

UCH - FC
6 - Ambiental
7 - 693
C. 1

UNIVERSIDAD DE CHILE-FACULTAD DE CIENCIAS-ESCUELA DE PREGRADO



EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN A COMPUESTOS AROMÁTICOS SOBRE LA ESTRUCTURA COMUNITARIA MICROBIANA EN UN SUELO SALINO.

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al título de:

Químico Ambiental.

Felipe Ernesto Torres Rojas

Director del Seminario de Título:

Dr. Bernardo González Ojeda

Co-Director:

Gustavo Rodríguez V.

Patrocinante:

Dr. David Véliz

Semestre Otoño 2016

Santiago – Chile





INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la candidata:

FELIPE ERNESTO TORRES ROJAS

“EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A COMPUESTOS AROMÁTICOS SOBRE LA ESTRUCTURA COMUNITARIA MICROBIANA EN UN SUELO SALINO.”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Químico Ambiental

COMISIÓN DE EVALUACIÓN

Dra. Bernardo González O.

Director Seminario de Título

P.P. [Signature]

Dr. David Véliz B.

Profesor Patrocinante

[Signature]

Dra. Julieta Laura Orlando

Presidente

[Signature]

Dra. María Cecilia Rojas G.

Corrector

M. Cecilia Rojas G.

Santiago de Chile, Marzo de 2016

DEDICATORIA.

Este trabajo va dedicado a mis "tatas" y todas las personas que siembran la semilla de la imaginación y la curiosidad por entender el mundo que nos rodea.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco a mis padres por apoyarme e ir comprendiendo el camino que quiero formar al realizar este trabajo. También debo agradecer a mis hermanos por apoyarme en los malos y buenos momentos que transcurrieron durante el desarrollo de esta investigación.

Durante el desarrollo de este trabajo mi segunda casa fue el laboratorio C de bioingeniería, siendo un colonizador junto a "kike", quien ahora es uno de los buenos amigos que tengo. En la estadía en este laboratorio fue vital la presencia de Gustavo Rodríguez mi cotutor de tesis, que mas bien, debo agradecer a la vida por situarlo en mi camino.

No puedo olvidar en esos momentos a Tammy, quien la conocí en el transcurso del trabajo otorgándome su apoyo y confianza, la que ahora se ha convertido en una buena compañera de viaje de la vida.

Agradezco la oportunidad y la confianza que depositó Bernardo González en mí, para desarrollar mi tesis en su laboratorio y quienes me acompañaron en este proceso de aprendizaje como los viejos amigos y los nuevos que conocí, un gran abrazo a todos y éxito en sus viajes personales....

ABREVIATURAS.

| | |
|---------|--|
| 2,4-D | ácido 2,4-diclorofenoxiacético |
| 4-HB | ácido 4-hidroxibenzoico |
| BSA | albúmina de suero de bovino |
| CEe | conductividad eléctrica del extracto |
| CEsusp. | conductividad eléctrica en suspensión |
| DNA | ácido desoxirribonucleico |
| dNTPs | desoxirribonucleótido trifosfato |
| EDTA | ácido etilendiaminotetraacético |
| HPLC | cromatografía líquida de alta resolución |
| kb | kilo pares de bases |
| M.O. | materia orgánica |
| NMDS | escalamiento multi-dimensional no métrico |
| OTU | unidad taxonómica operacional |
| pb | pares de bases |
| PCR | reacción en cadena de la polimerasa |
| Phe | fenol |
| RAS | relación de adsorción de sodio |
| TAE | tris/acetato/EDTA |
| Taq | DNA polimerasa de <i>Thermophilusaquaticus</i> |
| T-RFLP | polimorfismo en el largo del fragmento de restricción terminal |
| Tris | tri(hidroximetil)amino-metano |
| Tyr | tirosina |

TABLA DE CONTENIDOS.

| | |
|--|------|
| PORTADA..... | i |
| DEDICATORIA..... | ii |
| AGRADECIMIENTOS..... | iii |
| ABREVIATURAS..... | iv |
| TABLA DE CONTENIDOS..... | v |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | viii |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | xii |
| RESUMEN..... | xiii |
| ABSTRACT..... | xv |
| I.INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1 Antecedentes Generales..... | 1 |
| 1.1.1 Degradación de suelos y actividad microbiana..... | 1 |
| 1.1.2 Características químicas de suelos salinos..... | 1 |
| 1.1.3 Contaminantes Orgánicos en suelos salinos..... | 2 |
| 1.1.4 Microorganismos como bioindicadores de degradación de suelos..... | 4 |
| 1.1.5 Microorganismos halófilos y sus mecanismos de adaptación a condiciones de salinidad..... | 5 |
| 1.1.6 Uso potencial de microorganismos halófilos en la biorremediación de suelos degradados..... | 6 |
| 1.1.7 Variaciones de índices ecológicos como medida de perturbación del ecosistema..... | 12 |
| 1.1.8 Propuesta de Estudio..... | 13 |
| 1.1.9 Hipótesis..... | 16 |
| 1.1.10 Objetivo general..... | 16 |
| 1.1.11 Objetivos..... | 16 |

| | |
|---|-----------|
| II. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 17 |
| 2.1 Descripción del sitio de muestreo..... | 17 |
| 2.2 Obtención de las muestras de las Salinas Lo Valdivia..... | 18 |
| 2.3 Montaje de microcosmos de suelo de las Salinas Lo Valdivia..... | 19 |
| 2.4 Análisis de porcentaje de remoción de los compuestos aromáticos en los microcosmos de suelo salino por HPLC..... | 20 |
| 2.5 Extracción de DNA metagenómico y amplificación de las secuencias de rRNA 16S de bacterias y arqueas para el análisis de los cambios en las estructuras comunitarias por T-RFLP..... | 24 |
| 2.6 Manejo y análisis estadístico de los datos obtenidos mediante T-RFLP..... | 25 |
| 2.7 Aislamiento e identificación de microorganismos con capacidades degradativas de compuestos aromáticos en condiciones de alta salinidad..... | 26 |
| III. RESULTADOS..... | 28 |
| 3.1 Caracterización química de la muestra de suelo proveniente de Las Salinas Lo Valdivia..... | 28 |
| 3.2 Remoción de 2,4-D, 4-HB, Phe y Tyr en el transcurso del tiempo en los microcosmos de suelo salino..... | 29 |
| 3.3. Estudio de los cambios en las estructuras comunitarias de bacterias y arqueas en los microcosmos de suelo salino expuesto a Phe, 4-HB, 2,4-D y Tyr..... | 31 |
| 3.3.1 Cambios en los índices ecológicos de las comunidades de bacterias y arqueas, a partir de los perfiles de T-RFLP..... | 33 |
| 3.3.2 Cambios en la estructura comunitaria de bacterias y arqueas en el suelo salino por análisis de NMDS..... | 41 |
| 3.4 Aislamiento de microorganismos en medios selectivos utilizando compuestos aromáticos como única fuente de carbono..... | 52 |

| | |
|---|-----------|
| IV. DISCUSIÓN..... | 54 |
| 4.1 Características químicas del suelo de las salinas Lo Valdivia..... | 54 |
| 4.2 Dinámica de las comunidades microbianas del suelo salino-sódico..... | 55 |
| 4.3 Potenciales degradadores de compuestos aromáticos y su uso en remediación ambiental..... | 59 |
| V. CONCLUSIONES..... | 61 |
| VI. REFERENCIAS..... | 62 |
| VII. ANEXOS..... | 74 |

ÍNDICE DE FIGURAS.

| | | |
|-------------------|---|----|
| Figura 1: | Distribución mundial de los suelos afectados por la salinidad en las zonas costeras..... | 3 |
| Figura 2: | Ruta biodegradativa del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) codificado por los genes <i>tfd</i> en <i>Cupriavidus necator</i> JMP134 (Kumar, A., <i>et al.</i> , 2014)..... | 7 |
| Figura 3: | Ruta biodegradativa del ácido 4-hidroxibenzoico descrito en <i>Haloferax</i> sp. cepa D1227, considerando las enzimas numeradas; 1 = 4-hidroxibenzoate 3-monooxigenasa; 2 = 3,4-dioxigenasa; 3 = 3-carboxymuconate cicloisomerasa; 4 = 4-carboxymuconolactone-decatboxilasa; 5 = β -ceto adipato enol lactona hidrolasa; 6 = β -ceto adipato CoA thiloasa (Zhuang, X., <i>et al.</i> , 2010)..... | 8 |
| Figura 4: | Ruta biodegradativa del fenol (Phe) tanto por la vía orto y meta descrita en <i>Pseudomonas putida</i> considerando las enzimas involucradas en números; 1 = Phenol 2 monooxigenasa; 2 = Catecol 2,3 diooxigenasa; 3 = Catecol 1,2 diooxigenasa; 4 = Muconato lactonasa; 5 = Mucolactona isomerasa; 6 = β -ceto adipato enol lactonasa; 7 = transferasa ; 8 = Acetiltransferasa / Tiolasa ; 9 = 2 hidroximuconato semialdehído hidrolasa; 10 = 2 oxopent 4-enoato hidratasa; 11 = 4 hidroxil 2 oxovalenato aldolasa (Feist, C. F., & Hegeman, G. D., 1969)..... | 9 |
| Figura 5: | Ruta biodegradativa de la tirosina (Tyr) por <i>Pseudomonas putida</i> mediado por las enzimas; 1 = tirosina aminotransferasa; 2 = 4-hidroxifenilpiruvato-diooxigenasa, 3 = homogentisato diooxigenasa; 4 = isomerasa maleicetoacetate (Arias-Barrau, E., <i>et al.</i> , 2004)..... | 10 |
| Figura 6: | Salinas Lo Valdivia. Ubicación geográfica (34°41'50.16"S, 72°00'44.3"O), y vista aérea de "La Boca"..... | 17 |
| Figura 7: | Sitio preciso de obtención de la muestra de suelo en las Salinas Lo Valdivia..... | 18 |
| Figura 8: | Curva de calibración de fenol (Phe)..... | 21 |
| Figura 9: | Curva de calibración del ácido 4- hidroxibenzoico (4-HB)..... | 21 |
| Figura 10: | Curva de calibración de tirosina (Tyr)..... | 22 |
| Figura 11: | Curva de calibración del ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D)..... | 22 |
| Figura 12: | Porcentaje de remoción para el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), el ácido 4-hidroxibenzoico (4-HB), el fenol (Phe) y la tirosina (Tyr). Los análisis de remoción son los correspondientes al monitoreo a los días 1, 15 y | |

| | | |
|-------------------|---|----|
| | 30, a una concentración de 5 mM, en los microcosmos de suelo salino..... | 30 |
| Figura 13: | Porcentaje de remoción para el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), el ácido 4-hidroxibenzoico (4-HB), el fenol (Phe) y la tirosina (Tyr). Los análisis de remoción son los correspondientes al monitoreo a los días 1, 15 y 30, a una concentración de 20 mM en los microcosmos de suelo salino..... | 31 |
| Figura 14: | Detección de bacterias a partir de la amplificación de genes de rRNA 16S para el tratamiento con 4-HB. Las letras a, b y c representan las réplicas ordenadas por el tiempo de monitoreo al día 1, 15 y 30, para las concentraciones 5 mM y 20 mM. Los últimos dos carriles corresponden al control negativo (-) y al estándar de peso molecular de 1 kb..... | 32 |
| Figura 15: | Detección de arqueas a partir de la amplificación de genes de rRNA 16S para el tratamiento con 4-HB. Las letras a, b y c representan las réplicas ordenadas por el tiempo de monitoreo al día 1, 15 y 30, para las concentraciones 5 mM y 20 mM. Los dos últimos carriles corresponden al control negativo (-) y al estándar de peso molecular de 1 kb..... | 32 |
| Figura 16: | Cambios temporales del índice de diversidad (H') para las comunidades bacterianas presentes en cada tratamiento, al exponerlas a una concentración de 5 mM..... | 35 |
| Figura 17: | Cambios temporales del índice de diversidad (H') para las comunidades bacterianas presentes en cada tratamiento, al exponerlas a una concentración de 20 mM..... | 35 |
| Figura 18: | Cambios temporales del índice de equidad (J) para las comunidades bacterianas presentes en cada tratamiento, al exponerlas a una concentración de 5 mM..... | 36 |
| Figura 19: | Cambios temporales del índice de equidad (J) para las comunidades bacterianas presentes en cada tratamiento, al exponerlas a una concentración de 20 mM..... | 36 |
| Figura 20: | Cambios temporales del índice de riqueza (S) para las comunidades bacterianas presentes en cada tratamiento, al exponerlas a una concentración de 5 mM..... | 37 |
| Figura 21: | Cambios temporales del índice de riqueza (S) para las comunidades bacterianas presentes en cada tratamiento, al exponerlas a una concentración de 20 mM..... | 37 |

| | | |
|-------------------|--|----|
| Figura 22: | Cambios temporales del índice de diversidad (H') para las comunidades de arqueas presentes en cada tratamiento, al exponerlas a una concentración de 5 mM..... | 38 |
| Figura 23: | Cambios temporales del índice de diversidad (H') para las comunidades de arqueas presentes en cada tratamiento, al exponerlas a una concentración de 20 mM..... | 38 |
| Figura 24: | Cambios temporales del índice de equidad (J) para las comunidades de arqueas presentes en cada tratamiento, al exponerlas a una concentración de 5 mM..... | 39 |
| Figura 25: | Cambios temporales del índice de equidad (J) para las comunidades de arqueas presentes en cada tratamiento, al exponerlas a una concentración de 20 mM..... | 39 |
| Figura 26: | Cambios temporales del índice de riqueza (S) para las comunidades de arqueas presentes en cada tratamiento, al exponerlas a una concentración de 5 mM..... | 40 |
| Figura 27: | Cambios temporales del índice de riqueza (S) para las comunidades de arqueas presentes en cada tratamiento, al exponerlas a una concentración de 20 mM..... | 40 |
| Figura 28: | Análisis de las gráficas de Escalamiento Multi-Dimensional No Métrico (NMDS), para todos los tratamientos al día 1. Se observan las diferencias entre las estructuras comunitarias de bacterias, generadas utilizando la enzima AluI..... | 42 |
| Figura 29: | Análisis de las gráficas de Escalamiento Multi-Dimensional No Métrico (NMDS), para todos los tratamientos al día 15. Se observan las diferencias entre las estructuras comunitarias de bacterias, generadas utilizando la enzima AluI..... | 42 |
| Figura 30: | Análisis de las gráficas de Escalamiento Multi-Dimensional No Métrico (NMDS), para todos los tratamientos al día 30. Se observan las diferencias entre las estructuras comunitarias de bacterias, generadas utilizando la enzima AluI..... | 43 |
| Figura 31: | Análisis de las gráficas de Escalamiento Multi-Dimensional No Métrico (NMDS), para todos los tratamientos al día 1. Se observan las diferencias entre las estructuras comunitarias de arqueas, generadas utilizando la enzima AluI..... | 44 |
| Figura 32: | Análisis de las gráficas de Escalamiento Multi-Dimensional No Métrico (NMDS), para todos los tratamientos al día 15. Se observan las diferencias entre las estructuras comunitarias de arqueas, generadas utilizando la enzima AluI..... | 45 |

| | | |
|-------------------|--|----|
| Figura 33: | Análisis de las gráficas de Escalamiento Multi-Dimensional No Métrico (NMDS), para todos los tratamientos al día 30. Se observan las diferencias entre las estructuras comunitarias de arqueas, generadas utilizando la enzima AluI..... | 45 |
| Figura 34: | Efecto de la concentración de tirosina (Tyr) en la estructura comunitaria bacteriana en los tiempos 1, 15, y 30 d..... | 47 |
| Figura 35: | Efecto de la concentración del ác. 4-hidroxibenzoico (4-HB) en la estructura comunitaria bacteriana en los tiempos 1, 15, y 30 d..... | 47 |
| Figura 36: | Efecto de la concentración de fenol (Phe) en la estructura comunitaria bacteriana a los 1, 15, 30 días..... | 48 |
| Figura 37: | Efecto de la concentración de fenol (Phe) en la estructura comunitaria bacteriana en los tiempos 1, 15, y 30 d..... | 48 |
| Figura 38: | Efecto de la concentración de tirosina (Tyr) en la estructura comunitaria de arqueas en los tiempos 1, 15, y 30 d..... | 49 |
| Figura 39: | Efecto de la concentración del ácido 4-hidroxibenzoico (4-HB) en la estructura comunitaria de arqueas en los tiempos 1, 15, y 30 d..... | 49 |
| Figura 40: | Efecto de la concentración de fenol (Phe) en la estructura comunitaria de arqueas en los tiempos 1, 15, y 30 d..... | 50 |
| Figura 41: | Efecto de la concentración del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en la estructura comunitaria de arqueas en los tiempos 1, 15, y 30 d..... | 50 |

ÍNDICE DE TABLAS.

| | | |
|-----------------|--|----|
| Tabla 1: | Clasificación de microorganismos halófilos según el rango de salinidad..... | 5 |
| Tabla 2: | Elaboración de las curvas de calibración de phe, 4-HB, 2,4-D y Tyr, considerando LOD y LOC..... | 23 |
| Tabla 3: | Caracterización química del suelo de las salinas Lo Valdivia basada en los protocolos de la Comisión Nacional de Acreditación (CNA) de la Ciencia del Suelo..... | 29 |
| Tabla 4: | Identificación mediante el análisis de identidad de las secuencias (BLASTn) de las cepas con capacidad para crecer en compuestos aromáticos como única fuente de carbono en condiciones del 15% de salinidad, aisladas desde la muestra de suelo de las Salinas Lo Valdivia..... | 53 |

RESUMEN.

En este estudio se abordó el problema de los suelos salinos que se exponen a compuestos aromáticos provenientes de las descargas de efluentes agroindustriales, desde el análisis de los cambios en las estructuras comunitarias de bacterias y arqueas, como microorganismos bioindicadores del nivel de perturbación.

Estas comunidades microbianas, que se adaptan a los ambientes salinos (suelos hipersalinos), se expusieron a tres contaminantes presentes en los residuos industriales que se han utilizado a menudo como modelos de estudio de la contaminación antropogénica: fenol (Phe), ácido 4-hidroxibenzoico (4-HB) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Además, se agregó la tirosina (Tyr) en el diseño experimental, porque es un compuesto aromático considerado como un componente no tóxico para la microbiota.

El efecto producido por estos compuestos en suelos salinos se analizó a través de cambios en las estructuras de las comunidades después de 1, 15 y 30 días de exposición. Para ello, se utilizó un método molecular independiente de cultivo, el Polimorfismo en el Largo de Fragmentos Terminales de Restricción (T-RFLP). Para ensayar los efectos de cada compuesto en el suelo, se utilizaron microcosmos experimentales de suelo salino, aplicando dos concentraciones a 5 y 20 mM de cada compuesto. Los cambios en las comunidades microbianas se determinaron mediante el uso de los índices ecológicos de diversidad (H'), equidad (J) y riqueza (S) y el cálculo de matriz de similitud a partir del índice de Bray-Curtis, visualizado en gráficas de Escalamiento Multidimensional No Métrico (NMDS).

Los resultados indican que las comunidades más afectadas fueron las expuestas a 2,4-D y Phe, en ambas concentraciones, presentando bajos valores de diversidad (H') y equidad (J) y rápidas diferenciaciones estructurales con respecto a la exposición a 4-HB y Tyr. Esto fue corroborado por los resultados observados con cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) en cuanto a la eliminación de compuestos aromáticos, siendo el compuesto que mostró los niveles más bajos de eliminación de todo el experimento 2,4-D (30% y 14% de eliminación a 5 y 20 mM, respectivamente, después de 30 días de exposición), mientras que Phe se eliminó en un 93% y 77% a 5 y 20 mM, respectivamente.

En cambio, los compuestos 4-HB y Tyr se eliminaron cerca del 99% en ambas concentraciones después de 30 días.

Finalmente, se utilizaron técnicas microbiológicas de cultivo para el aislamiento de bacterias capaces de crecer en condiciones de salinidad del 15% de NaCl y en concentraciones de 5 mM en estos compuestos. En el aislamiento el género *Halomonas* fue el que mostró la mayor versatilidad hacia la degradación de los compuestos aromáticos. Los métodos utilizados en este trabajo son útiles para hacer frente a los efectos de las perturbaciones de los contaminantes aromáticos en suelos salinos.

ABSTRACT.

This study considers the problem of saline soils exposed to aromatic compounds from agro-industrial effluent discharges, analyzing the changes in community structures of Bacteria and Archaea as bioindicator microorganisms of the level of disturbance.

These microbial communities, which are adapted to saline environments (hypersaline soils) were exposed to three pollutants present in industrial wastes which have been often used as study models of anthropogenic pollution: phenol (Phe), 4-hydroxybenzoic acid (4-HB) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). In addition, tyrosine (Tyr) was added in the experimental design, because, it is considered as a non-toxic aromatic component for microbiota.

The effect produced by these compounds in saline soil was analyzed through changes in community structures after 1, 15 and 30 days of exposure the Length Polymorphisms (T-RFLP), was used. To test the effects of each compound on the soils, microcosms were used, applying two concentrations to 5 and 20 mM of each compound. Changes in microbial communities were determined by use of the ecological indexes of diversity (H'), evenness (J) and richness (S) and calculating similarity matrix from Bray-Curtis index, displayed in graphs of Non Metric Multidimensional Scaling (NMDS).

Results indicated that the more affected communities were those exposed to 2,4-D and Phe, in both concentrations, presenting low values of diversity (H) and evenness (J) and rapid structural differentiation with respect to exposition to 4-HB and Tyr. This was corroborated by the results observed with High Performance Liquid Chromatography (HPLC) regarding the removal of aromatic compounds, as the compound that showed the lowest levels of removal throughout the experiment was 2,4-D (30% and 14% removal at 5 and 20 mM, respectively, after 30 days of exposure), whereas Phe was removed by 93% and 77% at 5 and 20 mM, respectively. In contrast, both 4-HB and Tyr were removed close to 99% at both concentrations after 30 days.

Culture microbiological techniques were used for isolation of bacteria able to grow on 5 mM of these compounds as the sole carbon source, under 15% salinity. Among the isolates the genus *Halomonas* showed higher versatility towards degradation of aromatic

compounds. The methods used in this work are useful to address the effect of aromatic pollutant disturbances on saline soils.

I. INTRODUCCIÓN.

1.1. Antecedentes Generales.

1.1.1. Degradación de suelos y actividad microbiana.

Para mantener la estructura y calidad de un suelo es fundamental conocer el estado de los componentes bióticos (Dick, R. P., 1992; de-Bashan, L. E., y col., 2012). La actividad microbiana hace posible la circulación de los componentes abióticos, favoreciendo el intercambio de compuestos químicos que intervienen en los procesos que mantienen la estructura del suelo (Bronick, C. J. & Lal, R., 2005; Garrigues, E., y col., 2012).

Por otro lado, las distintas historias formativas de los suelos, que dependen de los efectos climatológicos, hacen de los suelos ambientes sumamente heterogéneos, complejos y particulares (Zhao, G., y col., 2013). Los ecosistemas de suelos son sensibles a las perturbaciones ambientales tanto naturales como antrópicas, sin embargo algunos ecosistemas, dada su estructura particular, son más vulnerables a la degradación (Darwish, T., y col., 2005).

En gran medida, el bajo nivel de resiliencia de un ecosistema se relaciona con la pérdida de diversidad microbiana edáfica, por lo que el estudio de la biodiversidad microbiana se ha convertido en un componente fundamental en el campo de la salud del suelo (Tripathi, S., y col., 2006).

1.1.2. Características químicas de suelos salinos.

Existen algunos ambientes naturales que presentan una particular sensibilidad frente a la degradación; un ejemplo de éstos son los suelos salinos (Gao, J. & Liu, Y., 2010). Estos suelos se caracterizan por poseer una alta concentración de iones (Ca^{+2} , Mg^{+2} , $(\text{HCO}_3)^-$, $(\text{SO}_4)^{2-}$, $(\text{CO}_3)^{2-}$, Na^+ , K^+ , Cl^-) y un bajo nivel de materia orgánica (M.O.) (Abd Elrahman S. H., y col., 2012).

Estos elementos pueden modificar la estructura del suelo, por lo que se han establecido como parámetros para distinguir las condiciones de salinidad de los suelos (Rhoades, J. D., 1996; Pathak, H. & Rao, D. L. N., 1998). Un parámetro que se ha propuesto para determinar el nivel de salinidad, ha sido determinar los iones presentes en el suelo, por medio de la conductividad eléctrica del extracto (CE_e) (Rhoades, J. D., 1996).

Cuando la CE_e se encuentra sobre 4 dScm^{-1} , se dice que el suelo se encuentra salino (Rengasamy, P., 2006). Sin embargo, la presencia o ausencia principalmente de iones (Ca^{+2} , Mg^{+2} , $(\text{HCO}_3)^-$, $(\text{SO}_4)^{2-}$, $(\text{CO}_3)^{2-}$, Na^+ , K^+ , Cl^-), permite distinguir entre un suelo salino, sódico o salino-sódico. Particularmente, utilizando la Relación de Adsorción de Sodio (RAS), se puede distinguir entre un suelo salino o sódico (Rietz, D. N. & Haynes, R. J., 2003).

Cuando el suelo presenta un $\text{RAS} > 13$ y un $\text{pH} > 8,5$, se denomina sódico, pero cuando solo esta última condición disminuye, el suelo corresponde al tipo salino-sódico (Gupta, R. K. & Abrol, I. P., 1990). Estas diferencias se deben principalmente al aumento de los iones Na^+ con respecto a los iones Ca^{2+} y Mg^{2+} . El intercambio de estos iones en el suelo provoca características sódicas que desestabilizan la estructura del suelo (Qadir, M. & Schubert, S., 2002).

1.1.3 Contaminantes Orgánicos en suelos salinos.

Los ambientes salinos se han incrementado en todo el planeta producto de la salinización natural y la contaminación generada por las descargas de efluentes industriales de la agroindustria textil, farmacéutica, refinería del petróleo y agricultura (Oren, A., y col., 1992; van der Meer, J. R., y col., 1992; Woolard, C. R. & Irvine, R. L., 1995; Rengasamy, P., 2006; Kılıç, K. & Kılıç, S., 2007) (Figura 1).

