones Unitarias* (Tercera ed.). CECSA. Recuperado el 2018
- Godic, A., Poljsak, B., Adamic, M., & Dahmane, R. (2014). The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. *Oxidative medicine and cellular longevity*.
- Grainger, K., & Tattersall, H. (2005). *Wine Production: Vine To Bottle*. doi:10.1002/9780470995600
- Guarino, C., Spada, V., & Sciarrillo, R. (2017). Assessment of three approaches of bioremediation (natural attenuation, landfarming and bioaugmentation – assisted landfarming) for a petroleum hydrocarbons contaminated soil. *Chemosphere*, 10-16.
- Gunde-Cimerman, N., Plemenitas, A., & Oren, A. (2018). Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations. *FEMS Microbiology Reviews*, Volumen 42(3), 353–375. doi:https://doi.org/10.1093/femsre/fuy009
- Hamzah, A., Chia-Wei, P., Pek-Hoon, Y., & Nurul, H. (2014). Oil Palm Empty Fruit Bunch and Sugarcane Bagasse Enhance the Bioremediation of Soil Artificially Polluted by Crude Oil. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 751-762.
- Hazaimeh, M. D., & Ahmed, E. S. (2021). Bioremediation perspectives and progress in petroleum pollution in the marine environment: a review. *Environmental Science and Pollution Research volume*.
- Hazen, T. C. (2009). Biostimulation. *Lawrence Berkeley National Lab. (LBNL), Berkeley, CA (United States)*.
- Hidalgo, J. C. (2009). Efectos de los derrames de petróleo sobre los hábitats marinos. *Ciencia Ahora*, 24.
- Hossain, M., & Dietz, K. (2016). Tuning of redox regulatory mechanisms, reactive oxygen species and redox homeostasis under salinity stress. *Frontiers in plant science*, 7, 548.
- Jawad, A., Snelling, A. M., Heritage, J., & Hawkey, P. M. (1998). Exceptional desiccation tolerance of *Acinetobacter radioresistens*. doi:doi:10.1016/s0195-6701(98)90263-8
- Jung, J., & Park, W. (2015). *Acinetobacter* species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives. doi:10.1007/s00253-015-6439-y
- Kämpfer, P. (2014). *Acinetobacter*. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 11-17.
- Kedare, S. B., & Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*. doi:10.1007/s13197-011-0251-1
- Khan, N. T. (2018). Bioremediation-An Effective Cleanup Technology. *Environmental Science: An Indian Journal*, 170.
- Ky, I., Lorrain, B., Kolbas, N., Crozier, A., & Teissedre, P.-L. (2014). Wine by-Products: Phenolic Characterization and Antioxidant Activity Evaluation of Grapes and Grape Pomaces from Six Different French Grape Varieties. *Molecules*, 482-506. doi:10.3390/molecules19010482



