



Carrera Biología Marina
Departamento de Oceanografía
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

Respuestas metabólicas de comunidades microbianas planctónicas expuestas a detergente usado en actividades vinculadas a la salmonicultura.

Constanza Daniela Fariña Gómez.

Seminario de Título presentado al
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFÍA
DE LA UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

Para optar al Título de
BIÓLOGA MARINA

Concepción, 2023.

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFIA

Este Seminario de Título ha sido realizado en el Departamento de Oceanografía de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas.

Profesor(a) Guía

Dr. Renato Quiñones.

Profesor(a) Co-Guía

Dra. María Lorena González.

Ha sido aprobada
por la siguiente
comisión Evaluadora

Dr. Rodrigo González.

Dr. Marcelo Fuentes.

Jefe de Carrera

Dr. Ariel Valenzuela.

DEDICATORIA

“A quién llevo por siempre en mí, hasta la raíz”.

Esta tesis va dedicada a con todo mi cariño a mi familia.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco, primeramente, a mi profesor guía el Dr. Renato Quiñones, por su crucial apoyo científico en el diseño y ejecución de este Seminario de Título, y por su disposición a contribuir significativamente en mi formación académica, personal y laboral.

Agradezco también a mi profesora co-guía, la Dra. María Lorena González, por todo su tiempo, su paciencia, enseñanzas y consejos. Me siento afortunada de haberla conocido, y expreso mi admiración por su profesionalismo; su aporte fue un pilar fundamental para esta investigación. También agradezco al Dr. Rodrigo González, por su colaboración y sugerencias en la realización de los experimentos. Por otra parte, deseo expresar mi agradecimiento por el apoyo y la ayuda de todo el equipo humano del Laboratorio de Metabolismo y Ecoalometría del Departamento de Oceanografía de la Universidad, por estar apoyándome, enseñándome con dedicación y llenando de entusiasmo las tardes de trabajo.

También deseo expresar mi agradecimiento a mis compañeros de carrera, que han sido de gran ayuda y apoyo durante mis años universitarios.

Finalmente, agradezco al motor de mi vida, mi familia, en especial a mis padres por darme y enseñarme todas las herramientas para enfrentar la vida, a mis abuelos maternos por el amor incondicional que me han entregado desde pequeña, y a Isidora mi compañera de vida.

Este Seminario de Título ha sido financiado por el Centro Interdisciplinario para la Investigación Acuícola (INCAR) (Proyecto ANID 1522A0004).

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|---|----|
| Índice de figuras..... | 3 |
| Índice de tablas..... | 5 |
| Resumen..... | 6 |
| Abstract..... | 7 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 8 |
| 2. HIPÓTESIS..... | 13 |
| 2.1 Hipótesis 1..... | 13 |
| 2.2 Hipótesis 2..... | 13 |
| 2.3 Hipótesis 3..... | 13 |
| 3. OBJETIVOS..... | 14 |
| 3.1 Objetivo general..... | 14 |
| 3.2 Objetivos específicos | 14 |
| 4. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 15 |
| 4.1 Estrategia y área de muestreo..... | 15 |
| 4.2 Diseño experimental..... | 16 |
| 4.2.1 Adenosín trifosfato (ATP)..... | 17 |
| 4.2.2 Clorofila y abundancia picoplanctónica..... | 17 |
| 4.2.3 Nutrientes..... | 17 |
| 4.2.4 Actividad enzimática extracelular (AAE) β -glucosidasa..... | 18 |
| 4.2.5 Actividad enzimática Malato deshidrogenasa (MDH)..... | 18 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.2.6 | Perfiles metabólicos (uso de sustratos de carbono) de la comunidad microbiana..... | 19 |
| 4.3 | Análisis Estadístico..... | 20 |
| 5. | RESULTADOS..... | 22 |
| 5.1 | Condiciones Oceanográficas del área de muestreo..... | 22 |
| 5.2 | pH experimento de microcosmos con adición de detergente..... | 22 |
| 5.3 | Adenosín trifosfato (ATP)..... | 24 |
| 5.4 | Clorofila y abundancia picoplanctónica..... | 25 |
| 5.5 | Nutrientes..... | 27 |
| 5.6 | Actividad enzimática extracelular (AAE) β -glucosidasa..... | 29 |
| 5.7 | Actividad enzimática Malato deshidrogenasa (MDH)..... | 30 |
| 5.8 | Perfiles metabólicos (uso de sustratos de carbono) de la comunidad microbiana..... | 31 |
| 5.9 | Análisis multivariado del experimento de microcosmos..... | 35 |
| 6. | DISCUSIÓN..... | 37 |
| 6.1 | Condiciones oceanográficas del área de muestreo..... | 38 |
| 6.2 | Experimento en los microcosmos con adición del detergente DM-500..... | 39 |
| 7. | CONCLUSIONES | 45 |
| 8. | REFERENCIAS..... | 46 |
| 9. | ANEXO..... | 54 |

ÍNDICE DE FIGURAS.

| | |
|--|----|
| Figura 1. Imagen de la zona de muestreo..... | 15 |
| Figura 2. Representación esquemática del diseño experimental..... | 21 |
| Figura 3. Perfil oceanográfico de temperatura (°C), salinidad (psu) y oxígeno disuelto (mL L ⁻¹) de la columna de agua en el sitio de muestreo (Achao, Chiloé) | 24 |
| Figura 4. Concentración de ATP µg L ⁻¹ para cada tratamiento y tiempo de incubación de los microcosmos expuestos al detergente) | 25 |
| Figura 5. Cambio relativo (%) respecto al control de la concentración de clorofila (µg L ⁻¹) para cada tratamiento y tiempo de incubación de los microcosmos expuestos al detergente DM-500..... | 26 |
| Figura 6. Cambio relativo (%) respecto al control de la concentración de nutrientes [µM] para cada tratamiento y tiempo de incubación de los microcosmos expuestos al detergente DM-500..... | 28 |
| Figura 7. Cambio relativo en comparación al control de la actividad enzimática extracelular de β-glucosidasa específica (β-Glu/ATP) de la comunidad microbiana expuestos a detergente durante 24 h..... | 29 |
| Figura 8. Cambio relativo (%) respecto al control de la actividad enzimática específica de la malato deshidrogenasa de la comunidad microbiana expuesta a detergente durante 24 h | 30 |
| Figura 9. Mapa de calor de la utilización de los 31 sustratos de carbono por la comunidad microbiana expuestas a diferentes concentraciones de detergente..... | 33 |
| Figura 10. Análisis de clúster en la utilización de sustratos de carbono de comunidad microbiana expuesta a detergentes..... | 34 |

Figura 11. Utilización relativa (%) de sustratos agrupada en 6 categorías; ácidos carboxílicos (CA), carbohidratos (CHO), aminoácidos (AA), aminas (AMI).....35

Figura 12. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de todas las variables biogeoquímicas y actividad metabólica durante el experimento de microcosmos.....36

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Perfil de macronutrientes en Achao, Chiloé..... | 23 |
| Tabla 2. Perfil de Clorofila-a y abundancia pico planctónica en Achao, Chiloé..... | 23 |
| Tabla 3. Abundancia picoplantónica de los tratamientos; Control (Sin adición de detergente) Tto 1 (Tratamiento 1; 1:500) Tto 2 (Tratamiento 2; 1:1000) durante las horas de experimento..... | 27 |
| Tabla 4. Promedio y desviación estándar de la AWCD, Riqueza específica (R') e índice de Shannon de utilización de sustratos (H')..... | 32 |

RESUMEN

La salmonicultura en Chile se ha desarrollado rápidamente en las últimas tres décadas, sin embargo, el crecimiento ha conllevado importantes problemas de sustentabilidad ambiental. La necesidad de combatir la propagación de enfermedades, ha impulsado el uso de detergentes en actividades vinculadas al rubro, sin conocimiento sobre el efecto de estos compuestos en los organismos que habitan la columna de agua de la zona austral de Chile. Los detergentes están compuestos por agentes tensoactivos los cuales podrían afectar a los microorganismos que habitan los ecosistemas acuáticos donde se utilizan. El objetivo de este Seminario de Título es evaluar el impacto de la adición de dos concentraciones del detergente de uso industrial DM-500 (0,2 y 0,1% v/v) sobre el metabolismo de la comunidad microbiana planctónica (<100 μm) en Achaó, Chiloé. Para esto, se realizó un estudio de microcosmos, en condiciones de oscuridad y temperatura controlada, durante 24 h, realizando submuestras a las 0, 6, 12 y 24 h. Para evaluar el impacto sobre la comunidad microbiana se utilizaron los siguientes enfoques metodológicos: medición de biomasa (ATP), medición de actividad enzimática (β -glucosidasa y Malato Deshidrogenasa) y cambios en los perfiles metabólicos (utilización de sustratos de carbono) mediante el uso de microplacas Biolog-Ecoplates™. Se observó una disminución significativa en la biomasa (ATP), sin embargo, la tasa de actividad específica malato deshidrogenasa incrementa significativamente ($\sim 37000\%$) en los tratamientos frente a la exposición a las dos concentraciones de DM-500. La respuesta de la tasa de actividad específica de β -glucosidasa muestra efectos positivos, variados por tratamientos y a través del tiempo, aumentando su actividad significativamente ($\sim 5000\%$). La utilización de sustratos de carbono (AWCD) disminuyó, mientras que la diversidad de sustratos y utilización relativa de carbohidratos, aminoácidos y polímeros incrementó con la adición del detergente. Los resultados de la presente investigación indican que la adición de detergentes industriales puede alterar las respuestas metabólicas de la comunidad microbiana planctónica existente en Chiloé.

ABSTRACT

Salmon farming in Chile has rapidly developed in the last three decades, however, this growth has also brought significant environmental sustainability issues. The need to combat the spread of diseases has prompted the use of detergents in aquaculture activities, although the possible effect of these compounds on the microbial community inhabiting the water column of the southern zone of Chile remains unknown. Detergents are composed of surfactants which may be affect microorganisms in aquatic ecosystems. The objective of this thesis is to evaluate the impact on the metabolism of the planktonic microbial community (<100 μm) in Achao (Chiloé Island) of the addition of two concentrations (0.2 and 0.1% v/v) of DM-500, a detergent for industrial use. To accomplish these objective experiments were conducted in microcosms, under dark conditions and controlled temperature, for 24 hours subsampling at 0, 6, 12 and 24 h. To evaluate the impact on the microbial community the following methodological approaches were used: measurement of biomass (ATP), measurement of enzyme activities (β -glucosidase and Malate Dehydrogenase) and changes in metabolic profiles (utilization of carbon substrates) using Biolog-Ecoplates™. A significant decrease in biomass (ATP) was observed. The specific activity of malate dehydrogenase increased significantly (~ 37000%) in the treatments when exposed to both concentrations of DM-500. The response of the specific activity of β -glucosidase showed positive effects varying among treatments and time, increasing its activity significantly (~5000%). Substrate carbon utilization (AWCD) decreased while substrate diversity and relative utilization of carbohydrates, amino acids, and polymers increased with detergent addition. The results of the thesis indicate that the addition of industrial detergents can alter the metabolic responses of the planktonic microbial community inhabiting Chiloé Island channels.

INTRODUCCIÓN

La salmonicultura se ha expandido rápidamente en las últimas tres décadas a nivel global (Quiñones *et al.*, 2019) y partir de la década del 90 se ha transformado en una de las principales actividades económicas del país. Actualmente, Chile se ha convertido en el segundo productor de salmónidos en el mundo, después de Noruega, y un actor importante para la acuicultura mundial (Bravo *et al.*, 2005; USDA, 2022). Esto se debe principalmente a la calidad del agua y a las condiciones ambientales que se dan en el sur del país, lo que resulta ser muy favorable para esta actividad (Buschmann y Fortt, 2005). Sin embargo, el crecimiento de la producción del Salmon chileno no ha estado exento de importantes problemas sanitarios y de sustentabilidad ambiental (Quiñones *et al.*, 2019).

El control y combate a diversas enfermedades, así como las necesidades operativas de la industria del salmón, han demandado el uso importante de detergentes y desinfectantes. El uso de estos compuestos pretende evitar la transmisión de patógenos en las instalaciones de cultivo y embarcaciones ligadas a la actividad. Los desinfectantes son sustancias o mezcla de sustancias que, por un proceso físico o químico, mata, inactiva o inhibe irreversiblemente el crecimiento de microorganismos, tales como bacterias, virus, hongos, entre otros (Circular A-52/008; D.G.T.M Y M.M ORDINARIO N°12600/6, 2020). En la actualidad, los detergentes pueden tener 20 o más componentes, que contribuyen a su adecuado funcionamiento (Velásquez, 2016), pero todos los detergentes poseen sustancias anfipáticas, compuestas por una parte hidrofílica (polares) y otra parte hidrofóbica (no polares). Esta naturaleza dual, facilita la mezcla de compuestos hidrofóbicos (como aceite y grasa) con agua y se denominan agentes tensoactivos o surfactantes que modifican la tensión superficial del agua. Los surfactantes pueden clasificarse en aniónicos, catiónicos, no iónicos o anfóteros. Desde un punto de vista ecológico, estas propiedades son muy relevantes, porque la concentración de tensoactivos en los detergentes que ingresan al agua puede ser tóxica, afectando la vida de organismos en ecosistemas acuáticos (Efendi *et al.*, 2017).

En términos generales, un detergente es un producto que posee un poder limpiador de una superficie, tanto en polvo como líquido, de uso doméstico o industrial. Los detergentes corresponden a formulaciones complejas en las cuales los surfactantes juegan un papel determinante en la combinación de efectos que se desean, tales como: mojabilidad, descenso de la tensión interfacial, adsorción en las interfaces líquido-líquido y sólido-líquido, solubilización y emulsificación (Velásquez, 2016). Directemar reporta 42 detergentes de uso permitido en Chile en cuerpos de agua marinos y de agua dulce. En la salmonicultura, los detergentes son utilizados principalmente para la mantención y conservación de estructuras, tales como naves marítimas, instalaciones marítimas, plataformas fijas o flotantes, artefactos navales y rodaluvios. Al respecto, y en cuanto a las concentraciones, Bravo *et al.* (2005) afirma que no existe información disponible de los volúmenes de detergentes utilizados por la industria acuícola nacional, porque no solamente son usados en los centros de cultivo, sino también en plantas de proceso e industrias de alimento, entre otras, por lo que es muy difícil llegar a determinar exactamente los volúmenes utilizados por la actividad. Lo anterior implica, la introducción de una cantidad indeterminada de detergentes a la columna de agua, donde existe una amplia diversidad de microorganismos, tales como hongos, bacterias y arqueas, entre otros (Gutiérrez *et al.*, 2015; Cruz-Leiva *et al.*, 2015; González *et al.*, 2023). Se eligió el uso experimental del DM-500, el cual es un detergente líquido, alcalino, concentrado en base acuosa, formulado para operaciones desengrasantes en la industria alimentaria y usado también en estructuras marítimas y actividades vinculadas a la acuicultura (autorizado para ser utilizado en actividades vinculadas a la salmonicultura en el país; Circular A-52/008; D.G.T.M, 2020). Este detergente está formulado en base a humectantes, surfactantes y emulsionantes, por lo que es capaz de penetrar grasas y aceites pesados. Sus características le permiten actuar como descarbonizante en frío, ya que reduce la acumulación de carbono y residuos de combustión (Velásquez, 2016). Además, su formulación amortigua en forma eficiente la dureza del agua, pudiendo diluirse en agua salada. El DM-500 se presenta como líquido verde, con pH $12,00 \pm 0,05$ y con densidad de $1,05 \pm 0,05$ g/cm³, siendo 100% soluble en agua.

La comunidad microbiana heterotrófica, sintetiza enzimas extracelulares capaces de descomponer macromoléculas orgánicas complejas a más pequeñas, para poder incorporar carbono (C), nitrógeno (N) y fósforo (P) (Romaní *et al.*, 2009). Por lo tanto, esta comunidad es fundamental en el ciclo biogeoquímico de dichos elementos, siendo las bacterias consideradas el núcleo esencial en la transformación y mineralización de la materia orgánica de la biosfera (Cho y Azam, 1988; Abad, 2020). Los microorganismos tienen la capacidad, mediante un conjunto de enzimas denominadas hidrolasas, de hidrolizar sustratos complejos. Las hidrolasas abarcan múltiples enzimas de acciones extra e intracelulares para digerir sustratos específicos (Weiner *et al.*, 2008; McBride *et al.*, 2009; Arnosti, 2011), permitiendo la degradación de moléculas de alto peso molecular a bajo peso molecular (Chróst, 1991; Romaní *et al.*, 2009). En general, los compuestos deben ser degradados a un tamaño de aproximadamente 600 Da (Weiss *et al.*, 1991; Arnosti, 2011) antes de poder ser transportados a través de la membrana celular para la obtención de energía y nutrientes (Arnosti, 2011).

La actividad enzimática extracelular (AEE) ha sido estudiada en diversos ecosistemas acuáticos mediante adición de sustratos fluorogénicos (Hoppe *et al.* 1983; Arnosti, 2011; Sinsabaugh y Follstad Shah, 2012; Sinsabaugh *et al.*, 2014; Abad, 2020; Garcés *et al.*, 2020; González *et al.*, 2023). Abad (2020) afirma que son numerosas las investigaciones de actividades enzimáticas extracelulares realizadas en aguas superficiales del océano abierto (ej. Davey *et al.*, 2001; Misic *et al.*, 2006; Ayo *et al.*, 2017), y que, de manera general, las medidas de actividad enzimática en aguas superficiales suelen ser superiores a las de aguas profundas (Nagata *et al.*, 2010; Arnosti, 2011).