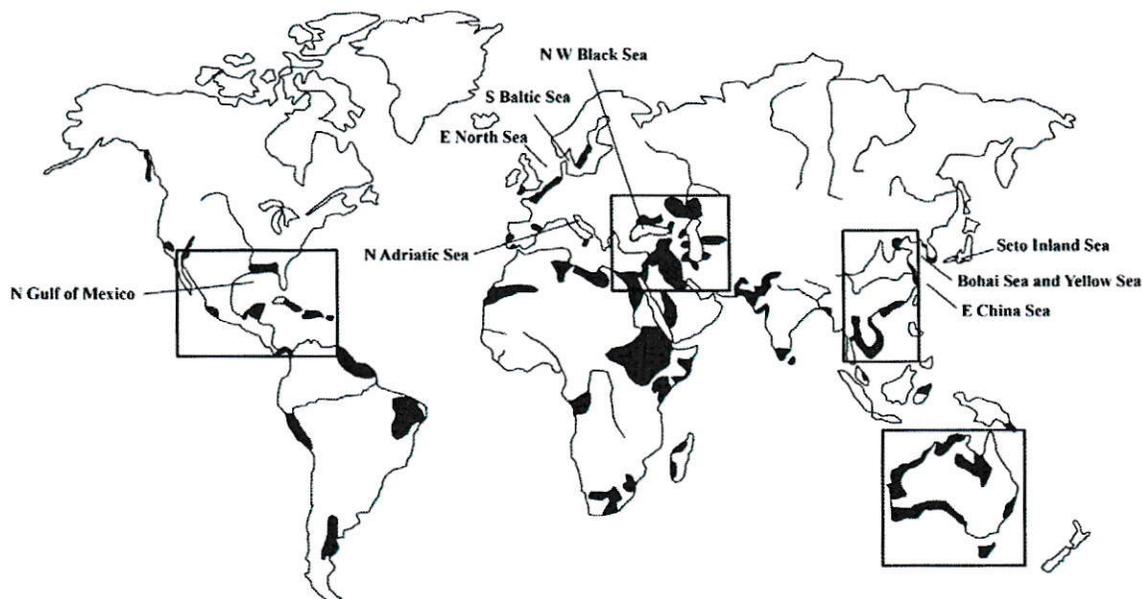


Figura 1. Distribución mundial de los suelos afectados por la salinidad en las zonas costeras (Sparks D. L., 2003).

Algunos de los compuestos orgánicos mayormente encontrados en estos sitios contaminados son los denominados COPs (Compuestos Orgánicos Persistentes), BTEX (Benceno, Tolueno, Etilbenceno y Xileno), alifáticos y compuestos aromáticos de bajo peso molecular, los que han generado un impacto al ser humano y al medio ambiente (Woolard, C. R. & Irvine, R. L., 1994; Flowers, T. J. & Yeo, A. R., 1995).

La mayoría de los compuestos de bajo peso molecular que se encuentran presentes en altas concentraciones en los desechos de las agroindustrias corresponden a los cloroaromáticos, ácidos fenólicos y sus derivados (Olaniran, A. O. & Igbinosa, E. O., 2011). A pesar que se conoce de la presencia de estos compuestos en los ambientes salinos, se desconoce su movilidad y persistencia en estos ambientes (Peyton, B. M., y col., 2002). En general, al ser compuestos solubles en agua poseen una alta movilidad, por lo que en ambientes salinos, donde la disponibilidad de agua es baja, se presume que estos compuestos tienen una baja movilidad y una alta persistencia, ya sea por la estabilización de éstos frente a la presencia de altos niveles de salinidad o por la baja

presencia de microorganismos para su biodegradación (Davezza, M., y col., 2013; Moussavi, G., y col., 2014).

Los ambientes salinos que se exponen a efluentes de la agroindustria, se espera que aumenten en los próximos años, debido principalmente al reemplazo del agua potable en los procesos productivos por agua de mar o aguas residuales, favoreciendo la formación de suelos salinos contaminados (Alva, V. A., & Peyton, B. M. 2003; Muyen, Z., y col., 2011; Gao, Y. C., y col., 2013).

Estos ambientes que presentan una alta salinidad y que además están contaminados, generan un escenario complejo y poco explorado en el suelo (Kleinstuber, S., y col., 2006). Sin embargo, gracias a la existencia de este tipo de ambientes complejos, ha resultado interesante intentar predecir las funciones ecosistémicas y la composición de las comunidades microbianas cuando éstas se enfrentan a perturbaciones de este tipo, ya que estas variables afectan la recuperación de los suelos (Robinson, C. J., y col., 2010; Zhou, J., y col., 2014; Schmidt, T. M. & Waldron, C., 2015).

1.1.4. Microorganismos como bioindicadores de degradación de suelos.

Los cambios a nivel microbiológico resultan útiles para conocer los efectos de las perturbaciones en el ambiente, ya que los microorganismos son sensibles a estas, lo que permite su uso como indicadores de la calidad del suelo (Nannipieri, P., y col., 2003; Feld, L., y col., 2015).

Esta sensibilidad se ha observado cuando persiste algún compuesto xenobiótico, afectando la actividad microbiana (Chowdhury, A., y col., 2008). Por ejemplo, se ha descrito que compuestos orgánicos de bajo peso molecular, como el paratión, presentan una disminución en su velocidad de biodegradación en suelos salinos, ya que la alta salinidad produce que este compuesto sea más estable en el ambiente, perjudicando la salud del suelo. Este efecto se ha relacionado principalmente a una menor diversidad microbiana en los ambientes salinos (Anjum, R., y col., 2012). A pesar de ello, aún hay

mucho desconocimiento en esta materia, particularmente de las características metabólicas que podrían poseer los microorganismos adaptados a los ambientes salinos para enfrentarse a la exposición a compuestos aromáticos de bajo peso molecular.

1.1.5. Microorganismos halófilos y su mecanismo de adaptación a condiciones de salinidad.

Los microorganismos que están adaptados a concentraciones elevadas de salinidad son los llamados halófilos. Estos microorganismos generalmente se encuentran presentes en ambientes salinos y pertenecientes tanto a los dominios Bacteria, Arquea como Eucaria, para los cuales se ha planteado una clasificación, basada en el rango de salinidad al que se encuentran adaptados (Tabla 1) (Oren A., 2002). Para resistir las condiciones adversas de estos ambientes salinos, los microorganismos halófilos han desarrollado mecanismos de adaptación, como acumular K^+ , Cl^- y solutos compatibles en el citoplasma (Beer, K. D., y col., 2014).

Estos últimos, son moléculas orgánicas de bajo peso molecular, solubles, que no interfieren con el metabolismo celular (Peyton, B. M., y col., 2002). Por otra parte, la presencia de Cl^- activa enzimas que desencadenan la biosíntesis de los solutos compatibles. Estos procesos permiten regular el pH interno celular, promoviendo la estabilidad osmótica y estructural. Los mecanismos de acumulación, junto al uso de bombas “antiport” Na^+/H^+ se presentan como las estrategias más comunes para combatir la alta salinidad (Ventosa, A., y col., 1998; Moberly, J. G., y col., 2010).

Tabla 1. Clasificación de microorganismos halófilos según el rango de salinidad.

| Halófilo | NaCl (mol/l) | NaCl %(p/v) |
|-----------------|-------------------------|------------------------|
| Débil | 0,17 – 0,51 | 1 – 3 |
| Moderado | 0,51 – 2,55 | 3 – 15 |
| Extremo | 2,55 – 5,44 | 15 – 32 |

Tomado de: (Kushner, D. J., 1993; Ventosa, A., y col., 1998.; Oren, A., 2013).

1.1.6. Uso potencial de microorganismos halófilos en la biorremediación de suelos degradados.

A partir de los estudios de Oren y col. (1992), se intensificó el interés por el estudio de los microorganismos halófilos para su posible uso en la biorremediación. Varios autores se han focalizado en el aislamiento de bacterias que habitan en ambientes salinos expuestos a diferentes tipos de compuestos provenientes de la agroindustria. Por ejemplo, se ha encontrado que bacterias halófilas pertenecientes a la familia *Halomonadaceae* presentan una alta versatilidad, dado que son capaces de degradar una variedad de compuestos aromáticos, en particular aquellas del género *Halomonas*.

Algunas especies de este género, aisladas desde suelos salinos, son capaces de crecer en medios con alta salinidad y compuestos aromáticos como única fuente de carbono. Por ejemplo, algunas especies de este género son capaces de degradar 2,2 mM de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) entre 35 a 58 g L⁻¹ de NaCl (Maltseva, O., y col., 1996), o de degradar 0,5 mM de fenol (Phe) con 100 g L⁻¹ de NaCl (Peyton, B. M, y col., 2002). Una de las especies más versátiles de este género es *Halomonas organivorans*, la que fue aislada a partir de suelos salinos y es capaz de degradar 5 mM de ácido 4-hidroxibenzoico (4-HB) al 10% de NaCl (García, M. T., y col., 2005; Zhuang, X., y col., 2010). Incluso la cepa *Halomonas* sp. PH2-2, es capaz de degradar 11 mM de Phe en 7 días al 15% de NaCl (Haddadi, A. & Shavandi, M., 2013).

Por otro lado, algunos investigadores se han enfocado en el aislamiento de arqueas halófilas, las que son capaces de crecer en condiciones hipersalinas. La mayoría de estos microorganismos crecen de manera óptima por encima de una concentración de 150 g L⁻¹ de NaCl, ya que a concentraciones inferiores (100 g L⁻¹ de NaCl) ocurren procesos de lisis celular (Andrei, A. S., y col., 2012). El primer estudio que reportó la degradación de los compuestos aromáticos por arqueas halófilas fue el de Emerson y col. (1994), quien trabajó con la cepa D1227 del género *Haloferax*, logrando que ésta creciera en ácido benzoico y ácido cinámico como únicas fuentes de carbono. También se ha visto que algunas especies del género *Haloferax* tienen la capacidad de degradar 4-HB a 1,5 mM

con 200 g L⁻¹ de NaCl (Orellana S. C., y col., 2012). Tanto en Chile como en otros países sudamericanos se han podido aislar arqueas halófilas desde salares y crecerlas utilizando 4-HB (0,4 mM) como única fuente de carbono con 200 g L⁻¹ de NaCl (Cuadros-Orellana S., y col., 2006).

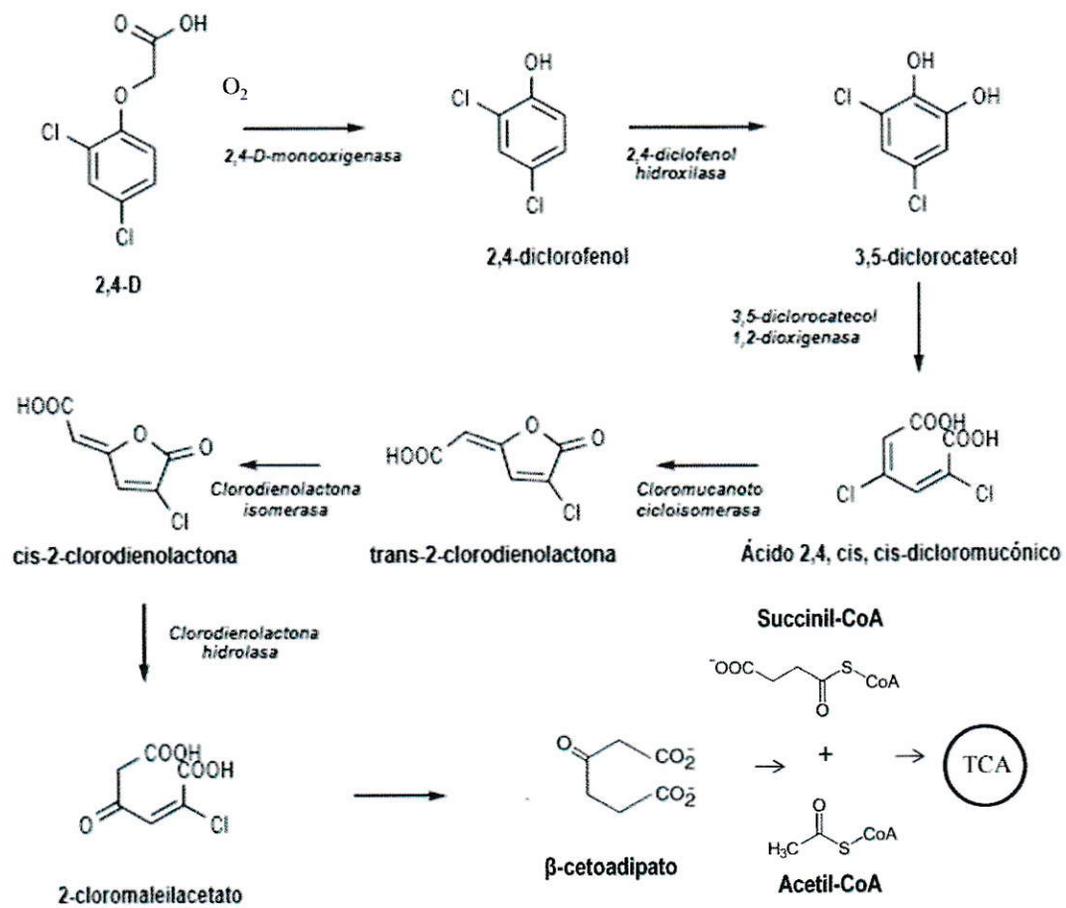


Figura 2. Ruta biodegradativa del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) codificado por los genes *tfd* en *Cupriavidus necator* JMP134 (Kumar, A., y col., 2014).

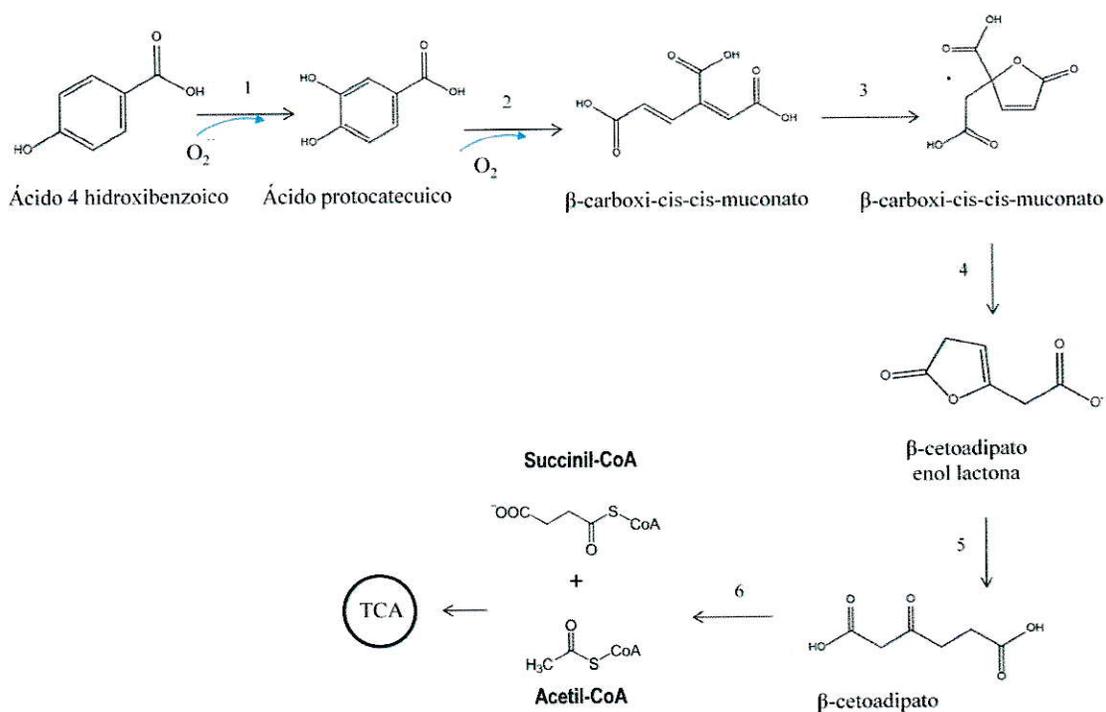


Figura 3. Ruta biodegradativa del ácido 4-hidroxibenzoico descrito en *Haloferax* sp. cepa D1227, considerando las enzimas numeradas; 1 = 4-hidroxibenzoate 3-monooxigenase; 2 = 3,4-dioxigenasa; 3 = 3-carboxymuconate cicloisomerasa; 4 = 4-carboxymuconolactone-decatboxilasa; 5 = β -cetoadipato enol lactona hidrolasa; 6 = β -cetoadipato CoA thioasa (Zhuang, X., y col., 2010)

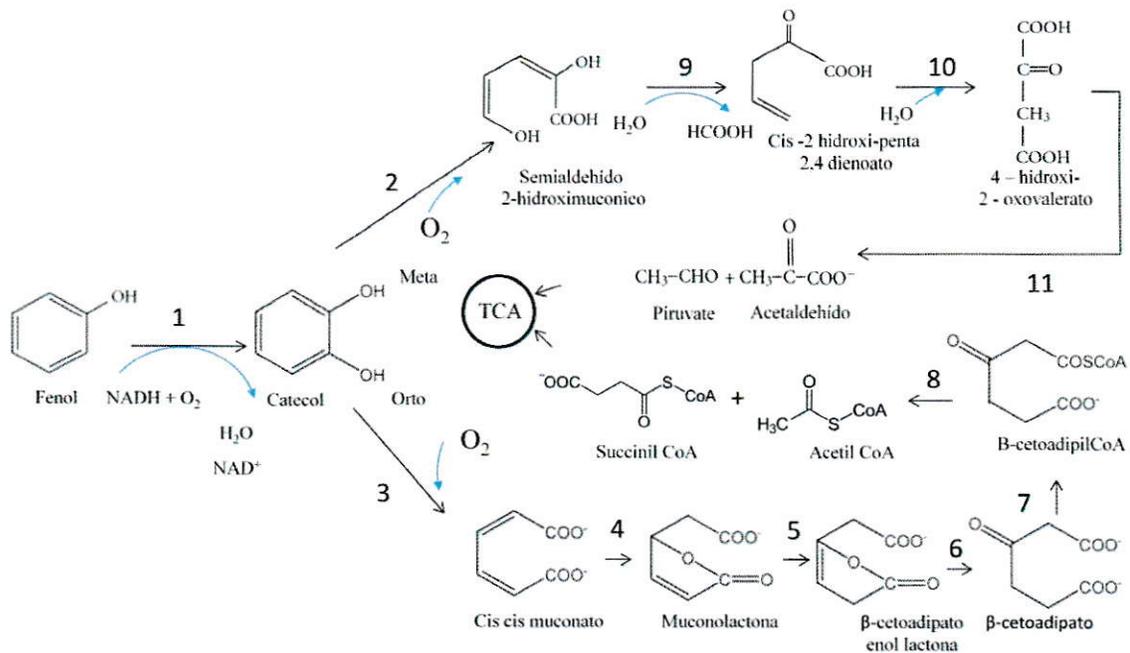


Figura 4. Ruta biodegradativa del fenol (Phe) tanto por la vía orto y meta descrita en *Pseudomonas putida* considerando las enzimas involucradas en números; 1 = Phenol 2 monooxygenasa; 2 = Catecol 2,3-dioxygenasa; 3 = Catecol 1,2-dioxygenasa; 4 = Muconato lactonasa; 5 = Mucolactona isomerasa; 6 = β -cetoadipato enol lactonasa ; 7 = transferasa ; 8 = Acetiltransferasa / Tiolasa; 9 = 2-hidroximuconato semialdehído hidrolasa; 10 = 2-oxopent 4-enoato hidratasa; 11 = 4-hidroxio 2-oxovalerato aldolasa (Feist, C. F., & Hegeman, G. D., 1969).

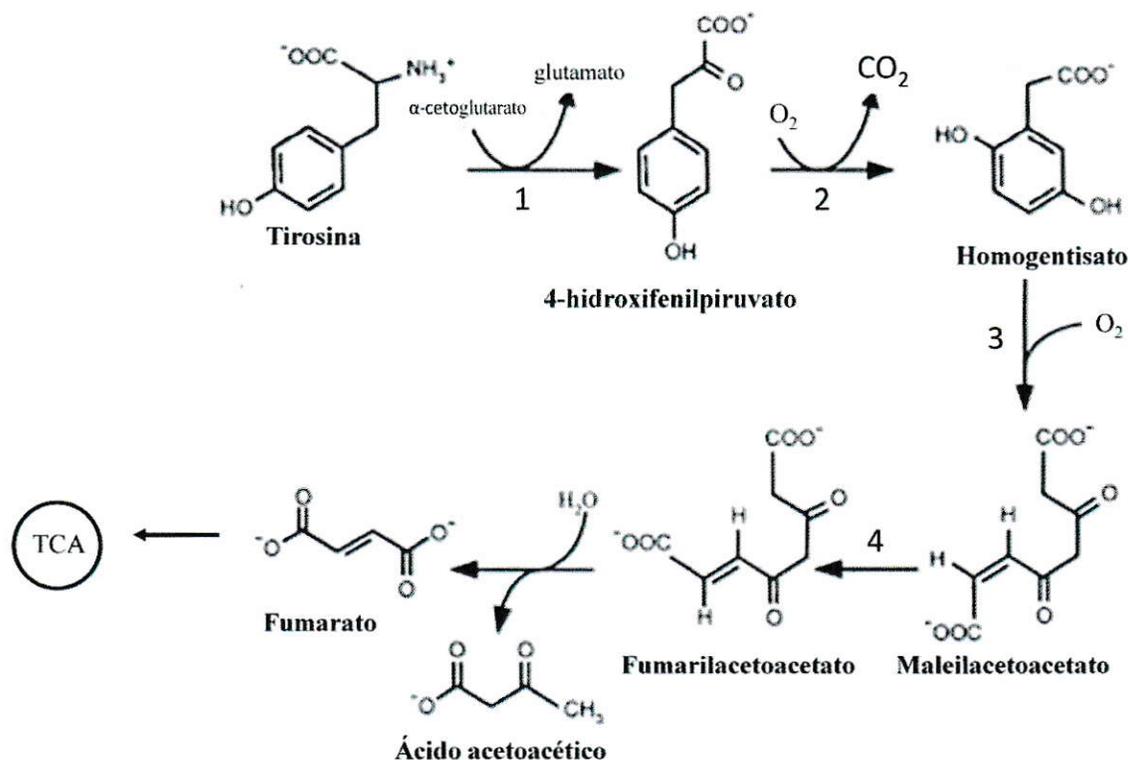


Figura 5. Ruta biodegradativa de la tirosina (Tyr) por *Pseudomonas putida* mediado por las enzimas; 1 = tirosina aminotransferasa; 2 = 4-hidroxifenilpiruvato-dioxigenasa; 3 = homogentisato dioxigenasa; 4 = isomerasa maleicetoacetate (Arias-Barrau, E., y col., 2004).

Estos avances en el conocimiento de la ecología y la biodiversidad tanto en bacterias como arqueas, en los ambientes salinos, han aumentado el interés en el uso de los microorganismos halófilos en la biorremediación de sitios salinos contaminados, ya que los métodos fisicoquímicos son muy costosos y de alto impacto ambiental (García, M. T., y col., 2005). La biorremediación ha resultado ser una alternativa segura, rentable y de bajo impacto ambiental que posee variedad de opciones tecnológicas, como la bioaumentación de microorganismos, ya sean autóctonos, exógenos o genéticamente modificados (Garbisu, C. & Alkorta, I., 1999; Habe, H. & Omori, T., 2003). La presencia de estos microorganismos se puede complementar con procesos de bioestimulación, que corresponden a la aplicación de algún compuesto como oxígeno, agua y/o algún nutriente que estimule los procesos metabólicos de los microorganismos

para que puedan transformar los compuestos xenobióticos a formas inocuas o hasta su combustión (CO_2 y H_2O) (Fernández-Luqueño, F., y col., 2011; Li, H., y col., 2012).

Los microorganismos halófilos se presentan como los candidatos idóneos para la biorremediación de suelos salinos ya que cuando se utilizan sistemas biológicos no adaptados a la salinidad en ambientes salinos contaminados, disminuye la capacidad degradativa de los microorganismos hacia los compuestos contaminantes (García, C. & Hernández, T., 1996; Fathepure, B. Z., 2014). Eso se debe a que en los suelos salinos se presentan factores inhibitorios de la actividad metabólica microbiana, como el alto contenido de iones (Na^+ , K^+ , Cl^- y $(\text{SO}_4)^{2-}$), la baja humedad y el alto pH (Margesin, R. & Schinner, F., 2001; Lefebvre, O. & Moletta, R., 2006; Fernández-Luqueño, F., 2011), lo que afecta el metabolismo celular de la mayoría de los microorganismos, incluso provocando la ruptura de la membrana celular y la desnaturalización de enzimas en microorganismos no halófilos (Pernetti, M. & Palma, L. D., 2005).

Sin embargo, antes de decidirse a utilizar alguna estrategia de biorremediación en los ambientes salinos, es importante conocer el comportamiento de las comunidades nativas de bacterias y arqueas frente a la exposición a compuestos aromáticos, en concentraciones similares a las generadas por el impacto de la actividad industrial, ya que se ha visto que estrategias de biorremediación que han superado las condiciones de salinidad fracasan en su aplicación en campo, por factores como la elevada concentración y el tipo de contaminante en el sitio a biorremediar (Maila, M. P. & Cloete, T. E., 2004; Aichberger, H., y col., 2005; Vaajasaari, K. & Joutti, A., 2006; Afzal, M., y col., 2007; Pandey, J., Chauhan, A., y col., 2009). Por lo tanto, es importante que al simular las condiciones medioambientales para el estudio de las comunidades microbianas, se utilicen las concentraciones de los compuestos aromáticos lo más ajustadas a la realidad industrial, para así conocer cómo las diferencias en los cambios en la estructura comunitaria microbiana se relacionan con la sensibilidad de las mismas frente este tipo de estrés ambiental (Sun, M. Y., y col., 2012). Esta información podría ser muy útil como metodología para establecer índices de la calidad del suelo, ya que las metodologías físicas, químicas y biológicas que se utilizan actualmente han sido

insuficientes para determinar el estado de un suelo. Sin embargo, a lo largo del tiempo se ha privilegiado el uso de metodologías biológicas, basadas en la actividad microbiológica del suelo como la medición de biomasa, cuantificación de nitrógeno, contenido de M.O. o la cuantificación de CO₂ en el suelo, por su bajo costo y fácil implementación (Schloter, M., y col., 2003; Cederlund, H., y col., 2014).

1.1.7. Variaciones de índices ecológicos como medida de perturbación del ecosistema.

A pesar de ello, aún existe escasa información respecto a los cambios que experimentan las comunidades microbianas en los ecosistemas salinos frente a perturbaciones generadas por la actividad industrial (Allison, S. D. &Martiny, J. B., 2008; Shade, A., y col., 2012). A pesar de la falta de información, se han realizado esfuerzos por evaluar la estabilidad y funcionalidad de las comunidades microbianas mediante la interpretación de las variaciones en los índices ecológicos de diversidad, equidad y riqueza (Giller K. E., y col., 1997; Girvan M. S., y col., 2005).

Con estos índices ecológicos aparece la posibilidad de asociarlos con la remoción de los compuestos presentes en las aguas residuales industriales a diferentes concentraciones, para comprender si los cambios en las abundancias de los presentes en una comunidad microbiana, están dados por un efecto de toxicidad del compuesto o por las ventajas que éste ofrece a las especies con capacidades para metabolizar y remover el compuesto.

Esto permitiría, de acuerdo a la sensibilidad de la comunidad microbiológica por algún compuesto, establecer rangos de concentraciones en la descarga de residuos industriales, que permitan la recuperación natural del suelo. Esta información podría ser útil para evitar el progresivo aumento del deterioro de los suelos, ya que algunos compuestos podrían ser más tóxicos que otros permitiendo distinguir la concentración adecuada para que el ambiente pueda autodepurarse naturalmente sin requerir tecnologías para su remediación.