- Lee, K., Boufadel, M., Chen, B., Foght, J., Hodson, P., Swanson, S., & Venosa, A. (2016). *Behaviour and environmental impacts of crude oil released into aqueous environments*. Ottawa: Canadian Electronic Library.
- Loya, Y., & Rinkevich, B. (1980). Effects of oil pollution on coral reef communities. . *Mar. Ecol. Prog.* , 3(16), 180.
- Macaya, C. C., Durán, R. E., Hernández, L., Rodríguez-Castro, L., Barra-Sanhueza, B., Dorochesi, F., & Seeger, M. (2019). Bioremediation of Petroleum. doi:10.1016/B978-0-12-809633-8.20810-8
- Macaya, C. C., Méndez, V., Durán, R. E., Aguila-Torres, P., Salvà-Serra, F., Jaén-Luchoro, D., . . . Seeger, M. (2019). Complete Genome Sequence of Hydrocarbon-Degrading Halotolerant *Acinetobacter radioresistens* DD78, Isolated from the Aconcagua River Mouth in Central Chile. *Microbiology Resource Announcement* . doi:https://doi.org/10.1128/mra.00601-19
- Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (2003). *Brock Biología de los Microorganismos*. Madrid: Pearson Educación.
- Marchand, C., St-Arnaud, M., Hogland, W., Bell, T. H., & Hijri, M. (2017). Petroleum biodegradation capacity of bacteria and fungi isolated from petroleum-contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 48-57. doi:https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.09.030
- Margesin, R., & Schinner, F. (2001). Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area. *Applied and environmental microbiology*, 3127-3133.
- Mayor Oxilia, R. (2010). Estrés Oxidativo y Sistema de Defensa Antioxidante. *Revista del Instituto de Medicina Tropical*.
- Meini, M.-R., Cabezudo, I., Boschetti, C., & Romanini, D. (2019). Recovery of phenolic antioxidants from Syrah grape pomace through the optimization of an enzymatic extraction process. *Food Chemistry*, 257-264. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.037
- Méndez, V., Fuentes, S., Morgante, V., Hernández, M., González, M., Moore, E., & Seeger, M. (2017). Novel hydrocarbonoclastic metal-tolerant *Acinetobacter* and *Pseudomonas* strains from Aconcagua river oil-polluted soil. *Journal of soil science and plant nutrition*, 1074-1087. doi:http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162017000400017
- Mercado-Mercado, G., de la Rosa Carrillo, L., Wall-Medrano, A., López Díaz, J., & Álvarez-Parrilla, E. (2013). Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México. *Nutrición Hospitalaria*. doi:https://dx.doi.org/10.3305/nh.2013.28.1.6298
- Metcalf, & Eddy. (s.f.). *Wastewater Engineering Treatment and Resource Recovery* (Quinta ed.). AECOM.
- Metcalf, E. &. (2014). *Wastewater Engineering Treatment and Resource Recovery*. New York: McGraw-Hill.

- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., & Mittler, R. (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ*, 33, 453–467. doi:10.1111/j.1365-3040.2009.02041.x
- Minería, M. d. (s.f.). *Extracción por Solventes*. Obtenido de <http://www.minmineria.gob.cl/glosario-minero-e/extraccion-por-solvente/>
- Møller, I., Jensen, M., P. E., & Hansson, A. (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 58, 459–481. doi:10.1146/annurev.arplant.58.032806.103946
- Molyneux, P. (2004). *The use of the stable free radical diphenylpicryl hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity*.
- Montero, M. (1996). Los radicales libres y las defensas antioxidantes. Revisión. *Anales de la Facultad de Medicina*, 278-281.
- Morgan, P., & Atlas, R. M. (1989). Hydrocarbon degradation in soils and methods for soil biotreatment. Critical reviews in biotechnology, 8(4), 305-333. *Critical reviews in biotechnology*, 305-333.
- Muñoz, P., Morales, M., Mendivil, M., Juárez, M., & Muñoz, L. (s.f.). Using of waste pomace from winery industry to improve thermal insulation of fired clay bricks. Eco-friendly way of building construction. 2014, 181-187. doi:10.1016/j.conbuildmat.2014.08.027
- Murillo, M., & Chirinos, J. (1994). Use of Emulsion Systems for the Determination of Sulfur, Nickel and Vanadium in Heavy Crude Oil Samples by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 9. doi:https://doi.org/10.1039/JA9940900237
- Navon-Venezia, S., Zosim, Z., Gottlieb, A., Legmann, R., Carmeli, S., Ron, E. Z., & Rosenberg, E. (1995). Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. doi: https://doi.org/10.1128/aem.61.9.3240-3244.1995
- Nishimura, Y., Ino, T., & Iizuka, H. (1988). *Acinetobacter radioresistens* sp. nov. Isolated from Cotton and Soil. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 209-211. doi:doi:10.1099/00207713-38-2-209
- Nwankwegu, A., & Onwosi, C. (2017). Bioremediation of gasoline contaminated agricultural soil by bioaugmentation. *Environ. Technol. Innov.* 7, 1–11. *Environ. Technol. Innov.*, 1–11.
- OIV. (2022). *Annual Assessment of the World Vine and Wine Sector in 2022*. Obtenido de https://www.oiv.int/sites/default/files/documents/OIV_Annual_Assessment-2023.pdf
- Oren, A. (1999). Bioenergetic Aspects of Halophilism. *Microbiology and Molecular*. doi:10.1128/mmbr.63.2.334-348.1999
- Orji, F., Abiye, A. I., & Dike, E. (2012). Laboratory scale bioremediation of petroleum hydrocarbon - polluted mangrove swamps in the Niger Delta using cow dung. *Malaysian Journal of Microbiology*, 219-228.

