



Universidad de Concepción  
Facultad Farmacia

**DETECCIÓN DE SISTEMA QUORUM SENSING TIPO 1  
EN COMUNIDAD BACTERIANA NITRIFICANTE AISLADA  
DE BIOFILTRO DE SISTEMA DE RECIRCULACION  
ACUICOLA DE SALMÓNIDOS**

**POR DANIELA ANTONIA SEPULVEDA AVILA**

Tesis presentada en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción  
para optar al título profesional de Bioquímico

**Profesor Guía**

Homero Enrique Urrutia Briones  
Dpto. de Microbiología  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

**Profesor Patrocinante**

Homero Enrique Urrutia Briones  
Dpto. de Microbiología  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Marzo, 2021

Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.



Tesis realizada en el Centro de Biotecnología de la Universidad de Concepción.

Profesores integrantes de la comisión evaluadora

---

Dr. Homero Urrutia Briones

Profesor Guía y Patrocinante  
Departamento de microbiología  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción,  
Concepción, Chile.



---

Dr. Manuel Alarcón Viveros

Instituto de Acuicultura  
Universidad Austral de Chile  
Puerto Montt, Chile

---

Dra. Nathaly Ruiz-Tagle Moena

Centro de Biotecnología  
Universidad de Concepción,  
Concepción, Chile.

## **AGRADECIMIENTOS**

Este estudio contó con el financiamiento de la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT) FONDEF IDeA I + D

ID18I10192 y FONDEF IT 18I0108



## TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	iv
TABLA DE CONTENIDOS.....	v
INDICE DE TABLAS.....	viii
INDICE DE ILUSTRACION.....	ix
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT .....	xiii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Acuicultura y Sistemas de Recirculación Acuícola (RAS).....	1
1.2. Bacterias Nitrificantes en RAS .....	4
1.3. Biofiltración nitrificante en RAS .....	8
1.4. Formación de biopelículas nitrificantes en biofiltro-RAS .....	11
1.5. Señalización intercelular en bacterias nitrificantes .....	13
2. HIPÓTESIS .....	19
3. OBJETIVOS .....	20
3.1. Objetivo general.....	20
3.2. Objetivos específicos .....	20
4. MATERIALES Y METODOS.....	21
4.1. Comunidad bacteriana, cepas biosensores y condiciones de cultivo ...	21
4.1.1. Comunidad bacteriana nitrificante .....	21
4.1.2. Cepas biosensores de sistema quorum sensing con capacidad de detección de AHLs.....	22
4.1.3. Biosensor quorum quenching (QQ) .....	22
4.2. Cultivo bacteriano en sistema de reactores discontinuos ( <i>Batch</i> ).....	23
4.2.1. Procesamiento de la muestra .....	23
4.2.2. Cultivo bacteriano planctónico en sistema de reactores discontinuos ( <i>batch</i> )	24

4.2.3.	Formación de biopelículas en soportes de polietileno en reactores discontinuos ( <i>batch</i> ).....	24
4.2.4.	Medición concentraciones de (N-NH <sub>4</sub> ), (N-NO <sub>2</sub> ) y (N-NO <sub>3</sub> ) y crecimiento bacteriano.....	24
4.2.5.	Microscopia láser confocal (CLSM) .....	26
4.3.	Detección y caracterización de la comunidad microbiana nitrificante mediante PCR-DGGE-Secuenciación masiva (principales grupos bacterianos en cultivos nitrificantes) .....	27
4.3.1.	Extracción de ácidos nucleicos.....	27
4.3.2.	Detección de genes nitrificantes mediante PCR .....	27
4.3.3.	Ensayo PCR-DGGE .....	29
4.3.4.	Secuenciación de bandas en DGGE. ....	30
4.3.5.	Análisis de secuencias .....	31
4.3.6.	Comparación genómica de comunidades bacterianas nitrificantes.....	31
4.3.7.	Evaluación de calidad de lecturas y Pre- proceso.....	32
4.3.8.	Denosing y detección de quimeras .....	32
4.3.9.	Generación de OTUs y Asignación taxonómica.....	32
4.4.	Ensayos de detección de sistema QS.....	33
4.4.1.	Detección de autoinductores de tipo AHLs mediante reporteros fluorescentes .....	33
4.4.2.	Detección de moléculas de tipo AHLs en cultivo nitrificante utilizando reportero <i>Pseudomonas putida</i> EL106 (RPL4cep).....	34
4.4.3.	Obtención de extractos totales desde biopelículas nitrificantes .....	35
4.4.4.	Análisis estadísticos .....	36
4.4.5.	Detección de efecto QQ en extractos de bacterias nitrificantes en la cepa reportera <i>C. violaceum</i> ATCC 12472.....	36
4.4.6.	Cuantificación del % de inhibición de violaceína en cepa reportera <i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472 .....	37
5.	RESULTADOS .....	38
5.1.	Cultivo bacteriano nitrificante en sistema de reactores discontinuos ( <i>Batch</i> ) .....	38
5.1.1.	Cultivo planctónico y de biopelículas nitrificantes en sistema de reactores discontinuos ( <i>batch</i> ) .....	39