La enzima β -glucosidasa, cataliza la hidrólisis de enlaces glucósidos (Yamada y Suzumura, 2010). La cuantificación de la actividad extracelular de microorganismos se utiliza para evaluar la capacidad de degradación de materia orgánica (ej. Hoppe 1983; Gutiérrez *et al.*, 2011), y en consecuencia la calidad ambiental y los efectos antropogénicos sobre la salud de los servicios ecosistémicos (Marx *et al.*, 2005; Ai *et al.*, 2012; Garcés *et al.*, 2020). Por otra parte, la enzima intracelular Malato

Deshidrogenasa (MDH) es un componente del ciclo del ácido cítrico en la segunda etapa de la respiración, que cataliza la reacción de la oxidación del (s)-malato a oxalacetato, utilizando NAD⁺ como aceptor de electrones (González y Quiñones, 2009). La MDH se ha propuesto como un indicador de actividad microbiana, dado que refleja la reacción metabólica oxidativa global, así un incremento en la actividad MDH, indica una mayor remineralización de la materia orgánica (Martínez *et al.*, 2002). Un procedimiento adecuado para realizar comparaciones de la actividad enzimática de la comunidad microbiana es estandarizarla por la biomasa microbiana a través de su contenido de ATP (adenosín trifosfato), dado que el ATP se usa como indicador de biomasa del microplancton. En este caso, se utiliza el término “actividad específica”, que en el sentido bioquímico, se refiere a unidades de actividad/unidades de ATP (González y Quiñones, 2009).

Una forma de estudiar el impacto de compuestos químicos sobre microorganismos marinos, es el análisis de posibles alteraciones en sus respuestas metabólicas a través de la actividad enzimática y del potencial uso de sustratos, el cual refleja la diversidad funcional de la comunidad (ej. Fuentes *et al.*, 2015, 2016; Garcés *et al.*, 2020; González *et al.*, 2023). Una herramienta para monitorear los potenciales cambios en la diversidad funcional microbiana es el sistema BIOLOG- EcoPlates™. Las Ecoplacas Biolog han sido utilizadas en estudios de suelos y sedimentos estuarinos, así como en la columna de agua (Sala *et al.* 2006; Fuentes *et al.*, 2015; Garcés *et al.* 2020; González *et al.* 2023) sometidos a algún tipo de perturbación en el entorno natural. BIOLOG- EcoPlates™ son placas de microtitulación de 96 pocillos que contienen 31 sustratos de carbono por triplicado. Las Ecoplacas se crearon especialmente para el análisis comunitario y estudios de ecología microbiana, debido a que entregan un patrón de respuesta en cuanto al uso de sustratos característicos denominado “finger printing” (Huella digital) (Gryta *et al.*, 2014). Las Ecoplates son eficaces para demostrar cambios temporales en las comunidades microbianas (ej. Wang *et al.*, 2018).

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados, el presente Seminario de Título analiza las respuestas metabólicas (actividad enzimática extracelular de la β -

glucosidasa y la actividad enzimática intracelular de la Malato Deshidrogenasa) de la comunidad microbiana de la columna de agua expuesta a la adición del detergente DM-500, autorizado para ser utilizado en actividades vinculadas a la salmonicultura en el país.

HIPÓTESIS

Hipótesis 1: Mayores concentraciones del detergente DM-500 disminuye la actividad enzimática específica de la β -glucosidasa de la comunidad microbiana en la columna de agua.

Hipótesis 2: Mayores concentraciones del detergente DM-500 disminuye la actividad enzimática específica de malato deshidrogenasa de la comunidad microbiana en la columna de agua.

Hipótesis 3: Mayores concentraciones del detergente DM-500 disminuye el uso de sustratos de carbono por parte de la comunidad microbiana en la columna de agua.

OBJETIVOS

Objetivo General

Investigar el potencial impacto de un detergente de uso industrial en salmonicultura sobre el metabolismo de las comunidades microbianas planctónicas marinas.

Objetivo Específicos

1. Estimar el efecto de dos concentraciones del detergente DM-500 sobre las actividades enzimáticas específicas de β -glucosidasa en comunidades microbianas planctónicas.
2. Estimar el efecto de dos concentraciones del detergente DM-500 sobre las actividades enzimáticas específicas de la Malato Deshidrogenasa en comunidades microbianas planctónicas.
3. Evaluar potenciales cambios generados por dos concentraciones del detergente DM-500 en los perfiles metabólicos, basados en uso de substratos de carbono, de comunidades microbiana planctónicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Estrategia y área de muestreo

Se realizó un crucero oceanográfico organizado por el Centro Interdisciplinario para la Investigación Acuícola (INCAR), durante el verano austral (13 de enero de 2023) en Achao, archipiélago de Chiloé (Lat. 42.520°S, Long. 73.201°W), Región de Los Lagos. En la zona de Achao existe una fuerte presencia de salmonicultura, así como de mitilicultura (Quiñones *et al.* 2019; Garcés *et al.*, 2020; González *et al.* 2023).

Se colectaron muestras de agua de mar mediante botellas oceanográficas Niskin de 10 L a 3 profundidades (2, 10 y 30 m) para la determinación de nutrientes (NO_3^- , NO_2^- y PO_4^{3-}), clorofila y abundancia picoplanctónica. Para el experimento de microcosmos, se colectaron 90 L de agua de mar a 2 m de profundidad del punto de muestreo. Las variables fisicoquímicas de la columna de agua (temperatura, salinidad y oxígeno) se obtuvieron mediante una sonda CTDO (AML Oceanographic Minos X).

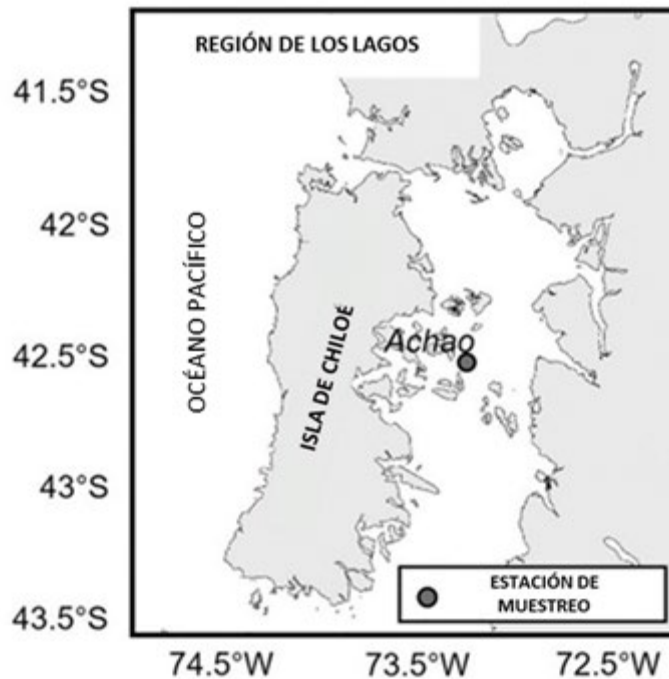


Figura 1. Ubicación de la zona de muestreo. Achao, archipiélago de Chiloé, Región de Los Lagos, Chile. Fuente: modificado de González *et al.*, (2023).

II. Diseño Experimental

Para estimar las respuestas metabólicas de la comunidad microbiana expuesta al detergente DM-500, se realizó un experimento utilizando microcosmos de 10 L de agua de mar colectada a 2 m de profundidad en el área de muestreo (Figura 1). El agua de mar fue tamizada por 100 μm para trabajar con la comunidad microplantónica. Los microcosmos se mantuvieron en oscuridad, dentro de una cámara fría, manteniendo la misma temperatura registrada *in situ* al momento de la colecta (11 ± 1 °C), durante 24 h.

El experimento incluyó un control (sin adición de detergente) y dos tratamientos con concentraciones diferentes del detergente DM-500 (Tratamiento (Tto.) 1= 1:500 y Tto 2= 1:1000) (Figura 2). Ambos tratamientos fueron determinados en base a diluciones de la concentración sugerida por el fabricante 1:120, la cual se diluyó 4 veces para obtener la concentración del Tto1 (1:500; 0,2 % v/v), y 8 veces para obtener la concentración del Tto 2. (1:1000; 0,1 % v/v).

Para ambos tratamientos se determinó el pH, tanto el control como los tratamientos se realizaron en triplicado; en consecuencia, se trabajó con un total de 9 microcosmos de 10L cada uno. Durante el experimento, se realizaron submuestreos a las 0, 6, 12 y 24 h, obteniendo muestras para la medición de la actividad enzimática extracelular de β -glucosidasa e intracelular de la Malato Deshidrogenasa, así como para la generación de perfiles metabólicos con Biolog-Ecoplates™. Adicionalmente, se obtuvieron muestras para la determinación de la biomasa microplanctónica (ATP), nutrientes, clorofila y abundancia picoplanctónica.

a) Adenosín trifosfato (ATP).

El ATP es un indicador de biomasa microbiana viva en ambientes acuáticos (Karl, 1993; Peperzak, 2023). Se filtró 1 L de agua de mar (<100 μm) en membranas GF/F

Whatmann® (25mm de diam.; tamaño nominal de poro = 0,7 µm). y se almacenó en nitrógeno líquido hasta el análisis en laboratorio.

La primera etapa del análisis consistió en la extracción del ATP en un baño ebuliente de 5+2 ml de buffer Tris (20 mM pH 7.7), seguido de la activación del complejo enzimático Luciferin–Luciferasa. La segunda etapa consistió en la cuantificación del ATP a través de un ensayo de bioluminiscencia (Holm-Hansen y Booth, 1966; Bulleid, 1978; Karl, 1993), usando el luminómetro (GloMax, Promega).

b) Clorofila-a y abundancia picoplanctónica.

La concentración de clorofila-a se determinó según el método de fluorimetría según Holm-Hasen *et. al.* (1965). Se filtraron 0,3 L de agua de mar mediante filtros de membrana GF/F Whatmann® 25mm de diam. y 0,7 µm de poro. Las muestras fueron preservadas en nitrógeno líquido hasta el análisis en laboratorio. Se realizó la extracción con acetona al 90% y se midió la fluorescencia en el fluorómetro (Trilogy, Turner Desings).

En el caso de la abundancia picoplanctónica se colectaron 1350 µL de muestra fijada con 150 µL de glutaraldehído al 1%, se almacenaron a -80°C hasta el análisis de laboratorio mediante citometría de flujo, usando el citómetro modelo FACSCalibur (Becton Dickinson), según la metodología de Marie *et al.* (1999)

c) Nutrientes

La determinación de concentración de los macronutrientes (NO_3^- , NO_2^- y PO_4^{3-}) se realizó filtrando muestras de agua de mar mediante GF/F Whatmann® 25mm de diam. y 0,7 µm (tamaño de poro nominal), y se almacenaron a -20°C. Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Biogeoquímica del departamento de oceanografía en la Universidad de Concepción. NO_3^- , NO_2^- y PO_4^{3-} , se midieron según la metodología propuesta por Grasshoff *et al.* (1983).

d) Actividad enzimática extracelular (AEE) β -glucosidasa

La AEE de β -glucosidasa (EC 3.2. 1.3) se determinó mediante la metodología descrita por Pantoja *et al.*, (2011) y Gutiérrez *et al.* (2011) adaptada al uso de microplacas de 96 pocillos (González *et al.*, 2023). Estos pocillos se inocularon con 196 μ L de muestra y con 4 μ L de metilumbeliferil-b-D-glucósido (MUB-GLU) a 100 μ M (Hoppe, 1983). Todo fue incubado en triplicado y en oscuridad. Los controles se realizaron con solo agua de mar previamente hervida durante 10 minutos. La curva de calibración se realizó en las mismas condiciones, con el estándar metilumbeliferil (MUB). Las lecturas de fluorescencia fueron realizadas mediante un lector de microplacas Synergy™ 2 Multi-Mode (Biotek: excitación 365nm, emisión 455nm) (Hoppe, 1983), cada 1 h durante 6 h. Las tasas de AEE se calcularon según lo descrito por Pantoja y Lee (1994).

e) Actividad enzimática Malato Deshidrogenasa (MDH).

Para estimar la actividad enzimática de la MDH (EC 1.1.1.37), se filtró 1 L de muestra por una membrana de 0,22 μ m de nitrocelulosa, y se preservó en nitrógeno líquido hasta su análisis. Para la extracción, se preparó un buffer de homogenización que consistió en tampón fosfato 200 mM (K_2HPO_4), pH 7,9, ditioneitol (DTT) 1mM, polivinilpirrolidona (PVP) al 0,3% (p/v), EDTA 5 mM, 0,1% (v/v) Triton X-100. Las muestras fueron homogenizadas mediante el uso de Ultra-Turrax durante 10 segundos, manteniéndolas a 4°C en un baño de hielo sin perder la cadena de frío para no desnaturalizar la enzima. Las muestras homogenizadas se centrifugaron a 3000 RPM manteniendo la temperatura de 4°C.

La actividad de MDH se evaluó siguiendo una versión modificada de la metodología de Childress y Somero (1979) y Vetter *et al.*, (1994), descrita en González y Quiñones (2009), mediante espectrometría.

f) Perfiles metabólicos (uso de sustratos de carbono) de la comunidad microbiana.

Para determinar eventuales cambios en la expresión metabólica, en cuanto al uso de sustratos, de la comunidad microbiana expuesta al detergente DM-500 se utilizaron microplacas Biolog-Ecoplates™, las que contienen 31 sustratos diferentes de carbono por triplicado. Cada pocillo contiene colorante violeta de tetrazolio en un “film” junto al sustrato de carbono. Una vez inoculado con la muestra, la coloración de los pocillos va cambiando de incoloros a púrpura a medida que los sustratos se van utilizando, ya que el tetrazolio se va transformando en formazán. Las microplacas fueron inoculadas con 150 µL de muestra en cada pocillo, utilizándose una placa por tratamiento (Control, Tto 1, Tto 2) en cada tiempo de submuestreo. El cambio de color se cuantificó a través de la densidad óptica (OD; $\lambda=590$ nm) cada 24 h con un lector de microplacas (ELx800 Epoch™, BIOTEK®). Se obtuvieron los índices según González *et al.* (2023). La utilización de cada fuente de carbono se calculó restando la absorbancia de los pocillos del control (sin fuente de carbono) a la absorbancia de cada pocillo de sustrato. Los valores negativos se fijaron en cero. Luego, para evitar el sesgo de seleccionar un punto de las mediciones de OD se calculó la densidad óptica integrada en el tiempo (130 h) (ODi) a través del método trapezoidal (Guckert *et al.*, 1996; González *et al.*, 2023). La ODi se expresó como un porcentaje de cada sustrato sobre la suma total de la ODi de todos los sustratos, para minimizar el efecto de densidades de inóculo potencialmente diferentes (Sala *et al.*, 2006; Frac *et al.*, 2012). Se calculó el Promedio del desarrollo del color (AWCD), que expresa el uso general del sustrato de carbono por parte de la comunidad microbiana, mediante la ecuación: $AWCD = \sum (ODi) / N$, donde N es el número de sustratos de la placa (31). La riqueza de sustrato (R') y el índice de diversidad de Shannon de sustratos utilizados (H') se calcularon como un índice de diversidad funcional microbiana. La riqueza de sustrato (R') es el número de sustratos de carbono utilizados. El índice de diversidad de Shannon de sustratos utilizados ($H' = -\sum p_i (\ln p_i)$), está relacionado con los sustratos de carbono que la comunidad bacteriana es capaz de degradar, donde p_i es proporcional a la ODi del pocillo, sobre la ODi total de todos los pocillos de una placa. Para simplificar la interpretación, los sustratos se agruparon en seis categorías: ácidos carboxílicos (CA),

carbohidratos (CHO), aminoácidos (AA), aminas (AMI), compuestos fenólicos (PhC) y polímeros (POL) de acuerdo con Sala *et al.* (2006) y González *et al.* (2023).

III. Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico, se corroboró en primer lugar, el supuesto de normalidad utilizando la prueba de Kolmogórov-Smirnov para las variables: actividad específica de MDH y actividad específica de β -GLU, ATP, nutrientes, clorofila, abundancia picoplanctónica e índices provenientes del uso de las Ecoplates (AWCD, H' y R'). Las variables que no cumplieron con el supuesto de normalidad fueron transformadas estadísticamente (Tabla 8, Anexo 1). El software utilizado para la prueba de Kolmogórov-Smirnov fue Statistica vs. 7.0.61.0.

Para evaluar las diferencias entre el control y tratamientos durante el experimento, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, luego se realizó una prueba *a posteriori* (Tukey HSD). El ATP, no cumplió con los supuestos de normalidad una vez aplicadas las transformaciones, por lo que se utilizó una prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

Complementariamente, se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) de las distancias Euclidianas, con vectores de correlación sobrepuestos, para visualizar patrones de la comunidad microbiana en respuesta a la adición del detergente en los distintos tratamientos y tiempos del experimento, mediante el software PRIMER 6.

Las significancias estadísticas corresponden a un valor $p < 0,05$ en las pruebas estadísticas ANOVA, post hoc Tukey y Kruskal Wallis, presentadas en la (Tabla 9 y 10, Anexo 1).

Para determinar diferencias en la utilización de sustratos (asociado a los tratamientos y tiempo), se calculó la matriz de similitud de Bray-Curtis, utilizando los datos estandarizados y transformados a raíz cuadrada. Se realizó un análisis de *clúster* para visualizar agrupaciones, utilizando el software de análisis multivariado PRIMER.