- Ossai, I. C., A. A., Hassan, A., & Hamid, F. S. (2020). Remediation of soil and water contaminated with petroleum hydrocarbon: A review. *Environmental Technology & Innovation*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100526>
- Otero, R. P., Ortiz, T. P., & Ordinola-Zapata, A. (2021). Caracterización de cepas de *Vibrio* spp. biorremediadoras de petróleo aisladas de agua marina. *Manglar*, 21-26.
- Panouille, M., Ralet, M., Bonnin, E., & Thibault, J. (2007). Recovery and reuse of trimmings and pulps from fruit and vegetable processing. *Handbook of waste management and co-product recovery in food processing*, (pp. 417-447).
- Parra Iglesias, E. (2003). *Petróleo y Gas Natural: Industria, mercados y precios*. Madrid: Akal.
- Perfumo, A., Banat, I., Marchant, R., & Vezzulli, L. (2007). Thermally enhanced approaches for bioremediation of hydrocarbon-contaminated soils. *Chemosphere*, 179-184.
- Pingping, Z., Shijie, Q., & Wenzhong Shen, S. (2019). Asphaltenes: Separations, structural analysis and applications. *Journal of Energy Chemistry*, 186-207.
- Ponce, B., Latorre, V., González, M., & Seeger, M. (2011). *Antioxidant compounds improved PCB-degradation by Burkholderia xenovorans strain LB400*. Valparaíso.
- Posthuma, J. (1977). *The composition of petroleum*.
- Ramírez, N., Sandoval, A., & Serrano, J. (2004). Las bacterias halófilas y sus aplicaciones biotecnológicas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*.
- Rath, K. M., & Rousk, J. (2015). Salt effects on the soil microbial decomposer community and their role in organic carbon cycling: A review. *Soil Biology and Biochemistry*, 108-123. doi:<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.11.001>
- Ren, X., Zeng, G., Tang, L., Wang, J., Wang, J., Deng, Y., . . . P. B. (2018). The potential impact on the biodegradation of organic pollutants from composting technology for soil remediation. *Waste Manage*, 138–149.
- Rojo, F. (2009). Degradation of alkanes by bacteria. *Environmental Microbiology*, 2477–2490. doi:[doi:10.1111/j.1462-2920.2009.01948.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01948.x)
- Ron, E. Z., & Rosenberg, E. (2002). Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 249-252. doi:[https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00316-6](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00316-6)
- Rondeau, P., Gambier, F., Jolibert, F., & Brosse, N. (2013). *Compositions and chemical variability of grape pomaces from French vineyard*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.06.053>
- Ruberto, G., Renda, A., Daquino, C., Amico, V., Spatafora, C., Tringali, C., & De Tommasi, N. (2007). Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. *Food Chemistry*, 203-210.
- SAG. (2022). *Informe Final de Producción de Vinos 2022*. Obtenido de <https://www.sag.gob.cl/content/informe-final-produccion-de-vinos-2022>
- Saha, M., Gitto, G., & Dally, B. (2020). Burning characteristics of grape marc under mild combustion conditions. *Experimental Thermal and Fluid Science*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.expthermflusci.2020.110059>

