UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA MARINA Y ACUICULTURA

Efecto del fotoperiodo artificial sobre la dinámica de abundancia de baterías nitrificantes en biofiltros de SRA para el cultivo de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

LEONARDO IGNACIO OLEA QUINTEROS

SEMINARIO DE TÍTULO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA MARINA Y ACUICULTURA

CONCEPCION – CHILE
SEPTIEMBRE, 2024

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS
INGENERÍA EN BIOTECNOLOGÍA MARINA Y ACUICULTURA

NOMBRE DEL SEMINARIO DE TITULO

Por

LEONARDO IGNACIO OLEA QUINTEROS

Profesor Guía

DR. FERNANDO CRUZAT CRUZAT

Profesor co-guía

JORGE AMADOR SILVA ACOSTA

SEMINARIO DE TÍTULO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA MARINA Y ACUICULTURA

CONCEPCIÓN - CHILE
SEPTIEMBRE, 2024

Universidad de Concepción

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

Seminario de título realizado en la Unidad de Biotecnología marina,

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas.

Profesor Guía:

Dr. Fernando Cruzat Cruzat

Departamento de Oceanografía

Universidad de Concepción

Profesor Co-guía:

Ing. Jorge Silva Acosta

Unidad de Biotecnología Marina

Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:

Dr. Ariel Valenzuela Saldías

Departamento de Oceanografía

Universidad de Concepción

Ing. José Miguel Vidal Araya

Microbiología

Universidad de Concepción

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

1.- Acuicultura a nivel mundial y su relevancia en chile

2.- Sistemas de recirculación acuícolas

3.- Fotoperiodo en sistemas de recirculación

4.- Nutrición y alimentación

5.- Remoción de compuestos nitrogenados

6.- Biofiltración

HIPÓTESIS

OBJETIVOS

MATERIALES Y MÉTODO

1.- Peces en cultivo

2.- Diseño experimental

3.- Condiciones de cultivo

4.- Análisis fisicoquímicos

4.1.- Medición de parámetros
4.2.- Evaluación de los biofiltros

5.- Muestreo microbiológico

6.- Procesamiento de las muestras

7.- Extracción y purificación de ADN en muestras de biopelícula

8.- Amplificación por qPCR de los Genes amoA y nxrA

8.1.- Reacción de qPCR
8.2.- Detección y purificación gen *amoA* de Bacterias Nitrificantes

9.- Curva estándar de cuantificación

9.1.- Método I Curva estándar de Cuantificación
9.2.- Método II Curva estándar de Cuantificación

10.- Reproducibilidad método II – Límite de cuantificación.

11.- Cuantificación gen amoA por qPCR en muestras de biopelícula

12.- Análisis estadístico

RESULTADOS

1.- Índice de remoción de compuestos nitrogenados

2.- Extracción y purificación de ADN muestras de biopelícula

3.- Amplificación y detección de genes nitrificantes *amoA* - *nxrA* mediante qPCR y Electroforesis

4.- Método I Curva estándar de cuantificación

5.- Método II Curva estándar de cuantificación

6.- Reproducibilidad método II – Límite de cuantificación

7.- Cuantificación gen *amoA* por qPCR en muestras de biopelícula.

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Consejo del Salmón, con datos FAO 2020. Porcentaje en producción de salmónidos a nivel mundial.

Figura 2: Diagrama básico del ciclo del tratamiento de agua de un sistema de recirculación acuícola (SRA).

Figura 3: Esquema desechos metabólicos de los peces y proceso de nitrificación.

Figura 4: Diseño del sistema de recirculación. Donde, A: muestra la unidad de cultivo, B: disposición del sistema general, C: sistema de tubería, D: unidad de biofiltro, BI: bioportadores. E1.1, E1.2, E2.1, E2.2, E3.1, E3.2: nos entrega la disposición de cada estanque en el sistema RAS.

Figura 5: Elaboración ocho diluciones en serie a partir de 1 µl de ADN purificado.

Figura 6: Índice de remoción de NH_3, NO_2 y NO_3 para los tres biofiltros independientes.

Figura 7: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la extracción de ADN en muestras de biopelícula correspondientes a las siete semanas de muestreo (M6 1, M6 2, M5 1, M5 2, M5 3, M4 1, M4 2, M4 3, M3 1, M3 2, M3 3, M2 1, M2 2, M1 1, M1 2, M1 3, M7 1, M7 2). Se observa en la mayoría de las muestras la banda al inicio del carril, correspondiente al ADN genómico. Adicionalmente, se identificó una degradación a lo largo del carril lo que sugiere la posible presencia de impurezas.

Figura 8: Gel de electroforesis en agarosa al 1% con productos de qPCR para el gen amoA de bacterias nitrificantes. Se observa en el carril MPM: Marcador de peso molecular de 200 pb. Seis muestras experimentales de ADN con factor de dilución de 1:25 (M7 1, M7 2, M5 1, M5 2, M6 1, M6 2) respectivamente, mostrando bandas específicas de aproximadamente 500 pb. C -: Control negativo.

Figura 9: Gel de electroforesis en agarosa al 1% con productos de qPCR para el gen *nxrA* de bacterias nitrificantes. Se observa en el carril MPM: Marcador de peso molecular de 200 pb. Ocho muestras experimentales (M7 2, M7 1, M6 2, M6 1, M5 2, M5 1, M4 2, M4 1), mostrando la mayoría de las muestras una banda de aproximadamente 200 pb y la muestra (M5 1, M6 1) una banda mayor de 300 pb. C -: control negativo.

Figura 10: **(a)** Figura del logaritmo de la concentración del estándar vs número de ciclos usando el total de las 8 diluciones seriadas: 1x108 – 1x101 (fuera del rango lineal). Pendiente = -2,142, R2 = 0,9279 y una Eficiencia de 193 %. **(b)** Figura del

logaritmo de la concentración del estándar vs número de ciclos usando 5 diluciones seriadas: $1x10^8$ – $1x10^4$. Pendiente = -3,195, R^2 = 0,981 y Eficiencia de 105,6 %.

Figura 11: (a) Curva estándar de amplificación por qPCR del número de copias del gen amoA, usando diluciones seriadas en base diez (10^8 - 10^1). **(b)** Curva estándar de amplificación por qPCR del número de copias del gen *amoA*, usando diluciones seriadas en base diez (10^8 - 10^4). **(c)** Curva de Melting (10^8 - 10^1). **(d)** Curva de Melting (10^8 - 10^4).

Figura 12: (a) Figura del logaritmo de la concentración del estándar vs número de ciclos usando el total de las 8 diluciones seriadas: $1x10^8$ – $1x10^1$ (fuera del rango lineal). Pendiente = -2,499, R^2 = 0,9484 y una Eficiencia de 151,3 %. **(b)** Figura del logaritmo de la concentración del estándar vs número de ciclos usando 5 diluciones seriadas: $1x10^8$ – $1x10^4$ (dentro del rango lineal). Pendiente = -3,397, R^2 = 0,9993 y Eficiencia de 97 %.

Figura 13: Número de copias del gen *amoA* amplificadas y corregidas con factor de dilución para las muestras M4 1, M6 1 y M7 1 del Biofltro 1. Gráfico de barra representa un aumento progresivo en el número de copias.

Figura 14: Comparación del número de copias del gen *amoA* para el Biofiltro 1 (n=5) y 2 (n=3). Las medianas del número de copias indican diferencias significativas entre ambos biofiltros, evaluado con prueba de Mann-Whitney. P= 0,035 ($p < 0,05$). *: diferencia significativa.

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Registro de parámetros diarios de calidad del agua monitoreados para tres sistemas independientes de recirculación, utilizados en este estudio. Se indican los valores de la media y desviación estándar (± DS) correspondientes a las mediciones durante el periodo de siete semanas.

Tabla 2: Factores de dilución y concentraciones finales de ADN en muestras de biopelícula. Los valores reflejan la concentración de ADN utilizadas en los ensayos posteriores, para la amplificación por qPCR en gen *amoA* – *nxrA*. Rango de dilución (20,5 – 23,6 ng/µl).

Tabla 3: Cebadores utilizados en este estudio para la amplificación de los genes amoA según (Shimomura et al., 2012) y para *nxrA* según (Wertz et al., 2008).

Tabla 4: Evaluación de la calidad y concentración del ADN en espectrofotómetro NanoDrop ND-1000.

Tabla 5: Concentraciones de las diluciones en número de copias/µl del gen *amoA* para cada muestra, presentadas en duplicado con sus resultados de Cq: ciclo de amplificación, Tm: temperatura de Melting. C - = control negativo. Pendiente = -2,146. R^2 = 0,928. E % = 192,4.

Tabla 6: Concentraciones de las diluciones y el número de copias/µl del gen *amoA* para cada muestra, presentadas en duplicado junto con sus respectivos valores de Cq: ciclo de amplificación, Tm: temperatura de Melting.

Tabla 7: Reproducibilidad del método de PCR en tiempo real del gen *amoA* para la primera y segunda amplificación con sus réplicas. SD: Desviación estándar. CV: Coeficiente de variación porcentual.

Tabla 8: Límite de cuantificacion de Cq para gen *amoA*

Tabla 9: Resultados de amplificación gen *amoA* por qPCR en muestras de biopelícula. La tabla presenta los valores de Cq y Tm obtenidos para las muestras M4 1, M5 2, M6 1, M7 1 y M7 2, correspondientes a los biofiltros 1 y 2. Número de copias corregido con factor de dilución.

RESUMEN

La intensificación de la acuicultura ha surgido como una estrategia eficaz para aumentar la producción de peces, al igual que la utilización de fotoperiodo artificial una herramienta que influye en aspectos fisiológicos como el comportamiento alimentario, el metabolismo, la reproducción, y la regulación hormonal. Estudios han determinado que la manipulación del fotoperiodo en los sistemas de recirculación acuícola resulta en una mayor conversión alimenticia, tasa específica de crecimiento y consumo de alimento. Sin embargo, este enfoque genera un incremento en la cantidad de desechos producidos, el nitrógeno amoniacal total TAN es el principal producto de excreción del metabolismo de las proteínas en los peces, siendo tóxico para los peces en altas concentraciones. Los biofiltros desempeñan un papel esencial en la remoción de estos desechos metabólicos en sistemas de recirculación acuícola.

El propósito de este estudio fue determinar el efecto de distintos regímenes de fotoperiodo artificial sobre la dinámica de abundancia de baterías nitrificantes en biofiltros de SRA para el cultivo de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss)*. Se llevaron a cabo experimentos en tres biofiltros sometidos a fotoperiodos de 24L:0D, 14L:10D y 12L:12D durante siete semanas. Se midieron los índices de remoción de amoníaco, nitrito y nitrato, y se estableció un protocolo molecular para cuantificar los genes *amoA* y *nxrA* indicadores de la abundancia de estas bacterias nitrificantes.

Los resultados obtenidos indican una variabilidad significativa en la abundancia de bacterias nitrificantes entre los biofiltros, con una mayor abundancia en los Biofiltros 1 y 2, que estuvieron expuestos a fotoperiodos artificiales más prolongados, en comparación con el Biofiltro 3 (12:12), donde no se detectó amplificación del gen *amoA* en ninguna de las muestras. El análisis estadístico mostró una diferencia significativa en el número de copias del gen amoA entre los Biofiltros 1 y 2 ($P = 0,035$), lo que sugiere que las condiciones experimentales, particularmente el régimen

de fotoperiodo, influyeron en la abundancia de las bacterias nitrificantes. En el Biofiltro 1, sometido a un fotoperiodo de 24:0, se observó un aumento progresivo en la abundancia de bacterias nitrificantes desde la semana 4 hasta la semana 7, mientras que en el Biofiltro 2, aunque también se detectaron bacterias nitrificantes, la abundancia fue significativamente menor. La falta de amplificación en el Biofiltro 3 podría estar relacionada con la ausencia de desarrollo de biopelícula o una inhibición en el crecimiento bacteriano.

INTRODUCCION

1.- Acuicultura a nivel mundial y su relevancia en chile

La acuicultura se define como cultivo de organismos acuáticos, incluidos peces, moluscos, crustáceos y plantas acuáticas, en entornos seleccionados o controlados. Esta actividad productiva ha sufrido un importante crecimiento durante las últimas dos décadas y hoy, es ampliamente reconocida como una contribución vital a un sistema alimentario mundial saludable, sostenible y resiliente (FAO., 2020). La contribución de la acuicultura mundial a la producción pesquera alcanzó el 46,0% para el 2018, y en el 2022 las exportaciones del sector acuicultor nacional representaron el 81,3% en cuanto al valor y 56,8% en volumen, siendo el salmón del atlántico el principal protagonista del sector acuícola al representar el 71,1% del valor total exportado, mostrando un aumento del 6 % respecto al 2021 (SERNAPESCA., 2022).

En el caso particular de Chile, ha sido tal el crecimiento de la acuicultura. Que nuestro país se ha llegado a posicionar como el segundo productor mundial de salmones representando un 27 % de la producción mundial, por debajo de Noruega con un 38 % (Figura 1), sumando entre las dos principales naciones más de un 60 % del suministro mundial de salmónidos cultivados (FAO., 2020). Entre los organismos más cultivados en Chile se encuentra el salmón del Atlántico (*Salmo salar*), salmón coho (*Oncorhynchus kisutch)* y la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Para el 2022 Chile produjo una cosecha anual acumulada de 1,044 millones de toneladas, de las cuales 50,6% correspondió a salmón del atlántico, 14,4% a salmón del pacifico y un 4,9% a trucha arcoíris. (SERNAPESCA, 2022).

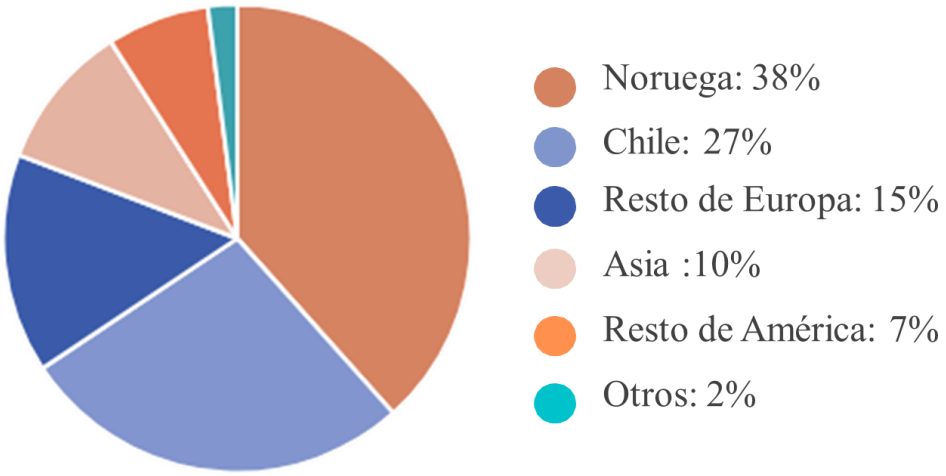

Figura 1: Consejo del Salmón, con datos FAO 2020. Porcentaje en producción de salmónidos a nivel mundial.

La intensificación de la acuicultura ha emergido como una solución efectiva para incrementar la producción acuícola, especialmente en respuesta a la creciente competencia por recursos naturales como tierra y agua, que son utilizados por otros sectores de producción (Henriksson et al., 2018). Sin embargo, este enfoque requiere un mayor aporte de insumos, como peces y alimentos, por unidad de superficie cultivada, lo que a su vez genera una mayor cantidad de desechos provenientes de los sistemas de producción (Dauda et al., 2019). Por ende existe la necesidad de desarrollar sistemas de cultivo que aumenten la producción de peces con una gestión eficiente de los desechos para limitar la degradación ambiental resultante de los desechos de la acuicultura y garantizar su sostenibilidad.