Detergentes: DM-500

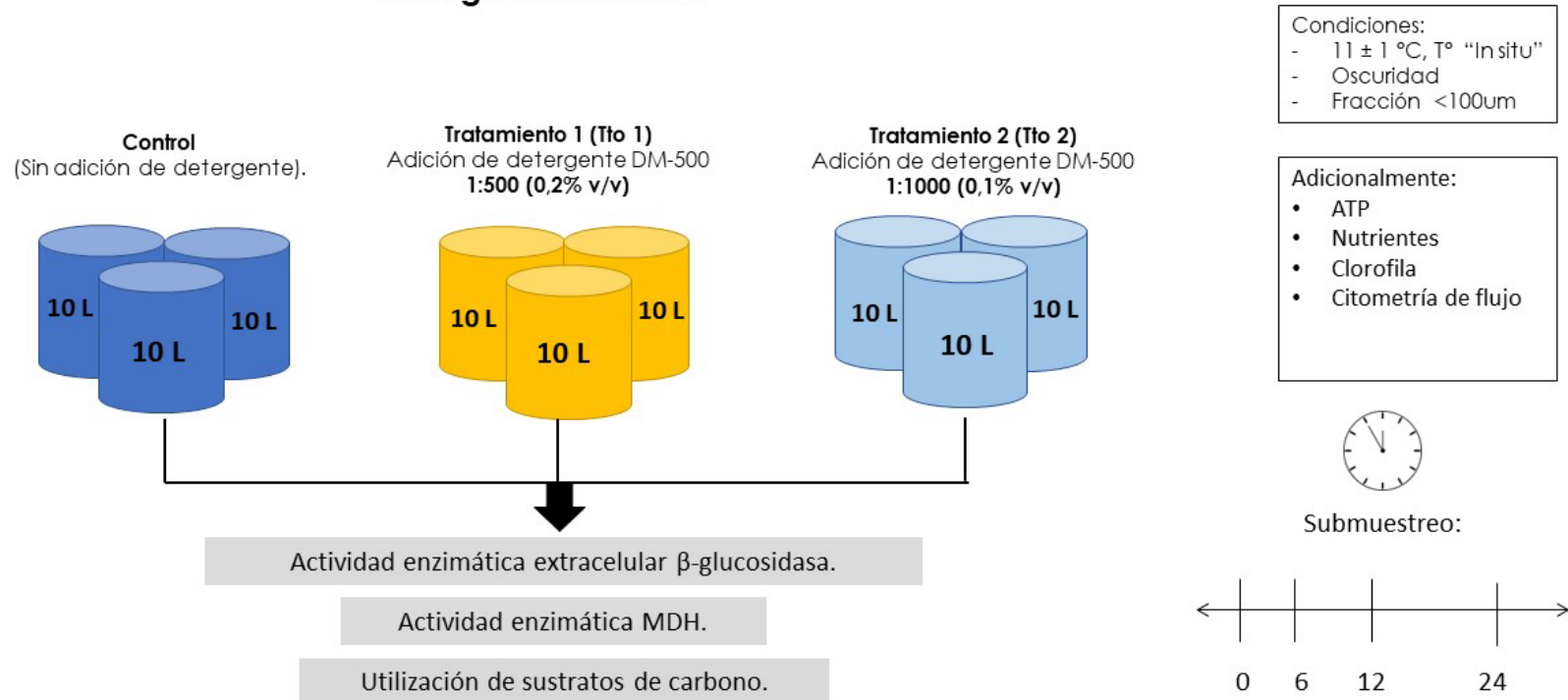


Figura.2 Representación esquemática del diseño experimental.

RESULTADOS.

I) Condiciones Oceanográficas del área de muestreo.

Las condiciones oceanográficas en Achao muestran una temperatura superficial de la columna de agua de 11,6 °C y desciende muy ligeramente hasta 11,4°C a los 80 metros de profundidad. La salinidad en la zona superficial registró 32,5 psu llegando a 32.9 psu bajo los 40 m. La concentración de oxígeno disuelto disminuye levemente con la profundidad, registrándose 7,1 a 7,2 mL L⁻¹ en la superficie y 6,4 mL L⁻¹ a los 80 m (Figura 3).

Los perfiles de la concentración de macronutrientes (NO₃⁻, NO₂⁻ y PO₄⁻³), Clorofila-*a* y abundancia picoplanctónica por flujocitometría se muestran en las Tablas 1 y 2. La distribución vertical de los macronutrientes en la columna de agua, presenta un perfil típico con menores concentraciones en superficie (ej. NO₃⁻ 8,84 µM a 2 m) en comparación a el estrato más profundo (ej. NO₃⁻ 11,8 µM a 30 m, Tabla 1). La clorofila fluctuó entre 3,57 µg L⁻¹ y 2,51 µg L⁻¹, la mayor concentración se observó a los 10 m de profundidad, respecto a la superficie y a los 30m (Tabla 1). La abundancia del bacterioplancton muestra el menor valor en la superficie de la columna de agua y aumenta con la profundidad, inversamente a lo que ocurre con los organismos picoeucariontes y *Synechococcus sp.* (Tabla 2).

II) pH en experimento de microcosmos con adición de detergente

Dada la naturaleza alcalina (pH 12) del detergente utilizado en esta investigación, se monitoreó el pH durante el desarrollo del experimento. Los tratamientos mantuvieron valores menores al pH del agua de mar (7 a 7,5) comportándose similares durante el experimento, sin embargo, el control tomo valores pH < 7 (Figura 1, Anexo 1)

Tabla 1. Perfil de macronutrientes en Achao, Chiloé.

| Lugar | Profundidad (m) | NO ₃ ⁻ (μM) | NO ₂ ⁻ (μM) | PO ₄ ⁻³ (μM) |
|-------|-----------------|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| | 2 | 8,84 ± 0,05 | 0,28 ± 0,01 | 1,04 ± 0,08 |
| Achao | 10 | 10,50 ± 1,27 | 0,34 ± 0,06 | 1,16 ± 0,11 |
| | 30 | 11,86 ± 0,11 | 0,39 ± 0,01 | 1,29 ± 0,01 |

Tabla 2. Perfil de Clorofila-a y abundancia pico planctónica en Achao, Chiloé.

| Lugar | profundidad (m) | Cl-a (μg/L) | Bact 10 ³ [cel/mL] | Syn 10 ³ [cel/mL] | Peuk 10 ³ [cel/mL] | pH |
|-------|-----------------|-------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------|
| | 2 | 3,32 ± 0,88 | 1206,4 ± 28,8 | 2,13 ± 0,12 | 2,674 ± 0,11 | 8,01 ± 0,01 |
| Achao | 10 | 3,57 ± 0,01 | 1395,1 ± 6,7 | 1,352 ± 0,12 | 2,158 ± 6,73 | 7,98 ± 0,02 |
| | 30 | 2,51 ± 0,01 | 1435,3 ± 0,3 | 2,002 ± 0,29 | 2,123 ± 0,29 | 7,95 ± 0 |

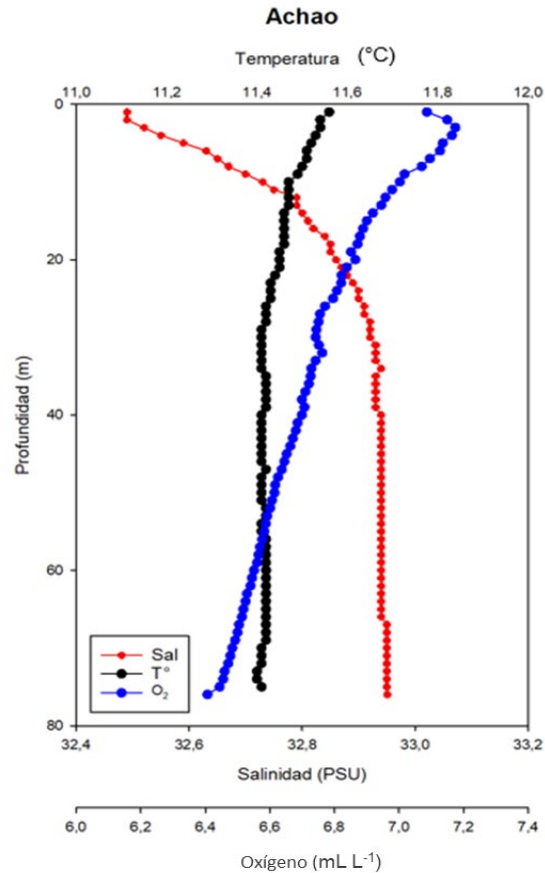


Figura 3. Perfil oceanográfico de temperatura (°C), salinidad (PSU) y oxígeno disuelto (mLO₂ L⁻¹) de la columna de agua en el sitio de muestreo (Achao, Chiloé).

a) Concentración de ATP en el microcosmo con adición de DM-500

La concentración de ATP mostró una disminución significativa (Kruskal Wallis; $p < 0,05$) en los tratamientos expuestos al detergente en comparación al control, durante todo el experimento. El Control varió entre 0,050 y 0,079 $\mu\text{g L}^{-1}$, mientras que el caso de ambos tratamientos las concentraciones de ATP fueron uno a dos órdenes de magnitud menores al Control. Cabe señalar que el Tto 1 se mantuvo más bajo que el Tto 2 durante el experimento y ambos muestran una ligera recuperación a las 24h. (Figura 4).

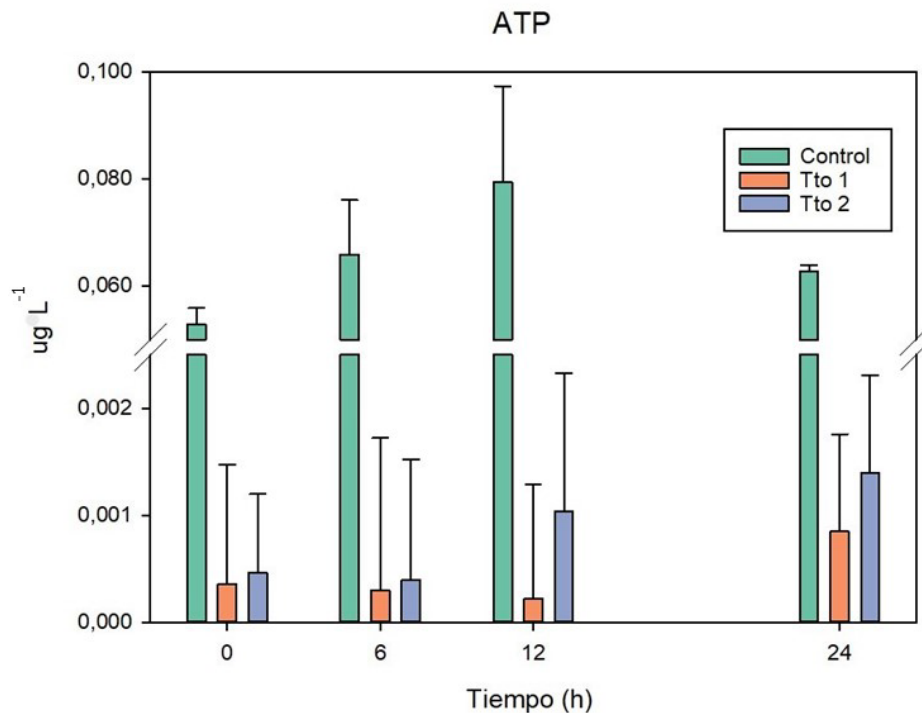


Figura 4. Concentración de ATP $\mu\text{g L}^{-1}$ para cada tratamiento y tiempo de incubación de los microcosmos expuestos al detergente DM-500. Control (sin adición de detergente), Tto1 (tratamiento 1; 1:500) Tto 2 (tratamiento 2; 1:1000).

b) Concentración de Clorofila-a y abundancia de picoplancton en el microcosmos con adición de DM-500.

Los resultados de clorofila muestran que el detergente tiene efectos negativos significativos en los microcosmos (ANOVA y prueba de Tukey; $p < 0,05$), con valores hasta un 90% ~ menores respecto al control en ambos tratamientos (Figura 5).

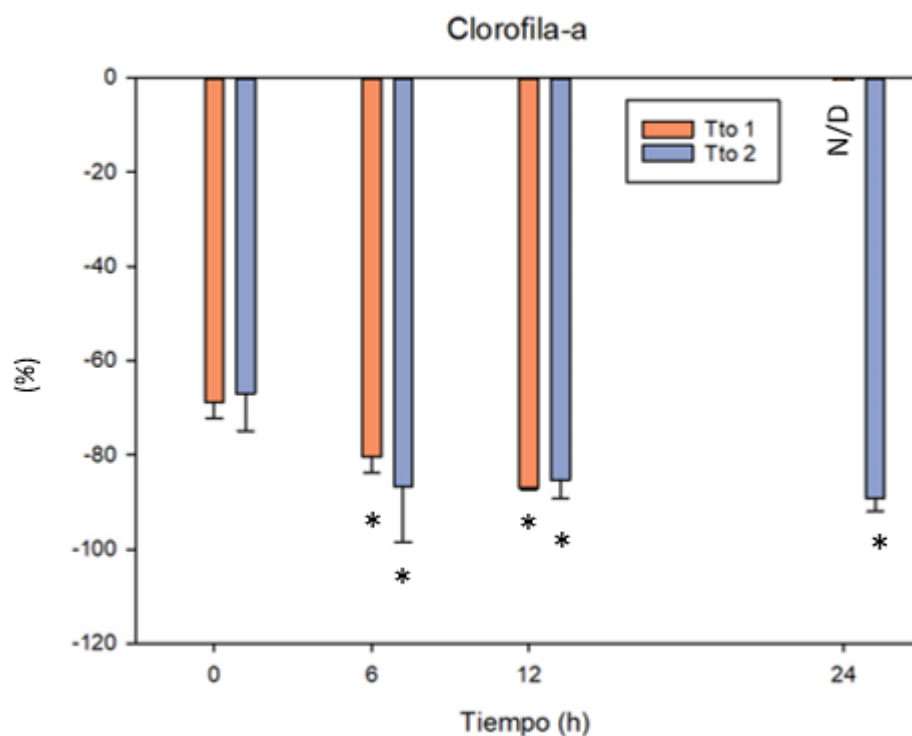


Figura 5. Cambio relativo (%) respecto al control de la concentración de clorofila-a ($\mu\text{g L}^{-1}$) para cada tratamiento y tiempo de incubación de los microcosmos expuestos al detergente DM-500. Tto1 (tratamiento 1; 1:500) Tto 2 (tratamiento 2; 1:1000). El símbolo (*) indica diferencias significativas (Test Tukey; $p < 0,05$) entre el control y los tratamientos.

La abundancia de picoplancton del control en general disminuyó hacia el final del experimento y los tratamientos mostraron efectos negativos significativos (ANOVA y prueba Tukey; $p < 0,05$). El control mostró variaciones entre $2,7$ a $0,7 \times 10^3$ cel. mL^{-1} , y $2,3$ a $1,0 \times 10^3$ cel. mL^{-1} en *Synechococcus sp.* y Picoeucariontes, respectivamente (Tabla 3), mientras que el Tto 1 disminuyó su abundancia en comparación al control en todos los tiempos del experimento. El bacterioplancton solo mostro valores en el control, mientras que en los tratamientos expuestos al detergente no se detectó abundancia de bacterias. El citograma mostró agrupaciones con diferentes características ópticas a las habituales observadas en un grupo de bacterias, por lo que no fue contabilizado.

Tabla 3. Abundancia picoplantónica de los tratamientos; Control (Sin adición de detergente) Tto 1 (Tratamiento 1; 1:500) Tto 2 (Tratamiento 2; 1:1000) durante las horas de experimento. Valores en negrita indican diferencias significativas (ANOVA/Tukey).

| Tratamiento | Tiempo | Peuk 10 ³ [cel/mL] | Syn 10 ³ [cel/mL] | Bact 10 ³ [cel/mL] |
|-------------|--------|----------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| Control | 0 | 2,3 ± 0,5 | 2,7 ± 0,1 | 906 ± 416 |
| Tto 1 | 0 | 2,0 ± 0,3 | 1,2 ± 0,3 | 0 |
| Tto 2 | 0 | 2,3 ± 0,2 | 2,1 ± 0,2 | 0 |
| Control | 6 | 2,5 ± 0,1 | 2,3 ± 0,1 | 782 ± 811 |
| Tto 1 | 6 | 1,6 ± 0,1 | 1,2 ± 0,1 | 0 |
| Tto 2 | 6 | 1,7 ± 0,4 | 1,5 ± 01 | 0 |
| Control | 12 | 2,2 ± 0,2 | 2,1 ± 0,1 | 1353 ± 1080 |
| Tto 1 | 12 | 1,9 ± 0,3 | 1,4 ± 0,9 | 0 |
| Tto 2 | 12 | 2,4 ± 0,1 | 1,6 ± 0,1 | 0 |
| Control | 24 | 1,0 ± 1,1 | 0,7 ± 1,4 | 728 ± 1030 |
| Tto 1 | 24 | 0,9 ± 0,9 | 1,3 ± 0,3 | 0 |
| Tto 2 | 24 | 1,3 ± 0,1 | 1,4 ± 0,2 | 0 |

c) Concentración de nutrientes en el microcosmo con adición de DM-500

Las concentraciones de macronutrientes en el Control se mantuvieron estables durante el experimento, con valores alrededor de 13,49µM, 0,46µM y 1,23µM para NO₃, NO₂, y PO₄³⁻, respectivamente (Figura 6, Anexo 1). En los tratamientos, el nitrato disminuye hasta un 21,2% y 19,4 % (Ttos 1 y 2, respectivamente) en comparación al control, el cual no presenta diferencias significativas (ANOVA y prueba Tukey; p>0,05). Contrariamente, el nitrito mostró un aumento significativo (ANOVA y prueba Tukey; p<0,05) en el Tto1, hasta 120% sobre el control a las 12h, mientras que el Tto 2 muestra un aumento de menor magnitud (3,7 a 11,7%), excepto a las 0h donde alcanza un 136 %, pero sin diferencias significativas (ANOVA y prueba Tukey; p<0,05). El fosfato muestra cambios principalmente positivos respecto al control en el Tto 1 (0,5 a 32%), mientras que en el Tto 2 muestra cambios principalmente negativos (-9,7 a -1,4%) (Figura 6), sin embargo, estas diferencias no fueron significativas (ANOVA y prueba Tukey; p<0,05).