5.1.2. Microscopía epifluorescencia de muestra biofiltro-RAS, cultivo planctónico y microscopía láser confocal (CLSM) de biopelícula nitrificante .....	42
5.2. Caracterización de principales grupos bacterianos en cultivos nitrificantes .....	44
5.2.1. Detección mediante PCR convencional de genes asociados a nitrificación bacteriana .....	45
5.2.2. Caracterización molecular mediante PCR-DGGE de comunidad bacteriana nitrificante .....	46
5.2.3. Comparación de comunidades bacterianas nitrificantes mediante secuenciación masiva .....	49
5.3. Detección de sistema QS en comunidad bacteriana nitrificante .....	53
5.3.1. Detección de autoinductores de tipo AHLs mediante reporteros fluorescentes .....	53
5.3.2. Detección de moléculas de tipo AHLs en cultivo nitrificante utilizando reportero <i>P. putida</i> EL106 (RPL4cep) .....	55
5.3.3. Efecto QQ de extractos bacterianos nitrificantes frente a reportero <i>C. violaceum</i> ATCC 12472 .....	56
5.3.4. Cuantificación del % de inhibición de violaceína en reportero <i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472 .....	59
6. DISCUSION.....	61
7. CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES .....	68
8. GLOSARIO.....	70
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

## INDICE DE TABLAS

Tabla 4-1. Partidores utilizados en este estudio para la amplificación de genes <i>amoA</i> y <i>nxrA</i> .....	28
Tabla 4-2. Partidores utilizados en ensayo PCR- DGGE comunidad bacteriana nitrificante .....	30
Tabla 5-3. Muestras de biofiltro- RAS obtenidas desde Sealand Aquaculture S.A .....	38
Tabla 5-4. Recuento viabilidad bacteriana muestras de biofiltro- RAS obtenidas desde soportes K1 Sealand Aquaculture S.A. ....	39
Tabla 5-5. Parámetros cinéticos obtenidos de curvas de crecimiento de cultivo de biopelículas nitrificantes.....	42
Tabla 5-6. Concentración y pureza de ADN obtenida utilizando NanoQuantPlate™ del equipo Tecan F200 infinite pro en muestras de ADN obtenido directo desde muestras de biofiltro RAS y de cultivos en reactores <i>batch</i> planctónicos y de biopelículas nitrificantes a escala de laboratorio .....	45

## INDICE DE ILUSTRACION

Ilustración 1-1. Procesos unitarios comunes utilizados en los sistemas de producción de acuicultura que incluyen recirculación. Adaptado de Losordo y colaboradores (1998).....4

Ilustración 1-2 Diagrama esquemático de un biofiltro nitrificante de un prototipo de sistema de recirculación acuícola. En un RAS, el agua fluye desde un tanque de peces a través del proceso de tratamiento y luego se devuelve al tanque. La mayoría de los biofiltros RAS utilizan soportes que permiten la formación de biopelículas a partir de diferentes comunidades bacterianas, siendo responsables de muchos ciclos biogeoquímicos en los ecosistemas acuáticos, especialmente en el ciclo del nitrógeno. En los soportes, se identifican las diferentes comunidades bacterianas que participan en el ciclo del nitrógeno. Las reacciones químicas no están equilibradas (Ruiz et al., 2020).....8

Ilustración 1-3. Esquematización de un agregado de nitrificación. (A) Agregado formado por bacterias oxidantes de amoníaco (BOA) y agrupaciones de células de oxidación de nitrito (BON) en biopelículas (B) interacciones que ocurren entre grupos. EPS, sustancias poliméricas extracelulares; QS, detección de quórum. EPS (Exopolisacáridos); QS quorum sensing. (Daims et al., 2016) ..... 13