2.- Sistemas de recirculación acuícolas

Los sistemas de recirculación acuícolas (SRA) son sistemas complejos que tienen una interacción tecnológica–biológica, que se han desarrollado para la piscicultura intensiva permitiendo el cultivo en tierra de especies hidrobiológicas de alta importancia comercial, ofreciendo bioseguridad en los cultivos. Estos sistemas de alta

tecnología permiten reciclar entre el 90-99 % del agua mediante la utilización de diversos procesos unitarios. Además, estos sistemas permiten al operador un mayor control sobre los parámetros ambientales y de calidad del agua, lo que permite condiciones óptimas para el cultivo de peces (Heinen & Hankins., 1996).

Para mantener la calidad de agua de un sistema de recirculación, es necesario un gran número de equipos y dispositivos, además de una sólida comprensión de los procesos físicos, químicos y biológicos que ocurren en las unidades de tratamientos de agua. Entre estos se encuentra (Figura 2) unidad de cutlivo de los peces, el filtro mecánico; encargado de la remoción de sólidos suspendidos, biofiltro; filtración biológica que se basa en la acción de microorganismos principalmente bacterias nitrificantes para eliminar compuestos nitrogenados, bomba de adición de oxigeno; aumenta la concentración de oxígeno disuelto en el agua, filtro ultravioleta; tratamiento que utiliza luz ultravioleta para desinfectar y eliminar microorganismos dañinos presentes en el agua, como bacterias, virus, y parásitos, desgasificador; elimina gases disueltos nocivos como el CO_2 que se acumula en el sistema (Parker., 2002).

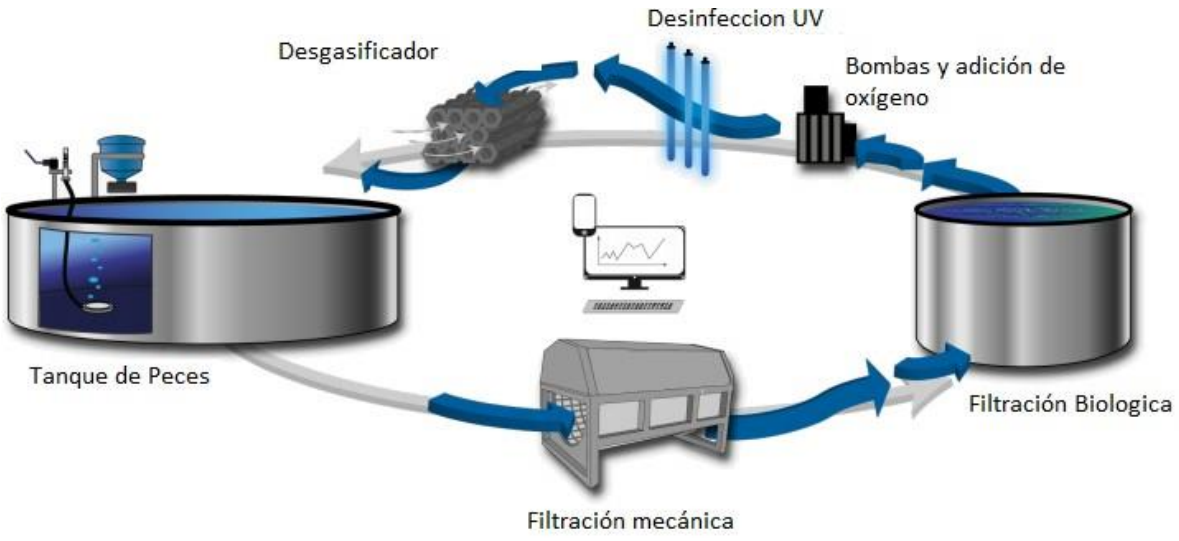

Figura 2: Diagrama básico del ciclo del tratamiento de agua de un sistema de recirculación acuícola (SRA).

Conocer la calidad del agua y los cambios que ocurren a nivel de los estanques, permite la comprensión, manejo y conservación de los organismos hidrobiológicos que son cultivados. Caracterizar la composición físico-química del agua, permite definir su calidad e identificar potenciales factores de riesgo sobre el bienestar y salud de los peces, tanto bajo condiciones productivas normales, como también a consecuencia de los manejos acuícolas (Lekang., 2007). A medida que la industria de la acuicultura se vuelva cada vez más intensiva, también aumentará el enfoque en la calidad del agua en las unidades de cultivo, debido a la degeneración en la calidad cuando el agua fluye a través de la unidad de producción.

3.- Fotoperiodo en sistemas de recirculación

El fotoperiodo se refiere a la duración de las fases de luz (día) y oscuridad (noche) a las que están expuestos los organismos en un ciclo de 24 horas. Este ciclo influye en varios procesos fisiológicos de los organismos acuáticos, incluyendo el comportamiento alimentario, el metabolismo, la reproducción, y la regulación hormonal. La receptividad de la luz en los peces varía considerablemente según la especie y su etapa de desarrollo. Las características de la luz, como la intensidad y el espectro, tienen un impacto directo sobre su fisiología y comportamiento. Los peces poseen células fotorreceptoras especializadas, localizadas no solo en sus ojos, sino también en la glándula pineal, lo que les permite percibir la luz y regular procesos como el ritmo circadiano y el crecimiento. Estas células son responsables de captar los cambios en las condiciones lumínicas, lo que influye en funciones esenciales como la alimentación, la reproducción y la migración (Boeuf, & Bail., 1999).

En la acuicultura, en especial en los sistemas de recirculación acuícolas, es común criar salmones bajo un fotoperiodo de luz continua 24 horas/día para maximizar el tiempo de alimentación (Oppedal et al., 2003). Estudios han determinado que la exposición prolongada y constante de la luz conduce a un aumento en las tasas de

crecimiento del pez. Así ciclos de 16L:8D (Luz:oscuridad) y períodos continuos 24L:0D han confirmado un resultado positivo en el crecimiento y la supervivencia de larvas y juveniles de algunas especies de peces, como la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Los resultados obtenidos en estas especies fueron mayor conversión alimenticia, tasa específica de crecimiento y consumo de alimento debido a un incremento en la actividad de los peces (Barlow et al., 1995, Simensen et al., 2000).

4.- Nutrición y alimentación

En los SRA la nutrición y la alimentación de salmónidos son aspectos cruciales y ampliamente estudiados para garantizar un crecimiento óptimo. El alimento es un factor crucial en la producción acuícola, y su relevancia varía según la técnica de cultivo utilizada. Los sistemas intensivos dependen de alimento artificial de muy alta calidad, destinados para un crecimiento rápido (Ajani et al., 2011). En consecuencia los alimentos son la principal fuente de desechos en los sistemas de acuicultura.

Los residuos sólidos han sido clasificados como los desechos más peligrosos en los sistemas de cultivo de peces y deben eliminarse de manera efectiva en el menor tiempo posible (Timmons & Summerfelt., 1997). Estos residuos se derivan principalmente de los alimentos no consumidos, excrementos fecales y desechos producto del metabolismo del alimento de los peces y se clasifican como sólidos suspendidos, sólidos sedimentados y desechos disueltos que incluyen compuestos nitrogenados como el amoníaco, nitrito y nitrato. La producción de desechos del alimento depende de muchos factores, incluida su composición nutricional, el método de producción, la relación entre el tamaño del alimento y el tamaño del pez, la cantidad de alimento por unidad de tiempo, el método de alimentación y el tiempo de almacenamiento (Miller & Semmens., 2002). En los desechos disueltos, los dos

componentes principales que preocupan son los productos de nitrógeno (N) y fósforo (P) (Boyd & Massaut, 1999).

El nitrógeno se excreta principalmente en forma disuelta como amoníaco, mientras que el fósforo se excreta como material particulado (Bureau & Cho.,1999). Ambos desechos son componentes esenciales de las proteínas, que constituyen el principal ingrediente en el alimento para peces. Todos los peces requieren una dieta rica en proteínas cruda, con niveles que oscilan entre el 25% y el 50% de su contenido total, independientemente de la especie. Se estima que menos del 50% de estos contaminantes potenciales del agua (nitrógeno y fósforo) se retienen en el cuerpo de los peces (Piedrahita., 2003). En consecuencia, un gran porcentaje se transfiere al agua de cultivo, donde se convierte en un problema cuando finalmente se libera, teniendo un gran impacto en la calidad del agua y ambiente. De esta manera, la cantidad de nitrógeno y fósforo retenidos por los peces varía, con un nitrógeno retenido promedio que oscila entre el 25% y el 30% (Lekang., 20013).

5.- Remoción de compuestos nitrogenados

En el agua, el amoníaco existe en dos formas: como amoníaco no ionizado (NH_3) e ion amonio (NH_4^+), siendo NH_3 el más tóxico. Las dos formas existen en equilibrio en proporciones determinadas por la temperatura del agua y el pH (Figura 3) (Ebeling & Timmons., 2012). El nitrógeno amoniacal total (TAN = $N\text{-}NH_3$ + $N\text{-}NH_4^+$) es el principal producto de excreción del metabolismo de proteínas en los peces y se elimina a través de las branquias y la piel (Figura 3). Al ser eliminado por las branquias, cuando la concentración de amonio no ionizado en el medioambiente se incrementa, el gradiente de concentración entre la sangre y el ambiente disminuye y la tasa de excreción de amonio baja (Godoy., 2018).

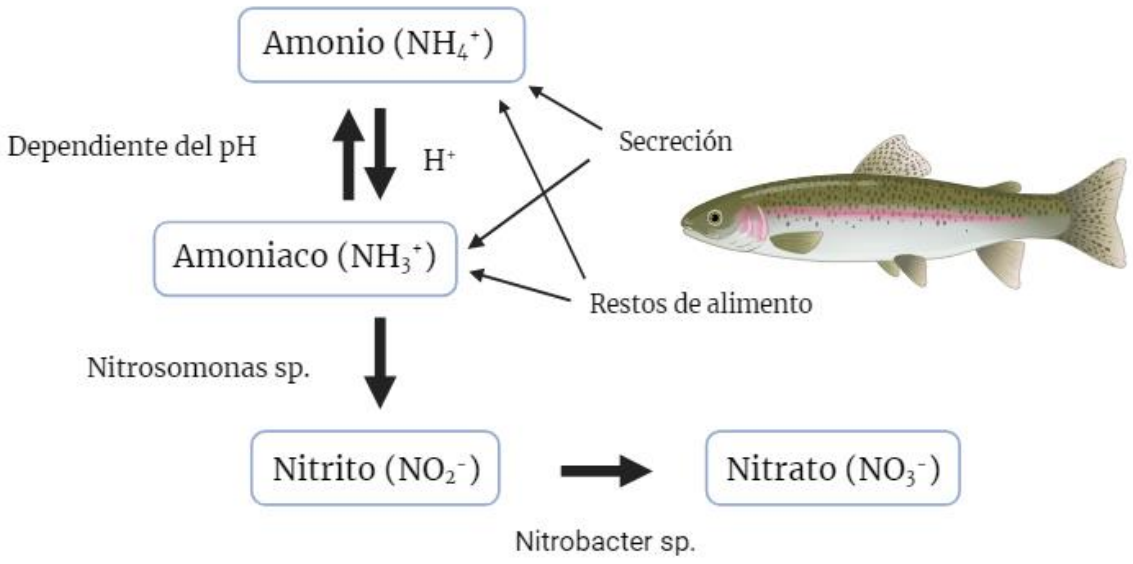

Figura 3: Esquema desechos metabólicos de los peces y proceso de nitrificación.

La concentración relativa de cada una de estas formas de amoníaco en la columna de agua es principalmente en función del pH, la temperatura y la salinidad (Figura 3) (Anthoniscn et al., 1976). Así un aumento en el pH o en la temperatura, aumentará la proporción de nitrógeno amoniacal no ionizado siendo este más tóxico para los peces, ya que se difunde libremente a través de la membrana branquial, principal ruta de excreción del amonio. Entre los síntomas que se pueden apreciar en los peces al ser expuestos a concentraciones letales o subletales de amonio encontramos: hiperplasia del epitelio branquial generando una disminución de la capacidad de captación de oxígeno por daños del epitelio branquial, así como cambios degenerativos y hemorragia en hígado (Moyano & Cardenete., 1988). De esta manera, como regla general el NH_3 se debe mantener por debajo de 0,1 a 0,05 mg/L (Timmons et al., 2010).

6.- Biofiltración

Los biofiltros nitrificantes son fundamentales en los sistemas de recirculación acuícola, son considerados ecosistemas artificiales complejos, donde las variables ambientales y la composición de la comunidad bacteriana están estrictamente relacionados, influyendo directamente el éxito del proceso. Aunque la diversidad y dinámica de las bacterias en estos biofiltros es crucial para su funcionamiento, el conocimiento en esta área es limitado, y la mayoría de los estudios se enfocan en situaciones específicas. Debido a que no hay sistemas iguales, es difícil utilizar un solo ejemplo para diseñar un sistema de recirculación eficiente y con buen rendimiento (Piedrahita et al., 1996). Además, los biofiltros nitrificantes no solo representan un factor determinante en el éxito operativo de los SRA, sino que también son comúnmente citados como el mayor desafío durante la puesta en marcha de estos sistemas y el componente más complejo de gestionar una vez que el sistema está en funcionamiento (Badiola et al., 2012).

El proceso de remoción de amonio por filtración biológica es llamado nitrificación y consiste en una oxidación sucesiva del amonio a nitritos y finalmente a nitratos. Los pasos de este proceso, normalmente, se llevan a cabo uno detrás del otro en un ambiente aerobio mediado por dos grupos de bacterias autótrofas quimiosintetizadoras.

Oxidación de Amonio

$$NH_4^+ + 1.5\ O_2 + BOA \rightarrow NO_2^- + 2H^+ + H_2O + \text{energía}$$

Oxidación de Nitrito

$$NO_2^- + 0.5\ O_2 + BON \rightarrow NO_3^- + \text{energía}$$

Las bacterias oxidantes del TAN incluyen géneros como Nitrosomonas, Nitrosococcus, Nitrosospira, Nitrosolobus y Nitrosovibrio. Aquellas oxidantes de

nitritos comprenden géneros como Nitrobacter, Nitrococcus y Nitrospina (Timmons et al., 2010). Estas bacterias crecen en la biopelícula del medio filtrante, y por tanto la nitrificación tiene lugar en esta, por lo que se debe establecer la biopelícula para que se realice el proceso de nitrificación. Este proceso crea más biopelícula a medida que las bacterias crecen y se dividen, y aumenta la masa celular (Lekang., 2013).

La oxidación del amonio (NH_4^+) es llevada a cabo por bacterias quimiolitotróficas conocidas como bacterias Amonio-Oxidantes (BOA), principales géneros *Nitrosomonas* y *Nitrosospira*. Estas bacterias sintetizan la enzima amonio monooxigenasa (AMO), la cual inicia el proceso de oxidación del amonio. Esta enzima es codificada por el gen *amoA*, correspondiente a la subunidad α de la enzima AMO. Esta subunidad es responsable de catalizar la conversión de NH_4^+ a hidroxilamina (NH_2OH), un paso clave que limita la velocidad del proceso de nitrificación. La subunidad *amoA* se ha utilizado ampliamente como marcador funcional para identificar y monitorear los microorganismos oxidantes de amonio en muestras ambientales (Francis et al., 2005; Rotthauwe et al., 1997).

En una segunda etapa la oxidación del nitrito (NO_2^-) es llevada a cabo por la enzima nitrito oxidoreductasa (NXR), la cual se encuentra asociada a la membrana en todos los organismos que oxidan nitrito. Esta enzima cataliza la conversión del NO_2^-, incorporando un oxígeno adicional proveniente del agua (H_2O) y, en el proceso, libera dos electrones que son utilizados para la generación de energía (Bock & Wagner, 2006).