1.1.8. Propuesta de Estudio.

Como se ha descrito en este documento, la mayoría de los residuos agroindustriales poseen compuestos aromáticos de bajo peso molecular de tipo fenólicos, cloroaromáticos y sus derivados, por lo que en este estudio se han seleccionado los compuestos fenol (Phe), ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D) y ácido 4-hidroxibenzoico (4-HB).

Éstos resultan adecuados para este tipo de estudios, ya que se han convertido en modelos de estudio de contaminación ambiental y biodegradación microbiana (Der Yang, R. & Humphrey, A. E., 1975; Pérez-Pantoja, D., y col., 2008; Kraiser, T., y col., 2013; Luna, A. J., y col., 2014; Chen, S. Y., y col., 2015). Por ejemplo, se han encontrado en efluentes agroindustriales concentraciones de 1053 mg L⁻¹ de Phe acompañado de iones Na⁺ (1176 mg L⁻¹), Cl⁻ (1572 mg L⁻¹), K⁺ (1612 mg L⁻¹) y (SO₂)²⁻ (2280 mg L⁻¹) (Afzal M., y col., 2007). También se ha observado la presencia del herbicida 2,4-D en los residuos de la agroindustria, en concentraciones entre 600 – 800 mg L⁻¹ en presencia de 60 g L⁻¹ de NaCl (Luna, A. J., y col., 2012).

Respecto a la toxicidad de estos compuestos sobre las comunidades microbianas se sabe, por ejemplo, que el herbicida 2,4-D por su efecto oxidante, genera un fuerte impacto sobre las microbiota afectando la calidad del suelo, sobre todo en suelos que no han sido expuestos previamente a este compuesto (Zabaloy, M., C., y col., 2008). Esta toxicidad también podría ser extrapolable a la producida por Phe y 4-HB, aunque en menor grado, dado que estos compuestos se han encontrado presentes en ambientes como la rizósfera de las plantas, producido como exudados de éstas, provocando el enriquecimiento de algunos microorganismos asociados a las raíces (Ramos, J. L., y col., 1995; Chen, S., y col., 2015).

Para distinguir el grado de toxicidad de estos compuestos se incorpora al diseño experimental, la tirosina (Tyr) como un compuesto aromático que no genera un efecto tóxico para los microorganismos. Este compuesto es un aminoácido que puede comportarse tanto como fuente de carbono o como fuente de nitrógeno para los



microorganismos, además de su uso como aminoácido para la producción de proteínas celulares (Arias-Barrau, E., y col., 2004). Se presume que este compuesto podría actuar como nutriente a bajas concentraciones, pero a altas concentraciones podría resultar tóxico para algunos microorganismos (Lütke-Eversloh, T., y col., 2007). La selección de Phe, 2,4-D, 4-HB y Tyr, busca establecer si las características particulares de cada tipo de compuesto aromático, producen diferentes impactos en los ecosistemas microbianos como por ejemplo, cambios de las estructuras comunitarias, y si estos cambios guardan relación, tanto con el tipo de compuesto, como con la concentración de cada uno aplicado.

Para estudiar estas diferencias se definió un diseño experimental basado en el montaje de microcosmos de suelo salino. Este tipo de experimentos, a diferencia de los de campo, disminuye las variables que podrían afectar los resultados como, por ejemplo, que no ocurren procesos de lixiviación del compuesto, aumentando la reproducibilidad de las observaciones. Es por ello, que el uso de microcosmos experimentales se ha establecido como una metodología recurrente para este tipo de estudios (Liu, M., y col., 2012; Riah-Anglet, W., y col., 2015).

Para el estudio del efecto de la exposición a compuestos aromáticos sobre las comunidades microbianas en el transcurso del tiempo, se utilizó la técnica molecular de polimorfismo del largo de fragmentos de restricción terminales (T-RFLP). Esta permite la detección de los cambios en la estructura comunitaria microbiana del suelo, con base en la extracción directa de DNA metagenómico, la amplificación por PCR de los genes marcadores rRNA 16S y el corte con enzimas de restricción, lo que la convierte en una alternativa muy apropiada para comparar los cambios estructurales en las comunidades microbianas (Ercolini, D., 2004; Nocker, A., y col., 2007). Además de estas técnicas moleculares, se aplicarán técnicas microbiológicas de aislamiento en medios de cultivo mínimos, utilizando los compuestos aromáticos antes mencionados como única fuente de carbono y energía, en condiciones salinas. La metodología de aislamiento nos permitirá identificar alguno de los microorganismos que participan en la degradación de los diferentes compuestos en los microcosmos de suelo salino.

Como se ha descrito, el suelo resulta ser un sistema muy complejo, por sus interacciones tanto químicas como biológicas. Esto ha llevado a la búsqueda de métodos que sean reproducibles y de bajo costo, que permitan generar índices de la calidad del suelo. Los métodos basados en la sensibilidad microbiológica han tenido mejores resultados en comparación a los métodos físicos o químicos, ya que han podido anticipar de mejor manera la degradación del suelo (Vasconcellos, R. L. F., y col., 2013). Sin embargo, aún existe un debate sobre las técnicas para evaluar el impacto sobre el suelo cuando éste se expone a algún agente externo, ya que todavía se presentan deficiencias metodológicas en las técnicas actuales (Li, F., y col., 2007). Por esto, se ha hecho necesario abordar las dinámicas microbianas desde una perspectiva biológica y química, dado que el contraste de diferentes tipos de análisis ha resultado la mejor manera de obtener un indicador del estado del suelo (Giacometti, C., y col., 2013).

Es por ello que, para el desarrollo del presente estudio, se escogieron 4-HB, 2,4-D, Phe y Tyr, pertenecientes al grupo de los compuestos aromáticos, aplicando diferentes concentraciones, para así comparar sus efectos sobre las comunidades de bacterias y arqueas. Estas comunidades, según su sensibilidad a las perturbaciones, pueden ser utilizadas como indicadores de la respuesta ecosistémica, siendo éste, uno de los primeros estudios que aborda los cambios en las estructuras comunitarias, producto de la exposición a compuestos monoaromáticos que provienen de la agroindustria en suelos salinos, aplicando técnicas que resultan ser muy precisas y que podrían complementar a los métodos actuales de medición.

1.1.9. Hipótesis:

La exposición a los compuestos 2,4-D, 4-HB, Phe y Tyr afecta selectivamente a las comunidades microbianas presentes en un suelo salino, tanto por su grado de toxicidad y su biodegradabilidad, como por la concentración en que éstos se presentan.

1.1.10. Objetivo general:

Estudiar la sensibilidad de las comunidades de bacterias y arqueas frente a la exposición a compuestos aromáticos y su potencial para degradar dichos compuestos en un suelo salino.

1.1.11. Objetivos:

- Caracterizar químicamente el suelo proveniente de las salinas Lo Valdivia con base en los protocolos de la Comisión de Normalización y Acreditación (CNA) de la Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo.
- Comparar las tasas de remoción para las concentraciones 5 y 20 mM de Phe, 2,4-D, 4-HB y Tyr en el tiempo en microcosmos de suelo de la muestra de las salinas Lo Valdivia.
- Evaluar los cambios en la estructura comunitaria de bacterias y arqueas frente a la exposición a Phe, 2,4-D, 4-HB y Tyr en microcosmos de suelo de la muestra de las salinas Lo Valdivia.
- Aislar e identificar microorganismos halófilos con capacidad para crecer en Phe, 2,4-D, 4-HB o Tyr, como única fuente de carbono y energía, en condiciones salinas.

II. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. Descripción del sitio de muestreo.

Las salinas Lo Valdivia, localidad que se encuentra en la (Provincia de Cardenal Caro, en la VI Región del Libertador General Bernardo O'Higgins, específicamente en la comuna de Paredones, a unos 4 km de Boyeruca ($34^{\circ}41'50.16''\text{S}$, $72^{\circ}00'44.3''\text{O}$) es un sitio de producción de sal que se ha mantenido prácticamente desde la Colonia, y por ello mantiene una condición libre de contaminación por compuestos aromáticos provenientes de la industria. Estas salinas, únicas en Chile junto a las de Cahuil, y las más australes del planeta, se caracterizan por ser lagunas litorales de agua dulce que en épocas de altas mareas se llenan con el agua del mar. A comienzos de noviembre, una vez que los salineros han quitado el barro de las salinas, se abre lo que ellos denominan "La Boca", que es un brazo de mar que se interna hacia el continente varios kilómetros entre dos cabos, posibilitado a través de una depresión topográfica con relación al nivel del mar. Este canal mayor se interna en el valle y se desprenden de él una serie de senderos de agua salada que nutren a las salinas (Figura 6).

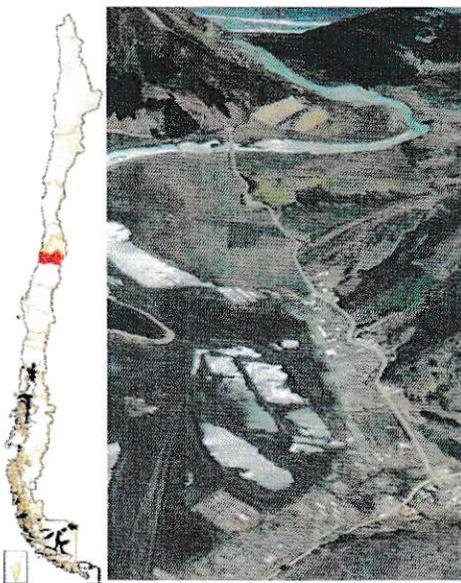


Figura 6. Ubicación geográfica de las salinas Lo Valdivia. ($34^{\circ}41'50.16''\text{S}$, $72^{\circ}00'44.3''\text{O}$), y vista aérea de "La Boca".

2.2. Obtención de las muestras y análisis químico del suelo de las salinas Lo Valdivia.

Se recolectaron 6 muestras de suelo en una bolsa plástica a una profundidad máxima de 30 cm, desde el sitio de la deposición de sal, respetando un muestro en zigzag (Figura 7). Las muestras obtenidas se mezclaron y homogenizaron con un mortero, para formar una muestra compuesta en el laboratorio para su caracterización química, el montaje de microcosmos y el aislamiento de microorganismos.

La caracterización química se realizó en el laboratorio de servicios FAIF (Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal) de la Universidad Católica de Chile. Este análisis consistió en la cuantificación de la Conductividad Eléctrica del extracto (CE_e), la Conductividad Eléctrica en suspensión (CE_{susp}), el pH del agua, la Materia Orgánica (M.O.), los aniones solubles, los cationes solubles y los elementos disponibles.

Con la concentración de aniones solubles y cationes solubles fue posible determinar la sodicidad del suelo mediante la Relación de Adsorción de Suelo (RAS). Los protocolos están basados en la CNA de la Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo.



Figura 7. Sitio preciso de obtención de la muestra de suelo en las salinas Lo Valdivia.

2.3. Montaje de los microcosmos de suelo de las salinas Lo Valdivia.

El estudio de los cambios en las comunidades microbianas de suelo salino se llevó a cabo mediante el montaje de microcosmos, a partir de la muestra homogenizada de suelo de las salinas Lo Valdivia. Cada microcosmos consistió en un vaso precipitado de 100 ml con 10 g de suelo, tapado con una película autosellante (Parafilm M). Los microcosmos se incubaron a temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 3$) por un periodo de 30 d. Cada microcosmos se expuso a un único compuesto y a una única concentración, por triplicado.

Los compuestos utilizados fueron Phe, 4-HB, 2,4-D, y Tyr, en concentraciones de 5 mM y 20 mM. Paralelamente se agregaron al montaje, dos tratamientos a modo de controles, en los que los microcosmos no fueron expuestos a un compuesto aromático, para así mejorar el análisis comparativo de la respuesta comunitaria.

Uno de estos tratamientos control, denominado control “sin compuesto” (S.C.), consiste en agregar agua estéril en vez del compuesto a los microcosmos. El otro tratamiento control estuvo sujeto solo a las variables de incubación, es decir no se agrega compuesto alguno ni agua, por lo que se denominó “control de incubación” (C.I.)

Las muestras de los microcosmos se analizaron a los días 1, 15 y 30 por triplicado. En cada tiempo de monitoreo, el análisis consistió en cuantificar el porcentaje de remoción de los compuestos y tomar muestras de suelo para obtener el DNA metagenómico para analizar la estructura microbiana.

2.4. Análisis del porcentaje de remoción de los compuestos aromáticos en los microcosmos de suelo salino por HPLC.

De cada microcosmos se extrajo 5 g de suelo salino, los que se mezclaron con 15 ml de metanol en un tubo de fondo cónico de 50 ml y se agitaron por 24 h a 200 rpm. Luego, la mezcla se centrifugó a 9000 rpm por 45 min para recuperar el sobrenadante. La solución recuperada se filtró en forma secuencial a través de filtros de 0,45 μm y 0,22 μm de tamaño de poro. La solución obtenida se llevó al laboratorio de Química de Suelos de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, para el análisis de la remoción de cada compuesto por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

El equipo de HPLC consistió en una bomba Waters 1525 Bynary HPLC, constituido por un detector UV con arreglo de diodos Waters 2996. Las muestras se eluyeron isocráticamente usando una solución acuosa de ácido fosfórico (3%), con un flujo de 1,5 ml min^{-1} y una fase móvil de 60:40 (metanol/agua), empleando una columna Kromasil 100-3.5C18 de 15 cm de largo y de 8 mm de diámetro, con un tamaño de poro de 4,6 μm . La detección se realizó por absorbancia de UV a 211 nm, 254 nm, 228 nm y 274 nm para Phe, 4-HB, 2,4-D y Tyr, respectivamente.

La detección de cada compuesto se llevó a cabo mediante una estandarización en la metodología de análisis de cada analito. Primero, según las condiciones descritas anteriormente para el HPLC se inyectaron 20 μl de la muestra patrón a una concentración 5 mM para cada compuesto con una pureza del 99% (Merck Millipore) por 20 minutos. A continuación, en las mismas condiciones se inyectaron las muestras provenientes de los microcosmos de suelo, para observar la coincidencia entre los tiempos de retención (t_r) y absorbancias registradas. Los tiempos de retención (t_r) obtenidos para los compuestos Phe, 4-HB, 2,4-D y Tyr fueron 2,07, 2,16, 2,91 y 1,92, respectivamente. Por otro lado, el control de incubación (C.I.) y sin compuesto (S.C.) no registraron compuesto alguno a los tiempos de retención (t_r) de cada analito durante los 30 minutos luego de la inyección de cada uno de los controles en el HPLC.

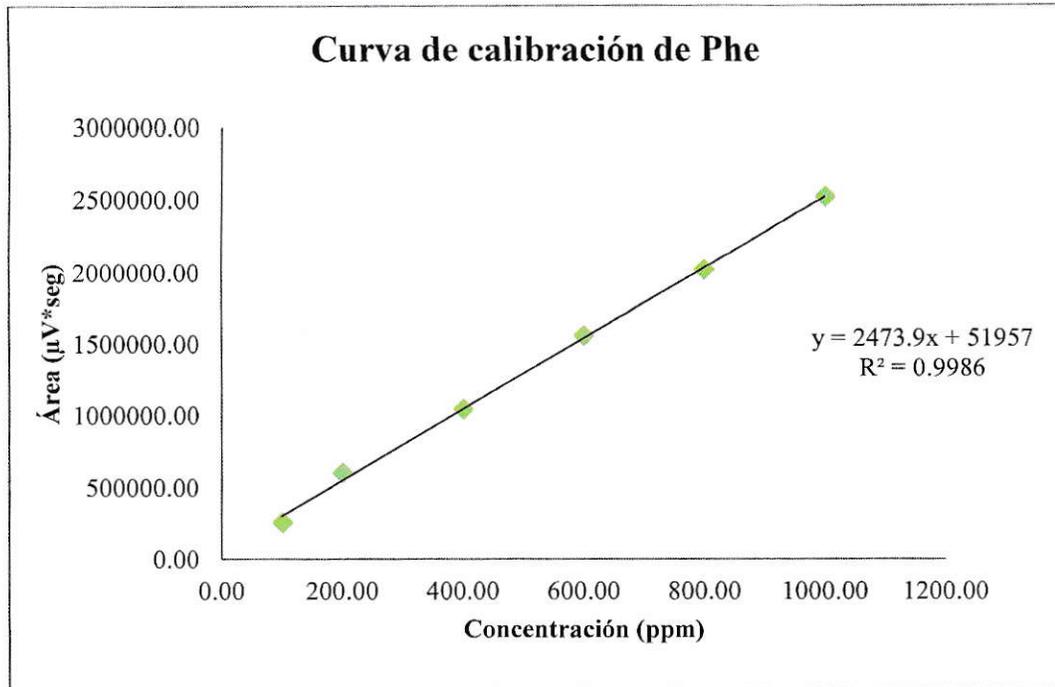


Figura 8. Curva de calibración de fenol (Phe).

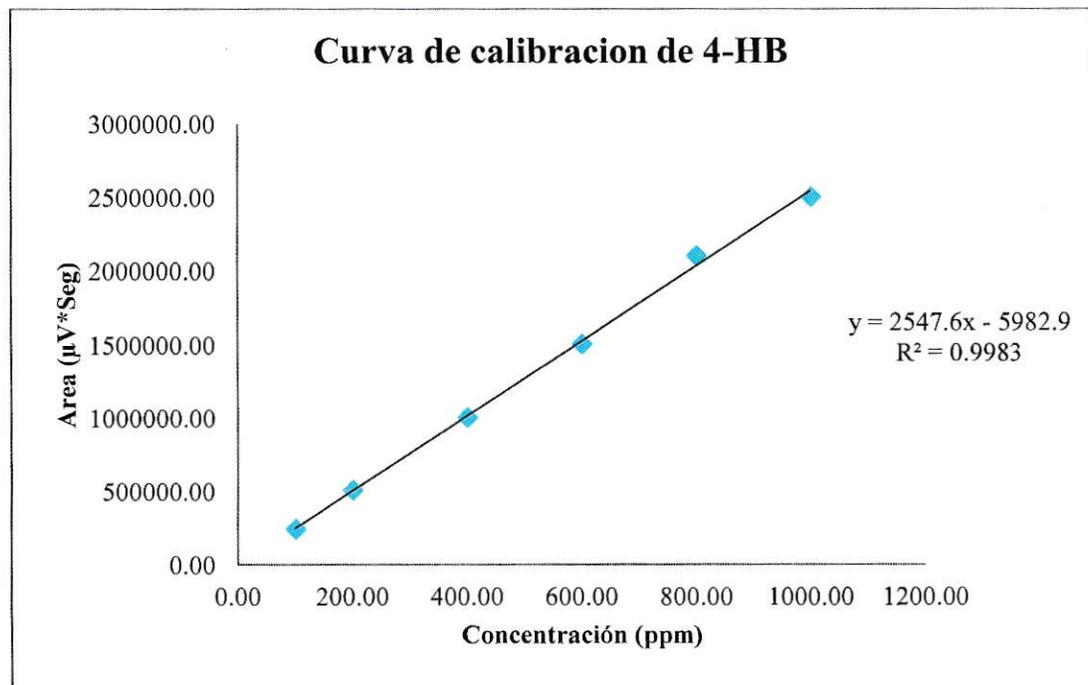


Figura 9. Curva de calibración del ác. 4- hidorxibenzoico (4-HB).

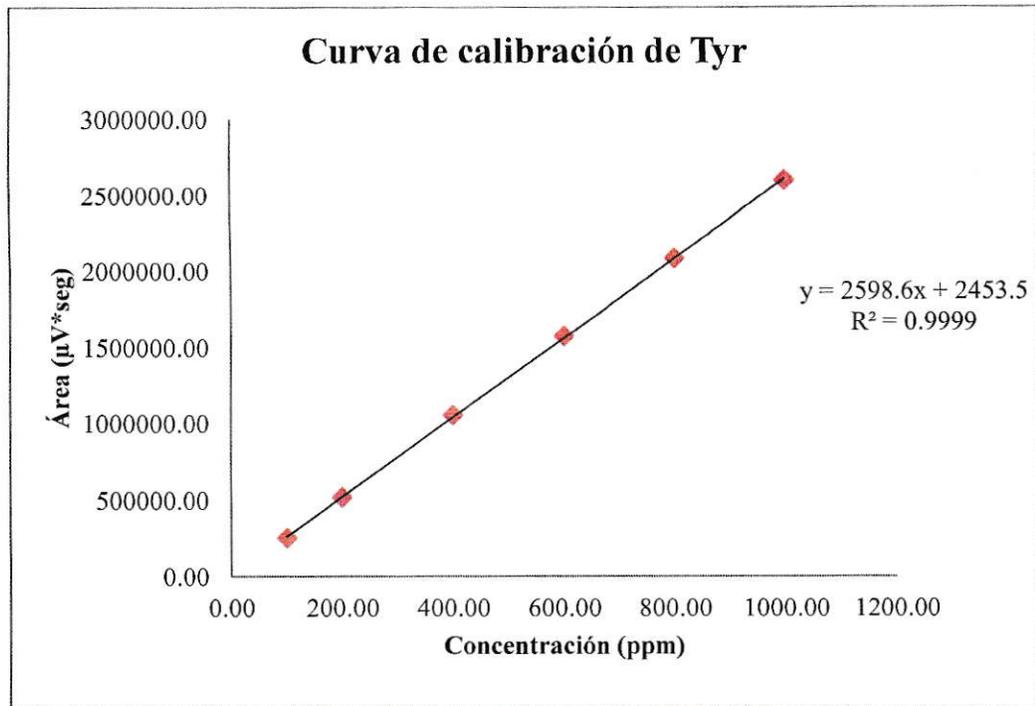


Figura 10. Curva de calibración de tirosina (Tyr).

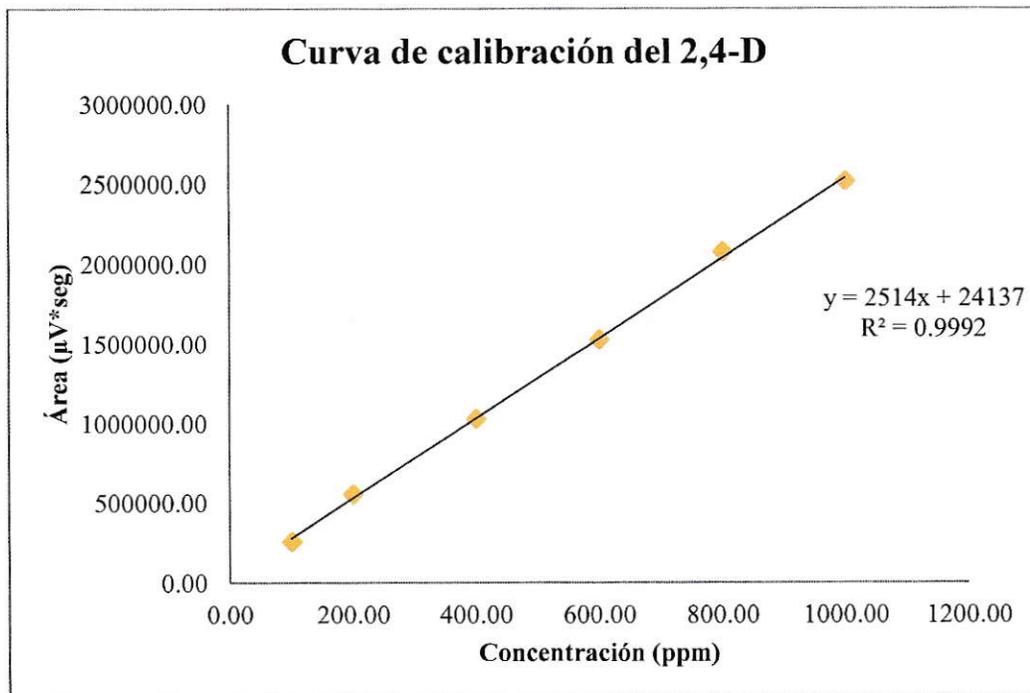


Figura 11. Curva de calibración del ác. 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D).

Para la elaboración de las curvas de calibración considerando el límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) (tabla 5), determinadas de la siguiente forma:

$$\text{LOD} = \frac{|S_{bl}| + 3 \cdot |SD_{bl}|}{m}$$

$$\text{LOQ} = \frac{|S_{bl}| + 10 \cdot |SD_{bl}|}{m}$$

Siendo, S_{bl} = la ordenada de la curva de calibración obtenida en cada compuesto
 SD = la desviación estándar de la ordenada y m = la pendiente de la curva de calibración.

Tabla 2. Elaboración de las curvas de calibración de Phe, 4-HB, 2,4-D y Tyr, considerando LOD y LOQ.

| Compuesto | Curva de calibración | R ² | LOD (mg/L) | LOQ (mg/L) |
|-----------|----------------------|----------------|---------------|---------------|
| Phe | Y = 2473,9x + 51957 | 0,9986 | 64,35 | 165,49 |
| 4-HB | Y = 2547,6x - 5982,9 | 0,9983 | 5,24 | 11,28 |
| Tyr | Y = 2598,6 + 2453,5 | 0,9999 | 23,19 | 75,08 |
| 2,4-D | Y = 2514x + 24137 | 0,9992 | 25,09 | 61,26 |

2.5. Extracción de DNA metagenómico y amplificación de las secuencias de rRNA 16S de bacterias y arqueas para el análisis de los cambios en las estructuras comunitarias por T-RFLP.

Para el análisis molecular de las comunidades de bacterias y arqueas, se extrajo el DNA metagenómico de los microcosmos de suelo a los días 1, 15 y 30, con el *Kit FastDNA SPIN for Soil (MP Biomedicals)* según las instrucciones del fabricante (Apéndice A).

La amplificación de los genes rRNA 16S se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*), con los partidores 63F (6-FAM-5'-AGGCCTAACACATGCAAGTC-3') y 1087R (5'-CTCGTTGCGGGACTTACCCC-3') para bacterias (Singh, B. K., y col., 2006).

Para la detección de arqueas se utilizan los partidores 21F (6-FAM-5'-TTCCGGTTGATCCTGCCGGA-3') y 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Waddell, E. J., y col., 2010). Los partidores *forward* se marcaron con el fluoróforo 6-carboxi-fluoresceína (6-FAM) en el extremo 5' para bacterias y arqueas.

La mezcla de reacción para la amplificación por *PCR* para ambos dominios consistió en 5,33 μl de *PCR Buffer* 10x sin MgCl_2 , 3,73 μl de MgCl_2 50 mM, 1,07 μl de cada partidore (10 mM), 1,07 μl de dNTP 10 μM , 1,07 μl de BSA 10 mg ml^{-1} , 2 μl de DNA molde, 0,4 μl de *Taq* DNA polimerasa recombinante y 34,26 μl de agua desionizada, filtrada (0,1 μm) y libre de nucleasas (*Hypure Molecular Biology*) hasta completar un volumen de 50 μl .

La amplificación se realizó usando un termociclador (*2720 Thermal Cycler Applied Biosystems*). Las reacciones de *PCR* tanto para la detección de bacterias como de arqueas se realizaron con una etapa inicial de desnaturalización a 95°C durante 10 min, seguido de 25 ciclos que comprenden: desnaturalización a 95°C durante 45 s, hibridación a 56°C durante 1 min y una extensión a 72°C durante 2 min.