Ilustración 1-4. Representación esquemática del sistema QS dependiente de la acil-homoserina lactona (AHL) como se ejemplifica por el sistema *LuxI / LuxR* para *Vibrio fisheri*. Algunas bacterias pueden modificar su comportamiento de manera coordinada, utilizando un método de comunicación de célula a célula que afecta la expresión génica y fisiológica. El sistema QS funciona de la siguiente manera: el gen *luxI* codifica una proteína sintasa que cataliza la síntesis de AHL (círculos naranjas) posteriormente LuxR al unirse a AHL una secuencia corta denominada caja lux y activa la transcripción del operón lux CDABEG aguas abajo, que contiene el gen *luxI* que codifica la AHL sintasa. La concentración de moléculas de AHL aumenta a medida que la población de bacterias crece. Muchas bacterias, incluidas las especies nitrificantes, desnitrificantes y heterotróficas, coordinan sus actividades metabólicas con respecto a los cambios en la densidad celular a través del sistema de señalización QS (Li and Nair, 2012; Ruiz et al., 2020). ..... 15

Ilustración 5-5. Curvas de crecimiento y cinéticas de consumo/producción de  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$  en comunidad bacteriana nitrificante cultivada en reactores discontinuos (*batch*) en medio AMS (A) Curva de crecimiento de cultivo

planctónico obtenida por recuento de bacterias mediante microscopia de epifluorescencia con tinción Bac Light. (•) células vivas  $\text{ml}^{-1}$ . (B) Concentraciones de  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$  en  $\text{mg/L}$  versus tiempo en días en cultivo planctónico. (●) consumo de  $\text{NH}_4^+$  (eje derecho), (■) producción de  $\text{NO}_2^-$  (eje izquierdo) y (▲) producción de  $\text{NO}_3^-$  (eje izquierdo). (C) Curva de crecimiento de biopelículas nitrificantes en soportes de polietileno obtenida por microscopia de epifluorescencia con tinción Bac light. (•) log (células vivas  $/\text{mm}^2$ ). (D) Concentraciones de  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$  en  $\text{mg/L}$  versus tiempo en días en biopelículas nitrificantes en soportes de polietileno. (●) consumo de  $\text{NH}_4^+$  (eje derecho), (■) producción de  $\text{NO}_2^-$  (eje izquierdo) y (▲) producción de  $\text{NO}_3^-$  (eje izquierdo).....41

Ilustración 5-6. Microscopia de epifluorescencia de comunidad bacteriana. Tinción LIVE/DEAD® (BacLight™). Células vivas color verde y células muertas color rojo Aumento 1000x. (A) comunidad bacteriana biofiltro-1. (B) Cultivo planctónico 10 días (C) Cultivo planctónico 30 días. Flecha blanca indica formación de floculo de nitrificación .....43

Ilustración 5-7. Micrografía obtenida utilizando microscopio láser confocal espectral dos fotones (aumento 40x) de biopelícula nitrificante soportada en polietileno después de 60 días de incubación en medio AMS. Tinción vivas y muertas, Células vivas color verde y células muertas color rojo.....44

Ilustración 5-8. Detección mediante PCR de genes involucrados en nitrificación en muestras de biofiltro, cultivo planctónico y biopelículas nitrificantes. Control positivo (gen *amoA*) *Nitrosomonas europaea*, control negativo *Pseudomonas putida*, (-) Blanco, B-RAS (Biofiltro-RAS), P-AMS (cultivo planctónico de 30 días), B-AMS (biopelícula 0 días), B-AMS (biopelícula 30 días), B-AMS (biopelícula 60 días), Ladder 100pb. A) Amplificación gen *amoA* fragmento de 491pb B) Amplificación gen *nxrA* de 322pb.....46

Ilustración 5-9. Perfiles del gen 16S rRNA en gel poliacrilamida (DGGE) -tinción nitrato de plata. Bandas marcadas (flecha roja) fueron cortadas y secuenciadas (Macrogen, inc). Carril 1. B-RAS (muestra directa), carril 2. P-AMS (30 días), carril 3. B-AMS (0 días), carril 4. B-AMS (30 días), carril 5. B-AMS (60 días). .....47

Ilustración 5-10. Diagrama de Venn representando el número de OTUs únicos y coincidente de cada muestra. (B-RAS) Muestra directa biofiltro RAS. (B-AMS) cultivo biopelícula nitrificante en sistema discontinuo (*batch*).....51

Ilustración 5-11 Heat Map en base a la abundancia relativa de los 30 OTUs más abundantes del total. La escala de abundancia relativa va de 0 (blanco) a 16,21

(rojo) (máximo individual - *Acidovorax*). B-RAS corresponde a muestra directa biofiltro RAS y B-AMS cultivo biopelícula nitrificante en sistema discontinuo (*batch*). .....52