El manejo de los biofiltros comienza con la aclimatación, que incluye la inoculación con bacterias nitrificantes específicas. Durante este proceso, es fundamental que la biomasa bacteriana y su actividad metabólica aumenten hasta alcanzar los niveles necesarios para la eliminación efectiva del nitrógeno amoniacal total. Estas formas de nitrógeno, generadas por los residuos de los peces deben ser removidas a la misma velocidad a la que se producen para asegurar un entorno seguro que promueva el crecimiento saludable de los peces (Losordo et al., 1998; Wheaton et al., 1994).

Para la eficiencia de los biofiltros es crucial mantener la calidad del agua. Factores claves incluyen la concentración de amoníaco, que debe ser baja para prevenir toxicidad; la temperatura, que afecta la actividad bacteriana; el oxígeno disuelto, esencial para la respiración de las bacterias; el pH, que influye en la solubilidad del amoníaco y la actividad enzimática; la alcalinidad, que estabiliza el pH. Además, la salinidad y la materia orgánica pueden afectar el rendimiento del biofiltro. La concentración de materia orgánica disuelta es un factor crítico que afecta la operación de nitrificación. Las bacterias heterótrofas encargadas de remover la materia orgánica tienen una tasa de crecimiento máxima cinco veces mayor que las bacterias nitrificantes, por lo que las bacterias heterótrofas tienen mayor éxito al competir por el espacio y el oxígeno disuelto en la biopelícula; en consecuencia, pueden llegar a inhibir la nitrificación (Lekang., 2013).

Los regímenes de fotoperiodo, particularmente los ciclos prolongados de luz, han mostrado aumentar la actividad metabólica de los peces. Este aumento de actividad se traduce en una mayor ingesta de alimento, y por consiguiente, una mayor excreción de desechos metabólicos, principalmente en forma de amoníaco (NH_3) y amonio (NH_4^+), los cuales son productos de la descomposición de las proteínas en la dieta de los peces. Este incremento en los desechos nitrogenados genera una mayor carga para los biofiltros, cuyo papel principal en el SRA es oxidar los compuestos nitrogenados tóxicos para los peces en compuestos menos tóxicos, cuando la carga de desechos excede la capacidad de los biofiltros, la eficiencia de la nitrificación puede verse comprometida por la competencia con las bacterias heterótrofas, favorecidas por un aumento en la materia orgánica. En resumen, un fotoperiodo más largo, al incrementar el metabolismo y la producción de desechos en los peces, puede sobrecargar el sistema de biofiltración y afectar la abundancia y eficacia de las bacterias nitrificantes

La carga resultante con nutrientes disueltos y materia orgánica a la que está expuesto un biofiltro es crucial al considerar el diseño y el funcionamiento del biofiltro

(Michaud et al., 2009). Para manejar eficazmente los sistemas bajo un fotoperiodo prolongado, es crucial monitorear los niveles de amoníaco, nitrito y nitrato de manera constante, y ajustar parámetros clave como la capacidad del biofiltro, la aireación, y la remoción de sólidos. Una mejor comprensión de cómo el fotoperiodo influye en la interacción entre los peces y los biofiltros permitirá optimizar la operación de los SRA y mitigar los posibles efectos negativos sobre las bacterias nitrificantes, asegurando una alta eficiencia en el tratamiento de los desechos nitrogenados.

HIPÓTESIS

Regímenes de fotoperiodo artificial prolongado (24:0), afecta negativamente la abundancia de bacterias nitrificantes en biofiltros de sistemas de recirculación acuícola (SRA) de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del fotoperiodo artificial sobre la dinámica de abundancia de baterías nitrificantes en biofiltros de SRA para el cultivo de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.- Determinar el índice de remoción global para Amoníaco (NH_3), Nitrito (NO_2^-) y Nitrato (NO_3^-) en SRA sometidos a distintos regímenes de fotoperiodo artificial.

2.- Establecer un protocolo a nivel molecular para la cuantificación de los genes *amoA* y *nxrA* en muestras provenientes de biofiltro de SRA sometidos a regímenes de fotoperiodo artificial.

3.- Determinar la dinámica de abundancia de bacterias nitrificantes a nivel molecular mediante la cuantificación de los genes *amoA* y *nxrA* en SRA bajo regímenes de fotoperiodo (24.:0, 14:10, 12:12) por un periodo de 7 semanas.

METODOLOGÍA

1.- Peces en cultivo

El presente estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Piscicultura y Patología Acuática de la Universidad de Concepción. Los organismos cultivados en el sistema de recirculación acuícola fueron 1020 alevines de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de un peso promedio inicial de 2,8 g.

2.- Diseño experimental

Los 1020 ejemplares se sometieron a un periodo de aclimatación de 26 días. Posterior a la aclimatación los alevines con un peso promedio de 5,67 ± 0,54 g fueron repartidos en 3 grupos, cada grupo constó de 2 estanques de 50 litros quedando con (152 peces/estanque).

Se utilizaron tres sistemas de recirculación independientes, dispuestos en paralelo, teniendo cada uno 2 estanques ubicados de manera vertical uno sobre otro (Figura 4). Los tres sistemas SRA contaron con un biofiltro sumergido con medio filtrante fijo en malla de nylon.

Los 3 grupos estuvieron expuestos a diferentes condiciones de fotoperiodo:

- **Biofiltro 1**: Estanques (E 1.1, E 1.2) expuestos a fotoperiodo de luz artificial 24 horas de luz, 0 horas de oscuridad (24L:0D). Luz artificial constante.
- **Biofiltro 2**: Estanques (E 2.1, E 2.2) expuestos a fotoperiodo de luz artificial 14 horas de luz, 10 horas de oscuridad (14L:10D). Condiciones de luz en estación de verano.
- **Biofiltro 3**: Estanques (E 3.1, E 3.2) grupo control 12 horas luz, 12 horas oscuridad (12L:12D). Simulando luz de primavera.

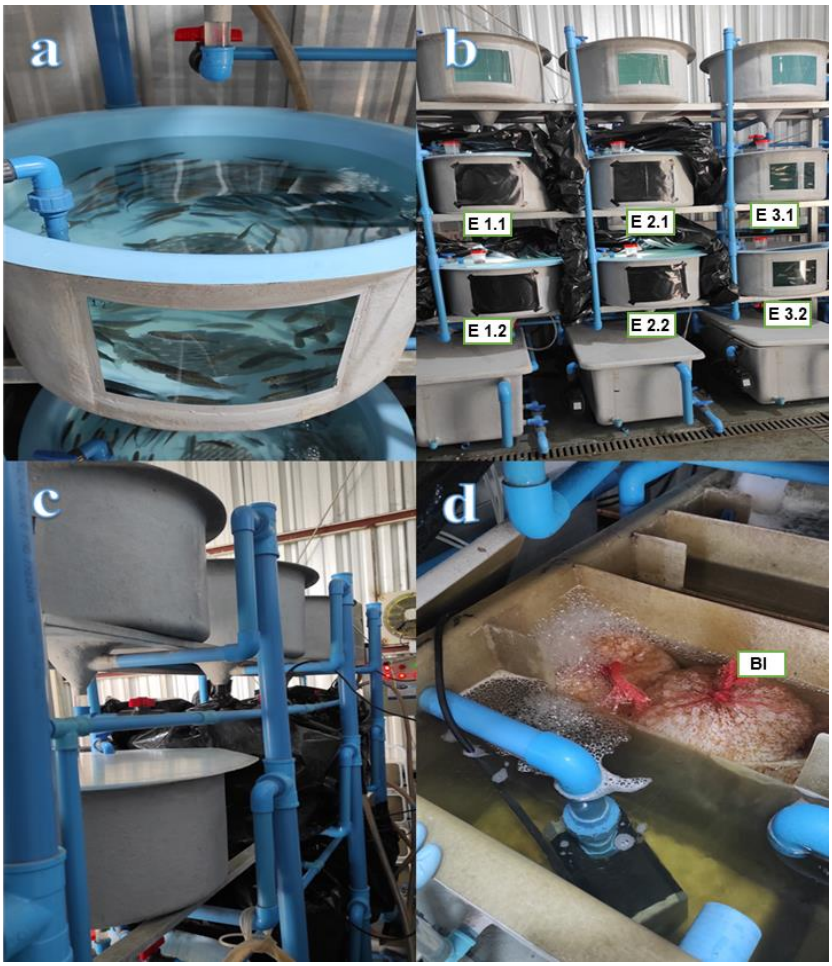

Figura 4: Diseño del sistema de recirculación. Donde, A: muestra la unidad de cultivo, B: disposición del sistema general, C: sistema de tubería, D: unidad de biofiltro, BI: bioportadores. E1.1, E1.2, E2.1, E2.2, E3.1 y E3.2: disposición de cada estanque en el sistema SRA.

3.- Condiciones de Cultivo

Durante la mantención de los peces en el sistema se mantuvo una alimentación a una razón de 6% peso corporal, alimentados con pienso compuesto comercial.

En el sistema los parámetros del agua se mantuvieron estables, y se realizó un monitoreo diario de los parámetros (Tabla 1). El agua se mantuvo a una temperatura promedio de 10,5 °C, el oxígeno disuelto con una media de 9,2 y un pH 7,24, medidos

con un multiparamétrico de registro portátil. El sistema se mantuvo con un caudal de 4 litros/min.

Tabla 1: Registro de parámetros diarios de calidad del agua monitoreados para tres sistemas independientes de recirculación, utilizados en este estudio. Se indican los valores de la media y desviación estándar (± DS) correspondientes a las mediciones durante el periodo de siete semanas.

BIOFILTRO	ESTANQUE	pH	T °C	O2 (mg/L)
B1	E 1.1	7,0 ± 0,3	10,5 ± 0,7	9,1 ± 0,8
	E 1.2	7,2 ± 0,2	10,4 ± 0,6	9,0 ± 0,6
B2	E 2.1	7,2 ± 0,2	10,5 ± 0,6	9,0 ± 0,7
	E 2.2	7,2 ± 0,2	10,5 ± 0,6	9,1 ± 0,7
B3	E 3.1	7,4 ± 0,1	10,2 ± 0,6	9,9 ± 0,7
	E 3.2	7,4 ± 0,2	10,2 ± 0,6	9,4 ± 0,7

4.- Análisis fisicoquímico

4.1- Medición de parámetros ($N\text{-}NH_3$), ($N\text{-}NO_2$) y ($N\text{-}NO_3$)

Los parámetros fueron analizados durante un periodo de 3 semanas. Para cada muestra se recolectaron 15 ml de agua a la entrada y salida de los Biofiltros 1, 2 y 3.

Los parámetros de amoníaco ($N\text{-}NH_3$), nitrito ($N\text{-}NO_2$) y nitrato ($N\text{-}NO_3$) se cuantificaron en la semana 2, 3 y 4 de experimentación, mediadas por duplicado a la entrada y salida de cada biofiltro, con fotómetro multiparamétrico de sobremesa (HI 83303), usando los respectivos kits de reactivos y siguiendo las especificaciones del fabricante.

4.2- Evaluación de los biofiltros

Para determinar el funcionamiento del biofiltro en la remoción de los compuestos nitrogenados, se estimaron los índices de remoción de amoníaco, nitrito y nitrato.

Estos índices se obtuvieron mediante una ecuación utilizando las concentraciones de estos compuestos en la entrada y salida de los biofiltros.

Para el calcula del índice de remoción (IR) se utilizó:

$$IR = \left(\frac{C.\ Entrada\ -\ C.\ Salida}{C.\ Entrada} \right)$$

Dónde *C. entrada* y C. *salida* representando las concentraciones en la entrada y salida del biofiltro, respectivamente. Las estimaciones se realizaron para los tres biofiltros evaluados, permitiendo comparar su desempeño en términos de remoción.

5.- Muestreo microbiológico

Se tomaron un total de 21 muestras de bioportadores. Estas muestras fueron tomadas cada semana durante las 7 semanas de experimentación, recolectando muestras de cada uno de los sistemas de biofiltración biológica independientes con distintas condiciones de fotoperiodo. Las muestras tomadas en la primera semana corresponden a pre-fotoperiodo.

Desde el biofiltro se tomaron de manera aleatoria una cantidad de 20 unidades de bioportadores para cada muestra, las cuales se depositaban en tubos falcon de 50 ml. Para mantener las muestras estas fueron sumergidas en solución Buffer PBS (NaCl 8 g/L, KCl 0,2 g/L, $NaHPO_4$ x 6H2O 1,44 g/L, KH_2PO_4 0,24 g/l, en un pH 7,5) para su transporte y procesamiento en el laboratorio. Las muestras fueron almacenadas a -20 °C hasta su posterior análisis.

6.- Procesamiento de las muestras

Las muestras de biopelícula desde los tubos falcon se sometieron a una agitación vigorosa por medio de un vortex durante 5 minutos, para facilitar el desprendimiento de la biopelícula adherida a los bioportadores.

Luego de una agitación las muestras fueron centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, este proceso se realizó por duplicado. Posteriormente, el sobrenadante y los bioportadores fueron descartados cuidadosamente dejando el pellet de las células bacterianas en el fondo.

El pellet generado se resuspendió en 8 ml de PBS estéril y se agitó suavemente para homogenizar. Luego, se agregó 2 ml de la muestra a los tubos eppendorf de 2 ml y se centrifugo a 5.000 rpm por 3 minutos, y trascurrido el tiempo se descartó el sobrenadante, proceso que se repitió hasta terminar con toda la solución de la muestra. Una vez retirado el último sobrenadante, la muestra se resuspendió con 300 µl de agua PCR y se almaceno a -20 °C.

7.- Extracción y purificación de ADN en muestras de biopelícula

Para la extracción de ADN genómico se tomaron los 300 µl de la muestra obtenida en el paso (6), utilizando protocolo de extracción de ADN fenol-cloroformo. Se agregaron 200 µl de Buffer de lisis, con ayuda de beats y vástago se realizó una trituración mecánica para mejorar ruptura celular y la liberación del ADN, las muestras fueron agitadas en vortex por 2 minutos, seguido de incubación por 15 min a 65ºC. Luego se agregó 10 µl ARNasa (1 µg/µl) y se incubo por 30 min a 55ºC, y posteriormente se añadieron 20 µl Proteinasa K con incubación de 30 min a 55ºC, y la enzima se inactivo por 10 min a 80ºC. Se añadieron 400 µl de cloroformo, se homogenizo y centrifugó 10 min a 14000 rpm, para luego tomar la fase acuosa. El ADN fue precipitado con etanol frío 100% y lavado 2 veces con etanol 70%,

recuperado mediante centrifugación, y finalmente fue resuspendido en 30 µl de agua ultrapura autoclavada.

El ADN obtenido se cuantificó y se midió su pureza utilizando NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer. La integridad del producto de la extracción fue visualizada en gel de agarosa al 1%. Para la electroforesis se utilizaron 6 µl de muestra y 4 µl de gel red con buffer de carga 3x, y el gel se corrió a 80 V por 45 min.

8.- Amplificación por qPCR del gen *amoA* y *nxrA*

8.1.- PCR en tiempo real

Se realizó una revisión bibliográfica y se seleccionaron dos conjuntos de cebadores para las comunidades de bacterias oxidantes de amonio (Tabla 3), y cebadores específicos para la secuencia del gen amoA descritos por Rotthauwe et al., 1997. Adicionalmente se seleccionaron cebadores para el gen *nxrA* de bacterias oxidantes de nitrito.

Para optimizar las condiciones de la qPCR y asegurar la eficiencia de la amplificación del gen amoA, se realizaron pruebas preliminares con distintas concentraciones de ADN. Se prepararon varias reacciones de PCR con concentraciones de ADN genómico que oscilaron entre 5 ng/µl y 50 ng/µl. En base a los resultados, se estableció que todas las muestras de biopelícula utilizadas en los ensayos de qPCR debían ser ajustadas a una concentración final de 20 ng/µl para asegurar la reproducibilidad y la eficiencia del proceso de amplificación (Tabla 2).