- Salazar de Vegasa, E. Z., & Nieves, B. (2005). *Acinetobacter* spp.: Aspectos microbiológicos, clínicos y epidemiológicos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*.
- Salleh, A. B., Ghazali, F. M., Abd Rahman, R. N., & Basri, M. (2003). Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon Pollution. *Indian Journal of Biotechnology*, 411-425.
- Samiullah, Y. (1985). Biological effects of marine oil pollution. *Oil and Petrochemical Pollution*, 235-264.
- Santos, .. F., Goufo, P., Santos, C., Botelho, D., Fonseca, J., Queirós, A., . . . Trindade, H. (2016). Comparison of five agro-industrial waste-based composts as growing media lettuce: Effect on yield, phenolic compounds and vitamin C. *Food Chem*, 293-301. doi:10.1016/j.foodchem.2016.04.087
- Saval, S. (1999). Éxitos y fracasos de la remediación de suelos en sitios contaminados con hidrocarburos. *Conservación y restauración de suelos*, 511-526.
- Schlegel, H. G. (1972). *Microbiologia general*.
- Shipra , J., & Praveen Dahiya, D. (2022). Impact analysis of oil pollution on environment, marine, and soil communities. En D. Papita, M. Suvendu, & K. Jitendra, *Advances in Oil-Water Separation* (págs. 99-113). Elsevier.
- Simpanen, S., Dahl, M., Gerlach, M., Mikkonen, A., Malk, V., Mikola, J., & Romantschuk, M. (2016). Biostimulation proved to be the most efficient method in the comparison of in situ soil remediation treatments after a simulated oil spill accident. *Environmental Science and Pollution Research*, 25024-25038.
- Singh, O., & Jain, R. (2003). Phytoremediation of toxic aromatic pollutants from soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 128 - 135. doi:10.1007/s00253-003-1425-1
- Teixeira, A., Baenas, N., Dominguez-Perles, R., Barros, A., Rosa, E., Moreno , D., & Garcia-Viguera, C. (2014). Natural Bioactive Compounds from Winery By-Products as Health Promoters: A Review. *International journal of molecular sciences*, 15(9), 15638-15678. doi:https://doi.org/10.3390/ijms150915638
- Treybal, R. E. (s.f.). *Operaciones de transferencia de masa* .
- Trulli, E., Morosini, C., Rada, E., & Torretta, V. (2016). Remediation in situ of hydrocarbons by combined treatment in a contaminated alluvial soil due to an accidental spill of LNAPL. *Sustainability* , 1086.
- Van Hamme, J. D., Singh, A., & Ward, O. P. (2003). Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67(4), 503-549.
- Varjani, S. J. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*, 277–286.
- Varjani, S. J., & Upasani, V. N. (2015). A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 71-83.
- Venereo Gutiérrez, J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 31(2), 126-133.



- Wade, L. G. (2017). *Química orgánica*. Pearson.
- Wartell, B., Boufadel, M., & Rodriguez-Freire, L. (2021). An effort to understand and improve the anaerobic biodegradation of petroleum hydrocarbons: A literature review. *International Biodeterioration & Biodegradation*.
- Wauquier, J. P. (2004). *El refino del petróleo: petróleo crudo, productos petrolíferos, esquemas de fabricación*. Díaz de Santos.
- Wu, M., Dick, W. A., Li, W., Wang, X., Yang, Q., Wang, T., . . . Chen, L. (2016). Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 158-164. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.11.019>
- Zhang, B., Matchinski, E. J., Chen, B., Ye, X., Jing, L., & Lee, K. (2019). Marine Oil Spills—Oil Pollution, Sources and Effects. *World Seas: An Environmental Evaluation*, 16. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805052-1.00024-3>
- Zhu, M., Huang, Y., Wang, Y., Shi, T., Zhang, L., Chen, Y., & Xie, M. (2019). *Comparison of (poly)phenolic compounds and antioxidant properties of pomace extracts from kiwi and grape juice*.