Ilustración 5-12. Detección de AHL-C8 mediante 3 reporteros de AHLs de amplio espectro. PP-22= *Pseudomonas putida* EL105 (RPL4las), PP-23= *Pseudomonas putida* EL106 (RPL4cep) y EC-13=*Escherichia coli* MT102 (pKR – C12). AHL-C8 (150 uM), control= DMSO (solvente de AHL-C8) (Barra de error: desviación estándar, ANOVA  $P \leq 0,01$ ,  $n=3$ ). .....54

Ilustración 5-13. Detección de AHLs en comunidad nitrificante mediante reportero *P. putida* EL106 (RPL4cep). Tratamiento reportero en co-cultivo con comunidad nitrificante en medio de cultivo 50% LB y 50% AMS (color rojo), control negativo reportero en co- cultivo con comunidad nitrificante en medio 100% LB (color verde), control negativo reportero en co-cultivo con comunidad nitrificante en medio 100% AMS (color azul) y control positivo reportero en co-cultivo con comunidad nitrificante en medio de cultivo 50% LB y 50% AMS con adición exógena de 250 nM de AHL-C8 (color plomo). LB (caldo Luria bertuani), AMS (medio amonio). Barra de error: desviación estándar. ANOVA  $P \leq 0,01$ ,  $n=3$ ) 56

Ilustración 5-14. Detección de inhibición de sistema QS mediante cepa reportera *C. violaceum* 12472. T1: extracto obtenido a los 12 días de incubación de la biopelícula nitrificante, T2: extracto obtenido a los 24 días de incubación de la biopelícula nitrificante, T3: extracto obtenido a los 36 días de incubación de la biopelícula nitrificante, T4: extracto obtenido a los 48 días de incubación de la biopelícula nitrificante, T5: extracto obtenido a los 60 días de incubación de la biopelícula nitrificante, control negativo (control -): acetato de etilo(Ethyl acetate, grado HPLC, Merck), control positivo (control +) : vainillina 70 ( $\mu\text{g/ml}$ ) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).....59

Ilustración 5-15. Inhibición de violaceína mediante cepa reportera *C. violaceum* ATCC 12472. (A) Ensayo actividad biosensora en placa de agar de *C. violaceum* ATCC 12472 frente a extracto T4: a los 48 días de incubación de la biopelícula nitrificante control negativo (control -): acetato de etilo (Ethyl acetate, grado HPLC, Merck), control positivo (control +): vainillina 250 ( $\mu\text{g/ml}$ ) .....60

## RESUMEN

La acuicultura requiere prácticas ambientalmente sustentables, como el uso de sistemas de recirculación acuícola (RAS), cuya etapa fundamental es el biofiltro nitrificante. Esta etapa es de difícil manejo debido a las complejas interacciones de las comunidades microbianas asentadas en el biofiltro, lo que lleva a un largo periodo de aclimatación para que se desarrolle un proceso eficiente de nitrificación. Existen reportes de que bacterias nitrificantes presentan sistema de comunicación quorum sensing (QS) tipo 1 y sobre un posible uso de este para optimizar biofiltros, siendo necesarios mayores estudios. En esta tesis se formó y enriqueció biopelícula de comunidad bacteriana nitrificante proveniente de biofiltro, la que alcanzo una tasa de oxidación de amonio de  $9.246 \pm 0.238$  mg/L ( $R^2$ : 0,98) y se determinó que la composición microbiana de la comunidad está formada por tres filos principales. *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, y *Nitrospirae*. La comparación genómica mostró que la comunidad bacteriana nitrificante proveniente de biofiltro fue reemplazada en un 75,5% de la abundancia relativa después de 60 días en medio enriquecido de sales de amonio (AMS). Finalmente, se detectó la presencia de sistema QS tipo I en la comunidad nitrificante y quorum quenching (QQ), en extractos totales de biopelícula nitrificante. Estos resultados indican que procesos QS y QQ podrían estar regulando la actividad de comunidades bacterianas nitrificantes en RAS industriales de agua dulce y establecen una base para su potencial optimización.