Tabla 2: Factores de dilución y concentraciones de ADN utilizadas en los ensayos posteriores, para la amplificación por qPCR en gen *amoA* – *nxrA*. Rango de dilución (20,5 – 23,6 ng/µl).

Semana	Biofiltro 1		Biofiltro 2		Biofiltro 3	
	Factor Dilución	Concentración ADN (ng/µl)	Factor Dilución	Concentración ADN (ng/µl)	Factor Dilución	Concentración ADN (ng/µl)
M1	1:35	22,4	1:15	21,8	1:10	22,6
M2	1:25	21,1	1:10	22,5	1:5	23,1
M3	1:25	22,0	1:10	23,3	1:25	21,1
M4	1:14	21,7	1:25	23,6	1:40	21,9
M5	1:25	21,1	1:12	20,8	1:18	21,7
M6	1:25	21,2	1:5	20,5	1:30	22,6
M7	1:40	21,8	1:6	22,1	1:9	21,9

Se amplificaron genes específicos mediante PCR en tiempo real, gen para la enzima amonio monooxigenasa (*amoA*) y para la enzima nitrito oxido reductasa (*nxrA*), con el propósito de evaluar la presencia de estos en las muestras de biofiltro-RAS. Para las amplificaciones de los genes la composición del mix de PCR con un volumen final de 20 µl contenía: 10 µl de Takyon Rox SYBR Blue MasterMix dTTP, 2 µl de cada cebador (amoA-1F, amoA-2R) y (F1370-F1 nxrA, F2843-R2 nxrA) según el gen de interés, 4 µl de agua utrapura autoclavada y 2 µl de muestra. La reacción se realizó en el termociclador (Agilent, AriaMx Real-Time PCR System). Las condiciones y ciclo térmico de amplificación fueron: 1 ciclo de pre desnaturalización a (95 °C durante 3 min) seguido de 35 ciclos (95 °C, 30 segundos; 55 °C, 30 segundos y 72 °C, 30 segundos) y un ciclo final de elongación de 72 °C por 5 min.

Tabla 3: Cebadores utilizados en este estudio para la amplificación de los genes *amoA* según (Shimomura et al., 2012) y para *nxrA* según (Wertz et al., 2008).

Grupo bacteriano	Nombre	Secuencia 5'-3'
Bacterias Oxidantes de amonio	amoA-1F	GGGGTTTCTACTGGTGGT
	amoA-2R	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC
Bacterias Oxidantes de nitrito	F1370 F1 nxrA	CAGACCGACGTGTGCGAAAG
	F2843 R2 nxrA	TCCACAAGGAACGGAAGGTC

8.2- Detección y purificación gen *amoA* de Bacterias Nitrificantes

Para asegurar la amplificación específica y eficiente de los fragmentos de ADN objetivo, los productos de qPCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, las muestras M7, M5 y M6 se cargaron en el gel junto con un marcador de peso molecular para facilitar la identificación de los fragmentos *amoA* tamaño (491 pb) y *nxrA* (323 pb). Las bandas fueron visualizadas bajo luz ultravioleta de un transiluminador. Con ayuda de un bisturí las bandas correspondientes al gen fueron recortadas cuidadosamente del gel, y se realizó una purificación de ADN desde las bandas del gel utilizando Omega Gel Extraction kit D2500-1 siguiendo las instrucciones del fabricante.

9.- Curva estándar de cuantificación

Con el fin de estandarizar una metodología para la detección y cuantificación del gen *amoA*, se emplearon dos estrategias con una serie de diluciones del material genético extraído.

9.1- Método I Curva estándar de cuantificación

A partir de la muestra purificada del gen *amoA* en el apartado (8.2) con una concentración de 2 ng/µl, se realizaron diluciones seriadas en base diez, 10^8, 10^7, 10^6, 10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10^1 copias/ µl. Para esto se calculó el número de copias en la muestra inicial, resultando 3.72 x 10^9 copias/µl, utilizando "a)". Finalmente se agregaron 0,54 µl de la muestra inicial en 19,5 µl de agua ultra pura autoclavada correspondiente a la primera dilución 10^8, el volumen necesario se obtuvo a partir de "b)". Las diluciones posteriores fueron preparadas en tubos eppendorf de 0,65 ml con 18 µl de agua añadiéndole 2 µl de la muestra diluida anteriormente.

- Tamaño del gen *amoA*: 491 pb
- Masa: 2 ng/µl = 2 x 10^{-9}
- La constante de Avogadro: 6.022×10^{23} copias/mol.
- El peso molecular promedio de un par de bases: 660 g/mol/pb.

a) $$\text{Número de copias (pb)} = \frac{(\text{concentración ng/µL}) \times 10^{-9}\ \text{g/ng} \times (6.022 \times 10^{23}\ \text{copias/mol})}{(\text{tamaño gen pb} \times 660\ \text{g/mol/pb})}$$

b) $$V_1\, C_1 = V_2\, C_2$$

9.2- Método II Curva estándar de Cuantificación

Para llevar a cabo la curva estándar se tomó 1 µl de la muestra del gen *amoA* purificada y se añadió a un tubo eppendorf de 0,65 ml conteniendo 10 µl de agua ultra pura autoclavada, se pipeteo suavemente para homogenizar la dilución, primera dilución correspondiente a un orden de magnitud de 10^8. A partir de aquí se fueron tomando 1 µl de la dilución anteriormente realizada, añadiéndola en 10 µl, hasta llegar a la dilución del orden 10^1 (Figura 5).

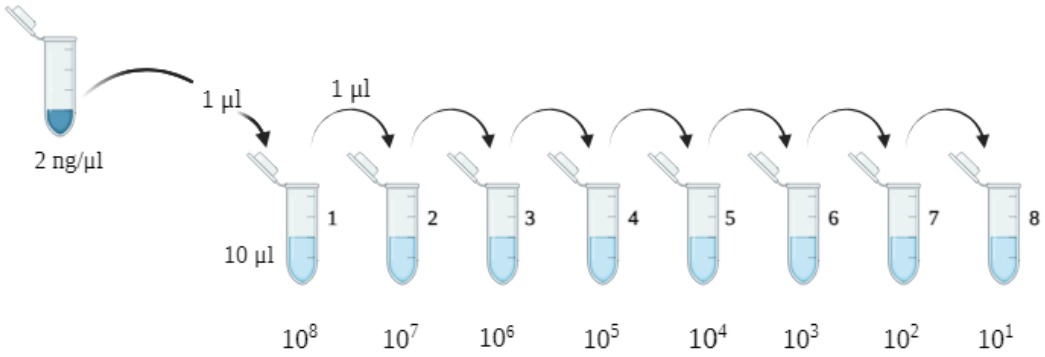

Figura 5: Elaboración ocho diluciones en serie a partir de 1 µl de ADN purificado.

Posteriormente, se realizó un qPCR con las diluciones seriadas resultantes para generar una curva estándar, la cual es fundamental para cuantificar con precisión el número de copias del gen *amoA* en las muestras de ensayo. En este proceso, se utilizaron las diluciones desde un rango de magnitud de 10^8 hasta 10^1 copias/µl, lo que permitió establecer una relación lineal entre el número de copias conocidas y los valores de umbral de (Cq) obtenidos durante la amplificación del ADN en el qPCR. Cada dilución fue preparada y amplificada por duplicado para asegurar la reproducibilidad de los resultados generados por el qPCR a partir de esta curva, se determinó ecuación de regresión lineal, el coeficiente de determinación R^2 y eficiencia de la amplificación, para confirmar la linealidad del proceso.

10.- Reproducibilidad método II – Límite de cuantificación.

Para evaluar la reproducibilidad del método de cuantificación por PCR en tiempo real del gen *amoA*, se realizaron dos rondas de diluciones, cada dilución se amplificó en duplicado bajo las mismas condiciones experimentales para garantizar la consistencia de los resultados. Se comenzó con una concentración inicial de 0,1818 ng/µl continuando hasta una concentración final de $1{,}24 \times 10^{-5}$ ng/µl.

El ciclo térmico utilizado en la PCR en tiempo real incluyó una fase de desnaturalización inicial a 95°C, seguido de 35 ciclos de amplificación (95 °C, 30 segundos; 55 °C, 30 segundos y 72 °C, 30 segundos) y un ciclo final de 72 °C por 5 min. Al finalizar cada ciclo, se registró el valor de Cq, que representa el punto en el que la fluorescencia del producto de amplificación excede el umbral de detección.

Los valores de Cq obtenidos de la amplificaciones se utilizaron para construir una curva estándar, graficando el logaritmo de las concentraciones frente al número de ciclos Cq. Aplicando una regresión lineal, con la ecuación se obtuvo los valores de la pendiente "m" y el coeficiente de determinación "R^2". La eficiencia "E" se obtuvo a partir de AriaMx versión 2.1 software especializado para el análisis de datos generados por Agilent AriaMx Real-Time PCR System.

Para evaluar la reproducibilidad del método para ambas diluciones realizadas. Los valores de Cq obtenidos se utilizaron para calcular la media, la desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación porcentual (CV) de cada dilución.

El rango dinámico de cuantificación se estableció dentro de las diluciones que mostraron una relación lineal entre el Cq y la concentración de ADN (evaluado por el R^2). El límite inferior de cuantificación se estableció en la concentración más baja que produjo una amplificación reproducible y confiable, mientras que el límite superior correspondió a la concentración más alta antes de que la eficiencia comenzara a decrecer.

11.- Cuantificación gen *amoA* por qPCR en muestras de biopelícula.

La cuantificación relativa del gen *amoA* se realizó tomando como punto de partida el ADN normalizado a 20 ng/µl de las muestras de biopelícula. El número de copias se determinó mediante PCR cuantitativo utilizando Takyon Rox SYBR Blue MasterMix Dttp 10 µl, 2 µl de cada cebador (amoA-1F, amoA-2R), 4 µl de agua utrapura autoclavada y 2 µl de muestra. Las condiciones y ciclo térmico de amplificación

fueron: 1 ciclo de pre desnaturalización a (95 °C durante 3 min) seguido de 35 ciclos (95 °C, 30 segundos; 55 °C, 30 segundos y 72 °C, 30 segundos) y un ciclo final de elongación de 72 °C por 5 min. Cada muestra se realizó por duplicado.

Para el análisis del número de copias del gen *amoA* en las muestras, se empleó la curva estándar por el método II, utilizando los datos de límites de cuantificación de la amplificación II (Tabla 7). Se realizó una interpolación en la curva de calibración para determinar las concentraciones de ADN en las muestras experimentales, utilizando los valores de Cq obtenidos. Este enfoque permitió calcular el número de copias del gen *amoA* en cada muestra.

$$\text{Nº Copias} = 10^{\left(\frac{b - Cq}{m}\right)}$$

Dónde, Cq: es el valor del umbral de amplificación obtenido en el qPCR, m: es la pendiente y b: es la ordenada al origen de la ecuación de la curva estándar empleada. Los resultados del número de copias se ajustaron aplicando el factor de dilución del ADN (Tabla 2).

12.- Análisis estadístico

Para determinar una diferencia significativa en el número de copias del gen amoA entre el Biofiltro 1 y 2, se aplicó la prueba no paramétrica Mann-Whitney. Esta prueba fue seleccionada debido a la distribución no normal de los datos y el tamaño reducido de las muestras.

RESULTADOS

1.- Índice de remoción de compuestos nitrogenados

En la (Figura 6a) se aprecia un índice de remoción negativa tanto para NH_3 como para NO_3^-, en cuanto al nitrato se observa un incremento progresivo en el índice, lo que refleja una acumulación en el SRA. Para el amoníaco no existe una conversión efectiva, se acumuló. Sin detección de NO_2 fuera de rango cuantificable por el equipo de análisis.

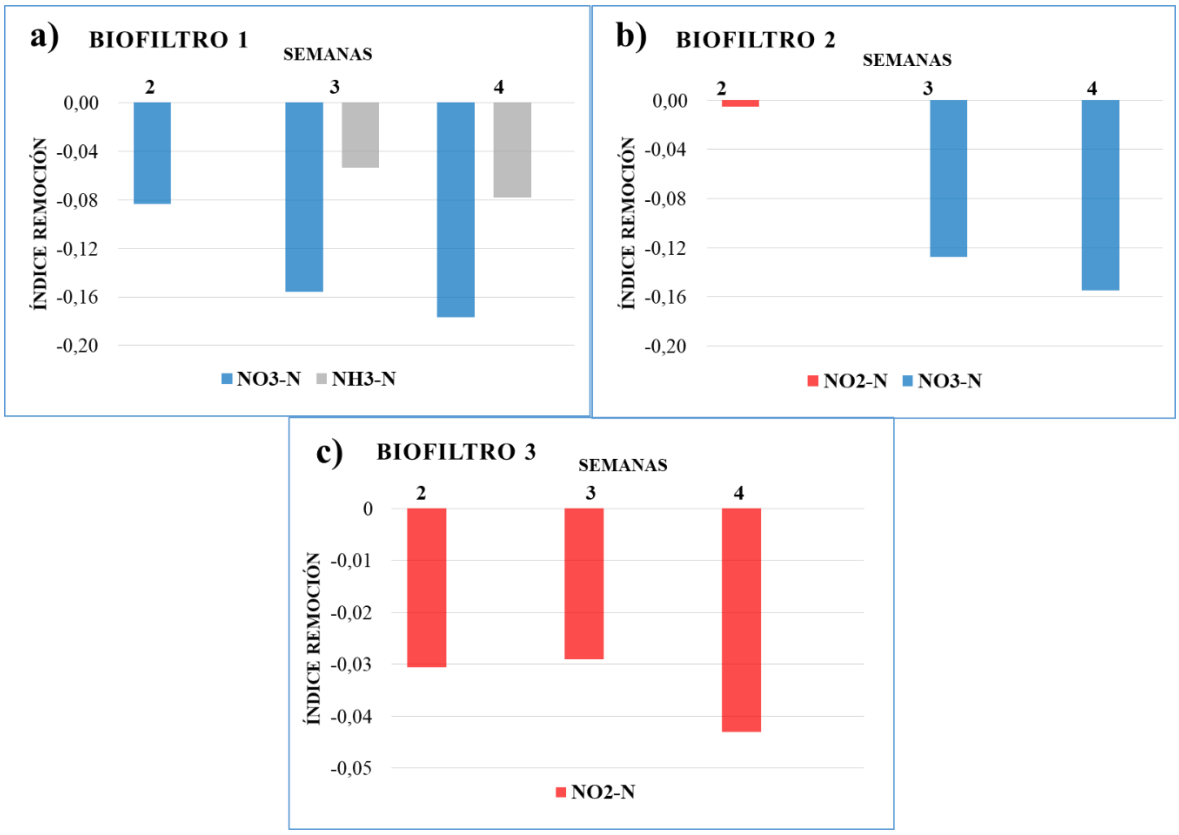

Figura 6: Índice de remoción de NH_3, NO_2 y NO_3^- para los tres biofiltros independientes.

Para (Figura 6b) hay un incremento en el índice de remoción de Nitrato reflejando al igual que en el "Biofiltro 1" una acumulación en el sistema. No se obtuvieron valores de NH_3 fuera de rango medible igual para NO_2 en la semana 3 y 4.

En la gráfica (Figura 6c), solo se obtuvieron datos de nitrito con un índice negativo encontrando un máximo en la semana 4 de muestreo, acumulación de Nitrito en el sistema. En cuanto a Nitrato no se detectó concentración durante las tres semanas a un rango de ng/µl. NH_3 fuera de rango para las tres semanas de muestreo.

2.- Extracción y purificación de ADN muestras de biopelícula

Extractos de ADN de las muestras de biopelícula de los biofiltro-RAS durante las siete semanas de muestreo microbiológico, se analizaron para evaluar su calidad y concentración, las cuales fueron apropiadas para ensayos posteriores (Tabla 4). En cuanto al índice de pureza en la relación 260/280 los resultados estuvieron cerca de los índices óptimos de 1,8.