10. Anexos

1. Datos obtenidos de curvas de crecimiento sin orujo de uva (Báez-Matus, Tesis doctoral en preparación)

1.1. Acetato de Sodio 20mM

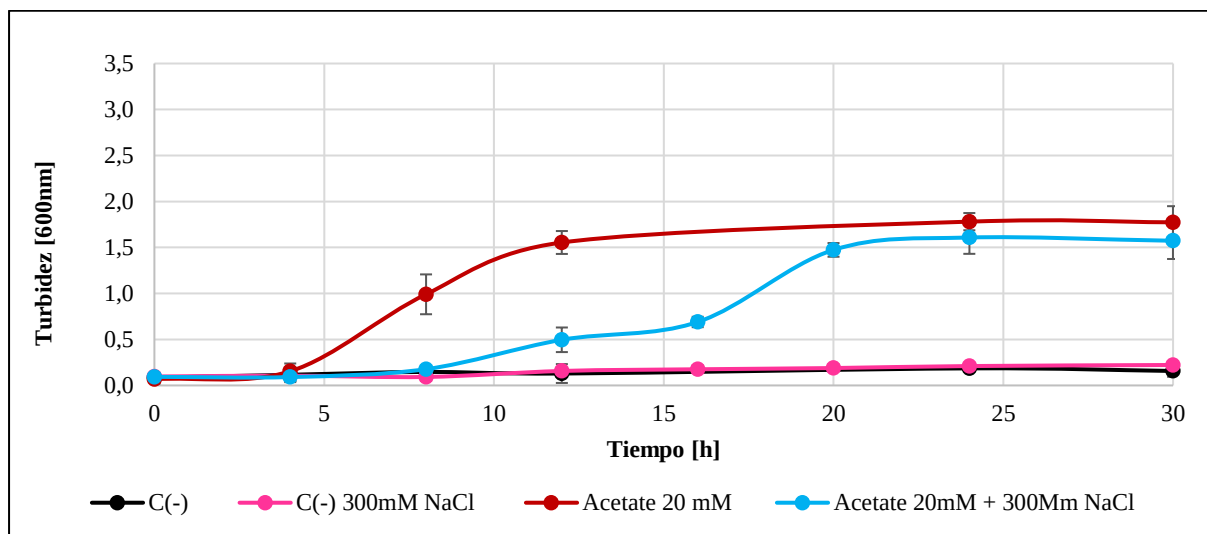


Gráfico 12. Curvas de crecimiento de *A. radioresistens* DD78 en las condiciones de control sin fuente de carbono (negro); control sin fuente de carbono más 300mM de NaCl (rosado); acetato de sodio 20mM (rojo) y acetato de sodio 20mM más 300mM de NaCl (celeste) expresado en turbidez a 600nm.

Fuente: (Báez-Matus, Tesis doctoral en preparación)

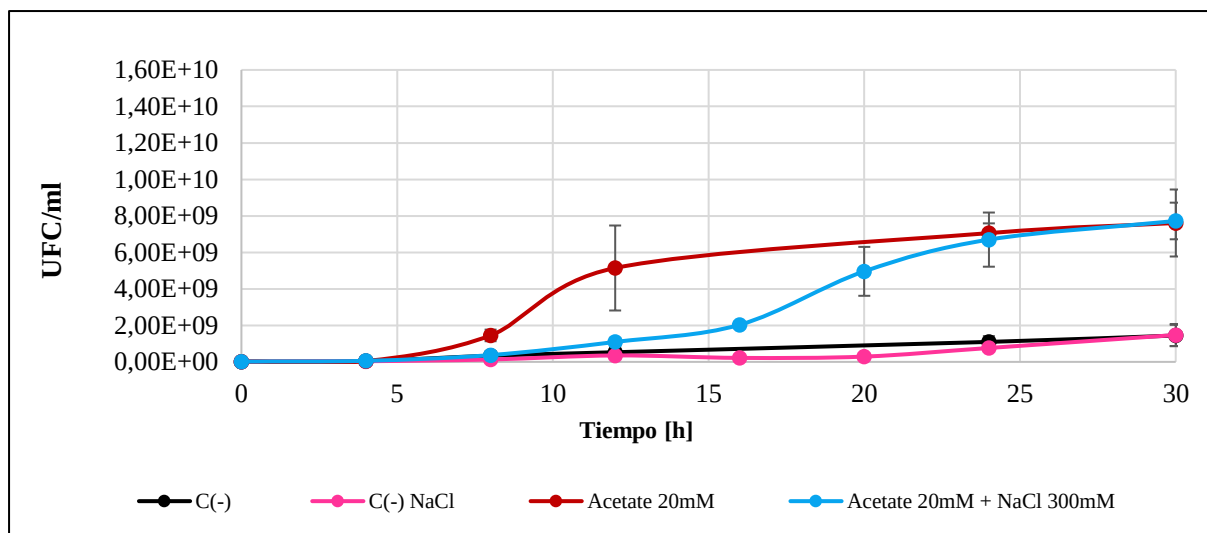


Gráfico 13. Curvas de crecimiento de *A. radioresistens* DD78 en las condiciones de control sin fuente de carbono (negro); control sin fuente de carbono más 300mM de NaCl (rosado); acetato de sodio 20mM (rojo) y acetato de sodio 20mM más 300mM de NaCl (celeste) expresado en Unidades Formadoras de Colonia por mililitro (UFC/ml).