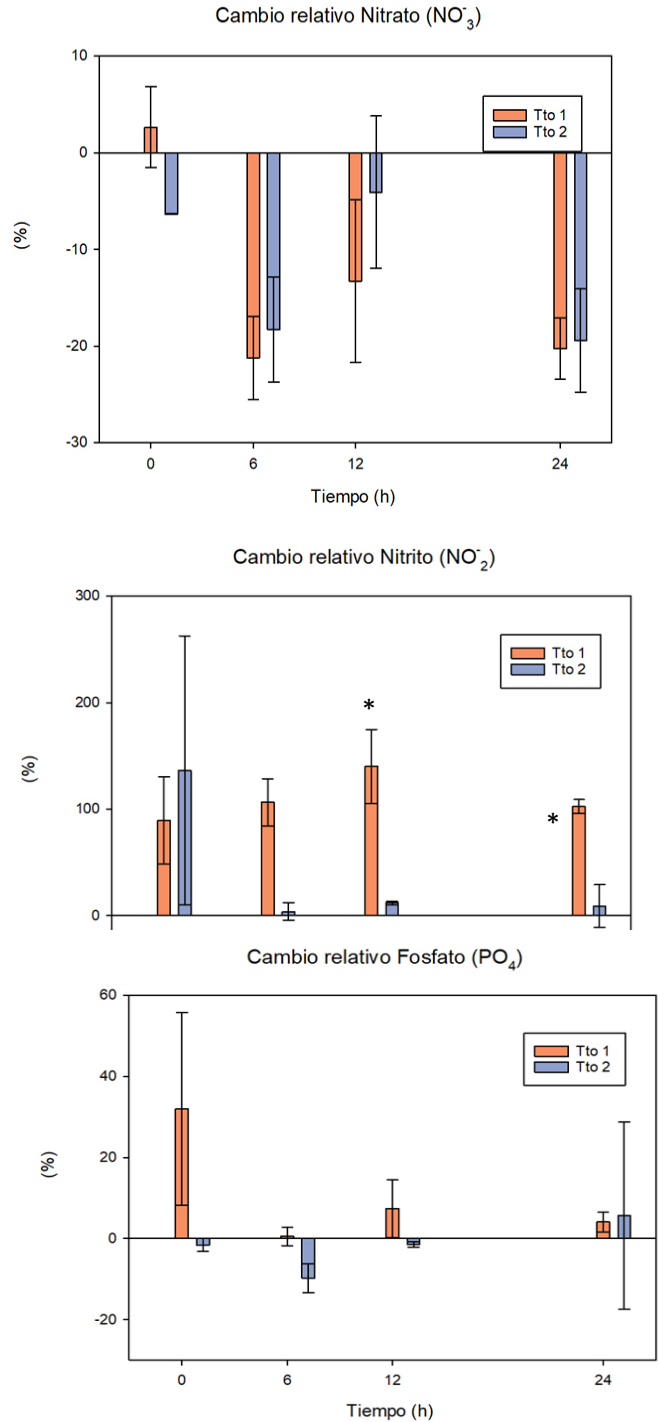


Figura 6. Cambio relativo (%) respecto al control de la concentración de nutrientes [μM] para cada tratamiento y tiempo de incubación de los microcosmos expuestos al detergente DM-500. Tto1 (tratamiento 1; 1:500) Tto 2 (tratamiento 2; 1:1000). El símbolo (*) indica diferencias significativas (Test Tukey; $p < 0,05$) entre el control y los tratamientos.

d) Actividad enzimática extracelular (AEE) específica β -glucosidasa en respuesta a la adición de DM-500

La AEE específica de β -glucosidasa en el Control fluctuó entre 0,6 y 0,24 pmol pg ATP⁻¹ h⁻¹ a las 6 y 24h, respectivamente (Figura anexo 5). Ambos tratamientos muestran una respuesta positiva significativa respecto al control (ANOVA y prueba Tukey; p<0,05) durante las 24 h del experimento. El Tto 1 aumentó entre >12000% hasta >37000% aproximadamente, mientras que el Tto 2 aumentó entre el >6000% hasta >18000% aproximadamente, respecto al control (Figura 7).

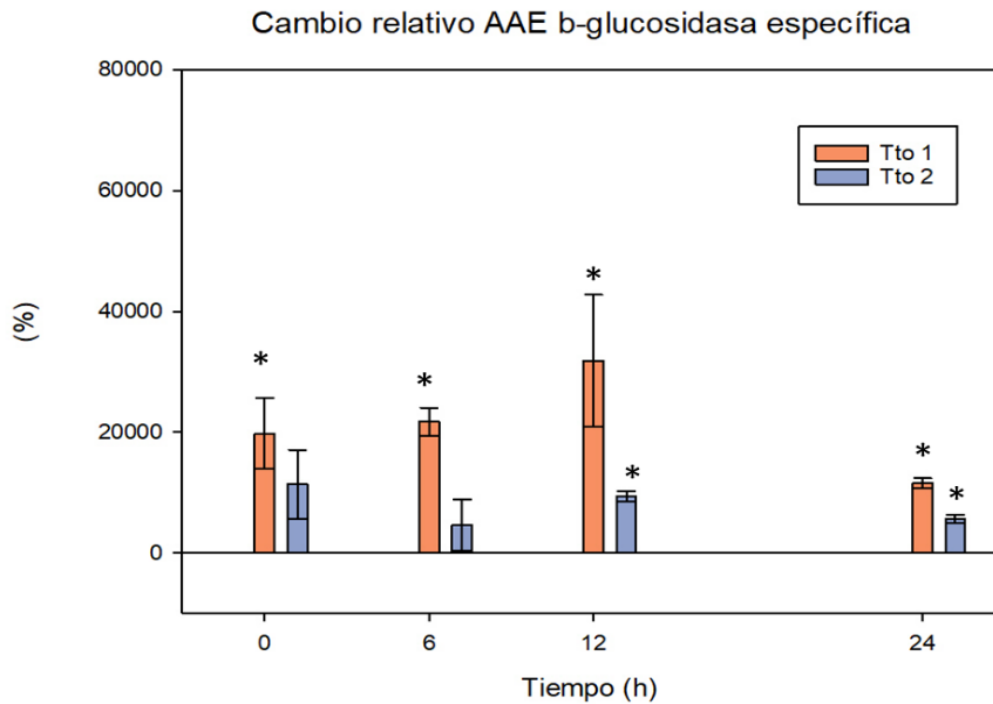


Figura 7. Cambio relativo en comparación al control de la actividad enzimática extracelular de β -glucosidasa específica (β -Glu/ATP) de la comunidad microbiana expuestos a detergente durante 24 h. (*) diferencias significativas (prueba Tukey; p<0,005) entre el control y los tratamientos en cada hora de submuestreo.

e) Actividad enzimática específica Malato deshidrogenasa (MDH) en respuesta a la adición de DM-500

La actividad enzimática específica de MDH en el Control varió entre 0,07 y 0,16 pmol NADH pg ATP⁻¹ min⁻¹ (a las 6 y 12 h respectivamente Figura 3, Anexo 1). En ambos tratamientos, la respuesta de la MDH específica respecto al control presentó un incremento, sin embargo, esta respuesta no fue significativa (ANOVA y prueba Tukey; $p > 0,05$; Figura 8). La mayor tasa específica la enzima MDH se observó en el Tto 2 (>5000%) a las 0 h, mientras que, el Tto 1 muestra mayor actividad a las 12 h del experimento (>2000%) (Figura 8).

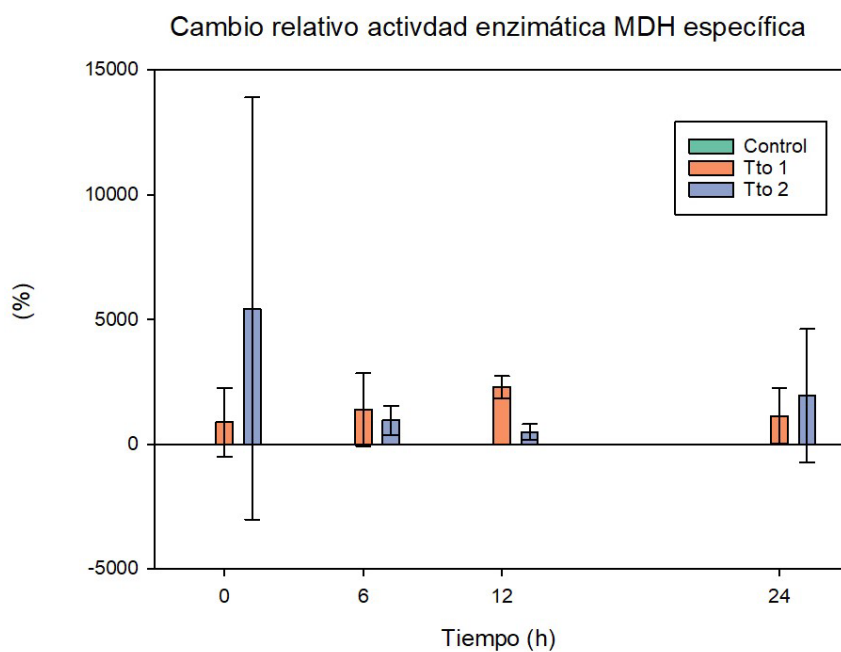


Figura 8. Cambio relativo (%) respecto al control de la actividad enzimática específica malato deshidrogenasa de la comunidad microbiana expuesta a detergente durante 24 horas.

f) Perfiles metabólicos (uso de sustratos de carbono) de la comunidad microbiana.

La utilización de sustratos de carbono por parte de la comunidad microbiana expuesta al detergente mostró diferencias significativas entre el control y los tratamientos para el AWCD y el índice de Shannon de utilización de sustratos (H') (ANOVA y prueba Tukey ($p < 0,05$)). Sin embargo, la riqueza de sustratos (R') no mostro cambios significativos (ANOVA y prueba Tukey $p > 0,05$). El AWCD disminuyó en los tratamientos en comparación al control (Tabla 4). El índice H' aumento en ambos tratamientos (3,0 a 3,2) respecto al control (2,1 a 3,1), especialmente a las 0, 6 y 12 h. El índice R' es relativamente estable y sin un patrón marcado de respuesta entre tratamientos y control (Tabla 4).

El mapa de calor muestra que hubo mayor utilización de sustratos durante las 6 y 12 horas del experimento (Figura 9). El Control muestra que, en general, los sustratos más consumidos son aminoácidos y carbohidratos. No obstante, se observa una inversión de esta preferencia en el tiempo, donde a las 0 horas el grupo más utilizado es el de aminoácidos (53,7%) disminuyendo hacia 24h (18,6%), mientras aumenta la preferencia de carbohidratos (de 24,1 a 44,5%) a las 24 horas (Figura 9 y 11). Los Tto 1 y 2 muestran un consumo más variado de sustratos, entre ácidos carboxílicos, aminoácidos, carbohidratos y polímeros (Figura 9). En las primeras 6 horas en ambos tratamientos la comunidad microbiana utiliza un menor porcentaje de aminoácidos (19,4%) en comparación al control (53,7%), pero amplían su preferencia aumentando el uso de carbohidratos (38,5%) y aminas (19,5%), mientras que hacia el final del experimento aumentan el uso de polímeros entre 11,6 y 15,6% (Tto1 y Tto2 respectivamente).

Tabla 4. Promedio y desviación estándar de la AWCD, Riqueza específica (R) e índice de Shannon (H').

| Tiempo | Tto | AWCD | R' | H' |
|--------|---------|--------------------|----------|------------------|
| 0 | Control | 43,37 ± 27,1 | 31 ± 0,5 | 2,1 ± 0,26 |
| 0 | T1 | 19,15 ± 5,1 | 29 ± 2,0 | 3,2 ± 0,70 |
| 0 | T2 | 18,3 ± 2,8 | 29 ± 1,7 | 3,0 ± 0,33 |
| 6 | Control | 55,4 ± 3,1 | 29 ± 2,8 | 1,4 ± 0,4 |
| 6 | T1 | 24,7 ± 2,8 | 29 ± 1,0 | 3,1 ± 0,3 |
| 6 | T2 | 17,4 ± 4,5 | 30 ± 0,6 | 3,1 ± 0,7 |
| 12 | Control | 54,1 ± 5,9 | 30 ± 0,6 | 3,1 ± 0,2 |
| 12 | T1 | 20,3 ± 3,1 | 29 ± 0,6 | 3,1 ± 0,5 |
| 12 | T2 | 36,4 ± 8,7 | 29 ± 0,6 | 3,2 ± 0,4 |
| 24 | Control | 17,5 ± 12 | 29 ± 1,1 | 3,1 ± 0,1 |
| 24 | T1 | 53,4 ± 19,3 | 30 ± 5,7 | 3,1 ± 0,3 |
| 24 | T2 | 4,1 ± 2,1 | 31 ± 1,8 | 2,9 ± 0,3 |

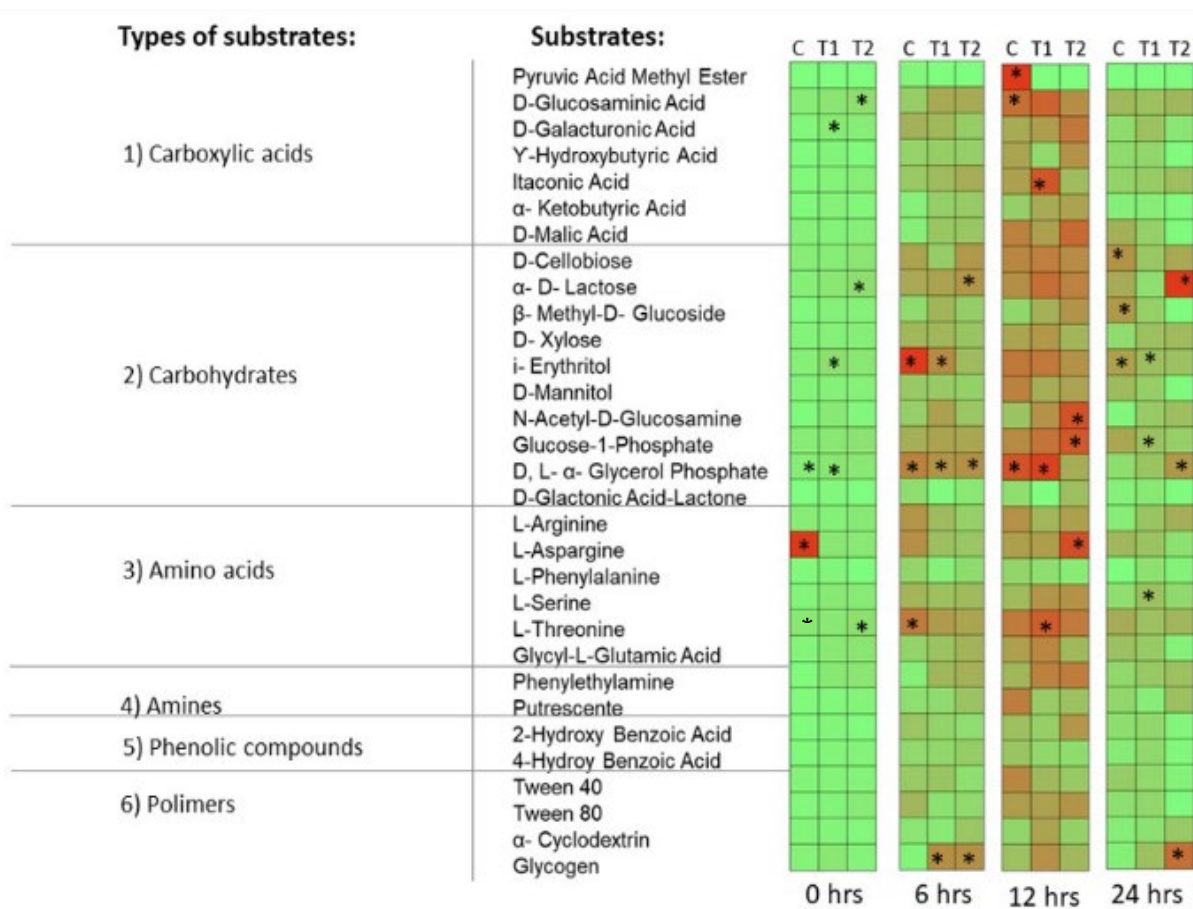


Figura 9. Mapa de calor de la utilización de los 31 sustratos de carbono por la comunidad microbiana expuestas a diferentes concentraciones de detergente. (*) marca los sustratos más utilizados por el control y los tratamientos a cada hora de muestreo.

El análisis de clúster de la utilización de sustrato muestra una agrupación principalmente por tratamiento (Figura 10). En general se observan tres grupos principales: la agrupación con mayor similitud (94,5) está dada por el Tto 1, mientras que, la segunda agrupación está dada por una afiliación por el Tto 2 (menor concentración) y el control, a una menor similitud (87,5). Dos muestras se segregaron con la menor similitud Control a las 0h (82) y el Tto 2 a 24 h (78).

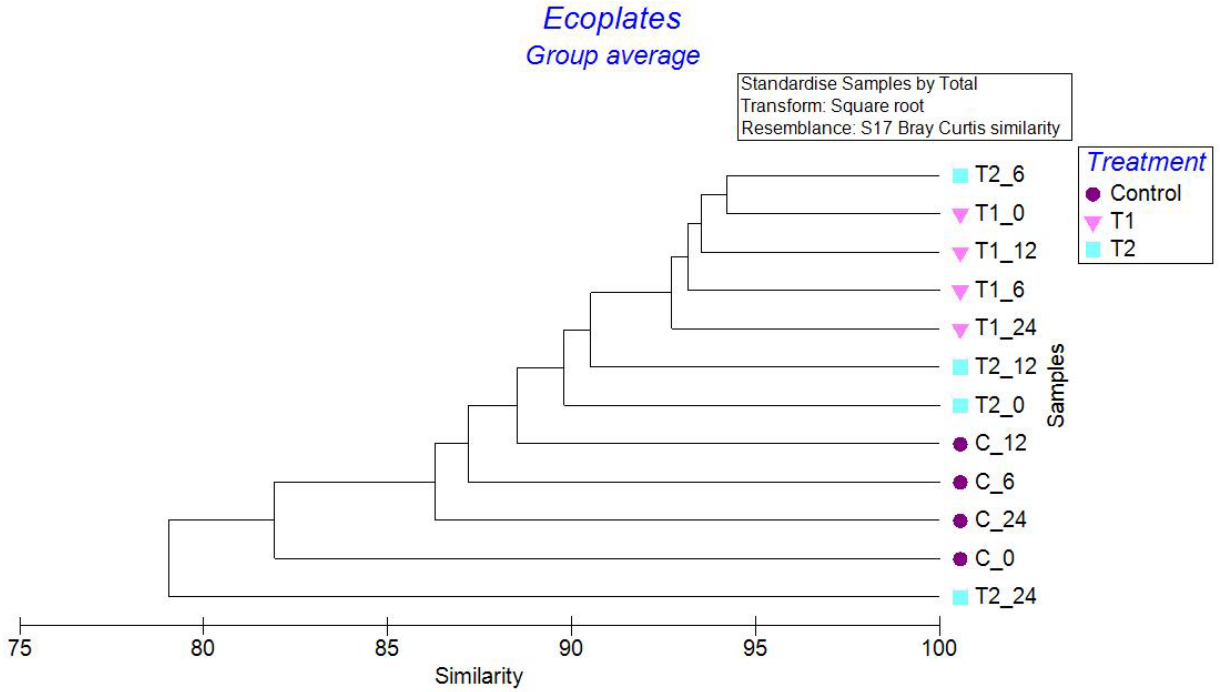


Figura 10. Análisis de clúster en la utilización de sustratos de carbono de comunidad microbiana expuesta a detergentes.