Tabla 4: Evaluación de la calidad y concentración del ADN en espectrofotómetro NanoDrop ND-1000.

Muestras (semanas)	**Biofiltro 1**		**Biofiltro 2**		**Biofiltro 3**	
	ng/µl	**260/280**	**ng/µl**	**260/280**	**ng/µl**	**260/280**
1	785.7	1,81	328	1,81	226.8	1,82
2	527.9	1,82	225.3	1,84	115.9	1,79
3	551,5	1,86	233.5	1,81	529.2	1,80
4	304	1,77	592,1	1,82	877,2	1,84
5	529,4	1,89	199,2	1,80	391	1,81
6	531,5	1,79	102,6	1,84	678,8	1,81
7	872,4	1,80	133,1	1,82	197,4	1,89

Para las muestras correspondientes al biofiltro 1 y 3 se obtuvo una alta concentración de ADN con un promedio de (557 ng/µl ± 203,1 y 536 ng/µl ± 301,4) respectivamente. En el biofiltro 2 se consiguió una concentración menor de 271 ng/µl ± 199,3 en promedio.

A partir de los resultados de la extracción y la cuantificación por espectrofotometría se realizó un gel de agarosa para observar la integridad del ADN (Figura 7). En la mayoría de las muestras se obtuvo un patrón característico. Al inicio de los carriles, se visualiza una banda bien definida, indicativo de la presencia de ADN de alto peso molecular. Sin embargo, también se puede observar en las muestras un gradiente de degradación extendiéndose hasta el final del carril, volviéndose progresivamente más intenso.

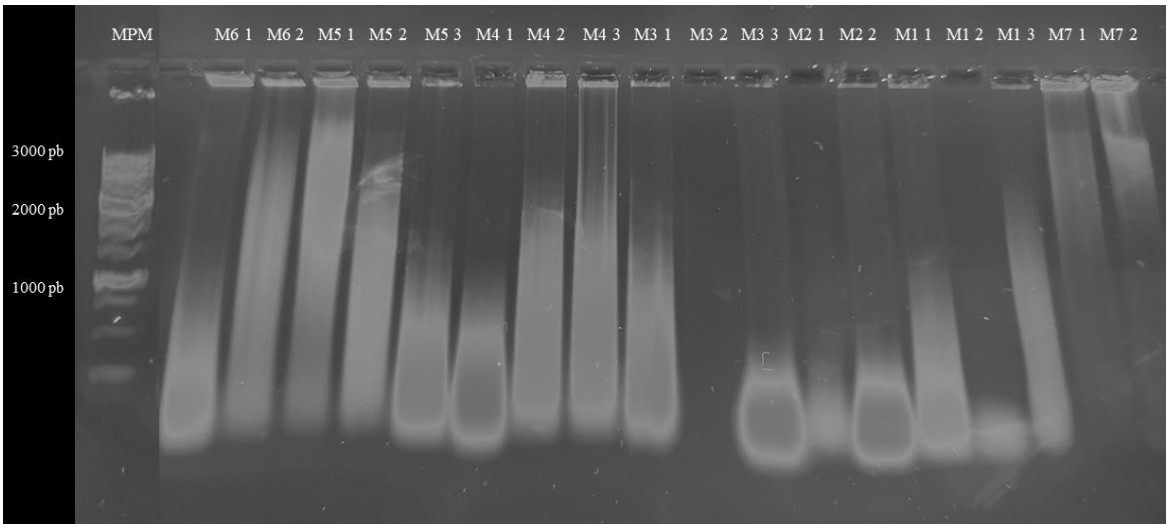

Figura 7: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la extracción de ADN en muestras de biopelícula correspondientes a las siete semanas de muestreo (M6 1, M6 2, M5 1, M5 2, M5 3, M4 1, M4 2, M4 3, M3 1, M3 2, M3 3, M2 1, M2 2, M1 1, M1 2, M1 3, M7 1, M7 2). Se observa en la mayoría de las muestras la banda al inicio del carril, correspondiente al ADN genómico. Adicionalmente, se identificó una degradación a lo largo del carril lo que sugiere la posible presencia de impurezas. MPM: marcador de peso molecular.

3.- Amplificación y detección de genes nitrificantes *amoA* - *nxrA* mediante qPCR y Electroforesis

Se amplificaron genes asociados al proceso de nitrificación para el gen *amoA* (gen amonio monooxigenasa) y gen *nxrA* (gen nitrito oxido reductasa) mediante qPCR en las muestras de biopelícula.

Producto de la amplificación de las muestras para el gen *amoA* (Figura 8) M7 1, M7 2, M5 1, M5 2, M6 1, M6 2, se visualiza en el gel de electroforesis un amplicón resultante de 491 pb del gen *amoA*, que confirma la presencia del gen de interés en las muestras analizadas. Para la muestra M5 1 no se obtuvo la presencia del gen diana. Desde los geles se logró recuperar las bandas más intensas de los carriles M5 2, M6 1, M6 2, las cuales fueron purificadas para generar una muestra estándar del gen de 2 ng/µl.

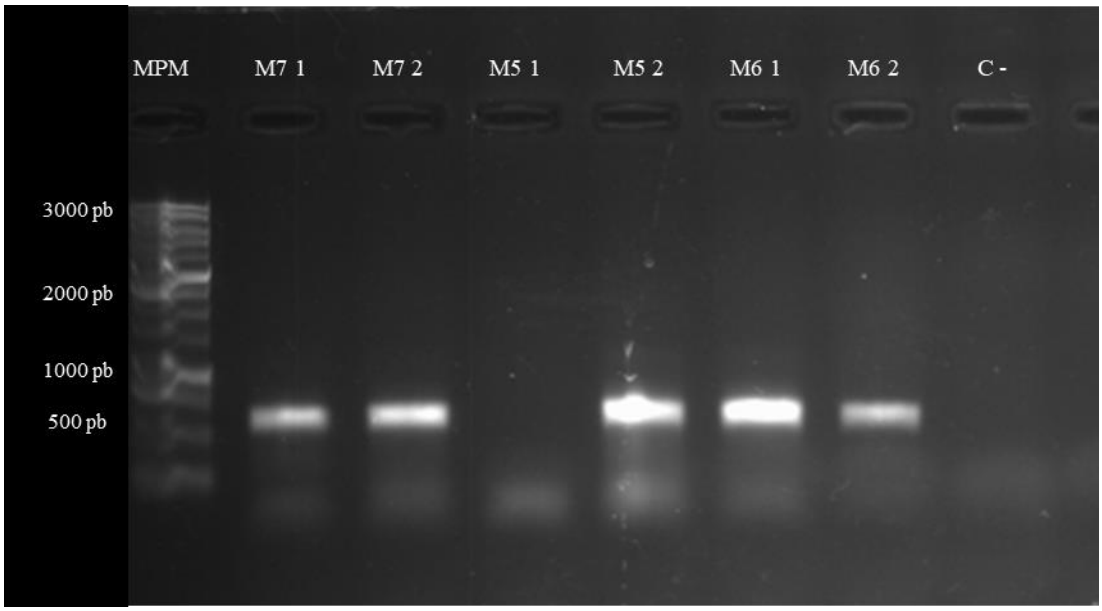

Figura 8: Gel de electroforesis en agarosa al 1% con productos de qPCR para el gen amoA de bacterias nitrificantes. Se observa en el carril MPM: Marcador de peso molecular de 200 pb. Seis muestras experimentales de ADN con factor de dilución de

1:25 (M7 1, M7 2, M5 1, M5 2, M6 1, M6 2) respectivamente, mostrando bandas específicas de aproximadamente 500 pb. C -: Control negativo.

Los resultados de la amplificación para el gen *nxrA*, se visualizan en el gel de electroforesis (Figura 9**)** ocho muestras experimentales. Para las muestras M7 2, M7 1, M6 2, M6 1, M5 2, M5 1, M4 2 se obtuvo una banda al final del carril de 200 pb. También para la mayoría de las muestra se puede ver una banda de 300 – 350 pb, mostrándose más intensa en M6 1 y M5 1. Sin embargo en la amplificación del gen, utilizando software AriaMx versión 2.1, no se observó el Tm específico para el gen *nxrA* en la Curva de Melting.

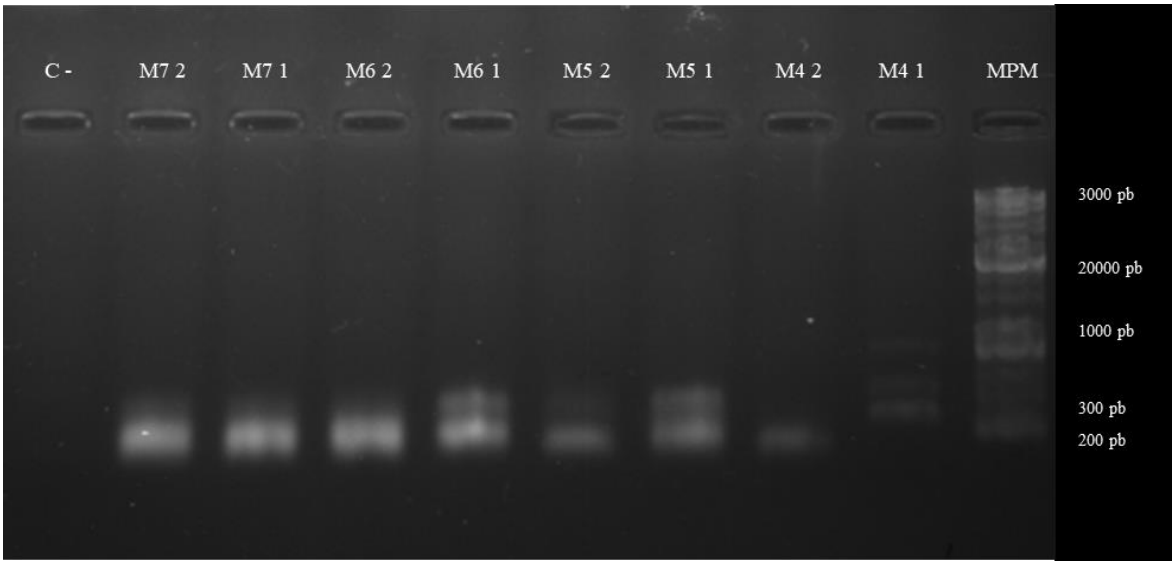

Figura 9: Gel de electroforesis en agarosa al 1% con productos de qPCR para el gen *nxrA* de bacterias nitrificantes. Se observa en el carril MPM: Marcador de peso molecular de 200 pb. Ocho muestras experimentales (M7 2, M7 1, M6 2, M6 1, M5 2, M5 1, M4 2, M4 1), mostrando la mayoría de las muestras una banda de aproximadamente 200 pb y la muestra (M5 1, M6 1) una banda mayor de 300 pb. C -: control negativo.

4.- Método I Curva estándar de cuantificación

En la (Tabla 5) se observan resultados de la amplificación por qPCR para la curva estándar de cuantificación. Las diluciones comienzan del orden 10^8 copias/ul, hasta la última dilución de 10^1 copias/ul. Se obtuvieron los valores de Cq y Tm.

Tabla 5: Concentraciones de las diluciones en número de copias/µl del gen *amoA* para cada muestra, presentadas en duplicado con sus resultados de Cq: ciclo de amplificación, Tm: temperatura de Melting. C - = control negativo. Pendiente = -2,146. R^2 = 0,928. E % = 192,4.

Dilución	Concentración Nº copias/µl	Replicas	Cq	Tm
Agua	C (-)	--	No Cq	85,0
1	10^8	1	12,38	88,5
		2	13,19	88,5
2	10^7	1	16,98	88,0
		2	16,71	88,5
3	10^6	1	19,74	83,5
		2	20,28	88,0
4	10^5	1	22,37	89,0
		2	22,34	88,5
5	10^4	1	24,19	87,5
		2	23,28	88,5
6	10^3	1	No Cq	87,0
		2	25,91	88,0
7	10^2	1	25,02	88,0
		2	No Cq	89,0
8	10^1	1	No Cq	90,0
		2	28,84	77,0
Pendiente = -2,146		**R²** = 0,928	**E %** = 192,4	

El Tm se mantuvo consistentemente en 88,0 y 88,5ºC entre las diluciones Nº 1 y 5, lo que indica una amplificación específica del gen diana a excepción de la réplica 1 de la dilución 3 (10^6 copias/µl), que obtuvo un Tm de 83,5ºC. Para las diluciones 6, 7 y

8 una de las réplicas no obtuvo un ciclo de amplificación. Esta variación podría deberse a la menor cantidad de ADN disponible en estas diluciones.

Para los límites de cuantificación en la tabla se debe considerar la dilución de un rango de Cq más amplio. En la dilución Nº 8 en una de las réplicas se obtuvo el Cq más alto de 28,84, sin embargo, al visualizar el Tm del producto amplificado, no corresponde a la temperatura de Melt del gen *amoA*. En consecuencia, para la curva estándar de cuantificación se obtuvo un límite de cuantificación de 25,91 correspondiente a la dilución Nº 6 con un rango de magnitud 10^3 copias/µl y un Tm de 88. Aun así este resultado no fue reproducible, la réplica 1 no obtuvo Cq.

Las ecuaciones de la recta se realizaron a partir de los resultados de Cq para cada dilución, y el logaritmo del número de copias por µl de los estándares. Los resultados se presentan por duplicado para cada muestra.

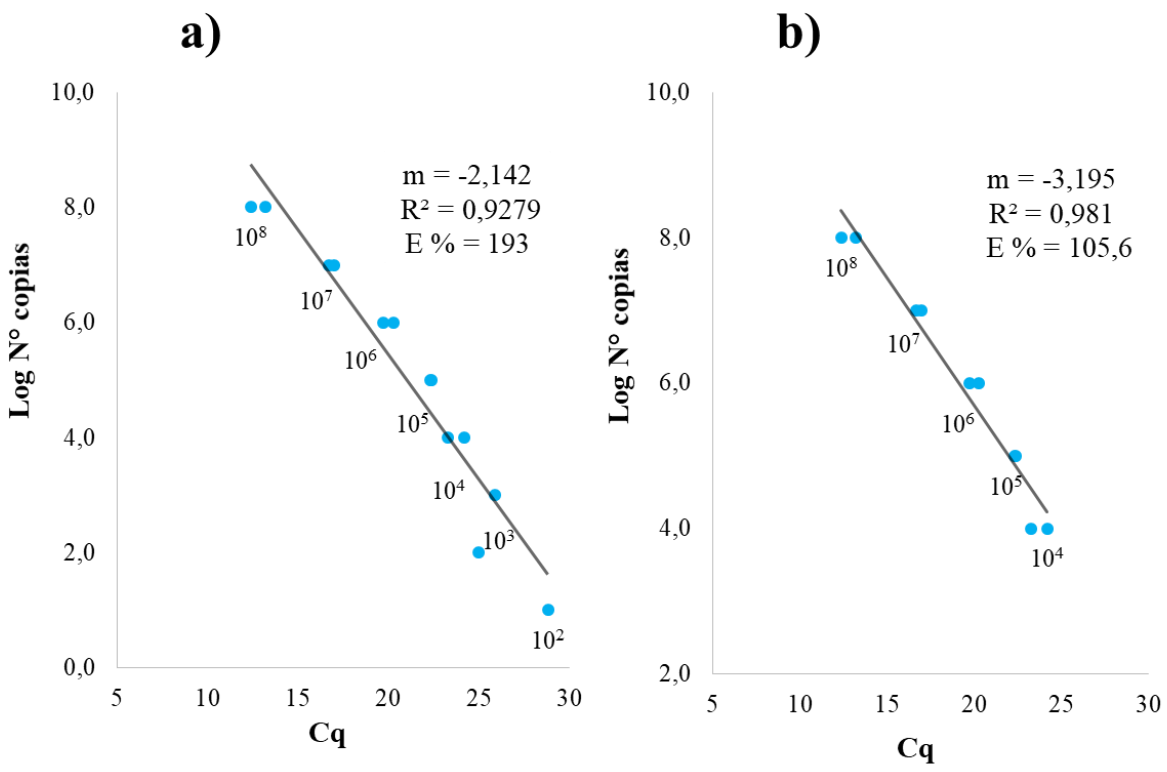

Figura 10: **a)** Figura del logaritmo de la concentración del estándar vs número de ciclos usando el total de las 8 diluciones seriadas: $1x10^8$ – $1x10^1$ (fuera del rango

lineal). Pendiente = -2,142, R2 = 0,9279 y una Eficiencia de 193 %. **b)** Figura del logaritmo de la concentración del estándar vs número de ciclos usando 5 diluciones seriadas: $1x10^8$ – $1x10^4$. Pendiente = -3,195, R^2 = 0,981 y Eficiencia de 105,6 %.