Por último, se agregó un paso de extensión final a 72°C durante 7 min. Los productos de la *PCR* se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%

(p/v) utilizando *GelRed* como agente intercalante de DNA. Las detecciones positivas de los productos de *PCR* se utilizaron para la digestión enzimática y el análisis de fragmentos mediante secuenciación capilar.

Los productos de *PCR* se sometieron a digestión con las enzimas *AluI* y *MspI* a 37°C durante 3h, y una inactivación de 20 min a 80°C. Luego los productos de la digestión se purificaron con un protocolo de limpieza de DNA (Apéndice B). Los fragmentos de restricción terminal, T-RF's, medidos en pares de bases y considerados como unidades taxonómicas operacionales (OTU's), se estimaron mediante electroforesis capilar utilizando un secuenciador automático (Macrogen, Corea).

Las unidades de fluorescencia obtenidas para cada OTU se representaron como áreas bajo la curva de cada pico individual, representativas de la abundancia relativa de las OTU's predominantes en las comunidades microbianas.

2.6. Manejo y análisis estadístico de los datos obtenidos mediante T-RFLP.

Los perfiles de T-RF's se visualizaron en el programa *Peak Scanner 1.0* (*Applied Biosystems*) utilizando el marcador estándar 1200 LIZ. Desde este programa se exportaron los datos para su lectura y manejo con el programa R-Studio. Para cada perfil de T-RFLP se consideraron solamente los T-RF's entre 50 a 500 pb para obtener fragmentos dentro del intervalo lineal.

Los T-RF's que representaban menos del 1% del área total no fueron considerados en el análisis, ya que no eran distinguibles del ruido propio de la técnica. Los datos se estandarizaron calculando el área de cada pico como un porcentaje del área total (Osborne, C. A., y col., 2006).

Para todos los perfiles de T-RF's se realizó una transformación de los datos mediante el cálculo de su raíz cuadrada, para luego generar una matriz de similitud, mediante el método de similitud de distancias de Bray-Curtis, y posteriormente visualizar estas diferencias mediante el uso de la técnica de Escalamiento Multi-Dimensional No Métrico (NMDS) (Clarke K., R., 1993). Además, se sometieron los

datos al análisis estadístico de similitud para datos multivariados (ANOSIM), que es equivalente al test de ANOVA no-paramétrico.

También se calcularon los índices ecológicos de diversidad de Shannon-Weaver ($H' = S \pi \ln(\pi)$) (Blackwood C. B., y col., 2007), equidad ($J = H'/\ln(R)$) (Margalef, D. R. y col., 1958; Gamito, S., 2010) y riqueza (S) como el total de T-RF's encontrados. Estos resultaron de utilidad para mostrar las diferencias en las estructuras comunitarias y la composición de microorganismos (Muckian L., y col., 2007).

2.7. Aislamiento e identificación de microorganismos con capacidades degradativas de compuestos aromáticos en condiciones de alta salinidad.

De la muestra de suelo destinada para el aislamiento, se utilizaron 2 g, los que se resuspendieron en 100 ml del medio líquido de sales (CTM). Este medio contenía 117 g de NaCl, 29,7 g MgSO₄, 20,7 g MgCl₂, 3 g KCl, 0,43 g CaCl, 0,39 g NaBr, 0,1 g HNaCO₃, 10 ml de buffer fosfato 10x y 10 ml de una solución de micronutrientes (Apéndice C), diluido en agua estéril hasta completar 1 L, a un pH = 7,2. Con este medio se prepararon cuatro tipos de matraces, agregando en ellos un único compuesto aromático (Phe, 2,4-D, Tyr, 4-HB), a una concentración de 5 mM, con una incubación en agitación a 30°C cada uno.

Al cumplir 30 días de incubación, de cada matraz se tomó una muestra de 100 µl y se realizaron tres diluciones (1:10, 1:100, 1:1000) considerando una alícuota de 100 µl del cultivo para una dilución en 900 µl del medio CTM. Cada dilución se sembró en placas Petri (agar-agar al 1,5 %) con 50 µl de la solución CTM y 5 mM de un único compuesto. Los cultivos en placas se incubaron por un mes a temperatura ambiente (25°C ± 3).

Los microorganismos que presentaron crecimiento en estos medios se traspararon tres veces sucesivamente al mismo medio mínimo enriquecido con cada compuesto. Luego, se seleccionó una colonia aislada de cada placa y se resuspendió en

un matraz de 25 ml que contenía 10 ml del medio CTM enriquecido con el compuesto correspondiente a una concentración de 5 mM, y se incubó por un mes.

Desde los cultivos que presentaron turbidez, se tomó una alícuota de 50 μ l y se inoculó en un medio sólido que contenía 5 g de triptona, 2,5 g de extracto de levadura y 500 ml del medio CTM al 1,5 % de agar-agar.

Aquellos microorganismos que mantienen su fenotipo se escogieron para extraer su DNA genómico. Para esto, se tomó una colonia aislada y se resuspendió en 800 μ l de Chelex-100 al 33% (*BioRad*); la mezcla se incubó a 80°C por 30 min, para inmediatamente enfriar en hielo por 5 min.

Cada muestra se centrifugó a 14000 rpm durante 15 min para luego extraer el sobrenadante con el contenido de DNA genómico. Los extractos de DNA genómicos se amplificaron con los partidores de bacterias y arqueas (sin marca fluorescente) bajo el programa de PCR, señalado para el análisis de T-RFLP.

Los productos de PCR se enviaron para su secuenciación a la empresa *Macrogen Inc* (Corea). Las secuencias se analizaron mediante el uso del BLAST utilizando la base de datos de *NCBI Gen-Bank* para el alineamiento de las secuencias. Finalmente, se registraron el porcentaje de identidad, cobertura y P-value asignados al primer género encontrado para cada aislado.

III. RESULTADOS.

3.1. Caracterización química de la muestra de suelo proveniente de las salinas Lo Valdivia.

Los resultados de la caracterización química del suelo de las salinas Lo Valdivia, elaborados bajo los protocolos de la Comisión Nacional de Acreditación (CNA), de la Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo, se muestran en la Tabla 3 y en el Apéndice D. Los resultados muestran que ese suelo posee un pH neutro (7,15) y un contenido de M.O. del 2,09%, valores presentes en típicos suelos apropiados para la agricultura. Sin embargo, se detectaron altos niveles de CE tanto del extracto (CEe: 201,0 mS/cm) como en suspensión (CEsusp: 43,18 mS/cm). De los componentes disponibles, el más relevante fue el alto contenido de B. También, en las fases intercambiables, aniones y cationes solubles, se encontraron altos valores de Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} (SO_4)²⁻ y Cl^- . A través de los valores obtenidos para los cationes solubles es posible calcular el índice de Relación de Adsorción de Sodio (RAS), que en este análisis se presentó con un valor alto de 52,3. Con los valores obtenidos de pH, CEe, y RAS, fue posible establecer que las condiciones de salinidad de la muestra estudiada son representativas de un suelo salino con características de sodicidad.

Tabla 3. Caracterización química del suelo de las salinas Lo Valdivia basada en los protocolos de la Comisión Nacional de Acreditación (CNA) de la Ciencia del Suelo.

| Análisis | Unidad | Rangos adecuados para cultivo | Valor |
|--------------------------------------|---------------|--------------------------------------|--------------|
| pH del agua | - | - | 7,1 |
| CEsusp. | mS/cm | <0,5 | 43,8 |
| CEe | mS/cm | <2,6 | 201,0 |
| M.O. | % | - | 2,09 |
| DISPONIBLES | | | |
| B | mg/Kg | 1,00 - 1,50 | 17,75 |
| ANIONES SOLUBLES | | | |
| (SO₄)²⁻ | meq/L | <15 | 340,0 |
| Cl⁻ | meq/L | <14 | 1637,0 |
| (HCO₃)⁻ | meq/L | <4,5 | 1,7 |
| CATIONES SOLUBLES | | | |
| Na⁺ | meq/L | <5 | 983 |
| Ca²⁺ | meq/L | - | 44 |
| Mg²⁺ | meq/L | - | 662 |
| K⁺ | meq/L | - | 33 |
| RAS | | < 10 | 52,3 |

3.2. Remoción de 2,4-D, 4-HB, Phe y Tyr en el transcurso del tiempo en los microcosmos de suelo salino.

Para comparar los niveles de toxicidad entre los compuestos y sus concentraciones aplicadas, se registraron los porcentajes de remoción a partir de los análisis de HPLC (Figuras 12 y 13). En las gráficas se observa que para el día 1 no hubo registro de remoción alguna de los compuestos. En cambio, a los 15 días de exposición, a una concentración de 5 mM de cada compuesto, los niveles de remoción de 2,4-D, 4-

HB, Phe, Tyr, fueron 10%, 99%, 74% y 96%, respectivamente. A los 30 días se registraron porcentajes de remoción de 4-HB y Tyr del 99% para ambos compuestos a la concentración de 5 mM. No obstante, para Phe y 2,4-D se observaron porcentajes de remoción del 93% y 34% a 5 mM al día 30. Por otro lado, cuando se aplicó la concentración más alta (20 mM), los niveles de remoción al día 15 de 2,4-D, 4-HB, Phe y Tyr, fueron 4%, 98%, 51% y 95%, respectivamente. En el último día de monitoreo (día 30) los niveles de remoción de 2,4-D, 4-HB, Phe y Tyr, alcanzaron un 14%, 99%, 77% y 98%, respectivamente, siendo el 2,4-D el compuesto más persistente entre los tratamientos aplicados.

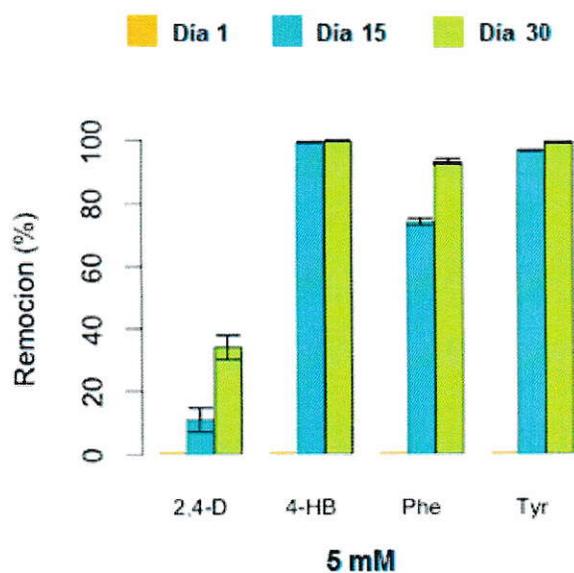


Figura 12. Porcentaje de remoción para el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), el ácido 4-hidroxibenzoico (4-HB), el fenol (Phe) y la tirosina (Tyr). Los análisis de remoción son los correspondientes al monitoreo a los días 1, 15 y 30, a una concentración de 5 mM, en los microcosmos de suelo salino.

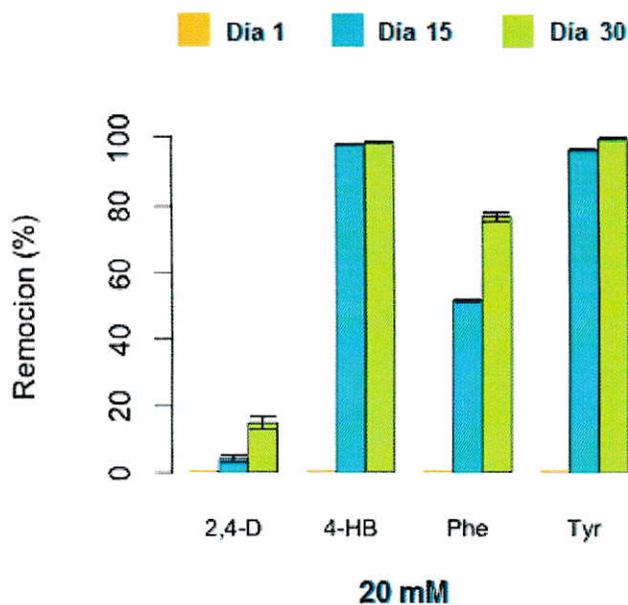


Figura 13. Porcentaje de remoción para el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), el ácido 4-hidroxibenzoico (4-HB), el fenol (Phe) y la tirosina (Tyr). Los análisis de remoción son los correspondientes al monitoreo a los días 1, 15 y 30, a una concentración de 20 mM en los microcosmos de suelo salino.

3.3. Estudio de los cambios en las estructuras comunitarias de bacterias y arqueas en los microcosmos de suelo salino expuesto a Phe, 4-HB, 2,4-D y Tyr.

La detección de la presencia de microorganismos de los dominios de bacterias y arqueas en los microcosmos de suelo salino en todas las réplicas, para cada tratamiento y en todos tiempos de muestreo mediante el método de PCR se observa en las Figuras 14 y 15. En la Figura 14 se muestran, a modo de ejemplo, los resultados obtenidos para el tratamiento con 4-HB, en el cual se evidencia la presencia de bacterias, dada por la amplificación positiva de los genes del RNA ribosomal 16S, con un tamaño aproximado de 1000 pb. Por otro lado, en la Figura 15 se presentan los resultados de la detección de arqueas en las muestras del tratamiento con 4-HB, esperando obtener un amplicón aproximado de 1500 pb de tamaño, el cual se detectó en todos los tratamientos.

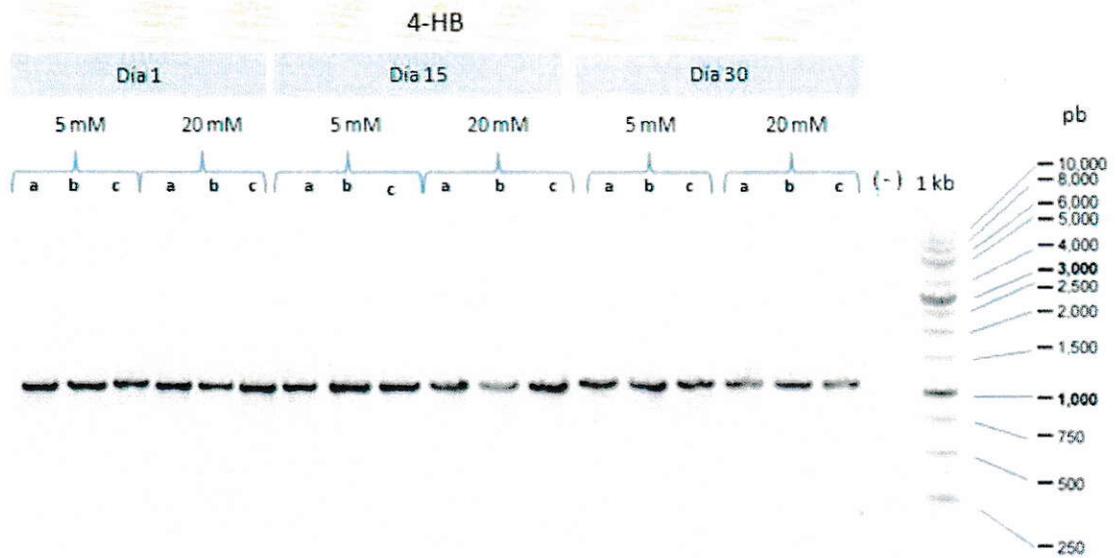


Figura 14. Detección de bacterias a partir de la amplificación de genes de rRNA 16S para el tratamiento con 4-HB. Las letras a, b y c representan las réplicas ordenadas por el tiempo de monitoreo al día 1, 15 y 30, para las concentraciones 5 mM y 20 mM. Los últimos dos carriles corresponden al control negativo (-) y al estándar de peso molecular de 1 kb.

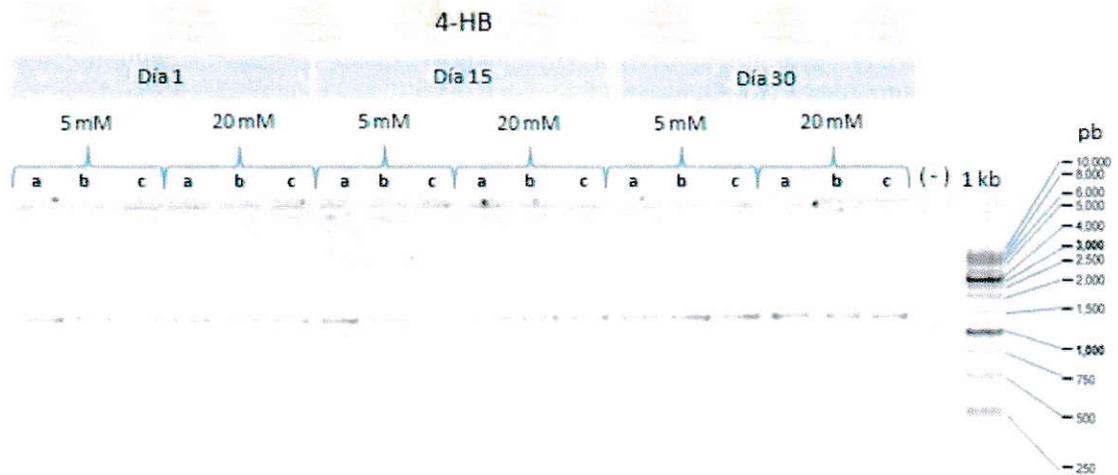


Figura 15. Detección de arqueas a partir de la amplificación de genes de rRNA 16S para el tratamiento con 4-HB. Las letras a, b y c representan las réplicas ordenadas por el tiempo de monitoreo al día 1, 15 y 30, para las concentraciones 5 mM y 20 mM. Los dos últimos carriles corresponden al control negativo (-) y al estándar de peso molecular de 1 kb.

3.3.1. Cambios en los índices ecológicos de las comunidades de bacterias y arqueas, a partir de los perfiles de T-RFLP.

A partir de los perfiles de T-RFLP de los microcosmos de suelo salino se analizaron los índices H', J y S, para bacterias y arqueas en el transcurso del tiempo. Las comunidades de bacterias presentaron cambios en su estructura desde el día 1, con aumentos en los índices S y H' para todos los compuestos con respecto a los controles C.I. y S.C., para ambas concentraciones aplicadas. Este aumento no generó la predominancia de microorganismos particulares, lo que se evidencia en la mínima variación del índice J al día 1 con respecto a los controles. Sin embargo, en el transcurso del tiempo se observaron diferencias en los cambios en los índices ecológicos relacionados tanto al compuesto como a la concentración a las que se ven expuestas las comunidades. Por ejemplo, la exposición a Tyr a 5 mM, mantuvo estable los índices H', J y S en un comienzo, pero a los 30 días se evidenció una baja, observable principalmente en los valores de H' y J (Figuras 16 y 18). Sin embargo, a la dosis más alta de Tyr, todos los índices se mantuvieron elevados y estables hasta el final del experimento (Figuras 17, 19). Este efecto estabilizante observado en los índices de diversidad y equidad, también se observó cuando se utilizó el compuesto 4-HB, pero en este caso ocurrió en ambas concentraciones.

En cambio, los tratamientos 2,4-D y Phe tanto a 5 como a 20 mM, fueron los que provocaron los mayores cambios en los índices ecológicos en las comunidades bacterianas en el tiempo. Para el tratamiento con 2,4-D a la menor concentración, todos los índices disminuyeron en el transcurso del tiempo, siendo el más pronunciado el índice de riqueza (S) (Figura 21). En cambio, a la concentración más alta de 2,4-D, la comunidad varió drásticamente en su diversidad H' y riqueza S, a los 15 d, retornando a los 30 d a niveles cercanos a los del control C.I. (Figuras 17 y 21). Por otro lado, en el tratamiento con Phe, en ambas concentraciones los valores de H', J y S disminuyeron (Figuras 17 y 21). Además, la exposición a Phe, generó los valores más bajos a los 15 d, con respecto a los otros compuestos, en ambas concentraciones.

Por otro lado, en las comunidades pertenecientes al dominio arquea sólo se registraron aumentos en el índice H' para el tratamiento con Tyr, en ambas concentraciones (Figura 22 y 23). En cambio, para los demás compuestos se observó una disminución de los índices ecológicos en relación a los controles C.I. y S.C. Para las comunidades de arqueas se observó un aumento en los valores del índice J, al exponerlas a Tyr y 4-HB, pero cuando se utilizó Phe se observó una disminución del mismo. Sin embargo, es la presencia de 2,4-D la que arrojó los valores más bajos de equidad (Figuras 24 y 25). Estas observaciones se relacionan con lo observado en los cambios del índice S, para el que se observó que tanto la exposición a Phe como a 2,4-D, generaron los mayores cambios en las comunidades de arqueas (Figuras 26 y 27). Además, la exposición a la concentración más alta (20 mM) de los compuestos Phe y 2,4-D, produjo cambios más acentuados que los provocados por la concentración de 5 mM, lo que indica un efecto dosis dependiente para estos compuestos sobre las comunidades de bacterias y arqueas.

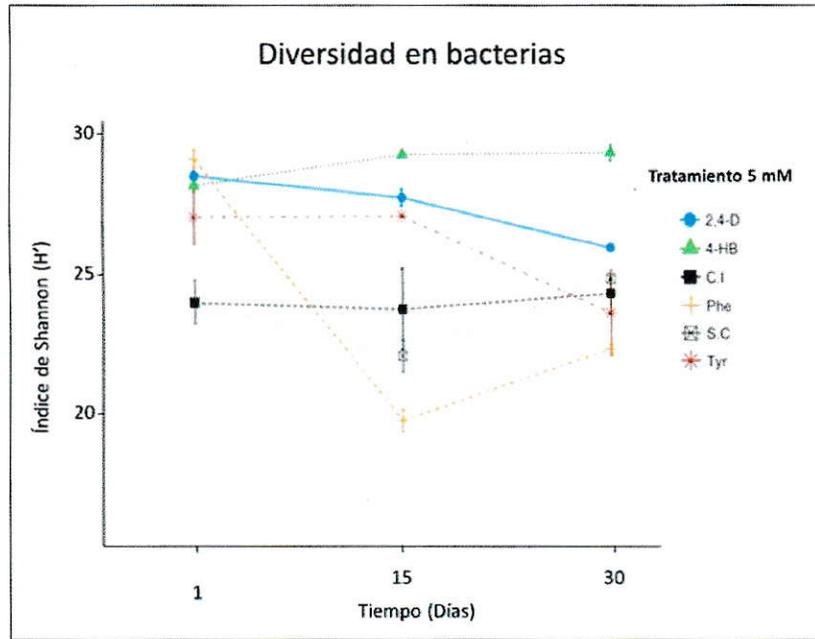


Figura 16. Cambios temporales del índice de diversidad (H') para las comunidades bacterianas presentes en cada tratamiento, al exponerlas a una concentración de 5 mM.

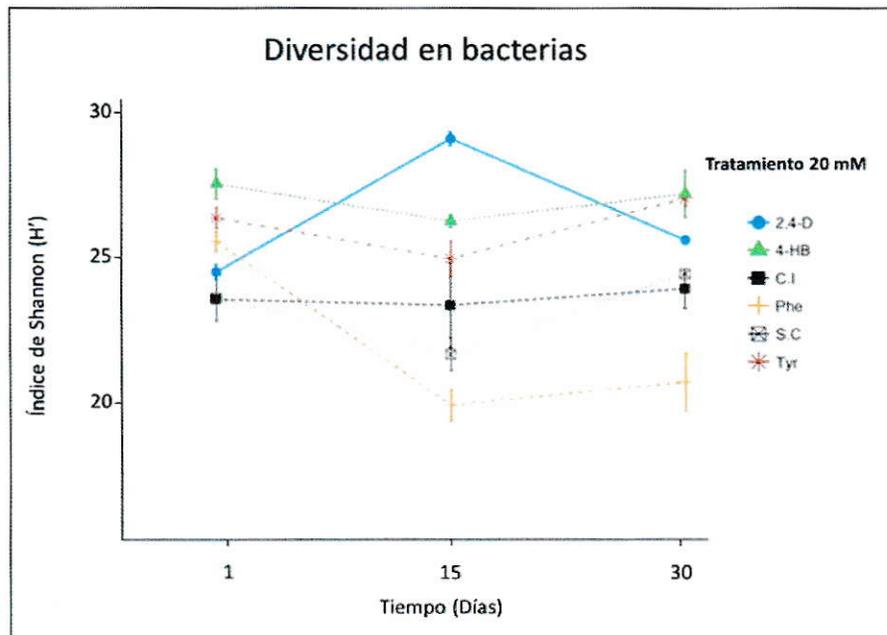


Figura 17. Cambios temporales del índice de diversidad (H') para las comunidades bacterianas presentes en cada tratamiento, al exponerlas a una concentración de 20 mM.

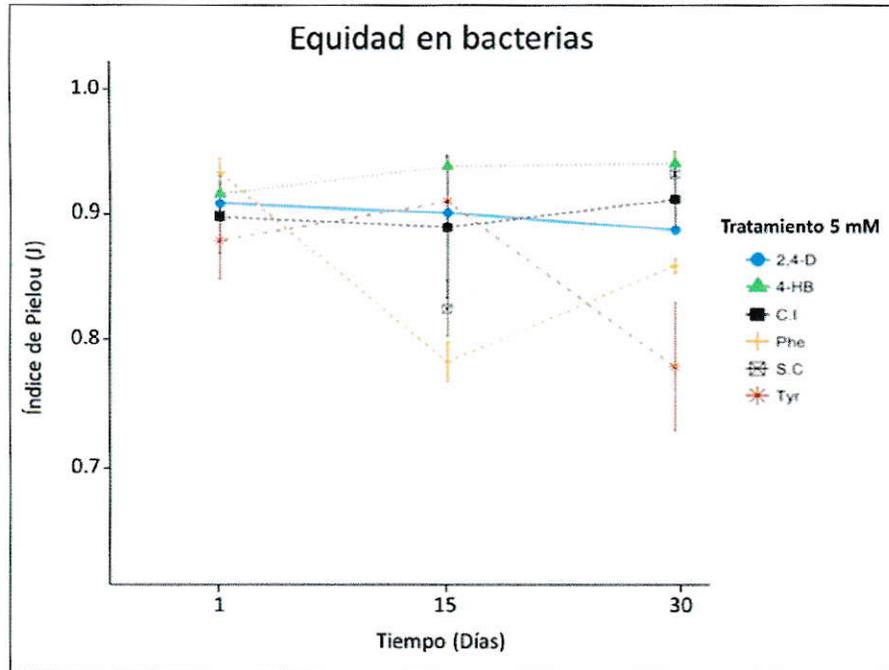


Figura 18. Cambios temporales del índice de equidad (J) para las comunidades bacterianas presentes en cada tratamiento, al exponerlas a una concentración de 5 mM.