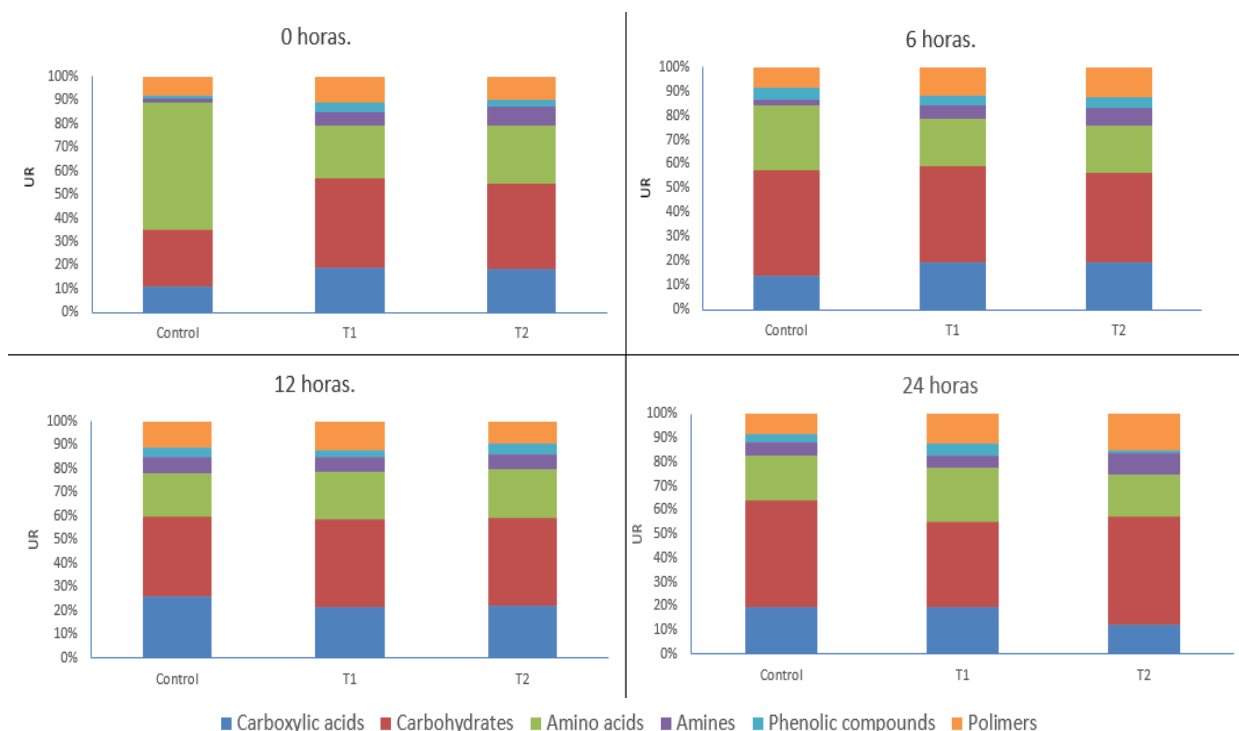


Figura 11. Utilización relativa (%) de sustratos agrupada en 6 categorías; ácidos carboxílicos (CA), carbohidratos (CHO), aminoácidos (AA), aminas (AMI), compuestos fenólicos (PhC) y polímeros (POL) de acuerdo con Sala *et al.* (2006). por la comunidad microbiana durante las 24 horas de experimento.

g) Análisis multivariado del experimento de microcosmos.

El análisis de coordenadas principales (PCoA) muestra que los dos ejes principales explican sobre un 59% de la variabilidad total del experimento (Figura 12). Las muestras se agrupan en relación con los tratamientos y secundariamente al tiempo. Predominantemente se visualiza una agrupación bien definida compuesta por ambos tratamientos basados en las variables MDH ($r = 0,5$), β -glucosidasa ($r = 0,7$), Índice de Shannon H' ($r = 0,6$) y nitrito ($r = 0,7$), relacionadas positivamente con la coordenada principal 1 (PCO1). Por otra parte, se observa otra agrupación dada por el control y las variables Syn ($r = -0,4$), Peuk ($r = -0,6$), Nitrato ($r = -0,6$), CL-a ($r = -0,8$), ATP ($r = -0,8$), Bact ($r = -0,9$), relacionadas negativamente con el PCO1.

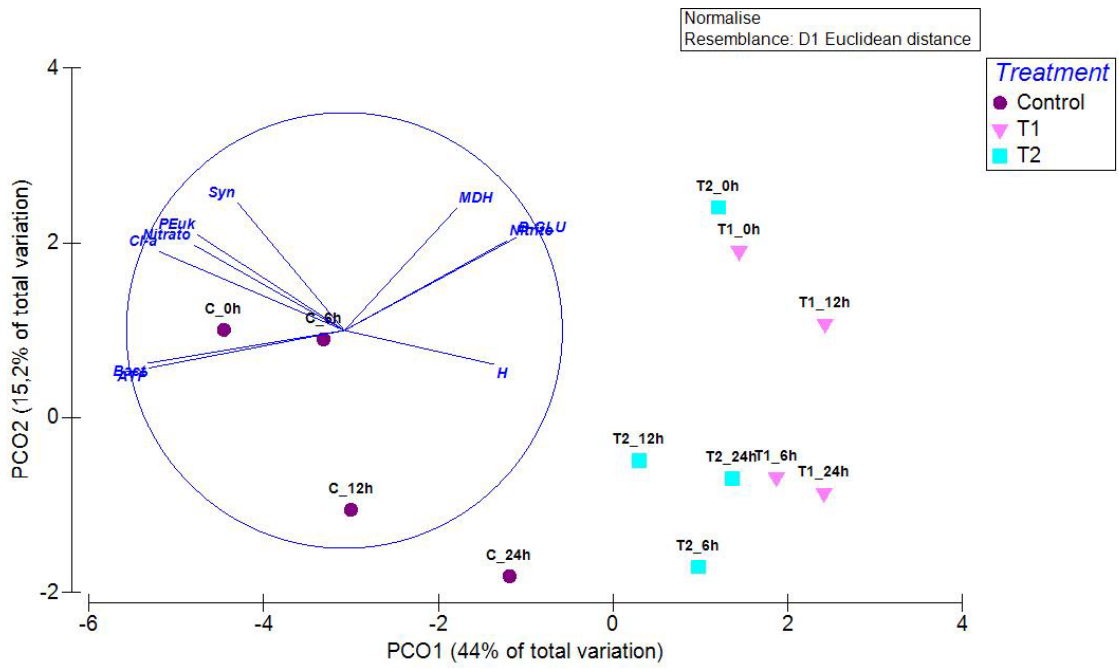


Figura 12. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de todas las variables biogeoquímicas y actividad metabólica durante el experimento de microcosmos.

DISCUSIÓN

El sector de la salmonicultura ha mostrado un crecimiento importante a nivel mundial enfrentando importantes problemas ambientales, entre los que destacan el riesgo ecológico asociado al uso de compuestos químicos como antimicrobianos y pesticidas (Quiñones *et al.*, 2009). La prevención y propagación de patógenos depende en gran medida de las estrategias de bioseguridad, descontaminación, desinfección y saneamiento utilizados (Ford, 1995). En varios procedimientos de producción de salmón los desinfectantes y detergentes son una herramienta importante para garantizar la bioseguridad de los cultivos (Quiñones *et al.*, 2009), los cuales se utilizan para reducir o eliminar microorganismos patógenos en las superficies de las instalaciones o para desinfectar equipos (Burka *et al.*, 1997). Sin embargo, se conoce muy poco sobre el efecto o la interacción de los detergentes y desinfectantes sobre las comunidades microbianas en la columna de agua, lo cual es de importancia dado el rol de los microorganismos en el ecosistema. Tanto hongos como bacterias, entre otros microorganismos, realizan la crucial función de reciclar el material orgánico que entra al ecosistema (Romaní *et al.*, 2009), cumpliendo un rol significativo en los ciclos biogeoquímicos, lo cual podría verse afectado frente a el uso de detergentes. Los tensoactivos que son introducidos al medio ambiente, si están presentes en altas concentraciones, pueden tener efectos tóxicos en todo tipo de vida acuática y esto incluye los detergentes biodegradables (Scott y Jones, 2002). El presente Seminario de Título abordó parte de esta problemática, estudiando la respuesta metabólica de la comunidad microbiana planctónica expuesta a dos concentraciones de un detergente industrial usado en actividades vinculadas a la salmonicultura en la Patagonia de Chile, a través de un experimento de microcosmos.

En términos generales, los resultados mostraron que hubo un efecto del detergente en el metabolismo de la comunidad microbiana de la columna de agua, lo que concuerda con el estudio de Effendi (2017) en Indonesia, quien observó, en detergentes diferentes a los utilizados en el presente estudio, una correlación negativa entre surfactantes o detergentes de uso doméstico y el crecimiento de las poblaciones bacterianas en medio marino.

Condiciones Oceanográficas del área de muestreo.

La Patagonia chilena, ubicada en el sureste del Océano Pacífico, es uno de los sistemas de fiordos más grandes del mundo, que abarca ca. 1700 km desde 41° S hasta 56° S; tiene un entorno topográfico y batimétrico formado por islas, bahías, canales y fiordos con origen glaciar (Palma y Silva, 2004; Pantoja *et al.*, 2011; Silva y Vargas, 2014). Las condiciones oceanográficas observadas durante el presente estudio, se encuentran en rangos esperados durante el verano austral. La columna de agua en el Mar Interior de Chiloé (MIC) se caracteriza por una capa superficial de baja salinidad asociada a influencias de agua dulce de ríos, precipitaciones y derretimiento de glaciares (agua estuarina) y una capa subsuperficial con mayor densidad, mayor salinidad y baja temperatura influenciada principalmente por entradas de aguas subantárticas (Dávila *et al.*, 2002; Palma y Silva, 2004; Narváez *et al.*, 2019). Esto explicaría la leve variación de salinidad en el perfil de Achao, el cual varió de 32,5 psu a 32,9 psu desde la superficie hasta 80 m de profundidad y la leve variación de temperatura que se encontraba un poco más cálida en superficie que a los 80 m de profundidad, indicando que la columna de agua está bien mezclada, principalmente debido a los vientos y mareas (Narváez *et al.*, 2019). Estas características coinciden con lo reportado por Garcés *et al.* (2020) y González *et al.* (2023) para el mismo sitio de muestreo y época del año.

El oxígeno disuelto se mantuvo dentro de los rangos esperados en el MIC. Según Rudolph *et al.* (2010) el oxígeno disuelto en las aguas de fondo en MIC son mayores a 2,5 ml L⁻¹ y en aguas superficiales de 5 a 7 ml L⁻¹.

Los perfiles de nutrientes del presente estudio se encuentran dentro de los valores esperados en el sitio de muestreo (González *et al.*, 2023), mostrando un perfil típico con menores concentraciones en superficie. Esto se condice con la concentración de clorofila-*a*, la cual evidencia mayor concentración en los primeros 10 m de la capa superficial (>3,32 µg L⁻¹). La concentración de Clorofila-*a* se encuentra dentro de los rangos reportados por González *et al.* (2023) para el mismo sitio y época del año y concuerdan con los valores esperados en el MIC donde se exhibe una fuerte

estacionalidad, con mayores concentraciones en el período correspondiente a primavera-verano y bajas concentraciones en los meses de invierno (mayo-agosto) (Martínez, 2005; Montecino *et al.*, 2009; Lara, *et al.*, 2010; González *et al.*, 2010).

Experimento en los microcosmos con adición del detergente DM-500.

La producción primaria del océano está modulada por procesos a escala local, regional y global, que controlan la disponibilidad de nutrientes y luz (Vásquez *et al.*, 2021), teniendo esto en cuenta, la concentración de clorofila-a (como índice de biomasa fitoplanctónica) en el microcosmos mostró una disminución en el tiempo, lo que se esperaba debido a que el experimento se realizó en oscuridad. Sin embargo, la concentración de clorofila-a en los tratamientos disminuyó respecto al control en todos los tiempos experimentales, lo que sugiere que el detergente puede también afectar a organismos fotosintetizadores. Esto también se refleja en los resultados provenientes de la citometría de flujo (abundancia picoplanctónica), donde en el control se observó una disminución en el tiempo de los organismos fotosintetizadores (*Synechococcus* y Picoeucariontes), pero esta disminución se exagera en los tratamientos con detergente.

Por otra parte, se observó un grupo con características ópticas diferentes a las habituales del grupo de bacterias, por lo que no fue contabilizado, sugiriendo que el detergente tiene efectos en su estructura y forma celular. Lo anterior se debe a que los detergentes son moléculas de naturaleza anfifílica con una cola de hidrocarburo hidrofóbico y un grupo de cabeza hidrofílico, donde el hidrófilo en el grupo principal lo que define al detergente como aniónico, catiónico, no iónico o anfótero, todos los cuales pueden usarse en formulaciones de detergente, características que permiten causar daño a la membrana externa celular y promueven su propia captación y entrada intracelular (Russell, 2002; Holah *et al.*, 2002). Bajo la referencia de que los detergentes dañan las membranas celulares, es posible que el metabolismo celular, estimado a través de las actividades enzimáticas en este estudio, también se vea afectado.

Sudiana (2004) reportó que un aumento en las concentraciones de tensoactivos afecta la capacidad celular dañando la pared celular, esto conduce a una disminución en la

degradación de moléculas e incluso puede conducir a la muerte celular (Effendí, 2017); estos resultados son consistentes con los resultados de ATP obtenidos en el experimento del presente estudio. Al evaluar el efecto de distintas concentraciones del detergente DM-500 en la comunidad microbiana se observó una disminución significativa de la biomasa (concentración de ATP), principalmente en el tratamiento con mayor concentración de detergente, lo que implica una disminución de organismos vivos, considerando que la concentración de ATP se utiliza como indicador de biomasa viva en estudios ecológicos de microorganismos acuáticos (Karl, 1993). Cabe señalar que la biomasa en el control del microcosmos de 0,05 a 0,079 $\mu\text{g L}^{-1}$, fue mayor que la reportada por Garcés *et al.* (2020) y González *et al.* (2023) de 0,02 y 0,023 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, para el mismo sitio y estación del año, lo cual refleja la variabilidad temporal de la zona de estudio.

En cuanto a la degradación de moléculas (sustratos) en ambientes acuáticos, la mayor parte de los componentes orgánicos son polímeros de alto peso molecular (Chrost, 1991), por lo que su incorporación a través de la membrana celular microbiana requiere del procesamiento previo a través de una variedad de enzimas hidrolíticas extracelulares (Arnosti, 2011; Pantoja *et al.*, 2011; Arnosti, 2014; Fuentes, 2022) como la β -glucosidasa. Nuestros resultados muestran que la β -GLU específica aumenta cuando la comunidad es expuesta al detergente. Esta respuesta positiva se observó especialmente con la mayor concentración de detergente, pero con un bajo indicador de concentración de ATP (biomasa). La β -GLU específica del control (hasta 0,2 pmol $\text{pg ATP}^{-1} \text{ h}^{-1}$, Figura 5, Anexo 1) estuvo bajo los rangos reportados por el estudio de González *et al.* (2023; de 3 a 10 pmol $\text{pg ATP}^{-1} \text{ h}^{-1}$) que midió la AEE de la β -glucosidasa específica de la comunidad microbiana expuesta al aditivo del alimento de salmónes Etoxiquina en Achao, obteniendo respuestas negativas principalmente. Cabe señalar que las tasas no específicas de este estudio (control: 4,29-15,20 $\text{nmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$; Figura 2, Anexo 1) coinciden dentro de los rangos reportados por Pantoja *et al.*, (2011a, 2011b; de 0,08 a 61 $\text{nmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Nuestros resultados indican que, si bien el detergente tuvo un efecto negativo significativo en la abundancia celular y biomasa, hubo un aumento en la AEE específica hasta 37000% en los microcosmos con la

comunidad microbiana residente, sugiriendo que esta comunidad puede aumentar sus tasas metabólicas frente a un estresor, como es la adición de DM-500.

La MDH es una enzima propuesta como indicador de la actividad microbiana porque refleja la reacción metabólica oxidativa global de la comunidad microbiana (Martínez *et al.*, 2002) y se ha determinado que un aumento en la actividad de MDH implica un aumento en la remineralización de la materia orgánica (Martínez *et al.*, 2002; González y Quiñones, 2009). La actividad específica de la enzima MDH mostró una respuesta positiva frente a la adición del detergente, aumentando hasta un 5000%. La actividad específica de MDH en el control, varió entre 0,03 y 0,16 pmol NADH pg ATP⁻¹ min⁻¹ (Figura 3, Anexo 1), lo cual se encuentra dentro de los rangos reportados en el estudio de Garcés *et al.* (2020; de 2 pmol NADH pg ATP⁻¹ min⁻¹) y González *et al.* (2023; de 3 a 10 pmol NADH pg ATP⁻¹ min⁻¹) en el MIC. En este contexto, el aumento de la actividad específica de MDH frente a la adición del detergente sugiere un aumento de la remineralización de la materia orgánica por unidad de biomasa. Según el estudio de González y Quiñones (2009), la actividad de MDH podría usarse como un índice del equilibrio NADH/NAD⁺ como expresión del potencial redox normal, dentro de las células microplánctónicas en la columna de agua. El mantenimiento de este equilibrio debe estar fuertemente ligado al control normal de actividad metabólica involucrada en el proceso de producción de energía. Esto es consistente con los resultados obtenidos para la β-glucosidasa y son concordantes con estudios anteriores que también han demostrado que varios grupos de bacterias y hongos aumentan sus tasas metabólicas cuando se exponen a sustancias nocivas como los pesticidas, entre otros (Pandey y Singh, 2004; Itoh, *et al.*, 2014; Garcés *et al.*, 2020; González *et al.* 2023).