En la (Figura 10a) se observa el total de las diluciones, donde al incluir 10^3, 10^2 y 10^1 va disminuyendo su comportamiento lineal, con una pendiente de -2,142, un R^2 de 0,9279 y una eficiencia de 193 %. Estos resultados sugieren que al incluir diluciones por debajo de 10^4 el ensayo comienza a perder su linealidad, como lo indica el descenso en R^2 y una eficiencia mayor a 190 %.

Por otro lado, en la (Figura 10b) muestra la relación entre el logaritmo de la concentración del estándar y el número de ciclos utilizando las primeras 5 diluciones seriadas, que abarca desde 1×10^8 hasta 1×10^4 copias/µl. La pendiente de la recta obtenida es de -3,195, con un coeficiente de determinación R^2 de 0,981 y una eficiencia de amplificación de 105,6 %. No se observa una tendencia lineal bien definida aun así en las primeras 5 diluciones los valores de Cq siguen una tendencia coherente.

5.- Método II Curva estándar de cuantificación

En la siguiente (Tabla 6) se observan las diluciones realizadas con sus respectivos resultados de amplificación Cq y Tm, además de los datos obtenidos a partir de la concentración de cada dilución y el tamaño del gen diana obteniendo el número de copias/ul de cada muestra.

Para la primera dilución se obtuvo una concentración inicial de 0,1818 ng/ul, obteniendo el ciclo de amplificación más bajo de 10,8 en promedio y un número de copias/ul de $3,34x10^8$. Para la última dilución 8 se obtuvo un Cq de 27,8 en promedio, con un orden de magnitud de 10^1 en el número de copias.

Tabla 6: Concentraciones de las diluciones y el número de copias/µl del gen *amoA* para cada muestra, presentadas en duplicado junto con sus respectivos valores de Cq: ciclo de amplificación, Tm: temperatura de Melting.

Dilución	Concentración gen amoA en la dilución (ng/ul)	Nº de Copias/µl	Replica	Cq	Tm
1	$1,8 \times 10^{-1}$	$3,34 \times 10^{8}$	1	10,7	88,5
			2	10,9	88,5
2	$1,65 \times 10^{-2}$	$3,06 \times 10^{7}$	1	14,0	88,5
			2	14,2	88,5
3	$1,5 \times 10^{-3}$	$2,79 \times 10^{6}$	1	17,5	88,5
			2	17,8	88,5
4	1.36×10^{-4}	$2,53 \times 10^{5}$	1	21,5	88,5
			2	21,4	88,5
5	1.24×10^{-5}	$2,31 \times 10^{4}$	1	24,8	88,5
			2	24,8	88,5
6	1.12×10^{-6}	$2,08 \times 10^{3}$	1	26,7	77
			2	26,8	76,5
7	1.02×10^{-7}	$1,89 \times 10^{2}$	1	27,7	75,5
			2	27,8	75,5
8	9.3×10^{-9}	$1,7 \times 10^{1}$	1	27,8	76
			2	27,9	79

Los resultados muestran que, para las primeras cinco diluciones, el Tm se mantiene consistentemente en 88,5 lo que indica una amplificación específica del gen diana. Sin embargo, en las últimas tres diluciones 6, 7 y 8, se observa una disminución en el Tm a valores entre 75,5 y 79. Esta variación sugiere la posible presencia de productos inespecíficos o dímeros de cebadores, lo cual podría deberse a la menor cantidad de ADN disponible en estas diluciones a concentraciones inferiores de 1.24×10^{-5} ng/µl. El cambio en el Tm indica que la amplificación en estas diluciones no fue tan específica como en las concentraciones más altas, afectando la precisión de la cuantificación en los niveles más bajos de ADN.

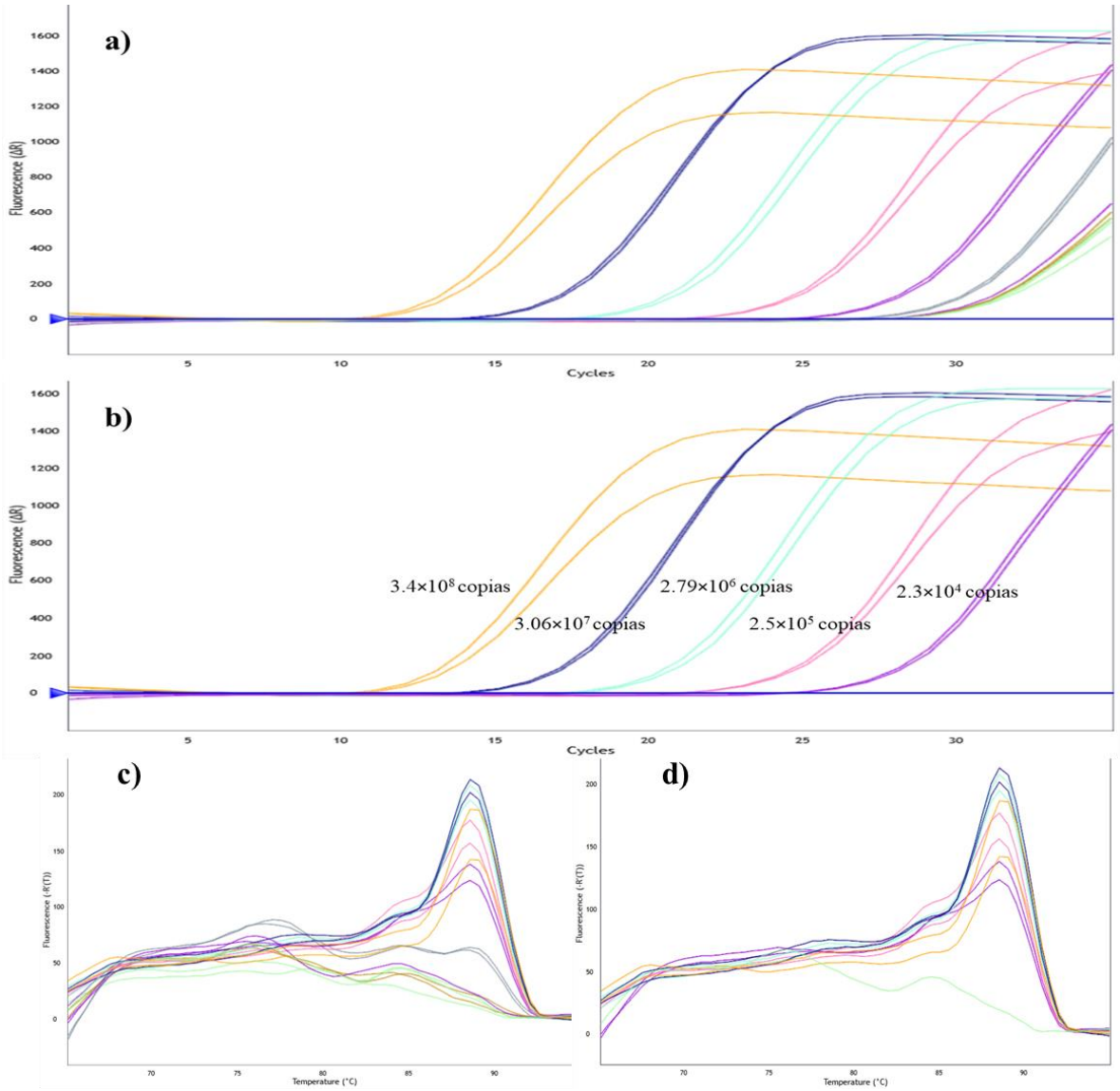

Figura 11: a) Curva estándar de amplificación por qPCR del número de copias del gen amoA, usando diluciones seriadas en base diez (10^8 - 10^1). **b)** Curva estándar de amplificación por qPCR del número de copias del gen *amoA*, usando diluciones seriadas en base diez (10^8 - 10^4). **c)** Curva de Melting (10^8 - 10^1). **d)** Curva de Melting (10^8 - 10^4).

Curva de temperatura, Tm o curva de Melt. En la (Figura 11 c y d) se observa una gráfica con un pico bien marcado, en la primera de ambas gráficas corresponde al producto del gen amoA desde la dilución 10^8 a 10^1 en donde el total de las muestras no presentan dicho pico, en consecuencia, presentan un Tm inferior inespecífico para

el gen de interés. Al descartar la dilución del orden 10^3, 10^2 y 10^1 se obtuvo (Figura 11d) una sola curva de Melting en común para las muestras a excepción del (control negativo) curva de color verde, asegurando una correcta amplificación sin contaminación.

Las ecuaciones de la recta se realizaron a partir de los resultados de Cq para cada dilución, y el logaritmo del número de copias por µl de los estándares. Los resultados se presentan por duplicado para cada muestra.

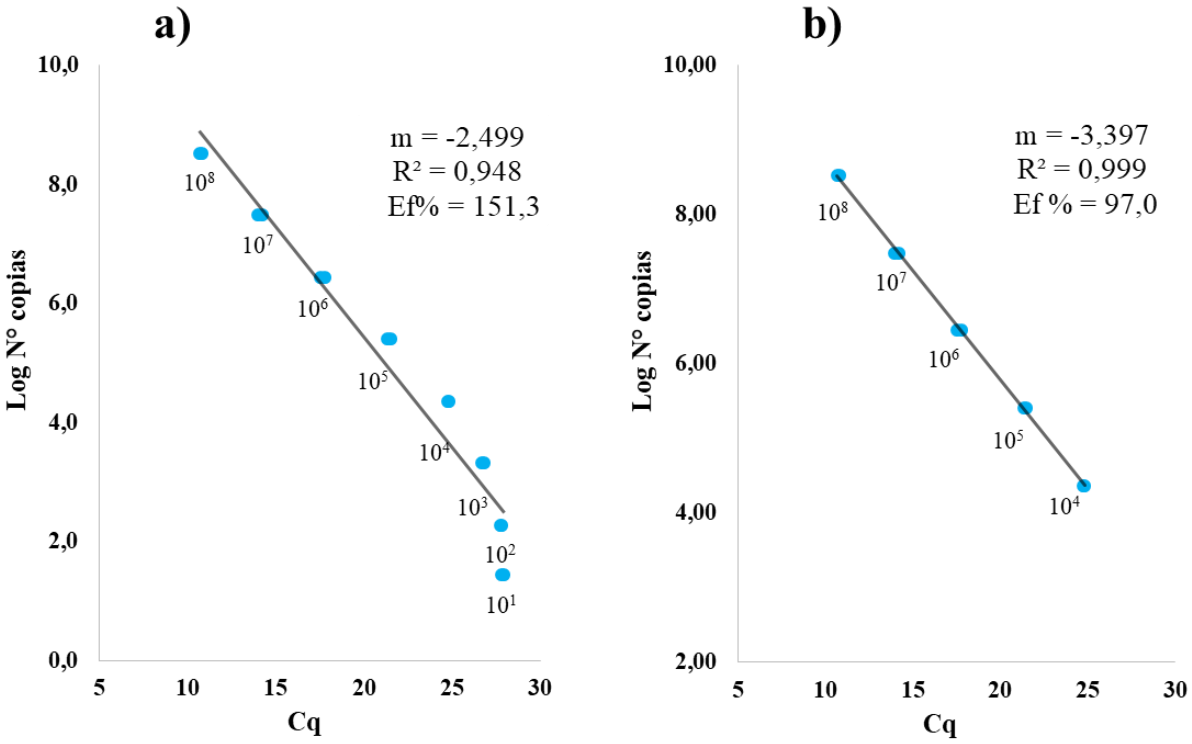

Figura 12: **a)** Figura del logaritmo de la concentración del estándar vs número de ciclos usando el total de las 8 diluciones seriadas: $1x10^8$ – $1x10^1$ (fuera del rango lineal). Pendiente = -2,499, R^2 = 0,9484 y una Eficiencia de 151,3 %. **b)** Figura del logaritmo de la concentración del estándar vs número de ciclos usando 5 diluciones seriadas: $1x10^8$ – $1x10^4$ (dentro del rango lineal). Pendiente = -3,397, R^2 = 0,9993 y Eficiencia de 97 %.

En la (Figura 12a) se muestra una tendencia lineal en las primeras diluciones, sin embargo, al llegar a la dilución 10^3 va disminuyendo su comportamiento lineal. Al incluir las diluciones seriadas $1x10^3$, $1x10^2$ y $1x10^1$, los resultados van reduciendo su linealidad, con una pendiente de -2,499, un R^2 de 0,9484 y una eficiencia de 151,3%. Estos resultados sugieren que al incluir diluciones más bajas (por debajo de 1×10^4 copias/µl), el ensayo comienza a perder su linealidad, como lo indica el descenso en R^2 y una eficiencia mayor a 150 %.

En la (Figura 12b**)** muestra la relación entre el logaritmo de la concentración del estándar y el número de ciclos utilizando 5 diluciones seriadas, que abarca desde 1×10^8 hasta 1×10^4 copias/µl. La pendiente de la recta obtenida es de -3,397, con un coeficiente de determinación R^2 de 0,9993 y una eficiencia de amplificación del 97%. Se observa una tendencia lineal en las primeras 5 diluciones. El valor de R^2 alto refleja una excelente correlación lineal entre la concentración del gen *amoA* y los ciclos de cuantificación. La eficiencia cercana al 100% indica que el proceso de amplificación se desarrolla de manera ideal, duplicando la cantidad de ADN en cada ciclo. Estos datos se encuentran dentro del rango óptimos.

6.- Reproducibilidad método II – Límite de cuantificación

En la (Tabla 7) se observan los resultados de reproducibilidad obtenidos a partir de dos amplificaciones y sus réplicas bajo las mismas condiciones, realizadas mediante cuantificación por PCR en tiempo real para el gen *amoA*. Los resultados indican para todas las diluciones y sus réplicas, partiendo desde una concentración de ADN de (0,1818 ng/µl hasta $1.24x10^{-5}$ ng/µl) una desviación estándar menor a 0,64 ciclos de amplificación. Específicamente, las dos SD mayores se observaron en la quinta dilución (0,59 – 0,64). Además, los coeficientes de variación (CV) porcentuales, que indican la variabilidad relativa respecto a la media de los ciclos de cuantificación (Cq),

oscilaron entre 0,4% y 5,3%. El rango más bajo del CV fue 0,4%, correspondió a la segunda dilución, la cual también tuvo la menor SD de 0,06.

Tabla 7: Reproducibilidad del método de PCR en tiempo real del gen *amoA* para la primera y segunda amplificación con sus réplicas. SD: Desviación estándar. CV: Coeficiente de variación porcentual.