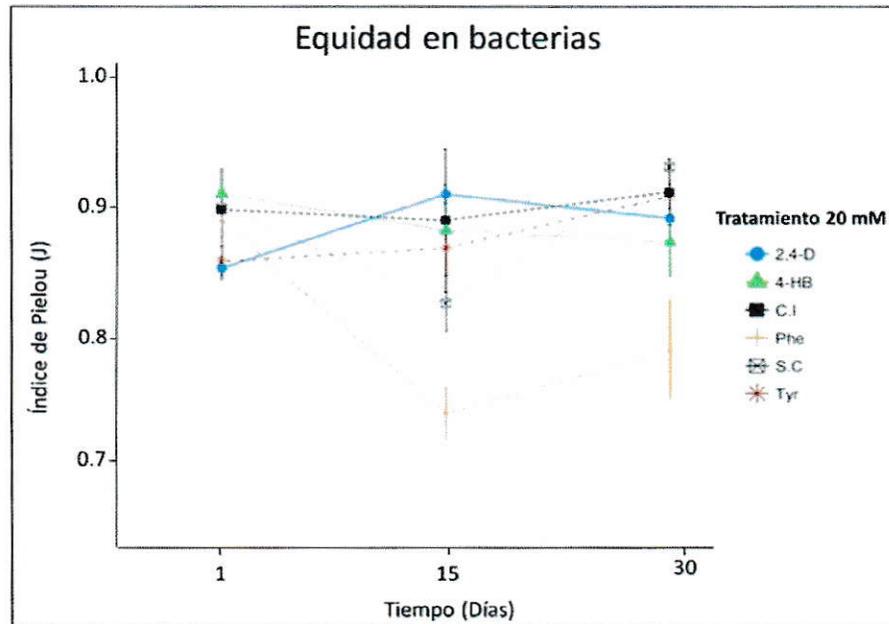


Figura 19. Cambios temporales del índice de equidad (J) para las comunidades bacterianas presentes en cada tratamiento, al exponerlas a una concentración de 20 mM.

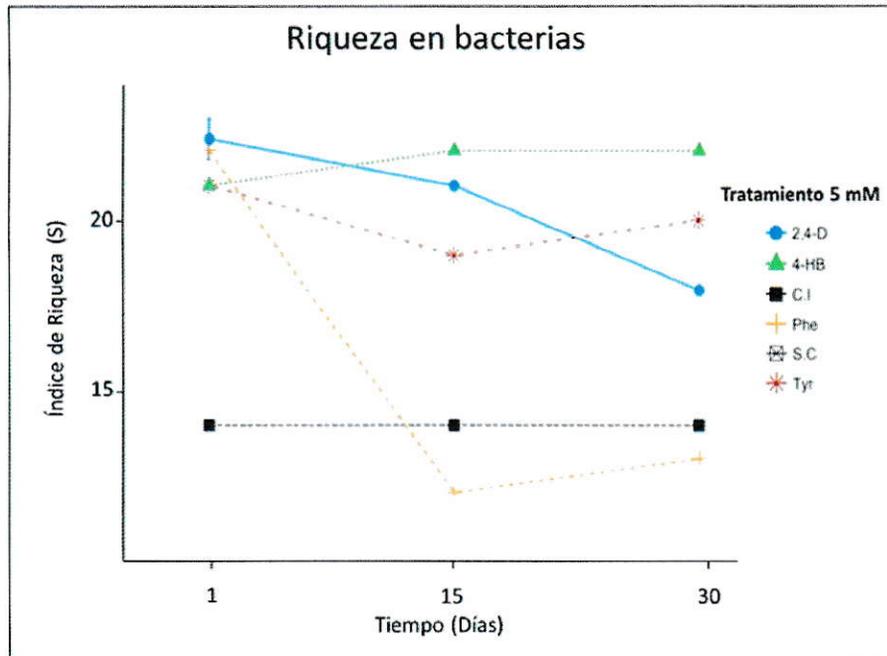


Figura 20. Cambios temporales del índice de riqueza (S) para las comunidades bacterianas presentes en cada tratamiento, al exponerlas a una concentración de 5 mM.

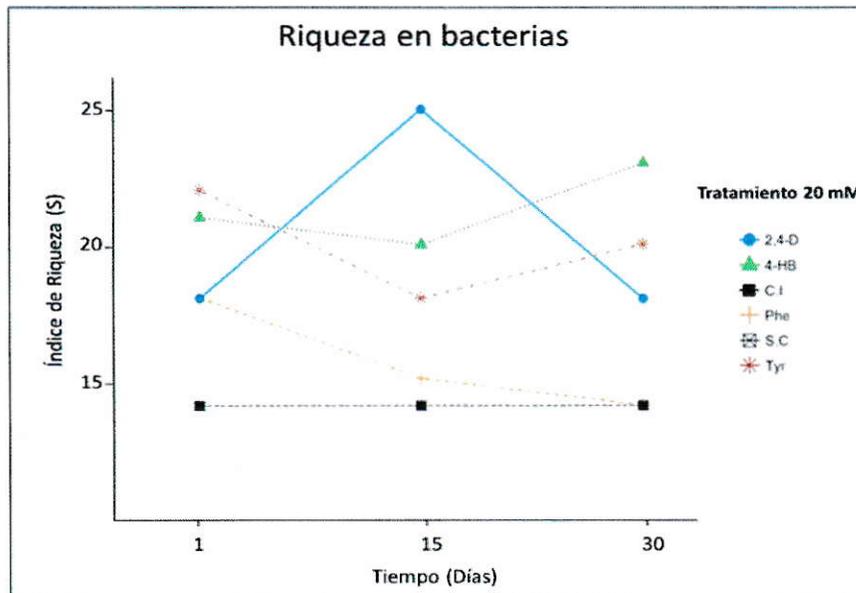


Figura 21. Cambios temporales del índice de riqueza (S) para las comunidades bacterianas presentes en cada tratamiento, al exponerlas a una concentración de 20 mM.

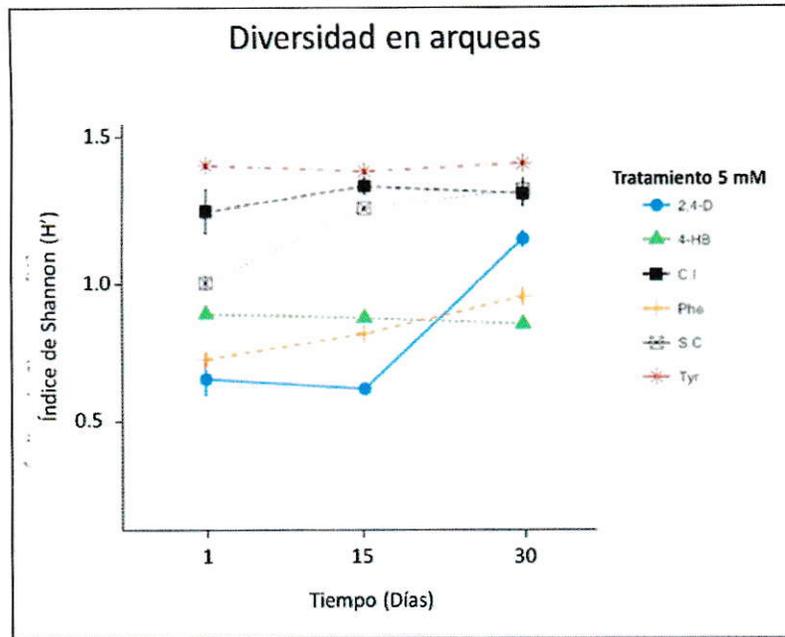


Figura 22. Cambios temporales del índice de diversidad (H') para las comunidades de arqueas presentes en cada tratamiento, al exponerlas a una concentración de 5 mM.

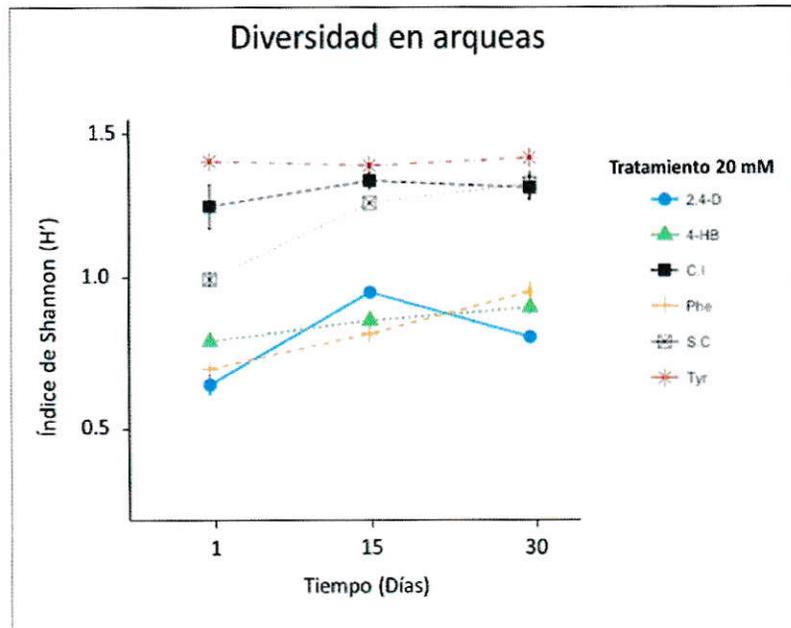


Figura 23. Cambios temporales del índice de diversidad (H') para las comunidades de arqueas presentes en cada tratamiento, al exponerlas a una concentración de 20 mM.

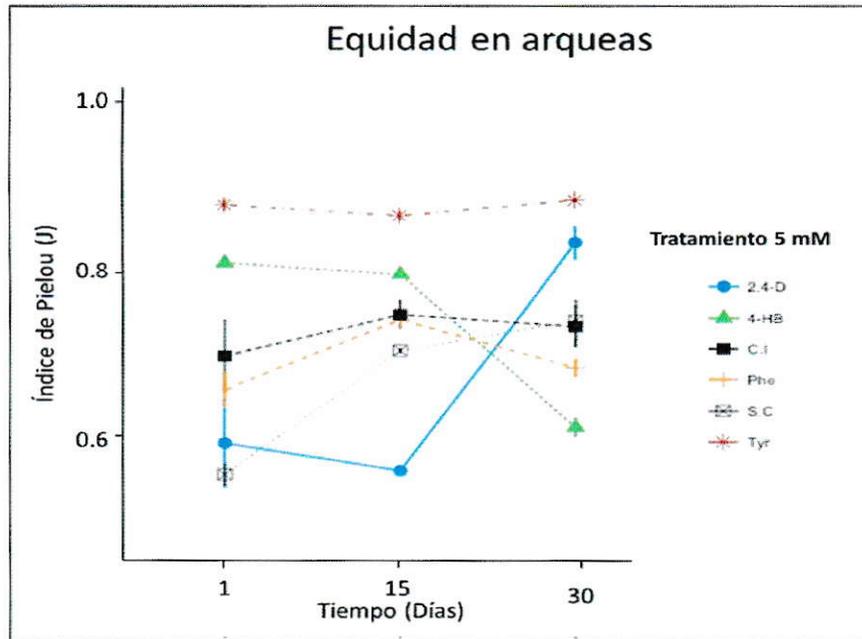


Figura 24. Cambios temporales del índice de equidad (J) para las comunidades de arqueas presentes en cada tratamiento, al exponerlas a una concentración de 5 mM.

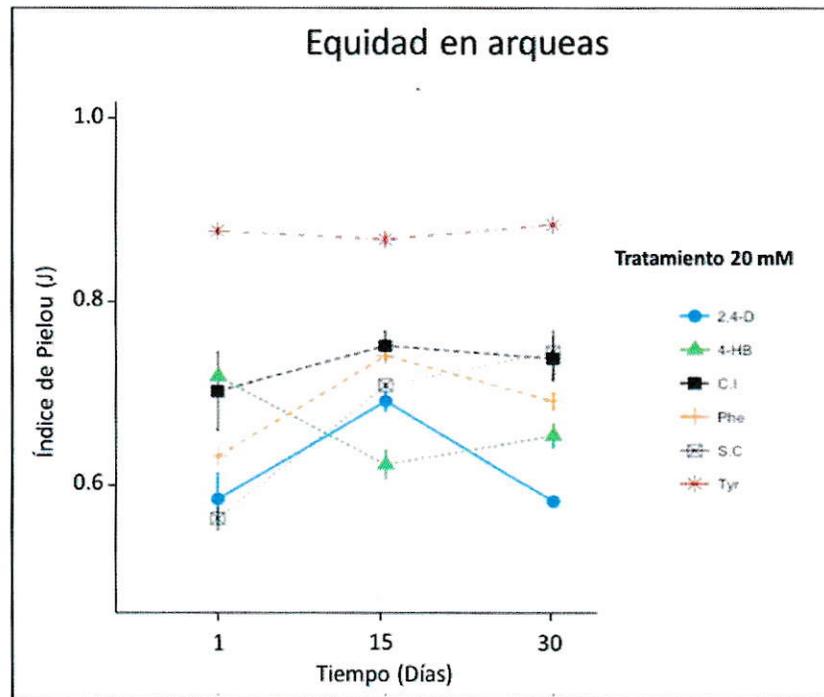


Figura 25. Cambios temporales del índice de equidad (J) para las comunidades de arqueas presentes en cada tratamiento, al exponerlas a una concentración de 20 mM.

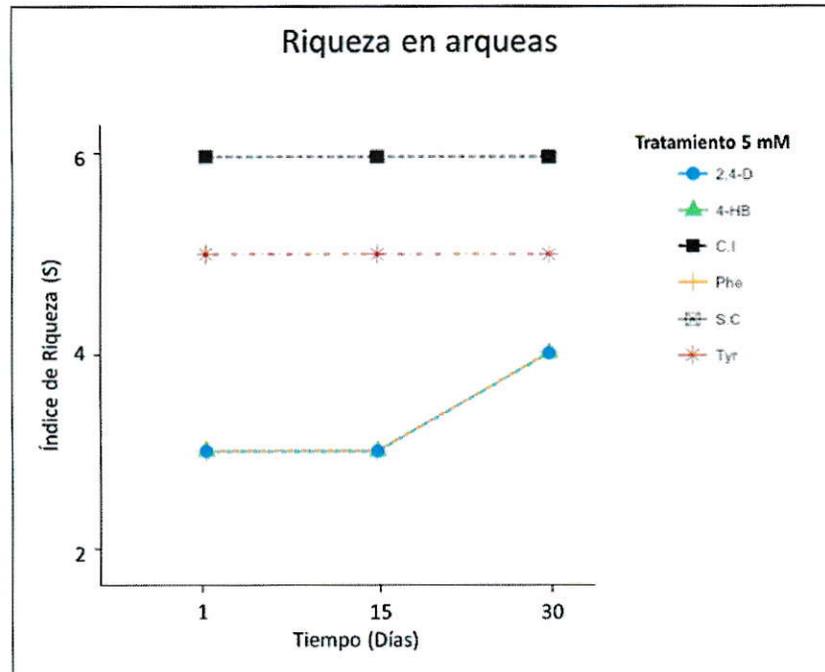


Figura 26. Cambios temporales del índice de riqueza (S) para las comunidades de arqueas presentes en cada tratamiento, al exponerlas a una concentración de 5 mM.

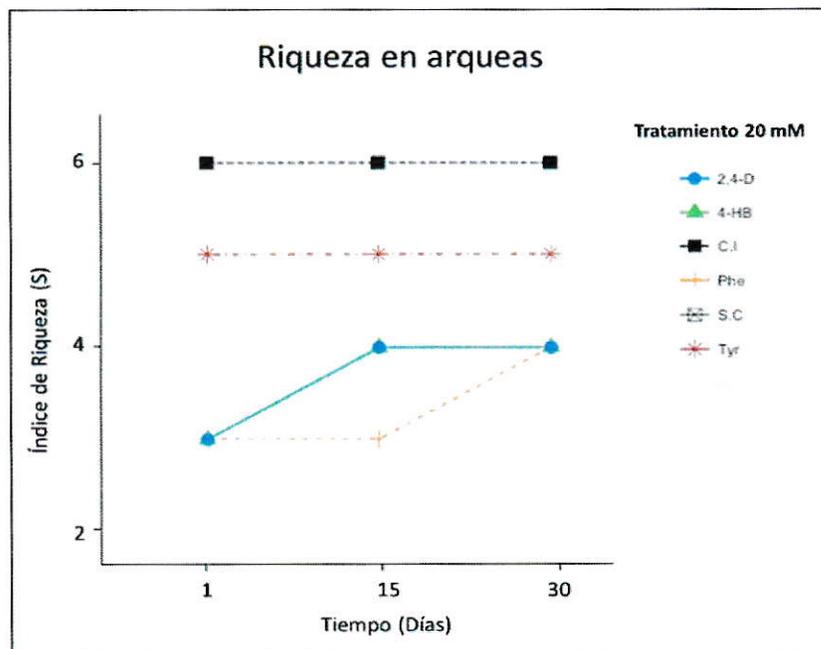


Figura 27. Cambios temporales del índice de riqueza (S) para las comunidades de arqueas presentes en cada tratamiento, al exponerlas a una concentración de 20 mM.

3.3.2 Cambios en la estructura comunitaria de bacterias y arqueas en el suelo salino por análisis de NMDS.

Las diferencias entre las estructuras comunitarias de bacterias y arqueas se visualizaron a través de NMDS. Las gráficas mostraron que existe al menos un 45% de similitud entre todas las muestras en el transcurso del tiempo y las réplicas muestran entre ellas al menos un 80% de similitud. Esta similitud (80%) también fue encontrada entre los controles C.I. y S.C., durante el transcurso del experimento. El incorporar el control S.C. resultó muy útil para demostrar que el agregar agua destilada estéril al suelo salino produce poco efecto sobre la estructura comunitaria, tanto de bacterias como de arqueas, dado que constituyen siempre un mismo grupo en conjunto con el control de incubación, alcanzando similitudes del 95%.

Como se mencionó anteriormente, al exponer a la comunidad bacteriana a la presencia de compuestos aromáticos, se generó un aumento inmediato del índice H en ambas concentraciones aplicadas (Figuras 16 y 17). Este efecto se correspondió con los valores de similitud detectados entre las comunidades bacterianas expuestas a los diferentes compuestos, con un nivel de similitud del 58% entre todas las muestras de los tratamientos que contenían algún compuesto, y con una diferencia del 8% con respecto a los controles C.I. y S.C. (Figura 28). Sin embargo, en el transcurso del tiempo se observó que la estructura comunitaria bacteriana se iba diferenciando de acuerdo al tipo de compuesto aplicado. La diferenciación estructural comunitaria bacteriana, caracterizada por la agrupación final, al día 30, está dada por el tipo de compuesto y fue registrado para todos los compuestos (Figuras 29 y 31). También se evidenciaron diferencias en la velocidad de cambio en la estructura comunitaria de acuerdo al compuesto y la concentración aplicada. Sin embargo, las comunidades expuestas a 4-HB, a diferencia de los otros compuestos, a los 30 d presentaron un alto nivel de similitud (58%) con las estructuras comunitarias de los controles al mismo tiempo (Figura 30), lo que indica que la recuperación de las comunidades bacterianas frente a la exposición a este compuesto fue de una alta resiliencia.

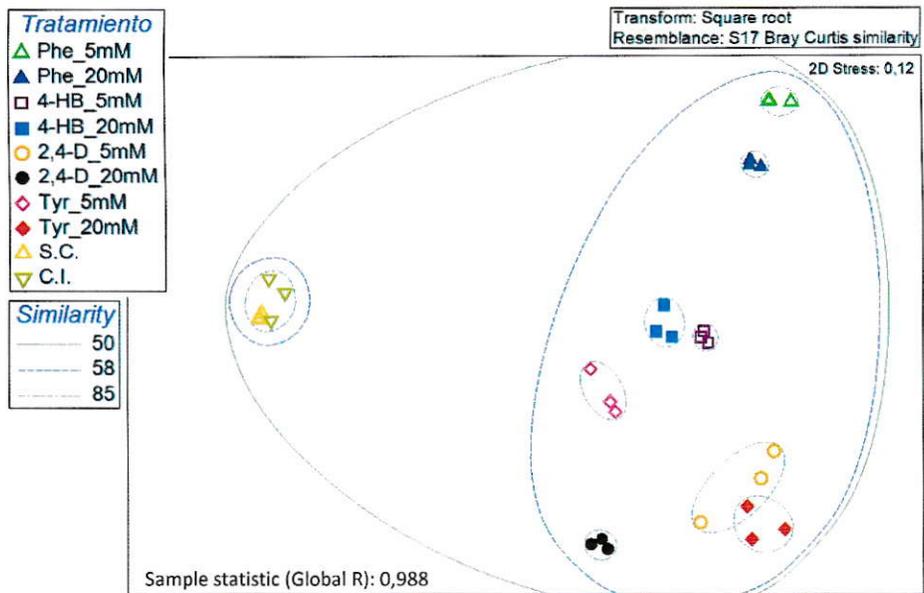


Figura 28. Análisis de las gráficas de Escalamiento Multi-Dimensional No Métrico (NMDS), para todos los tratamientos al día 1. Se observan las diferencias entre las estructuras comunitarias de bacterias, generadas utilizando la enzima AluI.

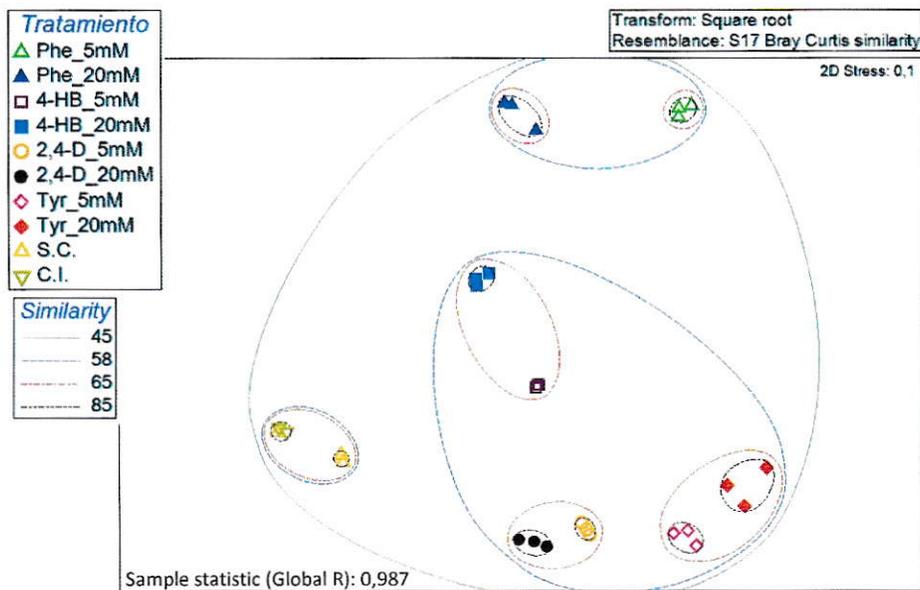


Figura 29. Análisis de las gráficas de Escalamiento Multi-Dimensional No Métrico (NMDS), para todos los tratamientos al día 15. Se observan las diferencias entre las estructuras comunitarias de bacterias, generadas utilizando la enzima AluI.

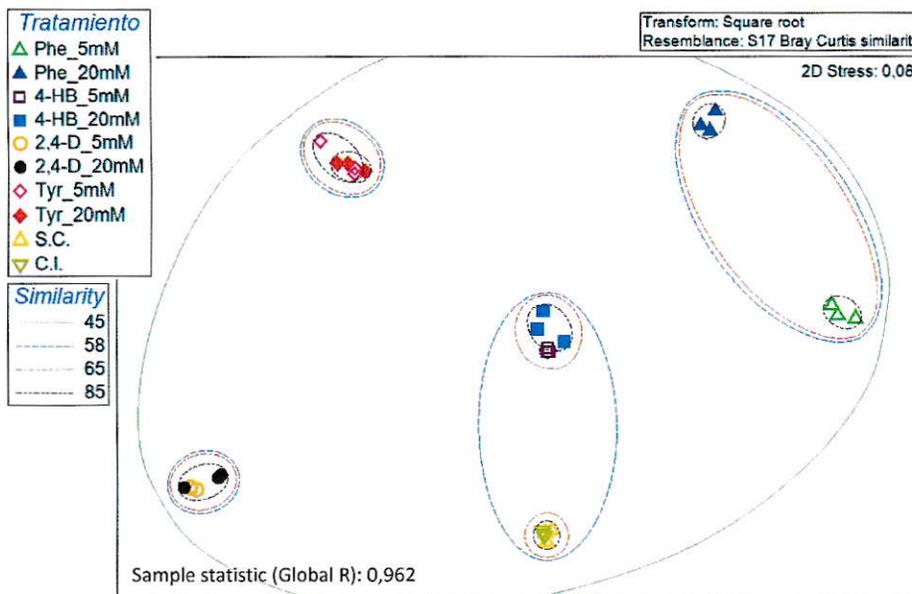


Figura 30. Análisis de las gráficas de Escalamiento Multi-Dimensional No Métrico (NMDS), para todos los tratamientos al día 30. Se observan las diferencias entre las estructuras comunitarias de bacterias, generadas utilizando la enzima AluI.

Por otro lado, el dominio de arqueas exhibió una mayor similitud entre las estructuras comunitarias de todas las muestras, con una similitud mínima entre todos los tratamientos del 58% al día 1 del experimento y, entre los tratamientos que contenían un compuesto, se registró un 65% de similitud, al día 1 (Figura 31). Al igual que las comunidades de bacterias, las comunidades de arqueas tienden a diferenciarse según el tipo de compuesto utilizado, encontrando para el día 15 tres grupos con similitudes del 65%. Un grupo representado por los tratamientos con Tyr, Phe y 2,4-D a 5 mM, un segundo grupo representado por 4-HB y 2,4-D a 20 mM y un tercer grupo representado por los controles (Figura 32). No obstante, anterior a los 30 d las comunidades de arqueas comenzaron a converger estructuralmente, llegando a un nivel de similitud del 85%, entre todos los tratamiento con compuesto (Figura 33). Al observar que las estructuras de las comunidades expuestas a los compuestos químicos exhibieron un comportamiento de diferenciación estructural, agrupándose desde los primeros días de acuerdo al factor compuesto, se realizó un análisis para cada tratamiento. Estos cambios

en las estructuras comunitarias se compararon en el tiempo y entre las concentraciones aplicadas. En el caso de las comunidades bacterianas se pudo distinguir que las mayores diferencias se presentaron al día 15 entre las comunidades expuestas a las distintas concentraciones de cada compuesto. Por ejemplo, en Tyr se observó que al día 15 la exposición a la mayor concentración generó una agrupación individual para estas muestras. No obstante, para el día 30 las comunidades expuestas a ambas concentraciones de Tyr tuvieron una similitud de al menos un 76% (Figura 34).