Fuente: (Báez-Matus, Tesis doctoral en preparación)

1.2. Diesel 1%v/v

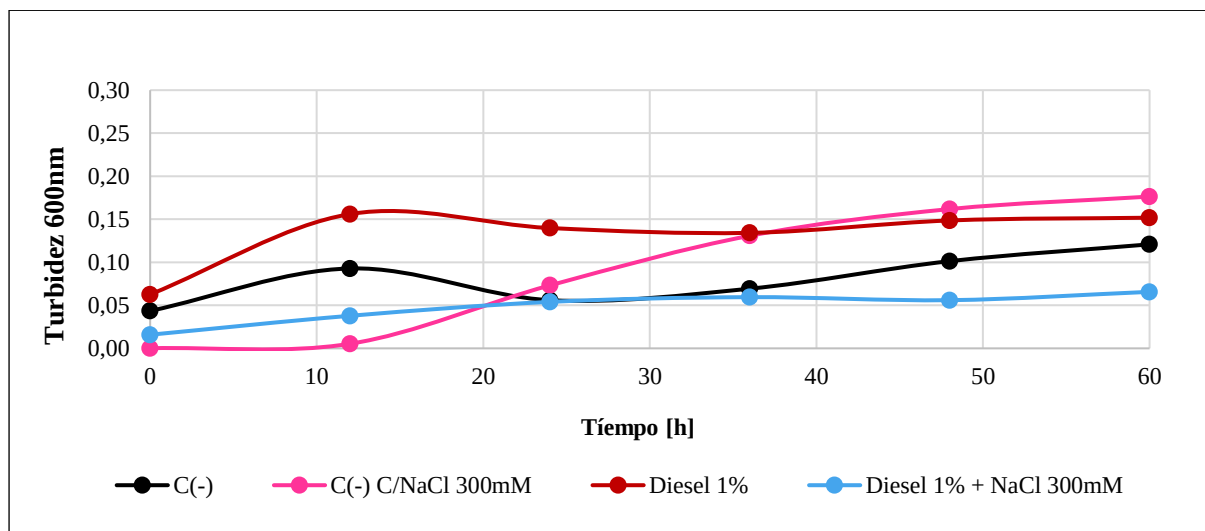


Gráfico 14. Curvas de crecimiento de *A. radioresistens* DD78 en las condiciones de control sin fuente de carbono (negro); control sin fuente de carbono más 300mM de NaCl (rosado); diésel 1%v/v (rojo) y diésel 1%v/v más 300mM de NaCl (celeste) expresado en turbidez a 600nm.

Fuente: (Báez-Matus, Tesis doctoral en preparación)