Dilución	Replicas	Amplificación I	Amplificación II	Media Cq	SD	CV (%)
1	1	10,68	9,91	10,3	0,54	5,3%
	2	10,85	10,96	10,9	0,08	0,7%
2	1	13,98	14,30	14,1	0,23	1,6%
	2	14,24	14,32	14,3	0,06	0,4%
3	1	17,53	18,00	17,8	0,33	1,9%
	2	17,77	18,07	17,9	0,21	1,2%
4	1	21,49	21,78	21,6	0,21	0,9%
	2	21,36	21,86	21,6	0,35	1,6%
5	1	24,82	25,66	25,2	0,59	2,4%
	2	24,78	25,68	25,2	0,64	2,5%

Los resultados de las curvas estándar para el gen *amoA*, indican que los límites de cuantificación de Cq se encuentran (Amplificación 1 = 24,78 – Amplificación 2 = 25,68). En consecuencia, el ciclo de amplificación máximo lo obtuvo la amplificación 2 con 25,68. Este límite de cuantificación es la menor concentración del gen objetivo que pueda ser detectado a través de las curvas estándar, que puede ser cuantificada con una exactitud aceptable. En cuanto al Cq mínimo posible para detectar una muestra dentro de la curva está el Cq de 9,91 correspondiente a la amplificación 2, esta es la concentración máximo cuantificable dentro de la curva.

Tabla 8: Límite de cuantificacion de Cq para gen *amoA*

Gen	Cq	Nº de copias/ul en qPCR
amoA	25.68	$2{,}31 \times 10^4$

7.- Cuantificación gen *amoA* por qPCR en muestras de biopelícula.

Se analizaron las muestras de biopelículas extraídas durante las 7 semanas de muestreo para los 3 biofiltros independientes, cada uno bajo diferentes regímenes de fotoperiodo. De todas las muestras procesadas mediante qPCR, cinco (M4 1, M5 2, M6 1, M7 1 y M7 2) mostraron amplificación, con valores de Cq que oscilaron entre 25,73 y 26,5 (Tabla 9). Estas muestras correspondieron a los biofiltros 1 y 2. El biofiltro 1, bajo un fotoperiodo de 24:0 (luz constante), presentó amplificación en las muestras M4 1, M6 1 y M7 1, mientras que el biofiltro 2, con un fotoperiodo de 14:10 (14 horas de luz y 10 horas de oscuridad), mostró amplificación en las muestras M5 2 y M7 2. Las muestras de ambos biofiltros presentaron un rango de Tm entre 88,5 y 89,5, confirmando la amplificación específica del gen *amoA*. En el caso del biofiltro 3, no se observó amplificación en ninguna de las muestras analizadas, independientemente de la semana de muestreo.

Tabla 9: Resultados de amplificación gen *amoA* por qPCR en muestras de biopelícula. La tabla presenta los valores de Cq y Tm obtenidos para las muestras M4 1, M5 2, M6 1, M7 1 y M7 2, correspondientes a los biofiltros 1 y 2. Número de copias corregido con factor de dilución.

Biofiltro	Muestras	Replicas	Cq	F. Dilución	Nº Copias	Tm
Biofiltro 1	M4 1	1	26,01	14	$2,57 \times 10^5$	89,5
		2	26,04	14	$2,53 \times 10^5$	89,5
	M6 1	1	26,5	25	$3,38 \times 10^5$	89,0
	M7 1	1	25,74	40	$8,73 \times 10^5$	88,5
		2	26,01	40	$7,36 \times 10^5$	89,0
Biofiltro 2	M5 2	1	25,82	12	$2,49 \times 10^5$	89,0
	M7 2	1	25,73	6	$1,31 \times 10^5$	88,5
		2	25,96	6	$1,14 \times 10^5$	88,5

Los resultados del número de copias del gen *amoA* se corrigieron aplicando el factor de dilución correspondiente para cada muestra de ADN. La muestra M7 1, perteneciente al Biofiltro 1, que operó bajo un fotoperiodo continuo, presentó el factor de dilución más alto, con un valor de 40. Después de aplicar las correcciones, se obtuvo el mayor número de copias en esta muestra, con una cantidad de $8,73 \times 10^5$ copias, mientras que su réplica mostró un valor de $7,36 \times 10^5$ copias, ambas correspondientes a la última semana de muestreo.

En contraste, los valores más bajos en el número de copias se registraron en el Biofiltro 2, que fue expuesto a un fotoperiodo de 14:10. Las amplificaciones obtenidas para las muestras M5 2 y M7 2 mostraron los valores más bajos. En M5 2, el número de copias fue de $2,49 \times 10^5$, mientras que en M7 2 se observó un valor de $1,23 \times 10^5$ en promedio con su réplica. Estos resultados indican una variabilidad en las cantidades de copias del gen *amoA* entre las distintas semanas de muestreo y entre los dos biofiltros sometidos a diferentes regímenes de fotoperiodo, reflejando que el Biofiltro

1 presentó consistentemente un mayor número de copias en las últimas semanas de muestreo en comparación con el Biofiltro 2

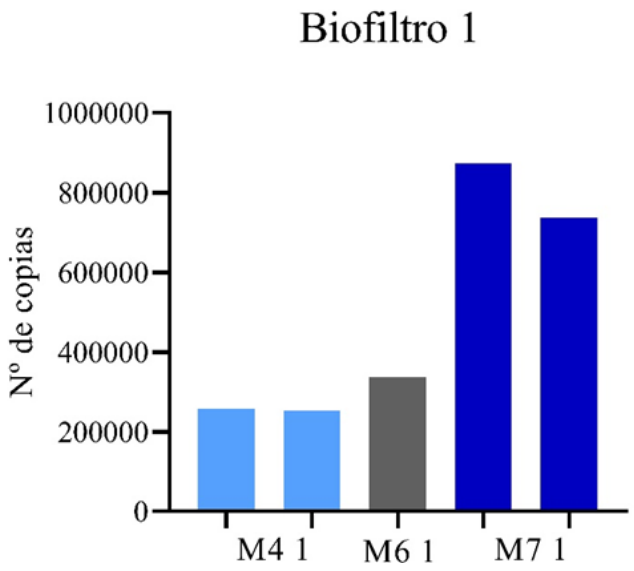

Figura 13: Número de copias del gen *amoA* amplificadas y corregidas con factor de dilución para las muestras M4 1, M6 1 y M7 1 del Biofltro 1. Gráfico de barra representa un aumento progresivo en el número de copias.

En la (Figura 13) se muestran los valores del número de copias del gen *amoA* para el biofiltro 1, con fotoperiodo 24:0. A partir de la cuarta semana de muestreo, se logró detectar la presencia del gen *amoA* en las muestras, mientras que en la quinta semana no se observó amplificación. En el gráfico de barras, se aprecia un incremento progresivo en el número de copias desde la muestra M4 1 hasta la muestra M7 1, donde se alcanzó el número más alto de copias detectado, con un valor que se duplicó en comparación con las semanas anteriores, alcanzando los valores más altos registrados en todo el experimento (8,73 x 10^5 copias en M7 1 y 7,36 x 10^5 copias en su réplica). Este aumento progresivo sugiere una acumulación constante de bacterias nitrificantes a lo largo del tiempo en el biofiltro 1 bajo luz constante.

Mientras que el biofiltro 1 con el SRA expuesto a fotoperiodo artificial 24:0 mostró un aumento progresivo en las últimas semanas de muestreo, el biofiltro 2 presentó valores más bajos.

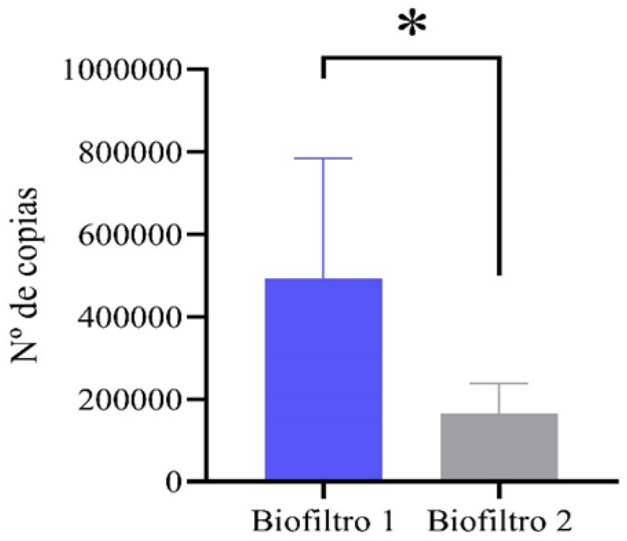

Figura 14: Comparación del número de copias del gen *amoA* para el Biofiltro 1 (n=5) y 2 (n=3). Las medianas del número de copias indican diferencias significativas entre ambos biofiltros, evaluado con prueba de Mann-Whitney. P= 0,035 ($p < 0,05$). *: diferencia significativa.

La (Figura 14) presenta los resultados del análisis comparativo del número de copias del gen *amoA* del biofiltro 1 (n=5) y el biofiltro 2 (n=3). Se aplicó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, esta prueba se utilizó debido a la distribución no normal de los datos y al tamaño reducido de las muestras. La prueba estadística reveló una diferencia significativa en las medianas del número de copias entre ambos biofiltros, con un valor de $p = 0,035$ ($p < 0,05$), indicando una variación significativa en la cantidad de copias del gen *amoA* entre las dos condiciones de fotoperiodo evaluadas.

DISCUSION

La detección de nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-) y amoníaco (NH_3) es fundamental para evaluar la eficiencia de los biofiltros en los SRA (Timmons & Ebeling., 2013). El análisis de NO_3^-, NO_2^- y NH_3 se realizó utilizando un fotómetro multiparamétrico adecuado para cuantificar estos compuestos en muestras acuosas mediante métodos colorimétricos. En algunos casos se obtuvieron valores que estuvieron fuera del rango cuantificable. Este fenómeno podría explicarse por la saturación en la concentración de estos compuestos nitrogenados en los SRA.

Los resultados obtenidos para los Biofiltros 1 y 2, que revelaron índices de remoción negativos para NH_3 y NO_2^-, sugieren una acumulación de estos compuestos en lugar de su eliminación eficiente, lo que podría atribuirse a varias razones. Timmons et al. (2002) indican que es crucial que un biofiltro alcance un estado estacionario antes de la recolección de datos, ya que un biofiltro inmaduro carece de la estabilidad y actividad metabólica necesaria para una eliminación efectiva de compuestos nitrogenados. En este contexto, la maduración de los biofiltros, que implica el desarrollo de biopelículas bacterianas nitrificantes activas, es fundamental para optimizar la eficiencia de remoción (Lekang, 2013). Para los biofiltros en este estudio, el tiempo de maduración fue de 26 días, lo que podría no haber sido suficiente para que alcanzaran su plena capacidad.

La literatura sugiere que biofiltros en las etapas iniciales de desarrollo suelen mostrar una menor capacidad de procesamiento debido a que las comunidades microbianas nitrificantes aún no están completamente establecidas (Badiola et al., 2012; Michaud et al., 2006). Esto podría explicar los índices de remoción negativos observados en el Biofiltro 1 y, en menor medida, en el Biofiltro 2. Además, la sobrecarga de nutrientes en el sistema podría haber superado la capacidad de las bacterias para metabolizar el amoníaco y nitrito presentes, lo que lleva a su acumulación en el sistema. Según Timmons et al. (2002), la inhibición de la nitrificación también puede ocurrir cuando

hay una acumulación excesiva de compuestos nitrogenados, lo que afecta negativamente el rendimiento del biofiltro.

El Biofiltro 3 mostró resultados consistentes en los que no se detectaron concentraciones de NO_3^- en las tres mediciones realizadas durante las semanas de monitoreo, incluso dentro de los límites de detección establecidos en el rango de nanogramos por microlitro (ng/µl). Ante esto se puede sugerir una falta de actividad de las bacterias nitrificantes, específicamente de bacterias oxidantes de nitrito, que convierten el NO_2^- en NO_3^-. Los procesos de nitrificación requieren la presencia y actividad de bacterias como Nitrosomonas que oxidan amoníaco a nitrito y Nitrobacter que oxidan nitrito a nitrato (Timmons et al., 2010). Si el Biofiltro 3 no desarrolló adecuadamente una comunidad microbiana nitrificante o si estas bacterias no estuvieron activas, es posible que no se haya producido una acumulación detectable de nitrato en el sistema. La falta de detección de nitrato, combinada con los datos de otros biofiltros que sí mostraron actividad nitrificante, resalta la necesidad de investigar más a fondo las condiciones en el Biofiltro 3 y de realizar ajustes para garantizar su funcionalidad en el proceso de remoción de compuestos nitrogenados.

La extracción y purificación de ADN de las muestras de Biopelícula resultaron en concentraciones adecuadas, con una calidad y pureza dentro de los rangos óptimos, como lo indica la relación 260/280 cercana a 1,8 lo que sugiere que no hubo contaminantes que afecten los resultados (Sambrook et al., 2001). Las concentraciones más altas de ADN se obtuvieron en los Biofiltros 1 y 3, con promedios de 557 ng/µl y 536 ng/µl, respectivamente, mientras que el Biofiltro 2 presentó una menor concentración de 271 ng/µl, esto puede estar relacionado con variaciones en la actividad microbiana o la densidad de la biopelícula, ya que la cantidad de ADN recuperado está influenciada por la biomasa presente en cada sistema (Leff et al., 2015). Sin embargo, estas diferencias en la cantidad de ADN no se correlacionaron directamente con el éxito en la amplificación del gen *amoA*. A pesar de las menores concentraciones en el Biofiltro 2, las muestras de este biofiltro

lograron amplificar el gen *amoA* de manera efectiva, lo que sugiere que la cantidad de ADN no fue un factor limitante para la detección de bacterias nitrificantes (Smith et al., 2010).

La optimización de las condiciones de qPCR es crucial para garantizar la eficiencia y reproducibilidad en la amplificación del gen *amoA*. En el estudio, se llevaron a cabo pruebas preliminares variando las concentraciones de ADN genómico entre 5 ng/µl y 50 ng/µl. Esta estrategia se alinea con las recomendaciones de estudios previos que destacan la importancia de ajustar la concentración de ADN para maximizar la sensibilidad y especificidad del qPCR (Bustin et al., 2005). Tras evaluar los resultados obtenidos, se determinó que una concentración final de 20 ng/µl proporcionaba la mejor combinación de reproducibilidad y eficiencia de amplificación.

Los resultados del qPCR y la electroforesis mostraron una clara presencia del gen en las muestras M7 1, M7 2, M5 2, M6 1 y M6 2, con el tamaño de la banda específico y consistente esperado de 491 pb (Rotthauwe et al., 1997). La purificación de las bandas más intensas permitió generar una muestra estándar del gen. Por otro lado, la amplificación del gen *nxrA*, se visualizó en un gel de electroforesis una banda inespecífica de 200 pb y una banda de 300-350 pb aproximadamente, aun así, al observar la curva de melting no mostró el Tm esperado para este gen. La curva de Tm es la relación entre fluorescencia y temperatura, conforme aumenta la temperatura la señal decrece, debido a la desnaturalización de los productos, es la derivada negativa de la curva de desnaturalización del ADN, la Tº de desnaturalización depende de la longitud y secuencia del (contenido de G:C). Esto podría deberse a la baja abundancia de bacterias nitrificantes del tipo *Nitrobacter* o *Nitrospira*.

Para evaluar y validar el método Syber Green utilizado se consideran algunos parámetros, los cuales son la eficiencia de amplificación y la linealidad de la reacción. Para el Método I considerando las primeras 5 diluciones la pendiente fue de -3,195, mientras que en el Método II fue de -3,397. La pendiente óptima en un ensayo de qPCR es -3,32, lo que refleja una duplicación del ADN en cada ciclo. En este sentido,

el Método II mostró una pendiente dentro del rango ideal, lo que indica una reacción eficiente y precisa. Por otro lado, la pendiente menos pronunciada del Método I puede estar relacionado con la presencia de productos inespecíficos.