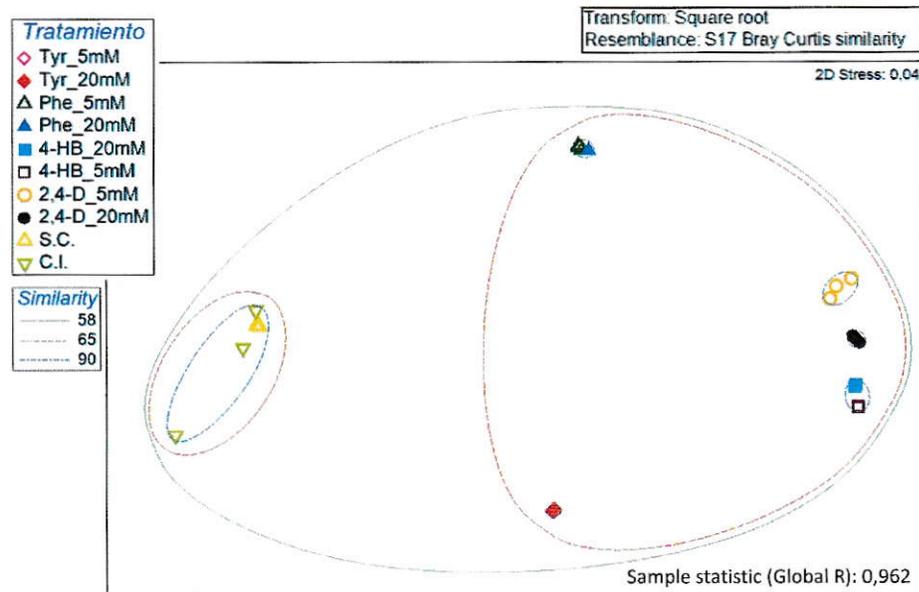


Figura 31. Análisis de las gráficas de Escalamiento Multi-Dimensional No Métrico (NMDS), para todos los tratamientos al día 1. Se observan las diferencias entre las estructuras comunitarias de arqueas, generadas utilizando la enzima AluI.

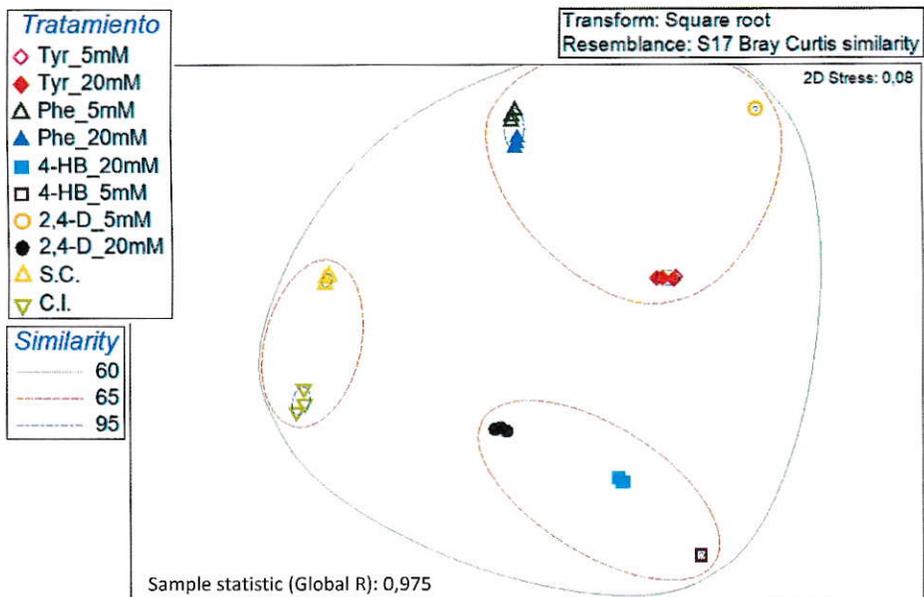


Figura 32. Análisis de las gráficas de Escalamiento Multi-Dimensional No Métrico (NMDS), para todos los tratamientos al día 15. Se observan las diferencias entre las estructuras comunitarias de arqueas, generadas utilizando la enzima AluI.

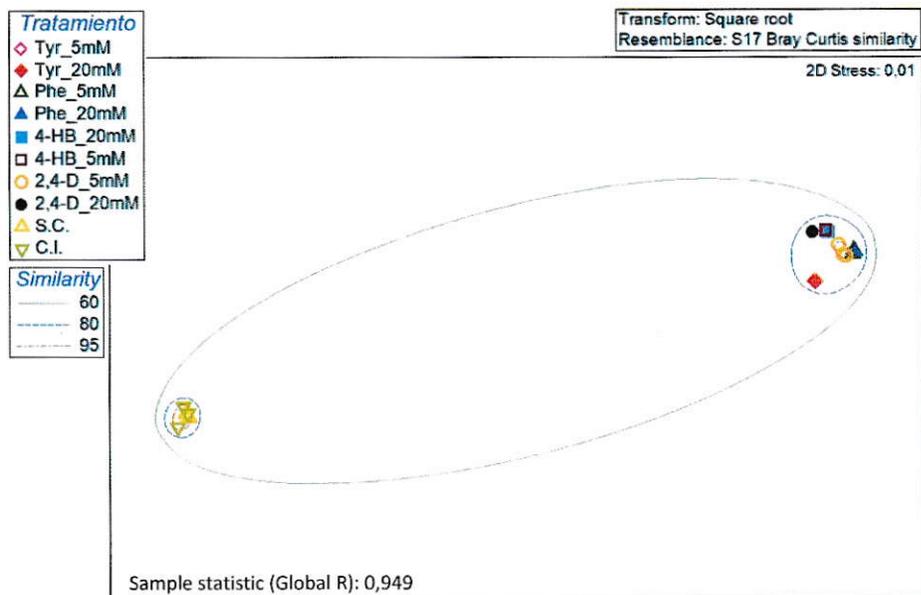


Figura 33. Análisis de las gráficas de Escalamiento Multi-Dimensional No Métrico (NMDS), para todos los tratamientos al día 30. Se observan las diferencias entre las estructuras comunitarias de arqueas, generadas utilizando la enzima AluI.

Estas diferencias a los 15 días fueron aun más acentuadas cuando se aplicó 4-HB, ya que cada comunidad en este tiempo conformó un grupo individual de acuerdo a la concentración utilizada (5 y 20 mM). A pesar de ello, al igual que en Tyr, las comunidades vuelven a congregarse al día 30 por compuesto con una similitud del 76% (Figura 35).

El mismo fenómeno de convergencia en las estructuras comunitarias bacterianas que se presentó cuando se las expuso tanto a Tyr como a 4-HB, se pudo distinguir en las comunidades expuestas a 2,4-D (Figura 28), siendo las comunidades expuestas a Phe las únicas que no mostraron una convergencia a los 30 días (Figura 37).

Para el caso de las comunidades de arqueas se encontró que los rangos de similitud entre las estructuras comunitarias por compuesto fueron mayores a las observadas para las comunidades bacterianas. A diferencia de las comunidades de bacterias, las arqueas, en todos los tratamientos, presentaron una convergencia estructural. Por ejemplo, la exposición tanto a Tyr como a 4-HB, provocaron los mayores niveles de similitud, del orden del 98%, entre las comunidades expuestas a las dos concentraciones de cada compuesto, a los 30 días (Figuras 38 y 39). En el tratamiento con 4-HB se encontró un 90% de similitud entre todas las muestras de todos los tiempos en ambas concentraciones aplicadas (Figura 39) y para los otros compuestos se registró un 70% de similitud entre las estructuras comunitarias. En menor grado se observó que en presencia de Phe, se alcanzó una similitud del 90% entre las comunidades de arqueas expuestas a ambas concentraciones, a los 30 días (Figura 36), seguido por 2,4-D con un 80% de similitud entre las comunidades, a los 30 días (Figura 41).

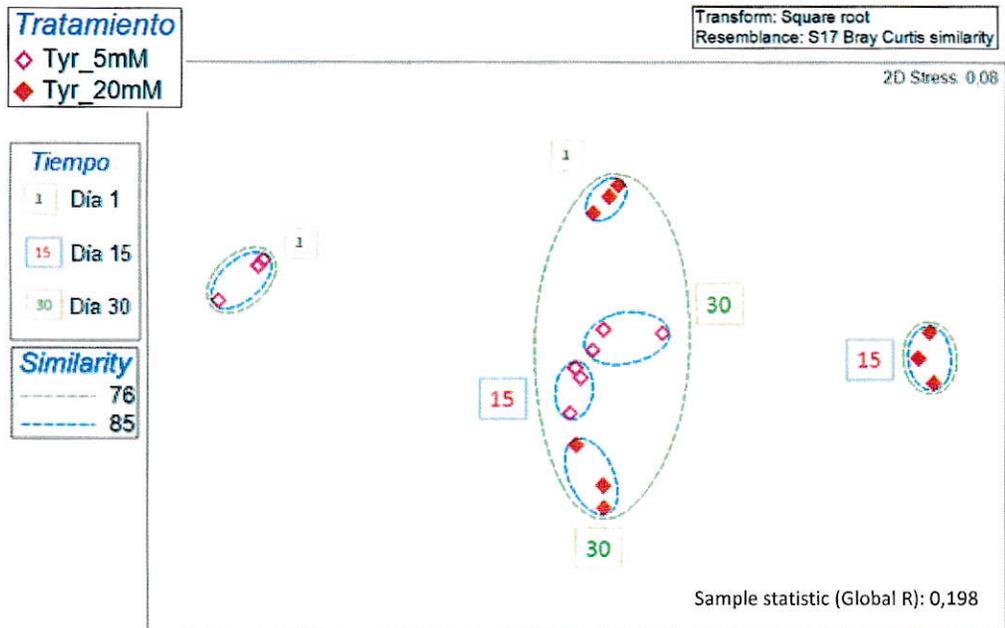


Figura 34. Efecto de la concentración de tirosina (Tyr) en la estructura comunitaria bacteriana en los tiempos 1, 15, y 30 d.

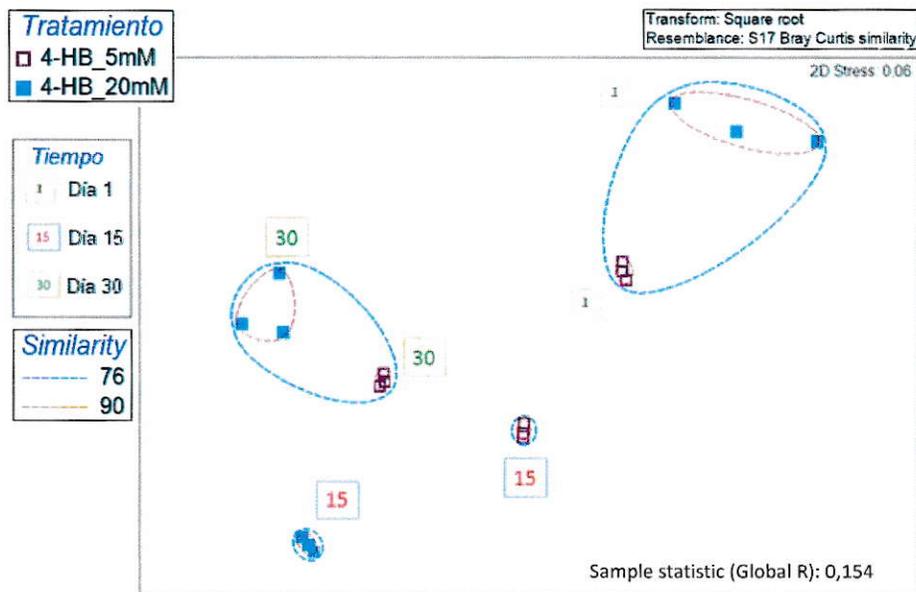


Figura 35. Efecto de la concentración del ác. 4-hidroxibenzoico (4-HB) en la estructura comunitaria bacteriana en los tiempos 1, 15, y 30 d.

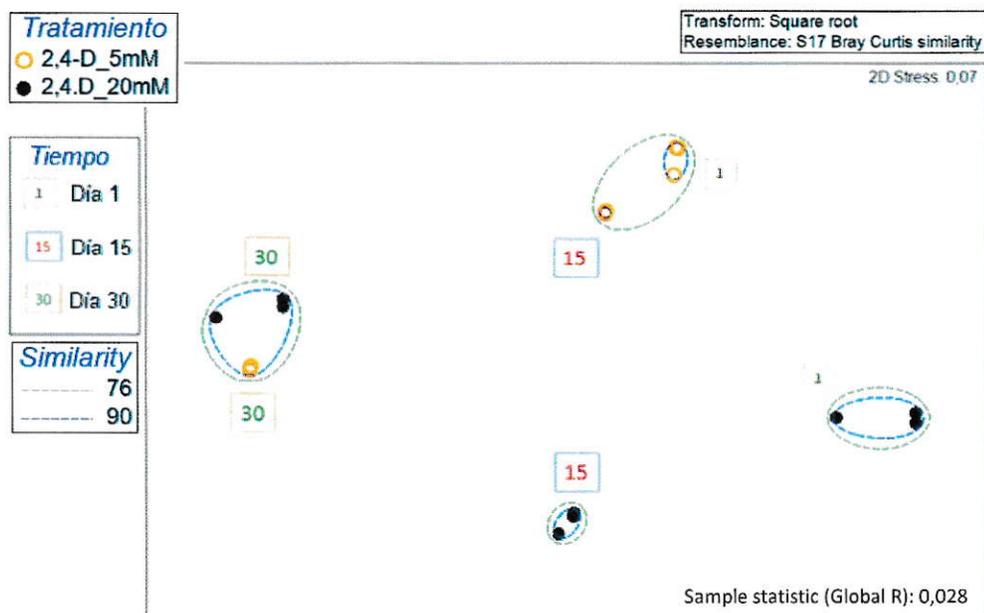


Figura 36. Efecto de la concentración del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en la estructura comunitaria bacteriana en los tiempos 1, 15, y 30 d.

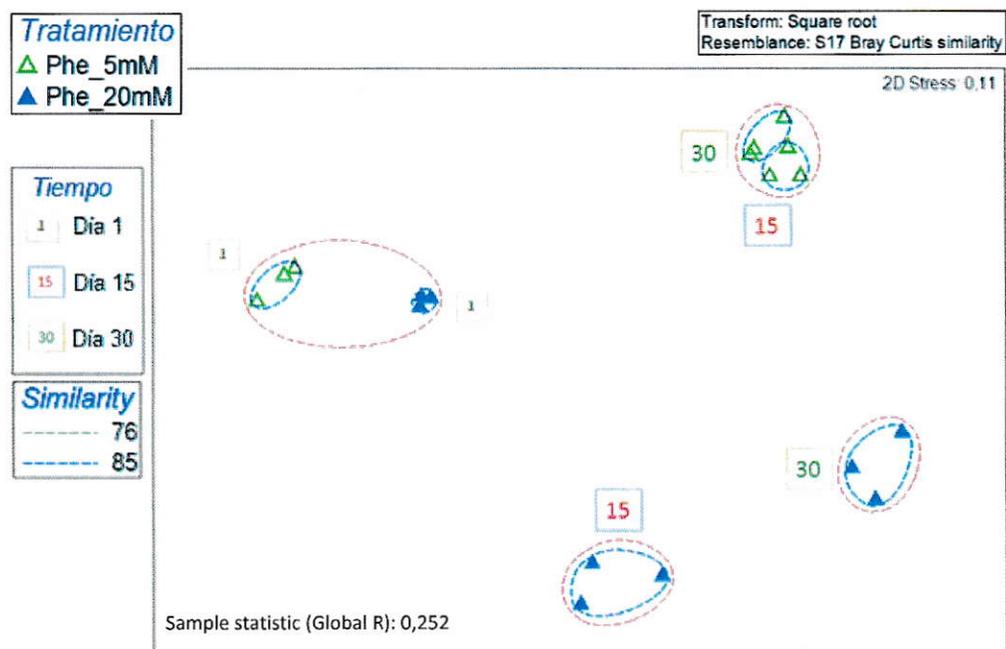


Figura 37. Efecto de la concentración de fenol (Phe) en la estructura comunitaria bacteriana en los tiempos 1, 15, y 30 d.

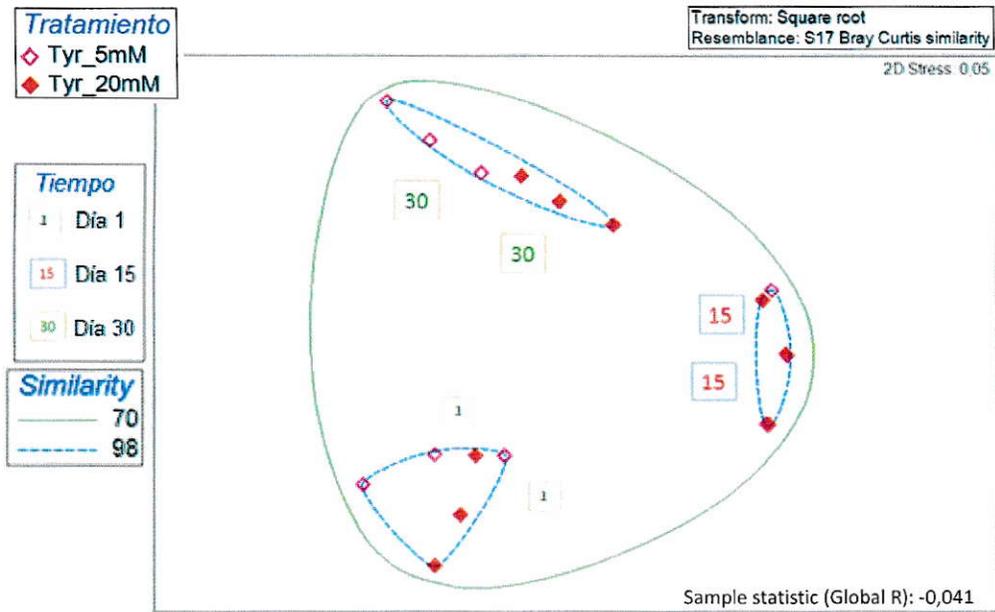


Figura 38. Efecto de la concentración de tirosina (Tyr) en la estructura comunitaria de arqueas en los tiempos 1, 15, y 30 d.

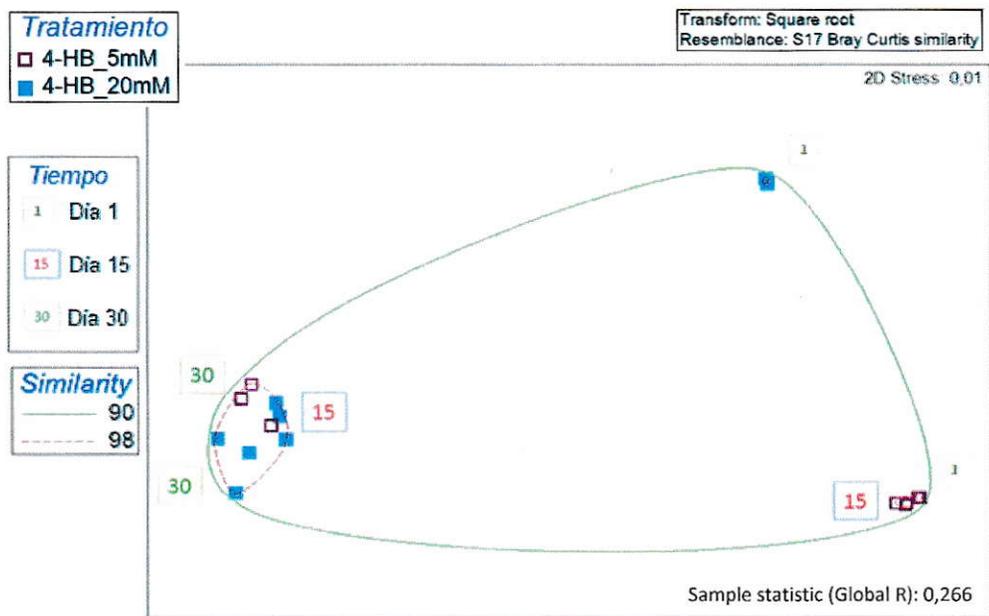


Figura 39. Efecto de la concentración del ácido 4-hidroxibenzoico (4-HB) en la estructura comunitaria de arqueas en los tiempos 1, 15, y 30 d.

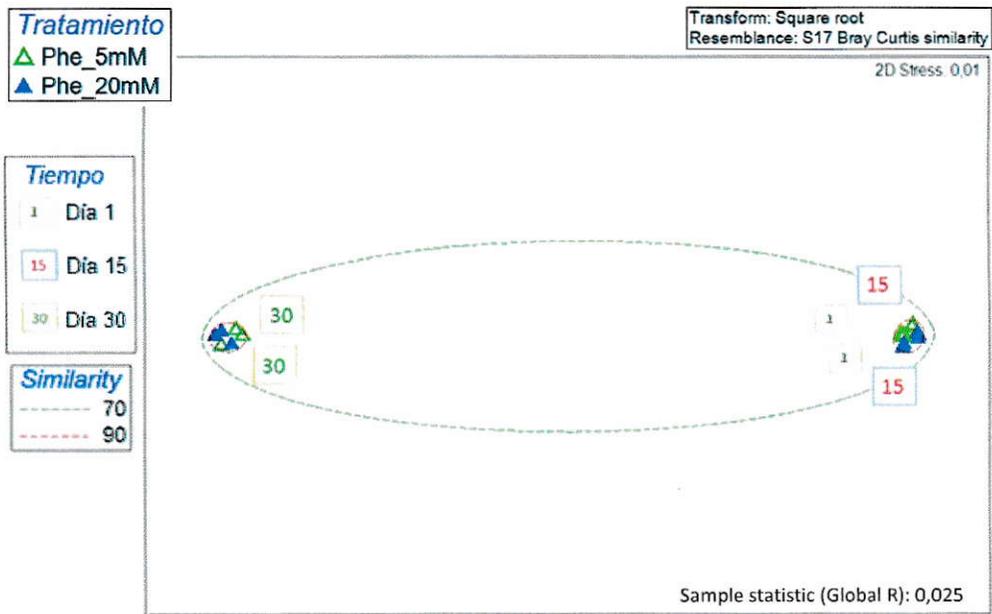


Figura 40. Efecto de la concentración de fenol (Phe) en la estructura comunitaria de arqueas en los tiempos 1, 15, y 30 d.

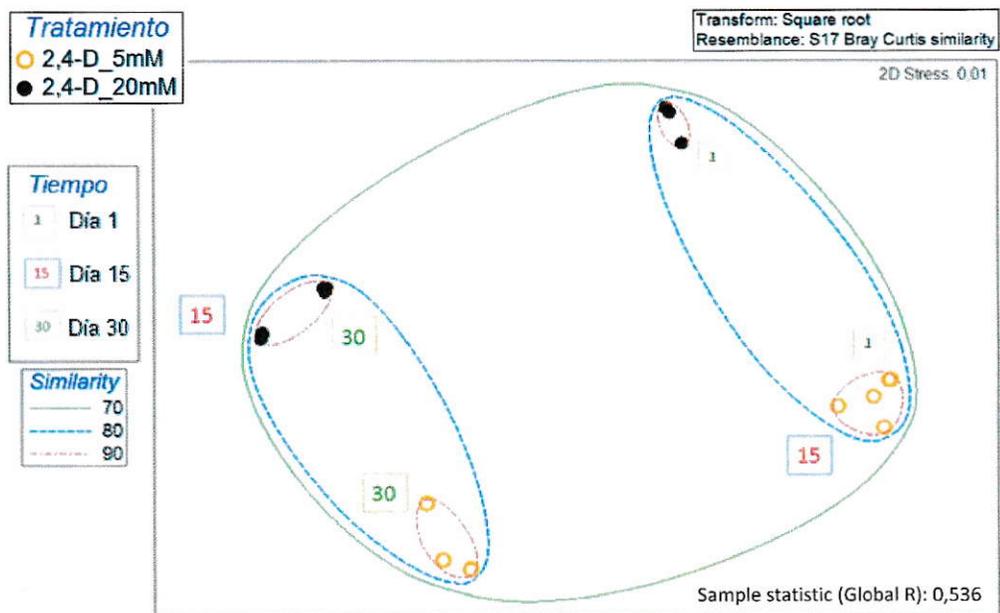


Figura 41. Efecto de la concentración del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en la estructura comunitaria de arqueas en los tiempos 1, 15, y 30 d.

Junto a estos cambios en los patrones de ensamblaje comunitario de arqueas, se observaron diferencias en la velocidad de cambio de las comunidades de arqueas, las que fueron dependientes tanto del compuesto como de la concentración utilizada. Por ejemplo, en 4-HB y 2,4-D se observó un aumento en la velocidad de los cambios estructurales entre las concentraciones aplicadas, agrupándose las muestras de los días 30 de la menor concentración con las muestras de los días 15 y 30 de la mayor concentración (Figuras 39 y 41). En cambio, con Tyr y Phe, independiente de la concentración utilizada, las comunidades de arqueas se diferenciaron a la misma velocidad. En Tyr se presentaron tres grupos bien definidos por el tiempo de muestreo (día 1, día 15 y día 30), en cambio, para Phe solo se distinguieron dos grupos, uno que agrupó a los días 1 y 15 y otro grupo con las comunidades del día 30, a ambas concentraciones (Figura 40).

En general, los cambios observados en las estructuras comunitarias tanto a través del cálculo de los índices ecológicos como a través del uso de NMDS, mostraron que las comunidades cambiaron inmediatamente al exponerlas a la presencia de algún compuesto aromático, lo que se reflejó en la lejanía estructural comunitaria con respecto al control C.I. Las mayores diferencias observadas entre estructuras comunitarias de bacterias y arqueas se dieron al día 15. Estas diferencias evidenciaron un efecto dado tanto por el compuesto como por la concentración utilizada, siendo la exposición a 2,4-D y Phe, las que generaron los cambios más acentuados. Debido a la heterogeneidad del comportamiento estructural microbiano, resultó atractivo identificar algún microorganismo versátil que pueda degradar los cuatro compuestos aromáticos en estas condiciones de salinidad.

3.4. Aislamiento de microorganismos en medios selectivos utilizando compuestos aromáticos como única fuente de carbono.

El aislamiento en los medios selectivos, utilizando como única fuente de carbono los compuestos aromáticos (Tyr, Phe, 4-HB y 2,4-D), permitió aislar e identificar 50 cepas del dominio Bacteria (Tabla 4). De éstas, el phylum *Firmicutes* y particularmente la familia *Halomonadaceae* presentó un mayor número de aislados (48%). El resto de los aislados pertenecen al phylum *Proteobacteria*, con representantes de las familias *Bacillaceae* (40% de los aislados) y *Alteromonadales* (12% de los aislados). Dentro de la familia *Halomonadaceae*, el género *Halomonas* fue el que presentó la mayor versatilidad, dado que se pudo obtener aislados tanto al usar Phe, Tyr, 2,4-D o 4-HB como única fuente de carbono. Sin embargo, los representantes de la clase *Gammaproteobacteria* también presentaron capacidad para degradar tanto 2,4-D como Phe. Por ejemplo, un representante del género *Thalassobacillus* (*Thalassobacillus devorans*) fue aislado en Phe y *Oceanobacillus* (*Oceanobacillus kimchii*) en 2,4-D, aunque para estos compuestos se registró el menor número de aislados, con 4 y 5 cepas, respectivamente. Cabe destacar que para al menos uno de los aislados, perteneciente al género *Bacillus* (*Bacillus hwajinpoensis*), del cual no se tenía registro de sus capacidades degradativas hacia el compuesto 4-HB, se observó su crecimiento en condiciones de 15% de salinidad y utilizando 5 mM de este compuesto como única fuente de carbono.