La utilización de sustratos de carbono en las microplacas Ecoplates, muestra que la comunidad microbiana sin adición del detergente resultó tener preferencias por aminoácidos y ácidos carboxílicos principalmente, los que se usaron en mayor porcentaje en el tiempo inicial del experimento. En cambio, con la adición del detergente, hay una mayor utilización de carbohidratos y un aumento del espectro de sustratos utilizados (i.e. incremento en diversidad, índice de Shannon (H'); Tabla 4), incorporando aminoácidos y polímeros en las últimas horas del experimento respecto

al control. Estudios previos realizados en suelo usando Biolog Ecoplates, han detectado cambios en la diversidad funcional de las bacterias frente a la adición de antibióticos, fungicidas e insecticidas (Lupwayi *et al.*, 2009) aumentando el uso de carbohidratos (específicamente N-acetil-D-glucosamina,) lo que concuerda con los resultados del presente estudio donde el sustrato más utilizado fue un carbohidrato, específicamente el D-L- α -Glycerol Phosphate. Esto también se relaciona con los estudios de González *et al.* (2023) y Garcés *et al.* (2020), que al exponer la comunidad microbiana planctónica a compuestos químicos como el azamefitos y la exoquitina (ambos utilizados por la salmonicultura), los aminoácidos y ácidos carboxílicos son mayormente utilizados, posiblemente debido a que son parte del pool lábil de materia orgánica y son fuentes importantes de C y N para el bacterioplancton (Obernosterer *et al.*, 1999; Pullin *et al.*, 2004), lo que sugiere que la exposición a sustancias químicas influye en la utilización de sustratos “más fáciles” de incorporar. Se propone que la comunidad microbiana expuesta al estresor del detergente disminuye la utilización de sustratos (AWCD) e incorpora mayormente carbohidratos, aminoácidos y polímeros, lo que sugiere que dadas las características del detergente de ser descarbonizante en frío, podría existir un efecto tanto en los sustratos disponibles en la columna de agua, como en la capacidad de degradación por parte de la comunidad microbiana, y como consecuencia ampliar la diversidad de utilización de sustratos.

Por otra parte, es importante tener en cuenta que diversos compuestos químicos pueden afectar la composición de la comunidad microbiana, generando la prevalencia de ciertos grupos que puedan adaptarse o eventualmente beneficiarse de la presencia del compuesto, y la reducción de otros, afectando la diversidad de la comunidad y en consecuencia la función del ecosistema (Joye *et al.*, 2014; Johnston *et al.* 2015; Pringault *et al.* 2016 y 2021; González *et al.*, 2023). Dado la zona de muestreo, donde existe una fuerte presencia de actividades vinculadas a la acuicultura, se sugiere que la comunidad microbiana posiblemente pueda presentar un cierto grado de adaptación frente a la exposición de los detergentes u otros compuestos químicos. Varios autores han sugerido la adaptación de comunidades microbianas en áreas expuestas a pesticidas, que serían más eficientes en su degradación (Racke y Coats, 1988; Coppola, *et al.*, 2007; Itoh *et al.*, 2014; Garcés *et al.*, 2020).

Respecto al uso de detergente, la norma vigente (i.e. Decreto Supremo N°175 de 1980, y sus modificaciones, del ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción; Reglamenta actividades pesqueras y deroga decretos supremos que indican la forma de cumplimiento) exige que todos los procedimientos de desinfección deben usar agentes de limpieza y desinfección registrados por el Ministerio de Salud y autorizados por la Dirección General del Territorio Marítimo y Mercante y cumplir con la normativa vigente sobre emisión. En el marco del Servicio de Evaluación Ambiental (SEIA) (Artículo 18° y Artículo 19°, D.S. N°40, del 2012, Ministerio del Medio Ambiente) se deben describir las principales acciones de limpieza y desinfección que involucren las embarcaciones externas de apoyo al cultivo que recalen en el centro, las embarcaciones de operaciones diarias del centro, estructuras de cultivo, sistema de ensilaje, artefactos navales con usos de habitabilidad, y bodegas, entre otros.

Para ello, se debe describir el diseño de operación de limpieza y desinfección indicando (SEIA, 2021):

- Volumen de agua (m³ o L).
- Volumen de detergente o desinfectante (m³ o L).
- Tipo de producto de limpieza.
- Residuos generados (Kg o t) y posterior destino.

A pesar, de que se deba presentar una descripción de los productos que se utilizan y generan en un proyecto de cultivo al SEIA y que, además, exista una descripción de las actividades operacionales de limpieza en el Reglamento Ambiental para la Acuicultura (RAMA), esta información no se encuentra disponible para el público general (Oceana, 2021). En otras palabras, se desconoce cuál es el volumen de detergentes utilizados por la industria acuícola nacional (Bravo *et al.*, 2005), información relevante a la luz de nuestros resultados para avanzar hacia una acuicultura más ambientalmente sostenible.

En Chile, si bien, las empresas salmoneras reportan información sobre usos de químicos y medicamentos al SERNAPESCA, no se requiere especificar las concentraciones utilizadas de los detergentes, lo cual podría ser importante para poder

evaluar el posible impacto que generan en la columna de agua y, eventualmente, en los sedimentos.

En el presente estudio se comprobó que el metabolismo de la comunidad microbiana en Achao, Chiloé, se ve afectada a escala local frente a detergentes utilizados en salmonicultura, generando cambios en la biomasa y capacidad de la comunidad para procesar compuestos orgánicos, al menos en las cercanías inmediatas a la fuente de incorporación del detergente al ecosistema marino. En este contexto, los resultados del presente Seminario de Título proveen evidencia de la necesidad de normar las concentraciones de detergentes en la industria acuícola nacional e incorporar medidas de fiscalización acerca de su utilización.

CONCLUSIONES

- La biomasa de la comunidad microbiana presente en la columna de agua de Achao durante el muestreo disminuye frente a la exposición del detergente industrial DM-500; sin embargo, las actividades específicas de las enzimas β -glucosidasa y MDH aumentan. Se rechaza la Hipótesis 1 y 2 (objetivos específicos 1 y 2), las cuales sugerían que las actividades metabólicas específicas de ambas enzimas disminuían frente al incremento de concentraciones de detergente.
- La AWCD disminuyó en los perfiles metabólicos frente a la presencia del detergente, aumentando la utilización relativa de carbohidratos y ampliando la degradación de otros sustratos. Esto se vio reflejado en el aumento del índice de diversidad en el uso de sustratos, aumentando la incorporación de carbohidratos, aminoácidos y polímeros frente a la exposición del detergente DM-500, confirmando cambios en la utilización de sustratos de carbono. En consecuencia, se acepta la Hipótesis 3 (objetivo específico 3), la cual sugería que la comunidad microbiana disminuye la utilización de sustratos frente al incremento de concentraciones del detergente

REFERENCIAS

- Abad, N. (2020) Actividad enzimática extracelular microbiana en el océano. (Doctoral dissertation, Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea).
- Acosta, Y., Zauahre, M., Rodríguez, L., Reyes, N., Rojas, D., (2012) Indicadores de calidad bioquímica y estabilidad de la materia orgánica durante el proceso de compostaje de residuos orgánicos. *Multiciencias* 12: 390-39.
- Armada de Chile (2020). Aprueba Circular de la Dirección General del Territorio Marítimo t De Marina Mercante, Ordinario N° A-52/008. Ministerio de Defensa Nacional; Subsecretaría para las Fuerzas Armadas; Armada de Chile; Dirección General Del Territorio Marítimo y de Marina Mercante. 11 pp+ Anexos. https://www.directemar.cl/directemar/site/docs/20201013/20201013145813/circular_a_52_008.pdf
- Arnosti, C. (2011). Microbial extracellular enzymes and the marine carbon cycle. *Annual review of marine science*, 3: 401-406.
- Arnosti, C., Bell, C., Moorhead, D., Sinsabaugh, R., Steen, A., Stromberger, M., Wallenstein, M., Weintraub, M. (2014). Extracellular enzymes in terrestrial, freshwater, and marine environments: perspectives on system variability and common research needs. *Biogeochemistry*, 117: 5–21.
- Bravo, S., Dölz, H., Silva, M.T., Lagos, C., Millanao, A., Urbina, M (2005). Diagnóstico del uso de fármacos y otros productos químicos en la acuicultura. Informe Final, Proyecto FIPA N° 2003-28. Fondo de Investigación Pesquera y de Acuicultura, Subsecretaría de Pesca, Valparaíso, Chile. 256 pp.
- Bradie, J., Broeg, K., Gianoli, C., He, J., Heitmuller, S., Curto, A.L., Nakata, A., Rolke, M., Schillark, L., Stehouwer, P., Vanden Byllaardt, J., Veldhuis, M., Welschmeyer, N., Younan, L., Zaake, A., Bailey, S. (2018) a. A shipboard comparison of analytic methods for ballast wáter compliance monitoring. *J. Sea Res.*, 133: 11-19.
- Bradie, J., Gianoli, C., He, J., Curto, A.L., Stehouwer, P., Veldhuis, M., Welschmeyer, N., Younan, L., Zaake A., Bailey, S., (2018) b. Detection of UV-treatment effects on plankton by rapid analytic tolos for ballast water compliance monitoring immediately following treatment. *J. Sea Res.*, 133: 177-184.
- Buschmann, A., Fortt, A. (2005). Efectos ambientales de la acuicultura intensiva y alternativas para un desarrollo sustentable. *Ambiente y Desarrollo*, 21: 58-59.

- Chevassus-au-Louis, B., Lazard, J. (2009). Perspectives pour la recherche biotechnique en pisciculture. *Cahiers Agricultures*, 18(2-3): 91-96.
- Childress, J.J., Somero, G.N. (1979). Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts. *Marine Biology*, 52: 273-283.
- Cho, B. C., Azam, F. (1988). Major role of bacteria in biogeochemical fluxes in the ocean's interior. *Letters in Applied Microbiology*, 332: 441-443.
- Chróst, R.J. (1991). Environmental Control of the Synthesis and Activity of Aquatic Microbial Ectoenzymes. In: Chróst, R.J. (eds) *Microbial Enzymes in Aquatic Environments*. Brock/Springer Series in Contemporary Bioscience. Springer, New York, NY.
- Cruz-Leyva, M.C., Zamudio-Maya, M., Corona-Cruz; I. A., González de la Cruz, J.U., Rojas-Herrera, R. (2015). Importancia y estudios de las comunidades microbianas en los recursos pesqueros. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 2(4): 99-115.
- Dávila, PM, Figueroa, D., Müller, E. (2002). Freshwater input into the coastal ocean and its relation with the salinity distribution off austral Chile (35-55°S). *Continental Shelf Research*, 22: 521-534.
- Effendi, I., Nedi, S., Ellizal, Nursyirwani, Feliatra, F., Fikar, Tanjug, Pakpaha R., Pratama (2017). Detergent Disposal into our environment and its impact on marine microbes. *IOP conf. ser.: Earth Environ. Sci.*, 97: 1-6.
- Fuentes, M., Quiñones, R.A., Gutiérrez, M.H., Pantoja, S. (2015). Fuentes, M., Quiñones, R.A., Gutiérrez, M.H., Pantoja, S., 2015. Effects of temperature and glucose concentration on the growth and respiration of fungal species isolated from a highly productive coastal upwelling ecosystem. *Fungal Ecol.*, 13: 135–149. *Effec. Fungal Ecol.* 13, 135–149.
- Fuentes, M.E., Quiñones, R.A. (2016). Carbon utilization profile of the filamentous fungal species *Fusarium fujikuroi*, *Penicillium decumbens*, and *Sarocladium strictum* isolated from marine coastal environments. *Mycologia*, 108(6): 1069-1081.
- Fuentes, K. (2022). Efecto de la interacción hongo-bacteria sobre la degradación de la materia orgánica, en sedimentos marinos costeros. Tesis pregrado. Departamento de oceanografía, Universidad de Concepción, Concepción.
- Garcés, D.V., Fuentes, M.E., Quiñones, R.A. (2020). Effect of Azamethiphos on enzymatic activity and metabolic fingerprints of marine microbial communities from the water column *Aquaculture*, 529, 735650.

- González, R.R., Quiñones, R.A. (2009). Common patterns of catabolic enzymes of a microplankton community in the Humboldt Current System off Northern and Central South, Chile: Malate dehydrogenase activity as an index of water column metabolism in the Oxygen Minimum Zone. *Deep Sea Research II*, 56: 1095–1104.
- González, M., Fuentes, M., Molina, V., Quiñones, R.A. (2023) Effects of ethoxyquin on metabolism and composition of active marine microbial communities. *Aquaculture*, 569, 739345.
- González, H.E., Calderón, M.J., Castro, L., Clement, A., Cuevas, L.A., Daneri, G., Iriarte, J.L., Lizárraga, L., Martínez, R., Menschel, E., Silva, N, Carrascor C., Valenzuela, C., Vargas, C, A., Molinet, C. (2010). Primary production and plankton dynamics in the Reloncaví Fiord and the Interior Sea of Chiloé, Northern Patagonia, Chile. *Marine Ecology Progress Series*, 402: 13-30.
- Grasshoff, K., Ehrhardt, M., Kremling, K. (1983) *Methods of Seawater Analysis*. 2nd Edition, Verlag Chemie Weinheim, New York, 419 p.
- Gutiérrez, M.H., Pantoja, S., Tejos, E., Quiñones, R.A. (2011). The role of fungi in processing marine organic matter in the upwelling ecosystem off Chile. *Mar Biol.*, 158: 205–219.
- Gutiérrez, M. H., Galand, P.E. Moffat, C., Pantoja, S. 2015. Melting glacier impacts community structure of Bacteria, Archaea and Fungi in a Chilean Patagonia fjord. *Environmental Microbiology*, 17: 3882-3897.
- Guckert, J.B., Carr, G.J., Johnson, T.D., Hamm, B.G., Davidson, D.H., Kumagai, Y. (1996). Community analysis by biolog: curve integration for statistical analysis of activated sludge microbial habitats. *J. Microbiol. Methods*, 27 (2–3): 183–197.
- Hoppe, H.-G. (1983). Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: measurements by means of methylumbelliferyl-substrates. *Marine Ecology Progress Series*, 11: 299-308.
- Iriarte, J.L., Quiñones, R.A, González, R.R. (2005). Relationship between biomass and enzymatic activity of a bloom-forming dinoflagellate (Dinophyceae) in southern Chile (41°S): a field approach. *Journal of Plankton Research*, 27: 159-166.
- Iriarte, J.L., González, H.E., Liu., K.K, Rivas, C., Valenzuela, C. (2007). Spatial and temporal variability of chlorophyll and primary productivity in Surface waters of southern Chile 41.5-43°S. *Estuarine, coastal and Shelf Science*, 74: 471-480.

- Itoh, H., Navarro, R., Takeshita, K., Tago, K., Hayatsu, M., Hori, T., Kikuchi, Y. (2014). Bacterial population succession and adaptation affected by insecticide application and soil spraying history. *Frontiers in microbiology*, 5: 457.
- Jackson, C.R., Tyler, H.L., Millar, J.J., (2013). Determination of microbial extracellular enzyme activity in waters, soils, and sediments using high throughput microplate assays. *J. Vis. Exp.*, 80: 50399.
- Jacob, B. G., Tapia, F.J., Daneri, G., Iriarte, J.L., Montero, P., Sobarzo, M., Quiñones, R.A. (2014). Springtime size-fractionated primary production across hydrographic and PAR-light gradients in Chilean Patagonia (41–50°S). *Progress in Oceanography*, 129 (A): 75–84.
- Johnston, E. L., Mayer-Pinto, M., Crowe, T. P. (2015). Chemical contaminant effects on marine ecosystem functioning. *Journal of Applied Ecology*, 52(1): 140-149.
- Joye, S. B., Teske, A. P., Kostka, J. E. (2014). Microbial dynamics following the Macondo oil well blowout across Gulf of Mexico environments. *Bioscience*, 64(9): 766-777.
- Karl, D.M., (1993). Total microbial biomass estimation derived from the measurement of particulate adenosine-5'-triphosphate. In: *Handbook of Methods in Aquatic microbial Ecology*. CRC press, pp. 3459-368.
- Lara, C., Miranda, M., Montecino, V., Iriarte, J.L (2010). Chlorophyll-a MODIS mesoscale variability in the Inner Sea of Chiloé, Patagonia, Chile (41-43°S): Patches and Gradients. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 45 (2): 217-225.
- Lazard, J., Leveque, C. (2009). Introductions et transferts d'espèces de poissons d'eau douce. *Cahiers Agricultures*, 18: 57-163.
- Martínez, C.A., Carcaño, M.G., López, L. (2002). Actividad biológica en un transecto altitudinal de suelos de La Malinche, Tlaxcala. *Terra*, 20: 141–146.
- Martínez, V.P., (2005). Heterogeneidad Ambiental y su influencia en la distribución y abundancia de la clorofila-a en el mar interior de Chiloé. Tesis de Magíster en Ciencias Biológicas, Universidad de Chile.
- Martínez, V., Lara, C., Silva, N., Gudiño, V., Montecino, V. (2015). Variability of environmental heterogeneity in northern Patagonia, Chile: effects on the spatial distribution, size structure and abundance of chlorophyll-a. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 50(1): 39-52.