Al analizar los datos mediante regresión lineal, el coeficiente de determinación es fundamental para evaluar la calidad de la regresión lineal entre el ciclo de cuantificación y el logaritmo del número de copias. En el Método I, el valor de R^2 fue de 0,981, lo que sugiere una relación lineal aceptable, pero con un margen de error mayor que en el Método II, que presentó un R^2 de 0,999. Un R^2 cercano a 1 indica una fuerte correlación lineal entre los datos, lo que significa que el Método II presentó una mejor capacidad para predecir el número de copias a partir de los valores de Cq (Bustin et al., 2009). Es importante preparar cuidadosamente la serie de diluciones estándares para garantizar resultados consistentes y precisos. Al comparar ambos métodos, se puede concluir que el Método II ofrece mejores resultados en términos de eficiencia, precisión y linealidad. Su eficiencia cercana al 100%, el coeficiente de determinación de 0,9993 y una pendiente dentro del rango ideal -3,397, sugieren que este método es más adecuado para la cuantificación precisa del gen *amoA*.

La reproducibilidad del método de la curva estándar de cuantificación, se evaluó a través del coeficiente de varianza, en el cual se muestra el grado de dispersión de los resultados obtenidos de Cq entre las diferentes repeticiones de cada una de las diluciones (Barrera et al., 2016). Con el método empleado las desviaciones estándares para el gen fueron bajas, no se obtuvieron desviaciones mayores a 0,64 lo cual demuestra que la técnica fue reproducible. Sin embargo, la reproducibilidad de la técnica de PCR en tiempo real suele ser afectada por pequeñas alteraciones en las concentraciones de los reactivos y por errores de manipulación (Bahrdt, et al., 2010).

Para evaluar la dinámica de abundancia de las bacterias nitrificantes de amoníaco en los tres Biofiltros, con las muestras de biopelícula obtenidas durante las siete semanas de muestreo se realizó un PCR cuantitativo, las muestras fueron amplificadas por duplicado y evaluadas según el valor de Tm, la temperatura de Melting confirmo la

especificidad de amplificación del gen *amoA* se consideraron los valores de 88,5 ºC. Los resultados mostraron solo amplificaciones para el Biofiltro 1 y 2, específicamente las muestras M4 1, M5 2, M6 1, M7 1, y M7 2 con valores de Cq entre 25,73 y 26,5. Se obtuvieron 5 muestras amplificadas para el Biofiltro 1 y 3 muestras para el Biofiltro 2. Sin embargo, para las muestras M5 2 y M6 1 las réplicas no amplificaron el gen objetivo, obteniendo valores de Cq de 85 y 76ºC respectivamente.

Se realizó un análisis estadístico con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, los resultados tenían una distribución no normal y un tamaño reducido de muestras. En el análisis se obtuvo que el números de copias del gen *amoA* entre el biofiltro 1 y 2 presentan una diferencia significativa con un valor P de 0,035 con un nivel de significancia de ($P < 0,05$). Este resultado sugiere que las condiciones experimentales de los biofiltros pueden haber influido en la cantidad de bacterias nitrificantes presentes.

Un aspecto importante a destacar es que en el biofiltro 3, no se detectó amplificación del gen *amoA* en ninguna de las muestras a lo largo de las 7 semanas de muestreo. Esto podría estar relacionado con múltiples factores, como las condiciones específicas de operación de este biofiltro, la posible falta de desarrollo de la biopelícula, o incluso la ausencia de bacterias nitrificantes activas en las muestras procesadas. Este resultado refuerza la importancia del diseño experimental en estudios de biofiltros y sugiere que factores como el fotoperiodo y las condiciones ambientales pueden tener un impacto significativo en la presencia y abundancia de bacterias nitrificantes.

CONCLUSION

1.- Los resultados sugieren que los Biofiltros 1 y 2 no lograron una remoción eficiente de NH_3 y NO_2^-, lo que podría deberse a la inmadurez de los biofiltros o a una sobrecarga de nutrientes, provocando su acumulación. En el Biofiltro 3 no se detectaron concentraciones de NO_3^- en ninguna de las mediciones, lo que indica una posible falta de bacterias nitrificantes, en particular, bacterias oxidantes de nitrito. El tiempo de maduración parece haber sido insuficiente para el desarrollo completo de las biopelículas bacterianas, comprometiendo la eficiencia de la nitrificación

2.- Se logró establecer un protocolo de amplificación para gen *amoA* en muestras de biopelícula proveniente de biofiltros, utilizando la técnica de qPCR. El protocolo demostró una alta sensibilidad y especificidad en la detección del gen, lo que asegura una amplificación robusta y precisa. La optimización de variables como la concentración de ADN y la validación de la curva estándar garantiza la reproducibilidad del ensayo en diferentes condiciones. La curva estándar generada por el Método II, con diluciones desde 10^8 hasta 10^4 copias/µl, mostró un rango lineal óptimo y una eficiencia cercana al 100%. Se estableció un límite de cuantificación que permite detectar entre $2{,}31 \times 10^4$ y $3{,}37 \times 10^8$ copias del gen *amoA*. Sin embargo, a concentraciones más bajas de ADN, la especificidad de la amplificación podría verse comprometida, afectando la precisión de los resultados.

3.- Los resultados obtenidos indican una variabilidad significativa en la abundancia de bacterias nitrificantes entre los biofiltros, con una mayor abundancia en los Biofiltros 1 y 2, que estuvieron expuestos a fotoperiodos artificiales más prolongados, en comparación con el Biofiltro 3 (12:12), donde no se detectó amplificación del gen amoA en ninguna de las muestras. El análisis estadístico mostró una diferencia significativa en el número de copias del gen amoA entre los Biofiltros 1 y 2 ($P = 0{,}035$), lo que sugiere que las condiciones experimentales, particularmente el régimen de fotoperiodo, influyeron en la abundancia de las bacterias nitrificantes. En el

Biofiltro 1, sometido a un fotoperiodo de 24:0, se observó un aumento progresivo en la abundancia de bacterias nitrificantes desde la semana 4 hasta la semana 7, mientras que en el Biofiltro 2, aunque también se detectaron bacterias nitrificantes, la abundancia fue significativamente menor. La falta de amplificación en el Biofiltro 3 podría estar relacionada con la ausencia de desarrollo de biopelícula o una inhibición en el crecimiento bacteriano.

BIBLIOGRAFIA

Ajani, E. K., Akinwole, A. O., & Ayodele, I. A. (2011). Fundamentals of fish farming in Nigeria. University of Ibadan Press.

Anthonisen A, Loehr R, Prakasam T, Srinath E. 1976. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. J Water Pollut Control Fed.

Badiola M, Mendiola D, Bostockb J. 2012. Recirculating Aquaculture Systems (RAS) analysis: Main issues on management and future challenges. Aquacultural Engineering.

Bahrdt, C., Krech, A. B., Wurz, A., & Wulff, D. (2010). Validation of a newly developed hexaplex real-time PCR assay for screening for presence of GMOs in food, feed and seed. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 396(6), 2103–2112.

Barlow, C. G., Pearce, M. G., Rodgers, L. J., & Clayton, P. (1995). Increased feeding rate, food conversion efficiency, and specific growth rate due to increased activity in fish. Journal of Fish Biology, 47(2), 200-210.

Barrera, G., Murcia, J., Cerón, J., Cuartas, P., Guzmán, C., & Villamizar, L. (2016). PCR en tiempo real: una metodología útil para la detección y cuantificación de granulovirus. Revista Colombiana de Biotecnología, 18(2), 24.

Bock, E., and Wagner, M.J.T.p. (2006). Oxidation of inorganic nitrogen compounds as an energy source. 2, 457-495.

Boeuf, G., & Le Bail, P. Y. (1999). Does light have an influence on fish growth? Aquaculture, 177(1-4), 129-152.

Boyd, C. E., & Massaut, L. (1999). Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture. Aquacultural Engineering, 20(2), 113-132.

Bureau, D., & Cho, C. (1999). Phosphorus utilization by rainbow trout (Oncorhynchus mykiss): Estimation of dissolved phosphorus waste output. Aquaculture, 179(1-4), 127–140.

Bustin, S. A. (2005). Real-time, fluorescence-based quantitative PCR: A snapshot of current procedures and preferences. Expert Review of Molecular Diagnostics, 5(4), 493-498.

Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clinical Chemistry, 55(4).

Dauda, A. B. (2019). Waste production in aquaculture: Sources, components and managements in different culture systems. Aquaculture and Fisheries, 4(1), 13-26.

Ebeling, J. M., & M. B. Timmons. (2012). Recirculating aquaculture systems. In: Tidwell J. Aquaculture production systems. Wiley-Blackwell, Hoboken, pp. 245-277.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2020). The State of World Fisheries and Aquaculture 2020: Sustainability in action. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Francis, C.A., Roberts, K.J., Beman, J.M., Santoro, A.E., and Oakley, B.B.J.P.o.t.N.A.o.S. (2005). Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. 102, 14683-14688.

Godoy M. (2018). Enfermedades en sistemas de recirculación Parte 1: No infecciosas. Salmonexpert.

Heinen J, Hankins J. 1996 .Water quality and waste production in a recirculating trout-culture system with feeding of a higher-energy or a lower-energy diet. Aquaculture Research, 27,699-710.

Henriksson, P. J. G., Belton, B., Murshed-e-Jahan, K., & Rico, A. (2018). Measuring the potential for sustainable intensification of aquaculture in Bangladesh using life cycle assessment. Environmental Science & Policy, 89, 112-124.

Leff, L. G., Dana, J. R., & McArthur, J. V. (2015). The relation between DNA yield and biomass in biofilm samples. Journal of Microbial Methods, 120, 93-96.

Lekang O. 2007. Aquaculture Engineering. Primera edición. Blackwell Publishing.

Lekang O. 2013. Aquaculture Engineering. Segunda edición. Blackwell Publishing.

Losordo, T., Masser, M., and Rakocy, J. (1998). Recirculating aquaculture tank production systems an overview of critical considerations. SRAC 451, 1-5.

Michaud L, Lo Giudice A, Troussellier M, Smedile F, Bruni V, Blancheton JP. 2009. Phylogenetic characterization of the heterotrophic bacterial communities inhabiting a marine recirculating aquaculture system. J Appl Microbiol. 107:1935-1946.

Miller, T. J., & Semmens, B. X. (2002). *Quantifying the influence of oceanographic conditions on fish recruitment*. Fisheries Oceanography**,** 11(2), 88-102.

Moyano F & Cardenete G. 1988. EL AMONIACO EN LOS PECES. ll. ASPECTOS TOXICOS. Ars Pharmaceutica.

Oppedal, F., Taranger, G. L., & Hansen, T. (2003). Growth performance and sexual maturation in diploid and triploid Atlantic salmon (Salmo salar L.) in seawater tanks exposed to continuous light or simulated natural photoperiod. Aquaculture, 215(1-4), 145-162.

Parker R. 2012. Aquaculture Science, Tercera edición. Delmar, Cengage Learning. 446- 456.

Piedrahita, R. H. (2003). Reducing the potential environmental impact of tank aquaculture effluents through intensification and recirculation. Aquaculture, 226(1-4), 35-44.

Piedrahita, R. H., Hargreaves, J. A., & Summerfelt, S. T. (1996). Recirculating aquaculture systems: Design and management. Aquacultural Engineering, 15(4), 263-291.

Rotthauwe, J.-H., Witzel, K.-P., and Liesack, W.J.A.E.M. (1997). The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine- scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. 63, 4704-4712.

Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). Molecular cloning: A laboratory manual (3rd ed., Vol. 1). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA). (2022). Informe anual de pesca y acuicultura 2022. SERNAPESCA.

Shimomura, Y., Morimoto, S., Takada Hoshino, Y., Uchida, Y., Akiyama, H., and Hayatsu, M. (2012). Comparison among amoA primers suited for quantification and diversity analyses of ammonia-oxidizing bacteria in soil. Microbes Environ 27, 94-98.

Simensen, L. M., Jonassen, T. M., Imsland, A. K., & Stefansson, S. O. (2000). Increased feed conversion, specific growth rate, and food intake due to elevated fish activity. Aquaculture Research, 31(3), 175-182.

Smith, C. J., Osborn, A. M., & Harwood, C. R. (2010). DNA extraction methods for microbial community analysis. In *Handbook of molecular microbial ecology I: Metagenomics and complementary approaches* (pp. 59-72). Wiley-Blackwell.

Timmons, M. B., Ebeling, J. M., Wheaton, F. W., Summerfelt, S. T., & Vinci, B. J. (2002). Recirculating aquaculture systems (2nd ed.). Northeast Regional Aquaculture Center.

Timmons M, Ebeling J. 2010. Recirculating Aquaculture. Segunda Edición. Northeastern Regional Aquaculture Center.

Timmons, M. B., & Ebeling, J. M. (2013). Recirculating aquaculture: Aquaculture and fish farming technology (3rd ed.). Wiley-Blackwell.

Timmons, M. B., & Summerfelt, S. T. (1997). Recirculating aquaculture systems. Cayuga Aqua Ventures.

Wertz, S., Poly, F., Le Roux, X., and Degrange, V. (2008). Development and application of a PCR-denaturing gradient gel electrophoresis tool to study the diversity of Nitrobacter-like nxrA sequences in soil. FEMS Microbiology Ecology 63, 261-271.

Wheaton, F.W., Hochheimer, J.N., Kaiser, G.E., Malone, R.F., Krones, M.J., Libey, G.S., and Easters, C.C. (1994). Nitrification filter design methods., Vol 27 (Aquaculture Water Reuse Systems: Engineering Design and Management.: Developments in Aquaculture and Fisheries Sciences.

ANEXO

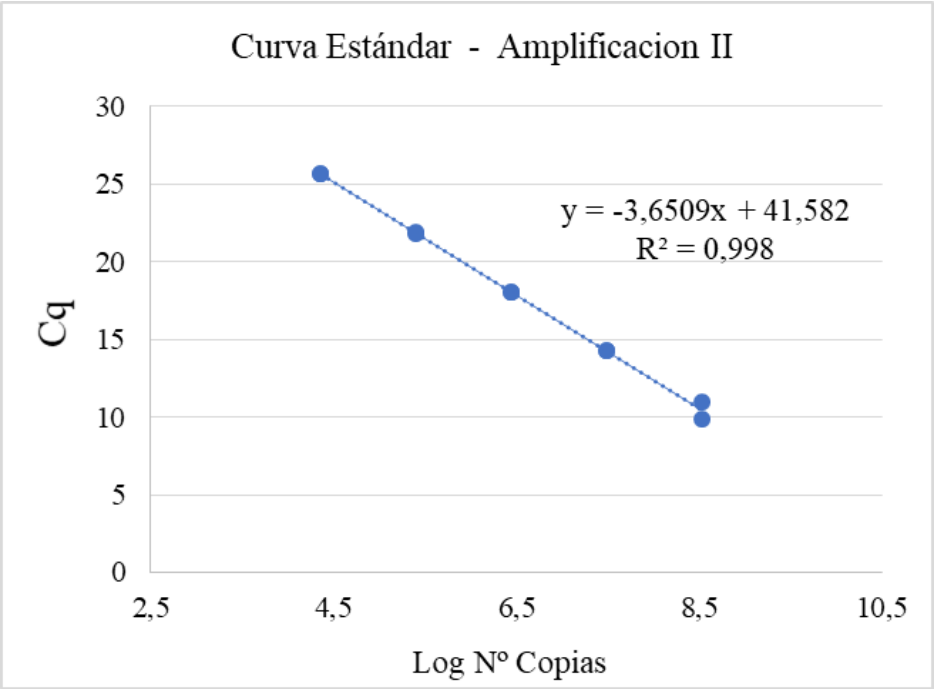

Figura: Figura del logaritmo de la concentración del estándar vs número de ciclos usando 5 diluciones seriadas: $1x10^8$ – $1x10^4$. Pendiente = -3,6509, R^2 = 0,998. Eficiencia = 88 %.