Tabla 4. Identificación mediante el análisis de identidad de las secuencias (BLASTn) de las cepas con capacidad para crecer en compuestos aromáticos como única fuente de carbono en condiciones del 15% de salinidad, aisladas desde la muestra de suelo de las salinas Lo Valdivia.

| Secuencia de referencia | N° de Acceso | Compuesto | Identidad (%) | Cobertura (%) | N° Aislados |
|---|--------------|-----------------------|---------------|---------------|-------------|
| <i>Halomonas zincidurans</i> B6 | NR_109633 | 4-HB, Tyr, Phe, 2,4-D | 98-99 | 100 | 12 |
| <i>Bacillus hwajinpoensis</i> SW-72 | NR_025264 | 4-HB | 99-100 | 99 | 9 |
| <i>Marinobacter nanhaiticus</i> D15-8W | NR_116815 | Tyr | 99-100 | 100 | 6 |
| <i>Halomonas ventosae</i> A112 | NR_042812 | Tyr | 99-100 | 100 | 5 |
| <i>Halomonas ilicicola</i> SP8 | NR_044436 | Tyr | 97-99 | 99 | 4 |
| <i>Bacillus vietnamensis</i> 15-1 | NR_024808 | 4-HB | 97-99 | 99 | 4 |
| <i>Chromohalobacter canadensis</i> | NR_114545 | Tyr | 94-97 | 100 | 3 |
| <i>Oceanobacillus kimchii</i> X50 | NR_117544 | 2,4-D | 99-100 | 100 | 3 |
| <i>Halobacillus faecis</i> NBRC 103569 | NR_114247 | 2,4-D | 99-100 | 100 | 2 |
| <i>Bacillus endophyticus</i> 2DT | NR_025122 | Phe | 92-95 | 99 | 1 |
| <i>Thalassobacillus devorans</i> G-19.1 | NR_042273 | Phe | 92-98 | 99 | 1 |

IV. DISCUSIÓN.

4.1. Características químicas del suelo de las salinas Lo Valdivia.

El suelo de las Salinas Lo Valdivia se caracterizó por tener una alta CE_{susp} (43,8 mS/cm) y CE_e (201,0 mS/cm). Estas altas conductividades no son comparables con los índices de salinidad de un suelo para cultivo, ya que los valores de clasificación son muy menores a los resultados obtenidos en este estudio. Por ejemplo, si se compara la CE_e obtenida en este trabajo con la clasificación actual de un ambiente extremadamente salino (16 mS/cm), éste corresponde a 12,5 veces menos que el valor observado en el suelo utilizado en este estudio. Según los reportes de Shi, Z., y col. (2005) y Li, F. y col. (2014), los suelos salinos costeros presentan conductividades por lo general entre 20 mS/cm a 50 mS/cm y los estudios de Rhykerd, R., y col. (1995) y Yuan, B. y col. (2007), indican que cuando la CE_e va desde 23,05 hasta 32 mS/cm, se produce una reducción exponencial de la actividad metabólica en los suelos, lo que inhibe la degradación de compuestos orgánicos. Los resultados obtenidos indican la presencia de una alta conductividad en el suelo, superando en 4 veces las conductividades presentadas en suelos salinos costeros, por lo que la actividad de degradación microbiana de compuestos orgánicos debería encontrarse muy disminuida. Esta alta salinidad y el pH neutro (7,15) que presentó el suelo de las Salinas de Lo Valdivia, permite clasificarlo como un suelo salino, sin embargo, el alto valor obtenido del RAS (52,3), determina que este suelo posee características de un suelo salino-sódico (Rietz, D. N. & Haynes, R. J., 2003; Sardinha, M., y col., 2003; Mavi, M. S., y col., 2012).

A pesar del escaso conocimiento que se tiene del efecto de la salinidad sobre las comunidades microbianas en los procesos de biodegradación de compuestos aromáticos, existe algún consenso en que el aumento en la salinidad inhibe la actividad microbiana (Leahy, J. G. & Colwell, R. R., 1990; Beltrán-Hernández, R. I., y col., 2007; Chowdhury, A., y col., 2008; Nie, M., y col., 2009). En estudios recientes se ha propuesto que a altas salinidades disminuye el oxígeno disponible, afectando

negativamente la acción de enzimas oxigenasas, lo que incide en la velocidad de degradación de este tipo de compuestos (Marín, J. A., y col., 2005). Además, se ha detectado que el aumento de la salinidad produce cambios a nivel de phylum y subphylum en las comunidades microbianas, afectando así el potencial de biodegradación (Vasudevan, N. & Rajaram, P., 2001; Campbell, B. J. & Kirchman, D. L., 2013). No solo los efectos de la salinidad influyen la actividad de las comunidades microbianas, también se ha visto que el aumento de la M.O. puede disminuir la capacidad biodegradativa de los compuestos químicos ensayados, debido a la adsorción de estos (Perucci, P., y col., 2000). No obstante lo anterior, se ha propuesto que sobre el 1% de M.O. es esencial para asegurar la actividad microbiana para degradar compuestos aromáticos (Burns, R. G. & Davies, J. A., 1986), por lo que, a partir de los resultados obtenidos en este estudio para este parámetro (M.O: 2,09%), podemos inferir que la M.O. no representa un factor importante que produzca un detrimento en la actividad microbiana.

4.2. Dinámica de las comunidades microbianas del suelo salino-sódico.

El suelo salino-sódico de este estudio presentó una alta diversidad de especies de bacterias, muy por sobre la detectada para arqueas; sin embargo, al estar ambas comunidades expuestas a los compuestos aromáticos su desarrollo se afectó, lo que se tradujo en las variaciones en la diversidad (H'), equidad (J) y riqueza (S) desde el primer día de exposición a los compuestos aromáticos. Este cambio estructural inmediato, que también se evidenció en las gráficas de NMDS, refleja la sensibilidad que tienen ciertos microorganismos frente a la exposición a las perturbaciones utilizadas. Estos resultados concuerdan con estudios realizados sobre los cambios en las comunidades microbianas, bajo perturbaciones abióticas, los que demuestran la sensibilidad de las comunidades frente a este tipo de perturbaciones (Shade, A., y col., 2012). No obstante, los resultados apuntan a que tanto bacterias como arqueas se ven afectadas por la exposición a los compuestos aromáticos, sin embargo, las arqueas presentan una mayor resistencia a estas perturbaciones, con un grado de similitud del 65% entre todas las estructuras de las comunidades expuestas a un compuesto al primer día de exposición, en comparación con

las comunidades de bacterias que presentaron un 58% de similitud. Esto podría indicar que todos los compuestos tienen un efecto sobre los mismos grupos taxonómicos de microorganismos presentes en el suelo salino, posiblemente debido a que la base estructural de todos los compuestos utilizados es similar, presentando un anillo de benceno central. Sin embargo, en el transcurso del tiempo se observaron diferencias según el compuesto aplicado, tanto en su efecto particular sobre las comunidades microbianas, como en sus tasas de degradación entre los compuestos más lábiles y recalcitrantes. Estas diferencias entre los compuestos pueden ser explicados, debido a los sustituyentes OH, COOH, NH₂ en el anillo fenil, los que los hacen más susceptible al ataque microbiano. En cambio, con sustituyentes halógenados, la molécula se hace más resistente a la biodegradación, lo que podría explicar la baja remoción del compuesto 2,4-D (Cork, D. J. & Krueger, J. P., 1991).

Estas diferencias que presentaron en el tiempo los diversos compuestos, se evidenciaron claramente en el tratamiento con Phe, para el cual se observó un aumento en la diversidad y una disminución en la equidad de las comunidades, acompañada de una alta remoción del compuesto al día 15. Esto podría indicar que existe un efecto selectivo del compuesto sobre ciertos microorganismos especializados en su remoción (Müller, A. K., y col., 2002; Piubeli, F., y col., 2012). Estas observaciones fueron más pronunciadas cuando se aplicó la concentración más alta (20 mM) de exposición a Phe en las comunidades de bacterias y arqueas, lo que resalta el efecto del aumento de la concentración del compuesto sobre la estructura comunitaria. Estos resultados concuerdan con lo propuesto por Ager D., y col. (2010), en que se muestra cómo las variaciones en las concentraciones de los compuestos influyen particularmente sobre las estructuras y funciones de las comunidades microbianas durante la biodegradación del compuesto.

Por su parte, las comunidades expuestas a 2,4-D presentaron grandes variaciones en los índices ecológicos. Esto podría ser un indicador del gran impacto que causa este compuesto sobre las comunidades, tanto de bacterias como arqueas. La baja predominancia de algún microorganismo en la comunidad, observado a través de los

altos valores del índice de equidad (J), junto a la baja remoción registrada de 2,4-D, podrían indicar que las comunidades se encuentran en una fase de adaptación a la perturbación hasta el día 30, por lo que para poder evidenciar la resiliencia comunitaria es necesario evaluar la dinámica comunitaria a tiempos mayores. El impacto que provoca la presencia de este compuesto sobre la actividad de las comunidades microbianas se puede deber al estrés oxidativo que éste provoca, ya que se ha encontrado que bacterias expuestas a este compuesto reprimen sus procesos de crecimiento y activan procesos de regeneración de la pared celular, lo que provoca a su vez, la inhibición de cualquier tipo de metabolización del compuesto (Grossmann, K., 2010; Pazmiño, D., y col., 2012; Bhat, S. V., y col., 2015). Esta característica recalitrante, baja remoción del 2,4-D, se ha observado también en estudios en que luego de la exposición a este compuesto, la bacteria *Pseudomonas putida* disminuye su actividad metabólica relacionada a los procesos de fosforilación oxidativa y biosíntesis de ATP, inhibiéndose su crecimiento y perjudicando su capacidad biodegradativa (Benndorf, D., y col., 2006; Dejonghe, W., y col., 2000). Además, estos estudios demuestran que concentraciones superiores a 5 mM son dañinas para la estructura celular de esta especie. Estos efectos perjudiciales también se han observado en comunidades microbianas (Fabra A., y col., 1993; Prado, A. G. S., & Airoidi, C., 2000). Dado esto, se explican los cambios en los índices ecológicos y las bajas tasas de degradación del compuesto en este estudio. Sin embargo, pese al efecto perjudicial que genera el 2,4-D sobre las comunidades microbianas, se pudo detectar que las tasas de remoción de 2,4-D tanto a 5 mM como a 20 mM al día 15 son similares a las reportadas por Dejonghe, W., y col. (2000), en el que se informa sobre una degradación de 100 mg Kg⁻¹ de 2,4-D en el suelo en 14 días. Estos resultados podrían indicar que el herbicida en este estudio afectó a la comunidad provocando que algunos microorganismos se vean inhibidos y otros comiencen a realizar un gasto energético para la metabolización del compuesto. Por lo que se podría pensar que existe un efecto conjunto de la salinidad y el tipo de compuesto que produce el retraso en la biodegradación.

Por su parte, los compuestos 4-HB y tirosina se presentan como los menos tóxicos para las comunidades microbianas, dado que éstos generan aumentos en la diversidad, riqueza y equidad frente a los demás tratamientos para la menor concentración.

Además, las comunidades expuestas a estos compuestos presentaron un alto nivel de resiliencia, el que se relaciona con la alta tasa de remoción de los compuestos, aunque existan pocos estudios que demuestren una recuperación o resiliencia en la comunidad (Girvan, M. S., y col., 2005). A pesar de ello, en este estudio al exponer las comunidades microbianas a estos compuestos, se produce una mayor participación de bacterias que se encontraban en baja abundancia. Esto podría indicar que estos compuestos a bajas concentraciones tienen un efecto estimulante de carácter no selectivo, dado que generan aumentos en los índices de equidad. Si bien al aumentar la concentración de estos compuestos se producen mayores efectos deletéreos en las comunidades microbianas, el comportamiento de las estructuras comunitarias fue similar al mostrado frente a la exposición a 5 mM con periodos más largos, ya que se mantuvo el efecto estimulante durante los 30 días.

Esta información resulta útil por el desconocimiento que existe sobre el impacto que pueden provocar los compuestos monoaromáticos provenientes de los efluentes agroindustriales en ambientes vulnerables como los suelos salinos, ya que el 2,4-D como el compuesto más persistente en estos ambientes, podría generar impactos importantes al lixiviarse este compuesto organoclorado hacia capas más profundas del suelo, debido a su solubilidad en agua (Cox, L., y col., 2000; Merini, L. J., y col., 2007; Gaultier, J., y col., 2009). Esto podría afectar a las comunidades del suelo principalmente por la concentración aplicada (Dejonghe, W., y col., 2000). Por lo que con base en estas técnicas microbiológicas, se pudieron diferenciar los niveles de toxicidad de diferentes compuestos semejantes, permitiendo diagnosticar preliminarmente el estado del suelo según la concentración aplicada y así utilizar alguna estrategia de biorremediación o solo bioestimular la microbiota del suelo para mejorar la autodepuración del sitio.

Contar con información de la capacidad intrínseca de las comunidades microbianas para sobreponerse a perturbaciones como las descritas en este estudio es importante para encontrar formas sustentables de recuperar suelos contaminados. Una alternativa cada vez más utilizada es utilizar microorganismos aislados y adaptados para su uso en estrategias de biorremediación.

4.3. Potenciales degradadores de compuestos aromáticos y su uso en remediación ambiental.

Este estudio pudo evidenciar el potencial microbiano de un suelo que no posee historia de contaminación por compuestos aromáticos. Esto refleja la capacidad de adaptación de estos ecosistemas frente a alguna perturbación, lo que se refleja en el número de aislados obtenidos por cada compuesto. Por ejemplo, la menor cantidad de aislados fue obtenida cuando se expuso a las comunidades microbianas a los compuestos más tóxicos (2,4-D y Phe), lo que se correlaciona con los cambios detectados en los índices ecológicos y las diferencias estructurales observadas a través de las gráficas de NMDS. La mayoría de los microorganismos fueron aislados desde los tratamientos que contenían los compuestos Tyr y 4-HB, lo que se relaciona con los altos índices de diversidad y riqueza detectados en las comunidades microbianas expuestas a estos compuestos.

Miembros del género *Halomonas* fueron capaces de crecer en cada uno de los cuatro compuestos como única fuente de carbono y energía. Representantes de este género se han encontrado en sitios contaminados con hidrocarburos, presentando capacidades para crecer en Phe y ácidos aromáticos en condiciones salinas (Martínez-Cánovas, M. J., y col., 2004; Cuadros-Orellana, S., y col., 2006; Piubeli, F., y col., 2012). Además, se ha registrado que miembros de este género son capaces de degradar compuestos aromáticos como Phe a concentraciones industriales ($1100-1200 \text{ mgL}^{-1}$) en condiciones de alta salinidad (18% de NaCl). Incluso ha sido capaz de degradar 1200 mgL^{-1} de Phe en 9 d con 10% de NaCl (Haddadi, A. & Shavandi, M., 2013).

Por otro lado, desde el 2008 no se habían reportado estudios que describieran las capacidades del género *Chromohalobacter* para degradar compuestos aromáticos en condiciones del 10% de NaCl (Kim, D., y col., 2008). Sin embargo, durante el 2015 se ha descrito a este género como uno de los más versátiles en la biodegradación de compuestos orgánicos, con capacidad para crecer en 4-HB, naftaleno, fenantreno y pireno en condiciones de alta salinidad (Erdogmus, S. F., y col., 2015).

Los géneros *Chromohalobacter* y *Halomonas* han sido previamente identificados en las salinas Lo Valdivia, asociados a la rizósfera de plantas nativas de este sitio en estudio (Mora-Ruiz, M. R., y col., 2015), por lo que sus capacidades biodegradativas pueden estar relacionadas a su capacidad natural para interactuar con estas plantas utilizando sus exudados radiculares como fuente de carbono para su crecimiento, ya que son compuestos estructuralmente análogos a los ensayados en este estudio.

Por otro lado, en este estudio se pudo establecer que los géneros *Marinobacter* y *Thalassobacillus* también poseen capacidades para degradar compuestos aromáticos en condiciones salinas, tal como se había descrito previamente (García, M. T., y col., 2005; Al-Awadhi, H., y col., 2007; Gao, W., y col., 2013). Incluso miembros del género *Bacillus* han demostrado poseer la capacidad para degradar compuestos aromáticos complejos como por ejemplo naftaleno al 6% de NaCl (Yastrebova, O. V., y col., 2009). Sin embargo, es el género *Halomonas* el que ha generado el mayor interés para su utilización en estrategias de biorremediación en condiciones de alta salinidad, dada su versatilidad y los altos rendimientos registrados previamente en la remoción de los diferentes compuestos en presencia de altas concentraciones de sal.

V. CONCLUSIONES.

El suelo de las salinas Lo Valdivia, se caracterizó por presentar una alta conductividad, un elevado índice de RAS y un pH neutro, por lo que, se concluye que el suelo se puede clasificar como salino-sódico. Además, este suelo presentó un porcentaje de M.O. que permite la actividad de microorganismos en este ambiente.

El herbicida 2,4-D resultó ser el compuesto más recalcitrante a la biodegradación en el suelo salino y el que produce el mayor efecto sobre las comunidades microbianas, lo que se traduce en los bajos valores en los índices ecológicos de diversidad, riqueza y sus bajas tasas de remoción. En cambio, el efecto tóxico de Phe permitió la selección de ciertos microorganismos especialistas en su degradación favoreciendo su abundancia en el suelo salino-sódico. Por otro lado, el 4-HB fue el compuesto que registró los efectos menos tóxicos sobre las comunidades tanto de bacterias como arqueas, similar al efecto producido por Tyr, ambos compuestos producen altos valores de diversidad, equidad, riqueza y altas tasas de remoción para las dos concentraciones ensayadas (5mM y 20mM).

Utilizar herramientas moleculares, diferentes análisis estadísticos y computacionales, otorgan una visión global de lo que sucede en el ecosistema, permitiendo discriminar el efecto que tiene una perturbación sobre las comunidades microbianas. Por lo tanto, su uso como complemento a los análisis de rutina que se realizan actualmente para evaluar el impacto de un determinado compuesto en el ambiente, resulta evidentemente necesario.

Las aproximaciones moleculares y aquellas cultivo-dependientes son útiles para identificar y aislar microorganismos que crecen en condiciones de alta salinidad y en presencia de los diferentes compuestos aromáticos. Estos aislados podrían ser útiles para su aplicación en estrategias de biorremediación de sitios salinos contaminados.

VI. REFERENCIAS.

- **Abd Elrahman, S. H., Mostafa, M. A. M., Taha, T. A., Elsharawy, M. A. O. & Eid, M. A. (2012). *Effect of different amendments on soil chemical characteristics, grain yield and elemental content of wheat plants grown on saltaffected soil irrigated with low quality water. Annals of Agricultural Sciences*, 57(2), 175-182.
- **Afzal, M., Iqbal, S., Rauf, S. & Khalid, Z. M. (2007). *Characteristics of phenol biodegradation in saline solutions by monocultures of Pseudomonas aeruginosa and Pseudomonas pseudomallei. Journal of Hazardous Materials*, 149(1), 60-66.
- **Ager, D., Evans, S., Li, H., Lilley, A. K. & Van Der Gast, C. J. (2010). *Anthropogenic disturbance affects the structure of bacterial communities. Environmental Microbiology*, 12(3), 670-678.
- **Aichberger, H., Hasinger, M., Braun, R. & Loibner, A. P. (2005). *Potential of preliminary test methods to predict biodegradation performance of petroleum hydrocarbons in soil. Biodegradation*, 16(2), 115-125.
- **Al-Awadhi, H., Sulaiman, R. H., Mahmoud, H. M. & Radwan, S. S. (2007). *Alkaliphilic and halophilic hydrocarbon-utilizing bacteria from Kuwaiti coasts of the Arabian Gulf. Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(1), 183-186.
- **Allison, S. D., & Martiny, J. B. (2008). *Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(Supplement 1), 11512-11519.
- **Alva, V. A. & Peyton, B. M. (2003). *Phenol and catechol biodegradation by the haloalkaliphile Halomonas campisalis: influence of pH and salinity. Environmental Science & Technology*, 37(19), 4397-4402.
- **Andrei, A. S., Banciu, H. L. & Oren, A. (2012). *Living with salt: metabolic and phylogenetic diversity of archaea inhabiting saline ecosystems. FEMS Microbiology Letters*, 330(1), 1-9.
- **Anjum, R., Rahman, M., Masood, F. & Malik, A. (2012). *Bioremediation of pesticides from soil and wastewater. In Environmental Protection Strategies for Sustainable Development Springer Netherlands*. pp. 295-328.
- **Arias-Barrau, E., E. R. Olivera, J. M. Luengo, C. Fernandez, B. Galan, J. L. Garcia, E. Diaz, & B. Minambres. (2004). *The homogentisate pathway: a central catabolic pathway involved in the degradation of L-phenylalanine, L-tyrosine, and 3-hydroxyphenylacetate in Pseudomonas putida. Journal of Bacteriology*, 186(15), 5062-5077.
- **Bastías, E., González-Moro, M. B., & González-Murua, C. (2014). *Interactive effects of excess boron and salinity on response curves of gas exchange to increase in the*

intensity of light of Zea maysmylacea from the Lluta Valley (Arica-Chile).IDESIA (Chile).

**Beer, K. D., Wurtmann, E. J., Pinel, N. & Baliga, N. S. (2014). Model organisms retain an “ecological memory” of complex ecologically relevant environmental variation. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(6), 1821-1831.

**Beltrán-Hernández, R. I., Luna-Guido, M. L. & Dendooven, L. (2007). Emission of carbon dioxide and dynamics of inorganic N in a gradient of alkaline saline soils of the former lake Texcoco. *Applied Soil Ecology*, 35(2), 390-403.

**Benndorf, D., Thiersch, M., Loffhagen, N., Kunath, C. & Harms, H. (2006). Pseudomonas putida KT2440 responds specifically to chlorophenoxy herbicides and their initial metabolites. *Proteomics*, 6(11), 3319-3329.

**Bhat, S. V., Booth, S. C., Vantomme, E. A., Afroj, S., Yost, C. K. & Dahms, T. E. (2015). Oxidative stress and metabolic perturbations in Escherichia coli exposed to sublethal levels of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Chemosphere*, 135, 453-461.

**Blackwood, C. B., Hudleston, D., Zak, D. R. & Buyer, J. S. (2007). Interpreting ecological diversity indices applied to terminal restriction fragment length polymorphism data: insights from simulated microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), 5276-5283.

**Bronick, C. J. & Lal, R. (2005). Soil structure and management: a review. *Geoderma*, 124(1), 3-22.

**Burns, R. G. & Davies, J. A. (1986). The microbiology of soil structure. *Biological Agriculture & Horticulture*, 3(2-3), 95-113.

**Campbell, B. J. & Kirchman, D. L. (2013). Bacterial diversity, community structure and potential growth rates along an estuarine salinity gradient. *The ISME Journal*, 7(1), 210-220.

**Cederlund, H., Wessén, E., Enwall, K., Jones, C. M., Juhanson, J., Pell, M., Philippot L. & Hallin, S. (2014). Soil carbon quality and nitrogen fertilization structure bacterial communities with predictable responses of major bacterial phyla. *Applied Soil Ecology*, 84, 62-68.

**Chen, S. Y., Guo, L. Y., Bai, J. G., Zhang, Y., Zhang, L., Wang, Z., Chen J. X., Yang H. X. & Wang, X. J. (2015). Biodegradation of p-hydroxybenzoic acid in soil by Pseudomonas putida CSY-P1 isolated from cucumber rhizosphere soil. *Plant and Soil*, 389(1-2), 197-210.

**Chowdhury, A., Pradhan, S., Saha, M. & Sanyal, N. (2008). Impact of pesticides on soil microbiological parameters and possible bioremediation strategies. *Indian Journal of Microbiology*, 48(1), 114-127.

- **Clarke, K. R. (1993). *Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure*. *Australian Journal of Ecology*, 18, 117-117.
- **Cork, D. J. & Krueger, J. P. (1991). *Microbial transformations of herbicides and pesticides*. *Advances in Applied Microbiology*, 36, 1-66.
- **Cox, L., Celis, R., Hermosín, M. C. & Cornejo, J. (2000). *Natural soil colloids to retard simazine and 2,4-D leaching in soil*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(1), 93-99.
- **Cuadros-Orellana, S., Pohlschröder, M. & Durrant, L. R. (2006). *Isolation and characterization of halophilic archaea able to grow in aromatic compounds*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 57(3), 151-154.
- **Darwish, T., Atallah, T., El Moujabber, M. & Khatib, N. (2005). *Salinity evolution and crop response to secondary soil salinity in two agro-climatic zones in Lebanon*. *Agricultural Water Management*, 78(1), 152-164.
- **Davezza, M., Fabbri, D., Pramauro, E. & Prevot, A. B. (2013). *Photocatalytic degradation of chlorophenols in soil washing wastes containing Brij 35. Correlation between the degradation kinetics and the pollutants-micelle binding*. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(5), 3224-3231.
- **de-Bashan, L. E., Hernandez, J. P. & Bashan, Y. (2012). *The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation—A comprehensive evaluation*. *Applied Soil Ecology*, 61, 171-189.
- **Dejonghe, W., Goris, J., El Fantroussi, S., Höfte, M., De Vos, P., Verstraete, W. & Top, E. M. (2000). *Effect of dissemination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) degradation plasmids on 2,4-D degradation and on bacterial community structure in two different soil horizons*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), 3297-3304.
- **Mora-Ruiz, M.R., Font-Verdera, F., Díaz-Gil, C., Urdiain, M., Rodríguez-Valdecantos, G., González, B., Orfila, A., Rosselló-Móra, R. (2015). *Moderate halophilic bacteria colonizing the phylloplane of halophytes of the subfamily Salicornioideae (Amaranthaceae)*. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(6), 406-416.
- **Der Yang, R. & Humphrey, A. E. (1975). *Dynamic and steady state studies of phenol biodegradation in pure and mixed cultures*. *Biotechnology and Bioengineering*, 17(8), 1211-1235.
- **Dick, R. P. (1992). *A review: long-term effects of agricultural systems on soil biochemical and microbial parameters*. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 40(1), 25-36.