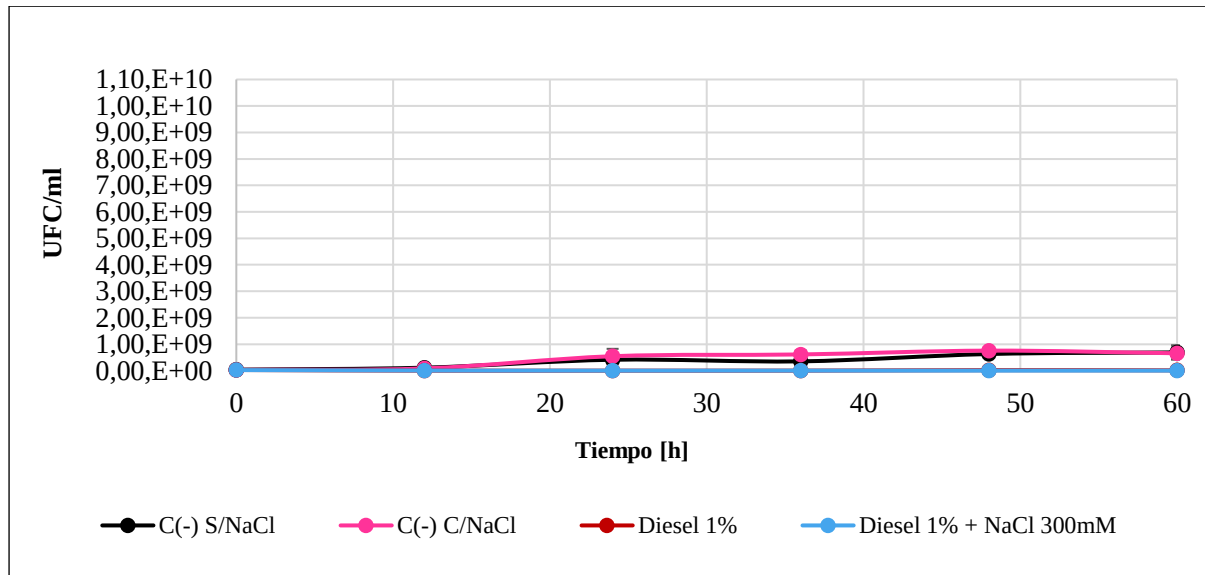


Gráfico 15. Curvas de crecimiento de *A. radioresistens* DD78 en las condiciones de control sin fuente de carbono (negro); control sin fuente de carbono más 300mM de NaCl (rosado); diésel 1%v/v (rojo) y diésel 1%v/v más 300mM de NaCl (celeste) expresado en Unidades Formadoras de Colonia por mililitro (UFC/mL).

Fuente: (Báez-Matus, Tesis doctoral en preparación)

2. Ejemplo de desarrollo de Test de ANOVA unidireccional y Test de Tukey HSD para curvas de Acetato 20mM a las 8h de experiencia

ANOVA: Acetato 20mM

Tiempo: 8h

8h	Orujo de Uva 7,5%	Orujo de Uva 7,5% + NaCl 300mM	Acetato 20mM + Orujo de Uva 7,5%	Acetato 20mM + Orujo de Uva 7,5% + NaCl 300mM	C(-) S/NaCl	Acetato 20mM	C(-) C/NaCl	Acetato 20mM + NaCl 300mM
N1	5,17E+09	2,83E+09	1,50E+09	1,03E+09	4,17E+08	1,27E+09	1,83E+08	5,17E+08
N2	4,17E+09	1,50E+09	1,42E+09	1,18E+09	2,83E+08	1,27E+09	1,00E+08	1,50E+08
N3	5,00E+09	2,67E+09	1,83E+09	1,33E+09	3,17E+08	1,82E+09	1,08E+08	4,50E+08

Media	4,78E+09	2,33E+09	1,58E+09	1,18E+09	3,39E+08	1,45E+09	1,31E+08	3,72E+08
-------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	4,81195E+19	7	6,8742E+18	53,2973672	6,61679E-10	2,6571966
Dentro de los grupos	2,06366E+18	16	1,2898E+17			
Total	5,01832E+19	23				

Test de Tukey HSD

$$C_n^r = \binom{n}{r} = \frac{n!}{r! \cdot (n-r)!}$$

$$C_8^2 = \frac{8!}{2! \cdot (8-2)!} = \frac{8 \cdot 7 \cdot 6!}{2! \cdot 6!} = 28$$