- McBride, M.J., Xie, G., Martens, E.C., Lapidus, A., Henrissat, B., Rhodes, R.G., Goltsman, E., Wang, W., Xu, J., Hunnicutt, D.W., Staroscik, A.M., Hoover, T.H., Cheng, Y-Q, Stein, J.L. (2009). Novel features of the polysaccharide digesting gliding bacterium *Flavobacterium jobsoniae* as revealed by genome sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75: 6864-75.
- Ministerio del Medio Ambiente (2012). Decreto Supremo N° 40, Reglamento del Sistema de Evaluación de Impacto Ambiental. Disponible en el Centro de Documentación de la Biblioteca del Congreso Nacional, en su sitio web, www.bcn.cl.
- Montecino, V., Uribe, P., Soto, D., González, H., Riveros, J., Alarcón, G., Giglio, S., Martínez, V., Paredes, M.A. (2009). Bio-óptica y diversidad de tamaños del fitoplancton del mar interior de Chile: variabilidad especial en invierno-primavera 2004 y 2005. *Ciencia Tecnología del Mar*, 32(2): 79-99.
- Morales, C.E., Anabalón, V. (2012). Phytoplankton biomass and microbial abundances during the spring upwelling season in the coastal area off Concepción, central-southern Chile: variability around a time series station. *Prog. Oceanogr.*, 92: 81-91.
- Narváez, D.A., Vargas, C.A., Cuevas, L.A., García-Loyola, S.A., Lara, C., Segura, C., Tapia, F.J., Broitman, B.R. (2019). Dominant scales of subtidal variability in coastal hydrography of the Northern Chilean Patagonia. *Journal of Marine Systems*, 193: 59 – 73.
- Obernosterer, I., Kraay, G., de Ranitz, E., Herndl, G. J. (1999). Concentrations of low molecular weight carboxylic acids and carbonyl compounds in the Aegean Sea (Eastern Mediterranean) and the turnover of pyruvate. *Aquatic Microbial Ecology*, 20(2): 147-156.
- Oceana (2021). Transparentando el uso de productos químicos y medicamentos en la salmonicultura nacional. Informe Bibliográfico.
- Pantoja, S., Gutiérrez, M., Ampuerto, P., Tejos, E. (2011). Degradation capability of the coastal environment adjacent to the Itata River in central Chile (36.5°S). *Biogeosciences*, 8(8): 2063-2074.
- Pantoja, S., Iriarte, J.L., Daneri, G., 2011. Oceanography of the Chilean Patagonia. *Cont. Shelf Res.*, 31: 149–153.
- Pandey, S., Singh, D.K. (2004). Total bacterial and fungal population after chlorpyrifos and quinalphos treatments in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) soil. *Chemosphere*, 55(2): 197–205.

- Palma, S., Silva, N., (2004). Distribution of siphonophores, chaetognaths, euphausiids and oceanographic conditions in the fjords and channels of southern Chile. *Deep-Sea Res. II Top. Stud. Oceanogr.*, 51: 513–535.
- Peperzak, L. (2022). The critical adenosine triphosphate (ATP) concentration in treated ballast water. *Marine Pollution Bulletin*, 187: 114506.
- Pringault, O., Lafabrie, C., Avezac, M., Bancon-Montigny, C., Carre, C., Chalghaf, M., Bouvy, M. (2016). Consequences of contaminant mixture on the dynamics and functional diversity of bacterioplankton in a southwestern Mediterranean coastal ecosystem. *Chemosphere*, 144: 1060-1073.
- Pringault, O., Bouvy, M., Carre, C., Mejri, K., Bancon-Montigny, C., Gonzalez, C., Goni Urriza, M. (2021). Chemical contamination alters the interactions between bacteria and phytoplankton. *Chemosphere*, 278: 130457.
- Pullin, M. J., Bertilsson, S., Goldstone, J. V., Voelker, B. M. (2004). Effects of sunlight and hydroxyl radical on dissolved organic matter: Bacterial growth efficiency and production of carboxylic acids and other substrates. *Limnology and Oceanography*, 49(6): 2011-2022.
- Quiñones, R.A., Fuentes, M., Montes, R.M., Soto, D., León-Muñoz, J. (2019). Environmental issues in Chilean salmon farming: a review. *Reviews in Aquaculture*, 11: 375–402.
- Quiñones, R. A., Gutiérrez, M. H., Daneri, G., Gutiérrez D.A., González, H.E., Chávez, F. (2010). Pelagic carbon fluxes in the Humboldt Current System. Páginas 44-64; En: *Carbon and nutrient fluxes in global continental margins: A global synthesis*. K.K. Liu, L. Atkinson, R. A. Quiñones, L. Talaue-McManus (eds.), IGBP Series Book, Springer-Verlag New York.
- Romaní, A. M., Artigas, J., Camacho, A., Graca, M. A., & pascoal, C. (2009). Conceptos y técnicas en ecología fluvial. *La biota de los ríos: los microorganismos heterotróficos* Primera Ed. A. Elosegi & S. Sabater, eds., País Vasco.
- Ruldolph, A., Medina, A., Novoa, V., Ahumada, R., Cortés, I., (2010). Calidad ecotoxicológica de sedimentos en sectores del mar interior de Chiloé, campaña CIMAR 12 fiordos. *Ciencia y Tecnología del Mar*, 33 (1): 17-29.
- Sala, M., Estrada, M., Gasol J.M., (2006). Seasonal changes in the functional diversity of bacterioplankton in contrasting coastal environments of the NW Mediterranean. *Aquat. Microb. Ecol.*, 44: 1-9.

- Scott, M.J., Jones, M.N. (2000). The biodegradation of surfactants in the environment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1508(1-2): 235-251.
- SEA (2021). Guía para la descripción de proyectos de engorda de salmónidos en el mar. Servicio de Evaluación Ambiental. Disponible en el Centro de Documentación de su sitio web, www.sea.gob.cl.
- Silva, N., Vargas, C.A., (2014). Hypoxia in Chilean Patagonian Fjords. *Prog. Oceanogr.*, 129: 62–74.
- Silva, N., Calvete, C., Sievers, H.A. (1997). Características oceanográficas físicas y químicas de canales australes chilenos entre Puerto Montt y laguna San Rafael (Crucero CIMAR-Fiordo 1). *Cienc. Tecnol. Mar.*, 20: 23–106.
- Stickney R.R., McVey, J.P. (2002). *Responsible Marine Aquaculture World*. Aquaculture Society. CABI Publishing, Wallingford, UK, 416 pp.
- Sudiana, I. M. (2004). Peran komunitas mikroba lumpur aktif dalam perombakan detergen alkil sulfonat linear dan benzena alkil sulfonat. *Berkala Penelitian Hayati*, 10(1): 75-80.
- Svasand, T., Crosetti, D., García-Vasquez, E., Verspoor, E. (eds) (2007). Genetic impact of aquaculture activities on native population. Genimpact final scientific report, EU contract N RICA-CT-2005-022802. Available from URL: <http://genim.pact.imr.no/>
- Tett, P. (2008). Fish Farm Wastes in the Ecosystem. In: Holmer, M., Black, K., Duarte, C.M., Marbà, N., Karakassis, I. (eds) *Aquaculture in the Ecosystem*. Springer, Dordrecht.
- Vásquez, S.I., de la Torre, M.B., Saldías, G.S., Montecinos, A. (2021) Meridional Changes in Satellite Chlorophyll and Fluorescence in Optically-Complex Coastal Waters of Northern Patagonia. *Remote Sens.*, 13(5): 1026.
- Van Slooten, C., Wijers, T., Buma, A., Peperzak, L., (2015). Development and testing of a Rapid, sensitive ATP assay to detect living organisms in ballast water. *J. Appl. Phycol.*, 27: 2299–2312.
- Velásquez, M. (2016). Comparación teórica del uso de un compuesto activo en un detergente líquido lavavajillas de alta biodegradabilidad y baja toxicidad a partir de tensioactivos y aniónicos y no iónicos. Tesis de pregrado. Facultad de Tecnología. Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia.

- Wang, RC., Wang, HM., Xiang, X., Gao, Y., Song Q-W, Gong L-F. 2018. Temporal and Spatial Variations of Microbial Carbon Utilization in Water Bodies from the Dajiuhu Peatland, Central China. *J. Earth Sci.*, 29: 969–976.
- Weiss, M.S., Abele, U., Weckesser, J., Welte, W., Schiltz, E., Schulz, G.E. (1991). Molecular architecture and electro-static properties of a bacterial porin. *Science*, 254: 1627–30.
- Weiner, R.M., Taylor, L.E. II., Henrissat, B., Hauser, L., Land, M., et al. (2008) Complete genome sequence of the complex carbohydrate-degrading marine bacterium, *Saccharophagus degradans* Strain 2–40T. *Genet.*, 5: e1000087.
- Yamada, N., Suzumura M., (2010). Effects of Seawater Acidification on Hydrolytic Enzyme Activities. *Journal of Oceanography*, 66: 233-241.

ANEXO 1

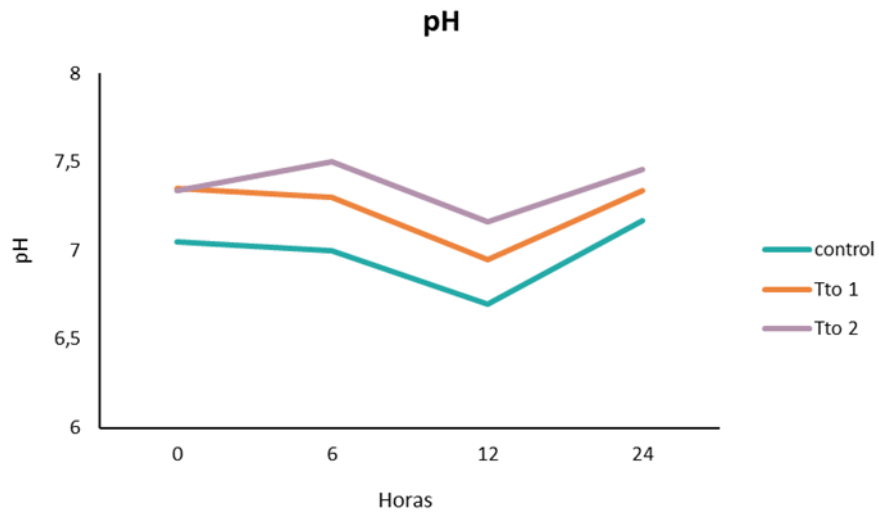


Figura 1 (Anexo). Variación de pH de los microcosmos Durante el experimento; Control (sin adición de detergente), Tto1 (tratamiento 1; 1:500) Tto 2 (tratamiento 2; 1:1000). durante los submuestreos

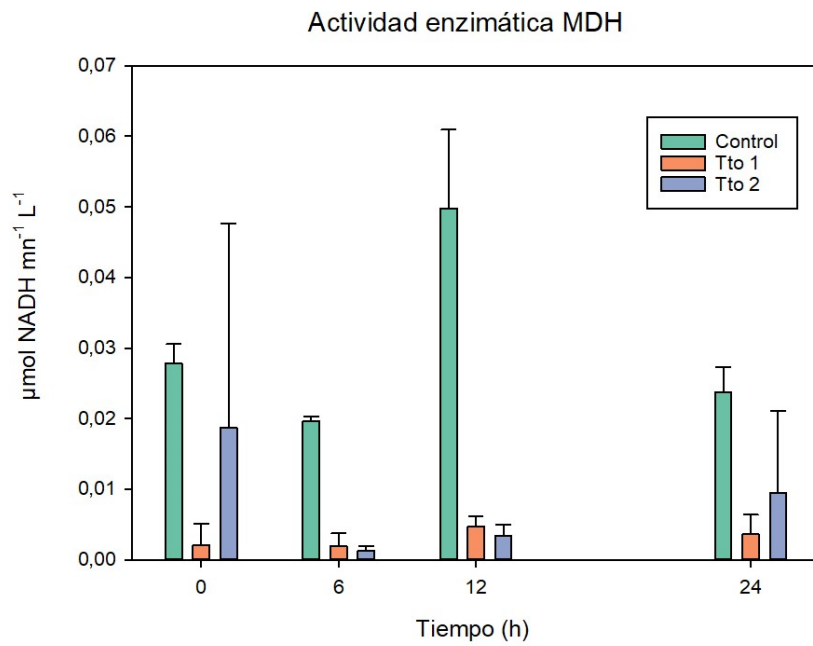


Figura 2 (Anexo). Tasa enzimática Malato deshidrogenasa no específica ($\mu\text{mol NADH mn}^{-1}\text{L}^{-1}$) de la comunidad microbiana expuesta a detergente en 24 hrs.

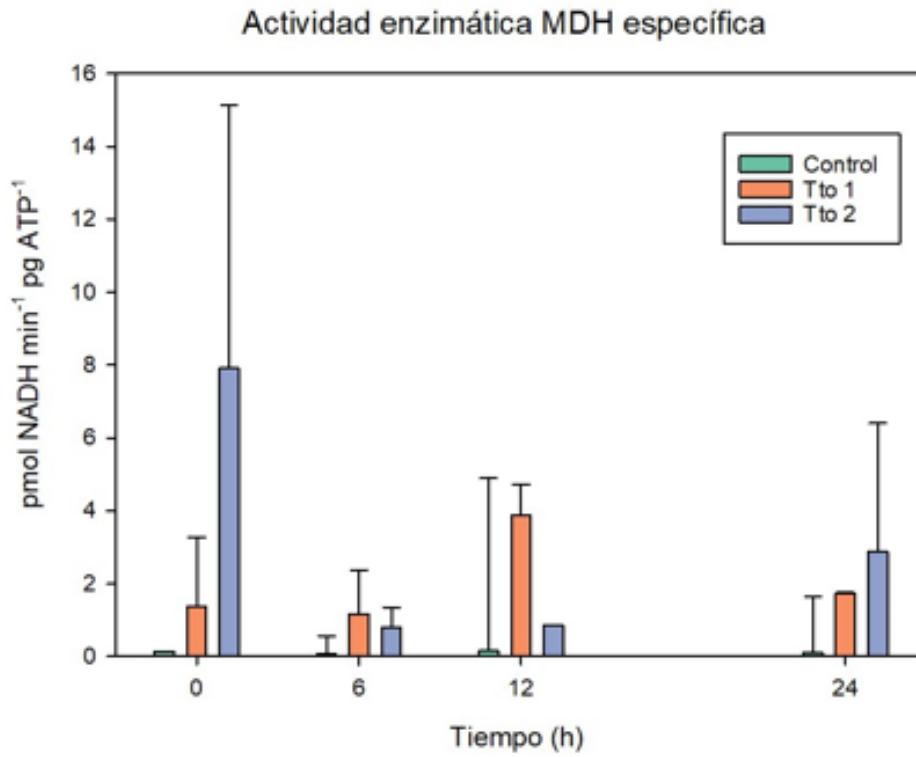


Figura 3 (Anexo). Tasa específica de la actividad enzimática malato deshidrogenasa de la comunidad microbiana expuestas a detergente durante 24 h.

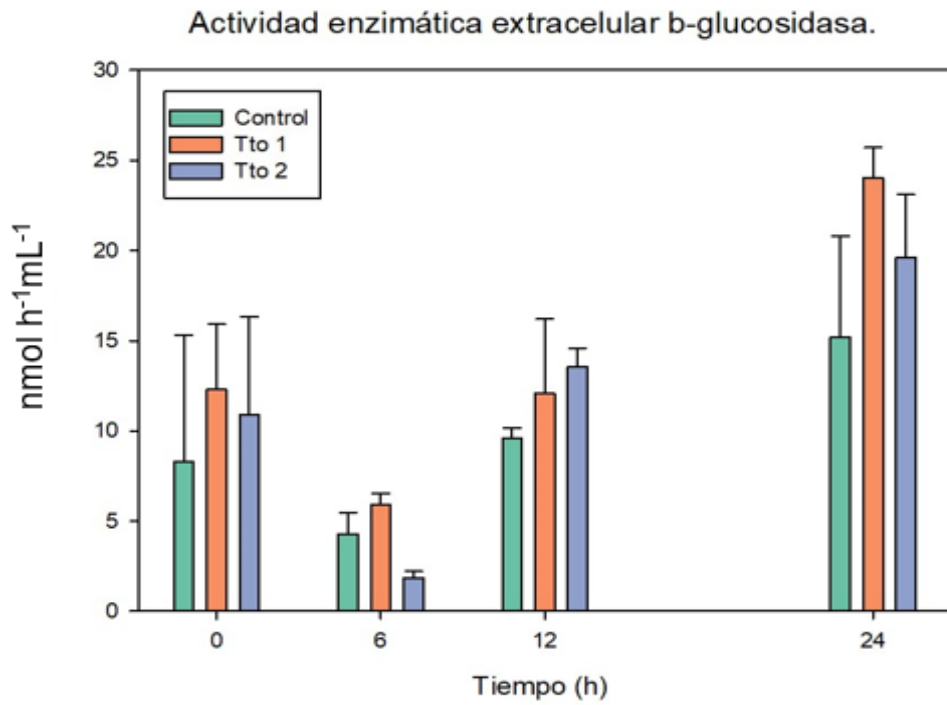


Figura 4.(Anexo) Actividad tasa enzimática extracelular b-glucosidasa no específica de la comunidad microbiana expuesta a detergente durante 24 h.

Actividad enzimática extracelular b-glucosidasa específica

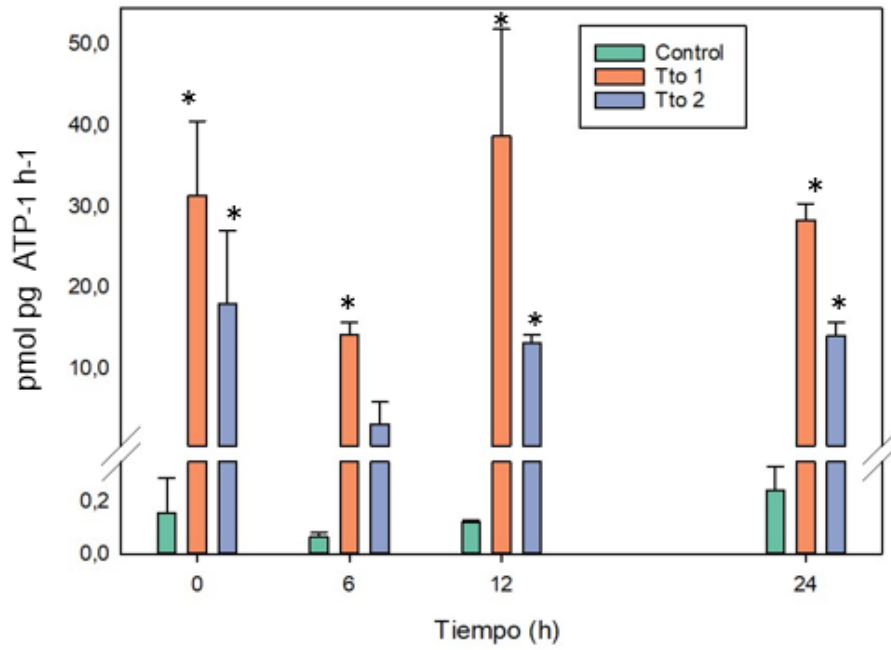


Figura 5 (Anexo). Tasa actividad enzimática extracelular de b-glucosidasa específica (B-Glu/ATP) en la comunidad microbiana expuesta a detergente durante 24 h.