- **Emerson, D., Chauhan, S., Oriol, P. & Breznak, J. A. (1994). *Haloferax sp. D1227, a halophilic archaeon capable of growth on aromatic compounds*. *Archives of Microbiology*, 161(6), 445-452.
- **Ercolini D. (2004). *PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food*. *Journal of Microbiological Methods*, 56(3), 297-314.
- **Erdogmus S. F., Korcan, S. E., Konukk, M., Guven, K. & Mutlu, M. B. (2015). *Aromatic hydrocarbon utilization ability of Chromohalobacter sp.* *Ekoloji*, 24(94), 10-16.
- **Fabra A., Giordano, W., Rivarola, V., Mori, G., Castro, S. & Balegno, H. (1993). *The interaction of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, ribosomes and polyamines in Azospirillum brasilense*. *Toxicology*, 83(1), 19-29.
- **Fathepure, B. Z., (2014). *Recent studies in microbial degradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments*. *Frontiers in Microbiology*, 5.
- **Feld, L., Hjelmsø, M. H., Nielsen, M. S., Jacobsen, A. D., Rønn, R., Ekelund, F. & Jacobsen, C. S. (2015). *Pesticide side effects in an agricultural soil ecosystem as measured by amoA expression quantification and bacterial diversity changes*. *PLoS ONE* 10(5): e0126080.
- **Fernández-Luqueño, F., Valenzuela-Encinas, C., Marsch, R., Martínez-Suárez, C., Vázquez-Núñez, E. & Dendooven, L. (2011). *Microbial communities to mitigate contamination of PAHs in soil—possibilities and challenges: a review*. *Environmental Science and Pollution Research*, 18(1), 12-30.
- **Flowers, T. J. & Yeo, A. R. (1995). *Breeding for salinity resistance in crop plants: where next?* *Functional Plant Biology*, 22(6), 875-884.
- **Gamito, S. (2010). *Caution is needed when applying Margalef diversity index*. *Ecological Indicators*, 10(2), 550-551.
- **Gao, J. & Liu, Y. (2010). *Determination of land degradation causes in Tongyu County, Northeast China via land cover change detection*. *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation*, 12(1), 9-16.
- **Gao, W., Cui, Z., Li, Q., Xu, G., Jia, X. & Zheng, L. (2013). *Marinobacter nanhaiticus sp. nov., polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from the sediment of the South China Sea*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 103(3), 485-491.
- **Gao, Y. C., Wang, J. N., Xu, J. B., Kong, X., Zhao, L. & Zeng, D. H. (2013). *Assessing the quality of oil-contaminated saline soil using two composite indices*. *Ecological Indicators*, 24, 105-112.

- **Garbisu, C. & Alkorta, I. (1999). *Utilization of genetically engineered microorganisms (GEMs) for bioremediation. Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 74(7), 599-606.
- **García, C. & Hernández, T. (1996). *Influence of salinity on the biological and biochemical activity of a calciorthird soil. Plant and Soil*, 178(2), 255-263.
- **García, M. T., Ventosa, A. & Mellado, E. (2005). *Catabolic versatility of aromatic compound-degrading halophilic bacteria. FEMS Microbiology Ecology*, 54(1), 97-109.
- **Garrigues, E., Corson, M. S., Angers, D. A., van der Werf, H. M. & Walter, C. (2012). *Soil quality in Life Cycle Assessment: Towards development of an indicator. Ecological Indicators*, 18, 434-442.
- **Gaultier, J., Farenhorst, A., Kim, S. M., Saiyed, I., Messing, P., Cessna, A. J. & Glozier, N. E. (2009). *Sorption-desorption of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by wetland sediments. Wetlands*, 29(3), 837-844.
- **Giacometti, C., Demyan, M. S., Cavani, L., Marzadori, C., Ciavatta, C. & Kandeler, E. (2013). *Chemical and microbiological soil quality indicators and their potential to differentiate fertilization regimes in temperate agroecosystems. Applied Soil Ecology*, 64, 32-48.
- **Giller, K. E., Beare, M. H., Lavelle, P., Izac, A. M. & Swift, M. J. (1997). *Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. Applied Soil Ecology*, 6(1), 3-16.
- **Girvan, M. S., Campbell, C. D., Killham, K., Prosser, J. I. & Glover, L. A. (2005). *Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation. Environmental Microbiology*, 7(3), 301-313.
- **González, I., Muena, V., Cisternas, M. & Neaman, A. (2008). *Acumulación de cobre en una comunidad vegetal afectada por contaminación minera en el valle de Puchuncaví, Chile central. Revista Chilena de Historia Natural*, 81(2), 279-291.
- **Grossmann, K. (2010). *Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. Pest Management Science*, 66(2), 113-120.
- **Gupta, R. K. & Abrol, I. P. (1990). *Salt-affected soils: their reclamation and management for crop production. Advances in Soil Science*, 11, 223-288.
- **Habe, H. & Omori, T. (2003). *Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 67(2), 225-243.
- **Haddadi, A. & Shavandi, M. (2013). *Biodegradation of phenol in hypersaline conditions by Halomonas sp. strain PH2-2 isolated from saline soil. International Biodeterioration & Biodegradation*, 85, 29-34.

- **Ibekwe, A. M., Poss, J. A., Grattan, S. R., Grieve, C. M. & Suarez, D. (2010). *Bacterial diversity in cucumber (Cucumis sativus) rhizosphere in response to salinity, soil pH, and boron.* *Soil Biology and Biochemistry*, 42(4), 567-575.
- **Kılıç, K. & Kılıç, S. (2007). *Spatial variability of salinity and alkalinity of a field having salination risk in semi-arid climate in northern Turkey.* *Environmental Monitoring and Assessment*, 127(1-3), 55-65.
- **Kim, D., Kim, S. W., Choi, K. Y., Lee, J. S. & Kim, E. (2008). *Molecular cloning and functional characterization of the genes encoding benzoate and p-hydroxybenzoate degradation by the halophilic Chromohalobacter sp. strain HS-2.* *FEMS Microbiology Letters*, 280(2), 235-241.
- **Kleinstüber, S., Riis, V., Fetzer, I., Harms, H. & Müller, S. (2006). *Population dynamics within a microbial consortium during growth on diesel fuel in saline environments.* *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 3531-3542.
- **Kraiser, T., Stuardo, M., Manzano, M., Ledger, T. & González, B. (2013). *Simultaneous assessment of the effects of an herbicide on the triad: rhizobacterial community, an herbicide degrading soil bacterium and their plant host.* *Plant and Soil*, 366(1-2), 377-388.
- **Kushner DJ. 1992. *Growth and nutrition of halophilic bacteria.* In: Vreeland RH, Hochstein LI, editors. *The biology of halophilic bacteria.* Boca Raton, Fla.: CRC Press. p. 87-103.
- **Leahy, J. G. & Colwell, R. R. (1990). *Microbial degradation of hydrocarbons in the environment.* *Microbiological Reviews*, 54(3), 305-315.
- **Lefebvre, O. & Moletta, R. (2006). *Treatment of organic pollution in industrial saline wastewater: a literature review.* *Water Research*, 40(20), 3671-3682.
- **Li, F., Hullar, M. A., & Lampe, J. W. (2007). *Optimization of terminal restriction fragment polymorphism (TRFLP) analysis of human gut microbiota.* *Journal of Microbiological Methods*, 68(2), 303-311.
- **Li, J., Pu, L., Zhu, M., Zhang, J., Li, P., Dai, X. & Liu, L. (2014). *Evolution of soil properties following reclamation in coastal areas: A review.* *Geoderma*, 226, 130-139.
- **Liu, M., Bjørnlund, L., Rønn, R., Christensen, S. & Ekelund, F. (2012). *Disturbance promotes non-indigenous bacterial invasion in soil microcosms: analysis of the roles of resource availability and community structure.* *PLoS One*, 7, e45306.
- **Lütke-Eversloh, T., Santos, C. N. S., & Stephanopoulos, G. (2007). *Perspectives of biotechnological production of L-tyrosine and its applications.* *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(4), 751-762.

**Luna, A. J., Chiavone-Filho, O., Machulek, A., de Moraes, J. E. F. & Nascimento, C. A. (2012). *Photo-Fenton oxidation of phenol and organochlorides (2,4-DCP and 2,4-D) in aqueous alkaline medium with high chloride concentration.* *Journal of Environmental Management*, 111, 10-17.

**Luna, A. J., Nascimento, C. A., Foletto, E. L., Moraes, J. E. & Chiavone-Filho, O. (2014). *Photo-Fenton degradation of phenol, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4-dichlorophenol mixture in saline solution using a falling-film solar reactor.* *Environmental Technology*, 35(3), 364-371.

**Maila, M. P. & Cloete, T. E. (2004). *Bioremediation of petroleum hydrocarbons through landfarming: Are simplicity and cost-effectiveness the only advantages?* *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 3(4), 349-360.

**Maltseva, O., McGowan, C., Fulthorpe, R. & Oriol, P. (1996). *Degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by haloalkaliphilic bacteria.* *Microbiology*, 142(5), 1115-1122.

**Margesin, R. & Schinner, F. (2001). *Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments.* *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(5-6), 650-663.

**Marín, J. A., Hernández, T. & García, C. (2005). *Bioremediation of oil refinery sludge by landfarming in semiarid conditions: Influence on soil microbial activity.* *Environmental Research*, 98(2), 185-195.

**Martínez-Cánovas, M. J., Quesada, E., Llamas, I. & Béjar, V. (2004). *Halomonas ventosae sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying, exopolysaccharide-producing bacterium.* *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(3), 733-737.

**Mavi, M. S., Sanderman, J., Chittleborough, D. J., Cox, J. W. & Marschner, P. (2012). *Sorption of dissolved organic matter in salt-affected soils: Effect of salinity, sodicity and texture.* *Science of the Total Environment*, 435, 337-344.

**Merini, L. J., Cuadrado, V., Flocco, C. G. & Giulietti, A. M. (2007). *Dissipation of 2,4-D in soils of the Humid Pampa region, Argentina: a microcosm study.* *Chemosphere*, 68(2), 259-265.

**Moberly, J. G., Staven, A., Sani, R. K. & Peyton, B. M. (2010). *Influence of pH and inorganic phosphate on toxicity of zinc to *Arthrobacter* sp. isolated from heavy-metal-contaminated sediments.* *Environmental Science & Technology*, 44(19), 7302-7308.

**Moussavi, G., Ghodrati, S. & Mohseni-Bandpei, A. (2014). *The biodegradation and COD removal of 2-chlorophenol in a granular anoxic baffled reactor.* *Journal of Biotechnology*, 184, 111-117.

- **Muckian, L., Grant, R., Doyle, E. & Clipson, N. (2007). *Bacterial community structure in soils contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons. Chemosphere*, 68(8), 1535-1541.
- **Müller, A. K., Westergaard, K., Christensen, S. & Sørensen, S. J. (2002). *The diversity and function of soil microbial communities exposed to different disturbances. Microbial Ecology*, 44(1), 49-58.
- **Muyen, Z., Moore, G. A. & Wrigley, R. J. (2011). *Soil salinity and sodicity effects of wastewater irrigation in South East Australia. Agricultural Water Management*, 99(1), 33-41.
- **Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M., Landi, L., Pietramellara, G. & Renella, G. (2003). *Microbial diversity and soil functions. European Journal of Soil Science*, 54(4), 655-670.
- **Nelson, D. R. & Mele, P. M. (2007). *Subtle changes in rhizosphere microbial community structure in response to increased boron and sodium chloride concentrations. Soil Biology and Biochemistry*, 39(1), 340-351.
- Nie, M., Zhang, X. D., Wang, J. Q., Jiang, L. F., Yang, J., Quan, Z. X. & Li, B. (2009). *Rhizosphere effects on soil bacterial abundance and diversity in the Yellow River Deltaic ecosystem as influenced by petroleum contamination and soil salinization. Soil Biology and Biochemistry*, 41(12), 2535-2542.
- **Nocker, A., Burr, M. & Camper, A. K. (2007). *Genotypic microbial community profiling: a critical technical review. Microbial Ecology*, 54(2), 276-289.
- **Olaniran, A. O., & Igbinosa, E. O. (2011). *Chlorophenols and other related derivatives of environmental concern: Properties, distribution and microbial degradation processes. Chemosphere*, 83(10), 1297-1306.
- **Orellana, S. C., Pohlschroder, M., Grossman, M. J. & Durrant, L. R. (2012). *Biodegradation of aromatic compounds by a halophilic archaeon isolated from the dead sea. Chemical Engineering*, 27.
- **Oren A. (2002). *Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria. FEMS Microbiology Ecology*, 39(1), 1-7.
- **Oren A. (2013). *Life at high salt concentrations, intracellular KCl concentrations, and acidic proteomes. Frontiers in Microbiology*, 4, 315.
- **Oren A., Gurevich, P., Azachi, M. & Henis, Y. (1992). *Microbial degradation of pollutants at high salt concentrations. Biodegradation*, 3(2-3), 387-398.
- **Osborne, C. A., Rees, G. N., Bernstein, Y. & Janssen, P. H. (2006). *New threshold and confidence estimates for terminal restriction fragment length polymorphism analysis*

- of complex bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(2), 1270-1278.
- **Pandey, J., Chauhan, A. & Jain, R. K. (2009). *Integrative approaches for assessing the ecological sustainability of in situ bioremediation*. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(2), 324-375.
- **Pathak, H., & Rao, D. L. N. (1998). *Carbon and nitrogen mineralization from added organic matter in saline and alkali soils*. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(6), 695-702.
- **Pazmiño, D. M., Romero-Puertas, M. C. & Sandalio, L. M. (2012). *Insights into the toxicity mechanism of and cell response to the herbicide 2,4-D in plants*. *Plant Signaling & Behavior*, 7(3), 425-427.
- **Pérez, D. R. (2014). Ley 20.412 de Sistema de Incentivos para la Sustentabilidad Agroambiental de los Suelos Agropecuarios: análisis de la conservación y remediación de suelos en Chile. La ley, 20, 20.
- **Pérez-Pantoja, D., De la Iglesia, R., Pieper, D. H. & González, B. (2008). *Metabolic reconstruction of aromatic compounds degradation from the genome of the amazing pollutant-degrading bacterium Cupriavidus necator JMP134*. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(5), 736-794.
- **Pernetti, M. & Palma, L. D. (2005). *Experimental evaluation of inhibition effects of saline wastewater on activated sludge*. *Environmental Technology*, 26(6), 695-704.
- **Perucci, P., Dumontet, S., Bufo, S. A., Mazzatura, A. & Casucci, C. (2000). *Effects of organic amendment and herbicide treatment on soil microbial biomass*. *Biology and Fertility of Soils*, 32(1), 17-23.
- **Peyton, B. M., Wilson, T. & Yonge, D. R. (2002). *Kinetics of phenol biodegradation in high salt solutions*. *Water Research*, 36(19), 4811-4820.
- **Piubeli, F., Grossman, M. J., Fantinatti-Garboggini, F. & Durrant, L. R. (2012). *Enhanced reduction of COD and aromatics in petroleum-produced water using indigenous microorganisms and nutrient addition*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 68, 78-84.
- **Prado, A. G. S. & Airoidi, C. (2000). *Immobilization of the pesticide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on a silica gel surface*. *Pest Management Science*, 56(5), 419-424.
- **Qadir, M. & Schubert, S. (2002). *Degradation processes and nutrient constraints in sodic soils*. *Land Degradation & Development*, 13(4), 275-294.
- **Ramos, J. L., Duque, E., Huertas, M. J. & Haidour, A. (1995). *Isolation and expansion of the catabolic potential of a Pseudomonas putida strain able to grow in the presence of*

- high concentrations of aromatic hydrocarbons. Journal of Bacteriology*, 177(14), 3911-3916.
- **Rengasamy, P. (2006). *World salinization with emphasis on Australia. Journal of Experimental Botany*, 57(5), 1017-1023.
- **Rhoades, J. D. (1996). *Salinity: Electrical conductivity and total dissolved solids. Methods of Soil Analysis*. Part, 3, 417-435.
- **Rhykerd, R. L., Weaver, R. W. &McInnes, K. J. (1995). *Influence of salinity on bioremediation of oil in soil. Environmental Pollution*, 90(1), 127-130.
- **Riah-Anglet, W., Trinsoutrot-Gattin, I., Martin-Laurent, F., Laroche-Ajzenberg, E., Norini, M. P., Latour, X. & Laval, K. (2015). *Soil microbial community structure and function relationships: A heat stress experiment. Applied Soil Ecology*, 86, 121-130.
- **Rietz, D. N. & Haynes, R. J. (2003). *Effects of irrigation-induced salinity and sodicity on soil microbial activity. Soil Biology and Biochemistry*, 35(6), 845-854.
- **Robinson, C. J., Bohannan, B. J. & Young, V. B. (2010). *From structure to function: the ecology of host-associated microbial communities. Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 453-476.
- **Salvatierra-Martínez, R., Sepúlveda-Chavera, G., Huanca-Mamani, W., & Rodríguez-Molina, M. (2015). *Native strains of Trichoderma from Northern Chile: adaptive tolerance in boric saline soils. Interciencia*, 40(4), 263.
- **Sardinha, M., Müller, T., Schmeisky, H. & Joergensen, R. G. (2003). *Microbial performance in soils along a salinity gradient under acidic conditions. Applied Soil Ecology*, 23(3), 237-244.
- **Schloter, M., Dilly, O. & Munch, J. C. (2003). *Indicators for evaluating soil quality. Agriculture, Ecosystems & Environment*, 98(1), 255-262.
- **Schmidt, T. M. & Waldron, C. (2015). *Microbial diversity in soils of agricultural landscapes and its relation to ecosystem function. The ecology of agricultural landscapes: long-term research on the path to sustainability, Oxford University Press, New York, USA*, 135-157.
- **Shade, A., Peter, H., Allison, S. D., Baho, D. L., Berga, M., Bürgmann, H. & Handelsman, J. (2012). *Fundamentals of microbial community resistance and resilience. Frontiers in Microbiology*, 3, 417.
- **Shi, Z., Tao, S., Pan, B., Fan, W., He, X. C., Zuo, Q. & Wong, P. K. (2005). *Contamination of rivers in Tianjin, China by polycyclic aromatic hydrocarbons. Environmental Pollution*, 134(1), 97-111.

- **Singh, B. K., Nazaries, L., Munro, S., Anderson, I. C. & Campbell, C. D. (2006). *Use of multiplex terminal restriction fragment length polymorphism for rapid and simultaneous analysis of different components of the soil microbial community. Applied and Environmental Microbiology*, 72(11), 7278-7285.
- **Sparks, D. L. (2003). *Environmental Soil Chemistry*. 2nd edition. New York: Academic Press.
- **Sun, M. Y., Dafforn, K. A., Brown, M. V. & Johnston, E. L. (2012). *Bacterial communities are sensitive indicators of contaminant stress. Marine Pollution Bulletin*, 64(5), 1029-1038.
- **Tripathi, S., Kumari, S., Chakraborty, A., Gupta, A., Chakrabarti, K., & Bandyapadhyay, B. K. (2006). *Microbial biomass and its activities in salt-affected coastal soils. Biology and Fertility of Soils*, 42(3), 273-277.
- **Vaajasaari, K. & Joutti, A. (2006). *Field-Scale assessment of phytotreatment of Soil contaminated with weathered hydrocarbons and heavy metals. Journal of Soils and Sediments*, 6(3), 128-136.
- **van der Meer, J. R., De Vos, W. M., Harayama, S. & Zehnder, A. J. (1992). *Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. Microbiological Reviews*, 56(4), 677-694.
- **Vasconcellos, R. L. F., Bonfim, J. A., Andreote, F. D., Mendes, L. W., Baretta, D., & Cardoso, E. J. B. N. (2013). *Microbiological indicators of soil quality in a riparian forest recovery gradient. Ecological Engineering*, 53, 313-320.
- **Vasudevan, N. & Rajaram, P. (2001). *Bioremediation of oil sludge-contaminated soil. Environment International*, 26(5), 409-411.
- **Ventosa, A., Nieto, J. J. & Oren, A. (1998). *Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(2), 504-544.
- **Waddell, E. J., Elliott, T. J., Vahrenkamp, J. M., Roggenthen, W. M., Sani, R. K., Anderson, C. M. & Bang, S. S. (2010). *Phylogenetic evidence of noteworthy microflora from the subsurface of the former Homestake gold mine, Lead, South Dakota. Environmental Technology*, 31(8-9), 979-991.
- **Woolard, C. R. & Irvine, R. L. (1994). *Biological treatment of hypersaline wastewater by a biofilm of halophilic bacteria. Water Environment Research*, 66 (3), 230-235.
- **Woolard, C. R. & Irvine, R. L. (1995). *Treatment of hypersaline wastewater in the sequencing batch reactor. Water Research*, 29(4), 1159-1168.

- **Yastrebova, O. V., Plotnikova, E. G., Anan'ina, L. N. & Demakov, V. A. (2009). *Aerobic spore-forming bacteria from the region of salt mining. Russian Journal of Ecology*, 40(7), 516-521.
- **Yuan, B. C., Li, Z. Z., Liu, H., Gao, M. & Zhang, Y. Y. (2007). *Microbial biomass and activity in salt affected soils under arid conditions. Applied Soil Ecology*, 35(2), 319-328.
- **Zabaloy, M. C., Garland, J. L. & Gómez, M. A. (2008). *An integrated approach to evaluate the impacts of the herbicides glyphosate, 2,4-D and metsulfuron-methyl on soil microbial communities in the Pampas region, Argentina. Applied Soil Ecology*, 40(1), 1-12.
- **Zhao, G., Mu, X., Wen, Z., Wang, F. & Gao, P. (2013). *Soil erosion, conservation and ecoenvironment changes in the loess plateau of China. Land Degradation & Development*, 24(5), 499-510.
- **Zhou, J., Deng, Y., Zhang, P., Xue, K., Liang, Y., Van Nostrand, J. D. & Arkin, A. P. (2014). *Stochasticity, succession, and environmental perturbations in a fluidic ecosystem. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(9), E836-E845.
- **Zhuang, X., Han, Z., Bai, Z., Zhuang, G. & Shim, H. (2010). *Progress in decontamination by halophilic microorganisms in saline wastewater and soil. Environmental Pollution*, 158(5), 1119-1126.

VII. ANEXO

a. Protocolo de extracción de ADN metagenómico.

1. Agregar 500 mg de suelo a un tubo tipo LysingMatrix E.
2. Agregar 978 μ L de Sodium Phosphate Buffer.
3. Agregar 122 μ L de MT Buffer.
4. Llevar al MP Fast Prep-24 (MP Biomedicals), en condiciones de 6 M/S por 40 segundos.
5. Centrifugar 14000 RPM por 10 minutos.
6. Transferir el sobrenadante a tubos centrífuga de 2 mL.
7. Agregar en los nuevos tubos 250 μ L de PPS e invertir 10 veces.
8. Centrifugar 14000 RPM por 5 min.
9. Transferir el sobrenadante a tubos de 15 mL y agregar 1 mL de BlindingMatrix.
10. Agitar solución por 2 min y luego dejar 3 minutos en reposo.
11. Descartar 500 μ L.
12. Agitar sobrenadante y transferir 600 μ L del sobrenadante a tubos SPIN FILTER.
13. Centrifugar a 14000 RPM por 1 minuto.
14. Repetir hasta agotar la solución contenida en los tubos de 15 mL.
15. Agregar 500 μ L de SEWS – M, resuspender.
16. Centrifugar y descartar solución.
17. Esperar 5 min. a tapa abierta y transferir la columna otro tubo.
18. Agregar 70 μ L de DES.
19. Esperar a que se humedezca la mezcla.

20. Centrifugar a 14000 RPM por 1 min.

21. Se descarta la columna.

Apéndice B. Protocolo de limpieza de los fragmentos terminales.

1. 0,1 v de acetato de sodio 3M
2. 2,5 v de etanol al 100% (en frío, - 20°C)
3. Incubar 1 h a - 80°C
4. Centrifugar 30 min a 14000 rpm a 4°C
5. Descartar la solución y agregar 100 µl de etanol al 70% en frío.
6. Centrifugar 30 min a 14000 rpm a 4°C
7. Descartar solución y dejar evaporar el etanol.
8. Resuspender en 10 µl de agua.

Apéndice C. Preparación de los micronutrientes del medio de cultivo para el aislamiento.

Preparar la solución Buffer Fosfato (10x) en 1 Litro de agua destilada a pH = 7,2. Esta solución se compone de 140 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ y 20 g de KH_2PO_4 . Una vez disueltos autoclavar. Luego preparar el medio Composición de Sales (100x) en 1 Litro de agua destilada, cuya composición consiste en 5 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 100g de $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, 20 g de $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ y 1 g de Fe(III)-citrato de amonio. Para su preparación se debe autoclavar por separado $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ y mezclarla con las soluciones autoclavadas $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, Fe(III)-citrato de amonio. Finalmente, aforar con agua hasta 900 ml y agregar 100 ml de solución de elementos trazas.

Solución de elementos trazas en 1 Litro.

| Compuesto | Contenido | Concentración (mM) |
|--|-------------------|--------------------|
| HCl (37%) | 900 μl | 10 |
| ZnCl ₂ | 70 mg | 0,5 |
| MnCl ₂ x 4H ₂ O | 100 mg | 1 |
| H ₃ BO ₃ | 62 mg | 1 |
| CoCl ₂ x 6H ₂ O | 190 mg | 0,8 |
| CuCl ₂ x H ₂ O | 17 mg | 0,1 |
| NiCl ₂ x 6H ₂ O | 24 mg | 0,1 |
| NaMoO ₄ x 2H ₂ O | 36 mg | 0,15 |

Nota: Disolver en agua hasta 1 litro, filtrar y no autoclavar.

Apéndice D. Análisis completo del suelo de las Salinas de Boyeruca.

| Análisis | Unidad | Rangos adecuados | Suelo nativo | Suelo irradiado | Calificación |
|----------------------------------|----------|------------------|--------------|-----------------|-------------------|
| pH del agua | - | - | 7,15 | 7,21 | |
| CE susp | mS/cm | <0,5 | 43,8 | 41,1 | Tóxico o Excesivo |
| CE extracto | mS/cm | <2,6 | 201,0 | 245,0 | Tóxico o Excesivo |
| M.O | % | - | 2,09 | 2,38 | |
| DISPONIBLES | | | | | |
| N | mg/Kg | * | 24 | 27 | |
| P-Olsen | mg/Kg | 20 – 40 | 22 | 22 | |
| K ⁺ | mg/Kg | 150 – 300 | 2098 | 2246 | |
| Zn | mg/Kg | >1,0 | 2,77 | 3,47 | |
| Mn | mg/Kg | >1,0 | 27,80 | 56,70 | |
| Cu ²⁺ | mg/Kg | >1,0 | 2,65 | 2,85 | |
| Fe ³⁺ | mg/Kg | >4,5 | 39,1 | 36,8 | |
| B | mg/Kg | 1,00 - 1,50 | 17,75 | 18,20 | Alto |
| S ext | mg/Kg | >9 | 1008,0 | 1001,0 | |
| INTERCAMBIABLES | | | | | |
| Ca ²⁺ | meq/100g | >4,1 | 12,0 | 12,2 | |
| Mg ²⁺ | meq/100g | >0,5 | 37,2 | 41,1 | |
| K ⁺ | meq/100g | >0,27 | 5,37 | 5,74 | |
| Na ⁺ | meq/100g | <0,5 | 45,80 | 46,20 | Tóxico o Excesivo |
| ANIONES SOLUBLES | | | | | |
| Cl ⁻ | meq/L | <14 | 1637,0 | 2172,0 | Tóxico o Excesivo |
| (HCO ₃) ⁻ | meq/L | <4,5 | 1,7 | 1,9 | |
| (SO ₄) ²⁻ | meq/L | <15 | 340,0 | 404,0 | Tóxico o Excesivo |
| CATIONES SOLUBLES | | | | | |
| Na ⁺ | meq/L | <5 | 983 | 1309 | Tóxico o Excesivo |
| Ca ²⁺ | meq/L | - | 44 | 57 | |
| Mg ²⁺ | meq/L | - | 662 | 808 | |
| K ⁺ | meq/L | - | 33 | 42 | |