$$T_\alpha = q_\alpha(k, N-k) \cdot \sqrt{\frac{CM_E}{n_i}}$$

Test de Tukey	Valor
k	8
N-k	16
C _{me}	1,28979E+17
ni	3
qa(K,N-k)	4,9

Ta

1,02,E+09

	Diferencia Poblacional (media)	Diferencia Muestral	Decisión
1	O-OS	2,44,E+09	EXISTE Diferencia significativa
2	O-AO	3,19,E+09	EXISTE Diferencia significativa
3	O-AOS	3,59,E+09	EXISTE Diferencia significativa
4	O-C	4,44,E+09	EXISTE Diferencia significativa
5	O-A	3,33,E+09	EXISTE Diferencia significativa
6	O-CS	4,65,E+09	EXISTE Diferencia significativa
7	O-AS	4,41,E+09	EXISTE Diferencia significativa
8	OS-AO	7,50,E+08	NO hay diferencia significativa
9	OS-AOS	1,15,E+09	EXISTE Diferencia significativa
10	OS-C	1,99,E+09	EXISTE Diferencia significativa
11	OS-A	8,83,E+08	NO hay diferencia significativa
12	OS-CS	2,20,E+09	EXISTE Diferencia significativa
13	OS-AS	1,96,E+09	EXISTE Diferencia significativa
14	AO-AOS	4,00,E+08	NO hay diferencia significativa
15	AO-C	1,24,E+09	EXISTE Diferencia significativa
16	AO-A	1,33,E+08	NO hay diferencia significativa
17	AO-CS	1,45,E+09	EXISTE Diferencia significativa
18	AO-AS	1,21,E+09	EXISTE Diferencia significativa
19	AOS-C	8,44,E+08	NO hay diferencia significativa
20	AOS-A	2,67,E+08	NO hay diferencia significativa
21	AOS-CS	1,05,E+09	EXISTE Diferencia significativa
22	AOS-AS	8,11,E+08	NO hay diferencia significativa
23	A-AS	1,08,E+09	EXISTE Diferencia significativa
24	A-C	1,11,E+09	EXISTE Diferencia significativa
25	A-CS	1,32,E+09	EXISTE Diferencia significativa
26	CS-AS	2,42,E+08	NO hay diferencia significativa
27	C-CS	2,08,E+08	NO hay diferencia significativa
28	C-AS	3,33,E+07	NO hay diferencia significativa

11. Participación en congresos

Congresos Internacionales

- Ximena Báez-Matus, Constanza Macaya, Roberto Durán, Ester González, Felipe Salazar, Mario Sepúlveda, **Tamara Gallardo**, Michael Seeger. (2023). **The presence of the antioxidant grape pomace enhances the bioremediation of hydrocarbons by a bacterial consortium**. Congreso BioRemid2023, 3rd International Meeting on New Strategies in Bioremediation/Restoration Processes, Muttentz, Suiza, del 29 al 30 de junio de 2023. (Póster)
- Ximena Báez-Matus, **Tamara Gallardo**, Mario Sepúlveda, Constanza C. Macaya, Roberto E. Durán, Ester G. Rivera, Felipe Salazar-Tapia, Michael Seeger. (2023) **Bioestimulación con Residuos agroindustriales: Orujo de Uva como fuente de antioxidante para bacterias en procesos de Biorremediación**. Congreso ISME-Lat 2023, 3er Congreso Latinoamericano de Ecología Microbiana, Buenos Aires, Argentina, del 7 al 10 de agosto de 2023. (Póster)

Congresos Nacionales

- **Tamara Gallardo Vega**, Ximena Báez-Matus, Mario Sepúlveda, Michael Seeger. (2023). **Capacidad antioxidante del extracto orujo de uva y su efecto sobre el crecimiento en *Acinetobacter* sp. en presencia de hidrocarburos y condiciones salinas**. LXVI Reunión Anual Sociedad de Biología de Chile, Valparaíso, Chile, del 13 al 15 de diciembre de 2023. (Póster)
- Ximena Báez-Matus, Constanza C. Macaya, Roberto E. Durán, Ester G. Rivera, Felipe Salazar-Tapia, **Tamara Gallardo**, Mario Sepúlveda, Michael Seeger (2023). **Bioestimulación con Residuos agroindustriales: Orujo de Uva como fuente de antioxidante en procesos de Biorremediación a escala semiindustrial**. LXVI Reunión Anual Sociedad de Biología de Chile, Valparaíso, Chile, del 13 al 15 de diciembre de 2023. (Póster)

12. Financiamiento

Esta tesis de pregrado fue desarrollada gracias al financiamiento de

- Proyecto Fondecyt N° 1200756 (Dr. Michael Seeger)
- Proyecto ILS (Dr. Michael Seeger)
- ANID - Núcleo Milenio Bioproductos, Genómica y Microbiología Ambiental BioGEM NCN2023_54. (Dr. Michael Seeger)
- Beca ANID: Gastos Operacionales (Ximena Báez Matus).