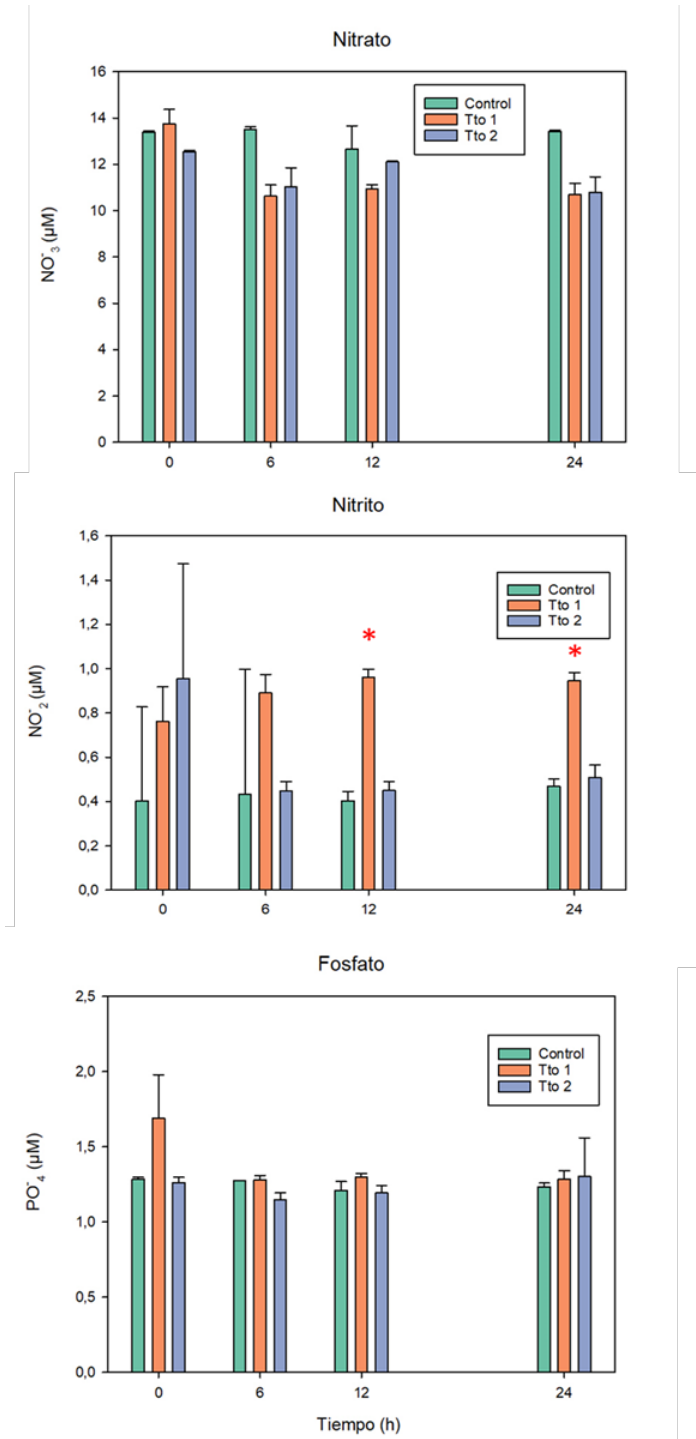


Figura 6 (Anexo). Concentración de nutrientes [μM] para cada tratamiento y tiempo de incubación de los microcosmos expuestos al detergente DM-500. Control (sin adición de detergente), Tto1 (tratamiento 1; 1:500) Tto 2 (tratamiento 2; 1:1000).

Citogramas Experimentos Detergentes.

En verde, corresponde a identificación de Bacterias + Arqueas.

En rojo, corresponde a micro esferas (beads) de 1 μm .

El código o numero en cada citograma, esta referenciado en el ID_Sample del archivo excel IF_DFARIÑA_05042023.

➤ Columna de Agua

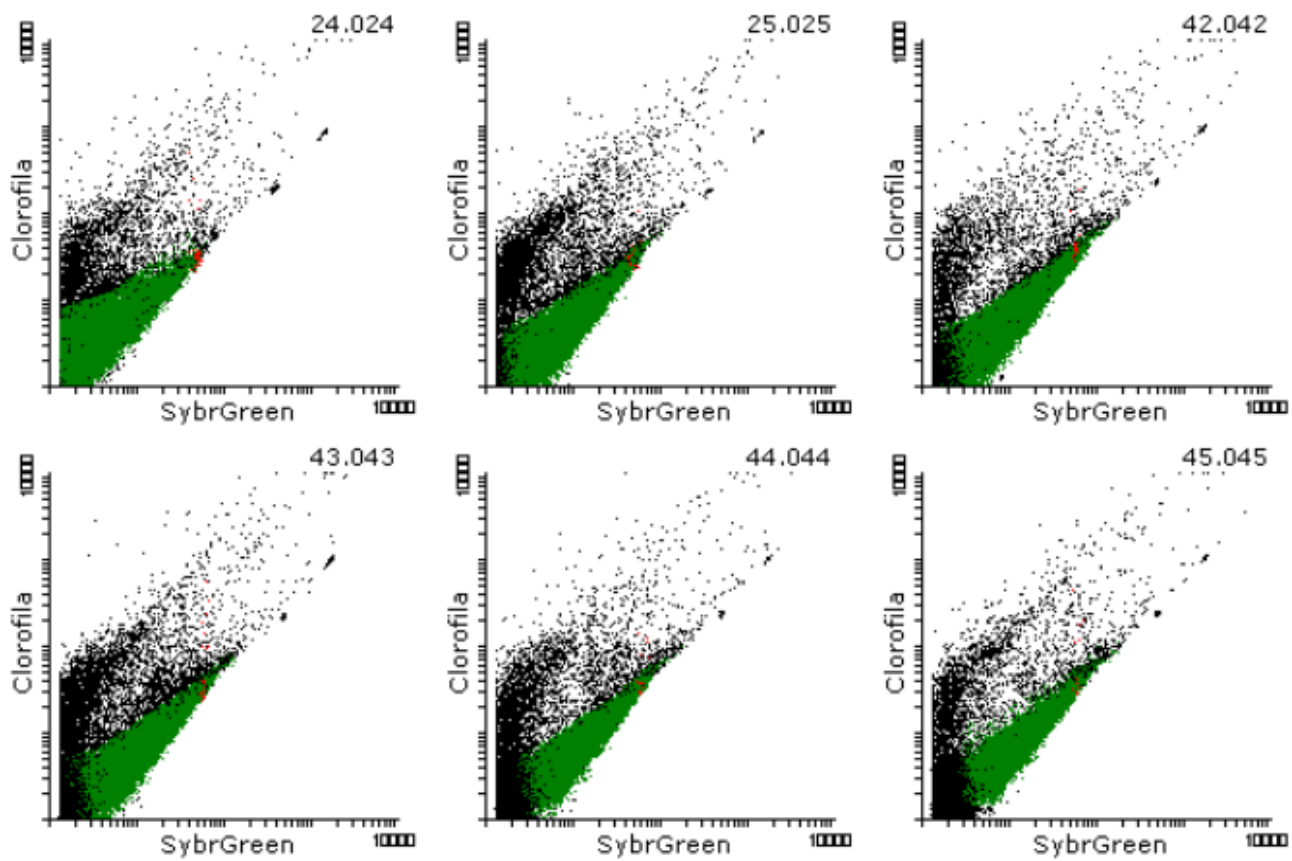


Figura 7. (Anexo) Citograma de flujo de la muestra ambiental de Achaó, Chiloé.

➤ Control

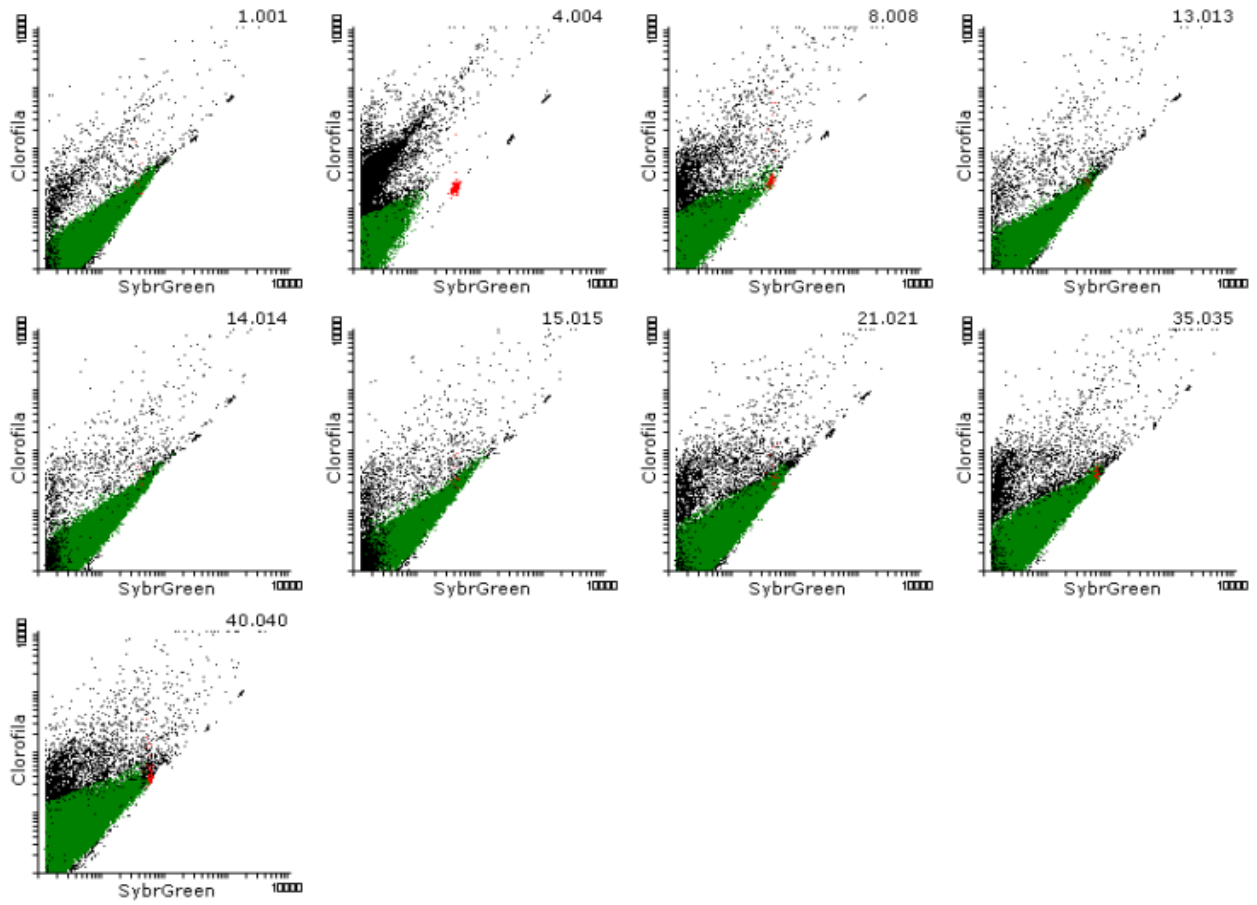


Figura 8. (Anexo) Citograma de flujo del Control experimental (sin adición de detergente).

➤ Tratamientos (T1 -> 006, 007, 010, 016; T2 -> 002, 005, 009, 018;

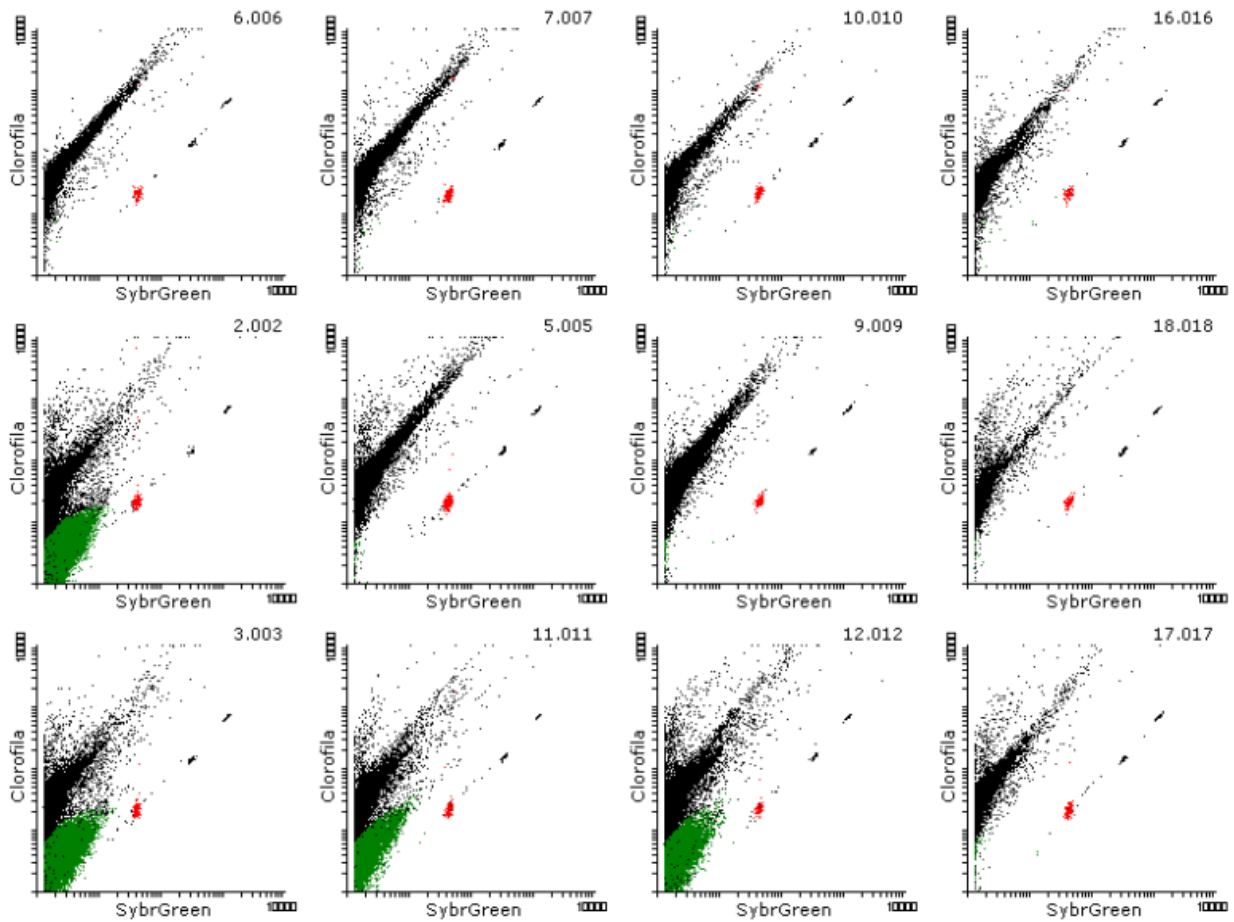


Figura 9. (Anexo) Citograma de flujo para cada tratamiento y tiempo de incubación de los microcosmos expuestos al detergente DM-500. Tto1 (tratamiento 1; 1:500) Tto 2 (tratamiento 2; 1:1000).

Tabla 1. (Anexo) Variables transformadas

| Variable | Transformación |
|-----------------|-----------------------|
| ATP | $y = x^2$ |
| MDH | $\ln(x)$ |
| R | $y = x^2$ |
| Nitrito | $1/x$ |
| Nitrato | $\ln(x)$ |
| Fosfato | $\ln(x)$ |
| Cl-a | $\ln(x)$ |

Tabla 2. (Anexo) Diferencias significativa test Tukey (HSD) para las variables MDH, β -glucosidasa, H, R, AWCD, nutrientes, Clorofila y citometría de flujo; entre el control y los tratamientos 1 y 2.

| Lugar | Tiempo | Tratamiento | MDH | B-GLU | H | R | AWCD | NO3- | NO2- | PO-34 | Cl-a | Syn | PEuk | bact |
|-------|--------|-------------|---------|-----------------|---------------|--------|----------------|----------|-----------------|--------|----------------|--------|---------------|---------|
| Achoa | 0 | Tt 1 | 1,00000 | 0,000179 | 0,1933 | 0,9847 | 0,04823 | 1,00000 | 0,298017 | 0,2334 | 0,37028 | 0,0636 | 0,0636 | 0,19843 |
| | | Tt 2 | 0,31292 | 0,259528 | 0,3566 | 0,9104 | 0,0352 | 1,00000 | 0,184106 | 1,0000 | 0,44855 | 0,9887 | 0,9887 | 0,98239 |
| | 6 | Tt 1 | 0,97803 | 0,999748 | 0,2923 | 0,9104 | 0,28861 | 0,999708 | 0,246003 | 1,0000 | 0,05105 | 0,4981 | 0,4981 | 0,63336 |
| | | Tt 2 | 0,75638 | 0,855929 | 0,3056 | 1 | 0,02543 | 0,997792 | 1,000000 | 0,9986 | 0,00092 | 0,8941 | 0,8941 | 0,99918 |
| | 12 | Tt 1 | 0,19869 | 0,158869 | 0,3844 | 0,7395 | 0,07372 | 1,00000 | 0,069446 | 1,0000 | 0,00618 | 0,9708 | 0,9708 | 0,49811 |
| | | Tt 2 | 0,98198 | 0,007341 | 0,0002 | 0,9847 | 0,9991 | 0,599401 | 1,000000 | 1,0000 | 0,01103 | 0,9984 | 0,9984 | 0,97843 |
| | 24 | Tt 1 | 0,75244 | 0,00018 | 0,2373 | 1 | 0,9653 | 0,998829 | 0,372387 | 1,0000 | 0,00019 | 0,9985 | 0,9985 | 0,19434 |
| | | Tt 2 | 0,66495 | 1,000000 | 0,9763 | 0,9104 | 0,00022 | 0,999323 | 1,000000 | 1,0000 | 0,00223 | 0,990 | 0,0477 | 1,00000 |

Tabla 3. (Anexo) Comparación múltiple p value, datos ATP para la variable de los tratamientos mediante la prueba no paramétrica Kruskal Wallis

| ATP | Tt 1 | Tt 2 |
|----------------|----------------|-----------------|
| Control | 0,00000 | 0,000013 |
| Tt1 | | 1,000000 |
| Tt2 | 1,0000000 | |