## ABSTRACT

Aquaculture requires environmentally sustainable practices, such as the use of recirculating aquaculture systems (RAS), whose fundamental stage is the nitrifying biofilter. This stage is difficult to manage due to the complex interactions of the microbial communities settled at the biofilter, which leads to a long period of acclimatization for an efficient nitrification process to develop. Currently there are reports that nitrifying bacteria present a type 1 quorum sensing (QS) communication system, regarding this a possible use of QS to optimize biofilters requires further studies. In this thesis, biofilms of nitrifying bacterial community from biofilter were formed and enriched, which reached an ammonium oxidation rate of  $9.246 \pm 0.238$  mg / L ( $R^2$ : 0.98) and it was determined that the microbial composition of the community is formed by three main edges. *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, and *Nitrospirae*. Genomic comparison showed that the original nitrifying bacterial community was replaced in 75.5% of the relative abundance after 60 days in ammonium salt enriched medium (AMS). Finally, the presence of type I QS system in the nitrifying community and quorum quenching (QQ) was detected in total nitrifying biofilm extracts. These results indicate that QS and QQ processes could be regulating the activity of nitrifying bacterial communities in freshwater industrial RAS and establish a basis for their potential optimization

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Acuicultura y Sistemas de Recirculación Acuícola (RAS)

La acuicultura es el cultivo de animales acuáticos y es responsable del suministro de pescado para consumo humano, representando un 47% del total de la producción pesquera mundial (171 millones de toneladas en año 2016) (Pulvenis, 2020). Actualmente hay una demanda mundial de peces en rápida expansión y una pesca de captura estable por lo que la producción de acuicultura debe incrementarse (Ahmed y Thompson, 2019). Chile es uno de los principales países exportadores acuícolas de América Latina y el Caribe, siendo el séptimo exportador de pescados en el mundo con 1,4 millones de toneladas en el año 2016. Actualmente lidera en mercados globales específicos como la producción de salmónidos, siendo el segundo mayor exportador mundial con una producción de más de 700 mil toneladas y un valor de exportación de alrededor de 4 mil millones de USD en el año 2016, proyectando un crecimiento en exportación pesquera del 56% para el año 2030 (Pulvenis, 2020).

Para satisfacer la demanda de alimentos de una población mundial en crecimiento, muchas industrias acuícolas han adoptado un sistema de producción intensiva donde los peces se mantienen a una densidad de población alta, con alto aporte de alimentos y el agua debe reponerse a una velocidad alta

para mantener los niveles de oxígeno y eliminar los desechos (Badiola *et al.*, 2012). Los sistemas de acuicultura son responsables del aumento de materia orgánica del agua debido a los desechos de peces y los insumos de alimentos no consumidos. Los elementos que más preocupan son los productos a base de nitrógeno y fósforo que pueden promover el crecimiento de algas y afectar la disponibilidad de agua de alta calidad (Kawasaki, 2016; Verdegem, 2013; Zohar *et al.*, 2005). De hecho, se han planteado serias preocupaciones ambientales y ecológicas asociadas con la producción acuícola, incluida la contaminación del agua, el aumento de la salinidad y la destrucción de los manglares (Arvanitoyannis y Kassaveti, 2008; Guimarães *et al.*, 2009; Proisy *et al.*, 2018; Turcios y Papenbrock, 2014). Por lo tanto, se necesitan urgentemente prácticas sostenibles en los sistemas de acuicultura. Una de las estrategias utilizadas para contrarrestar las limitaciones antes mencionadas y potenciar la intensificación de los cultivos, son el uso de Sistemas de Recirculación Acuícola (RAS). El agua se recicla recirculando a través de biofiltros para eliminar los desechos y alimentos de los peces, y luego, se devuelve a los tanques, es decir, se reutiliza entre el 90-99% del agua (Badiola *et al.*, 2012; Nazar *et al.*, 2013; Rosenthal, 1986; Verdegem *et al.*, 2006). Al controlar los desechos de pescado, el alimentos no consumido, el proceso de nitrificación y la reducción de la toxicidad del amoníaco, los RAS permiten la producción intensiva de peces de calidad, lo que incluye la proximidad a grandes mercados, minimiza las huellas de agua y las preocupaciones medioambientales (Ebeling y Timmons, 2012; Martins *et al.*,

2010; Schneider, 2010). Existen innumerables diseños para RAS y la mayoría funcionará eficazmente si cumplen: 1) aireación, 2) remoción de partículas, 3) filtración biológica para eliminar los residuos de amonio y nitrito, y 4) tamponamiento del pH (McGee y Cichra, 2000) (Ilustración 1-1). Una de las características prominentes de cualquier RAS, es el biofiltro nitrificante, donde se utiliza una conversión microbiana para transformar el amonio a nitrato, compuesto menos tóxico (Crab *et al.*, 2007), que luego se retira por intercambio de agua (Gutierrez-Wing y Malone, 2006; Martins *et al.*, 2010). Sin embargo, la principal desventaja del RAS es el deterioro de la calidad del agua, si el proceso de tratamiento dentro del sistema no se controla adecuadamente (Molleda *et al.*, 2008).



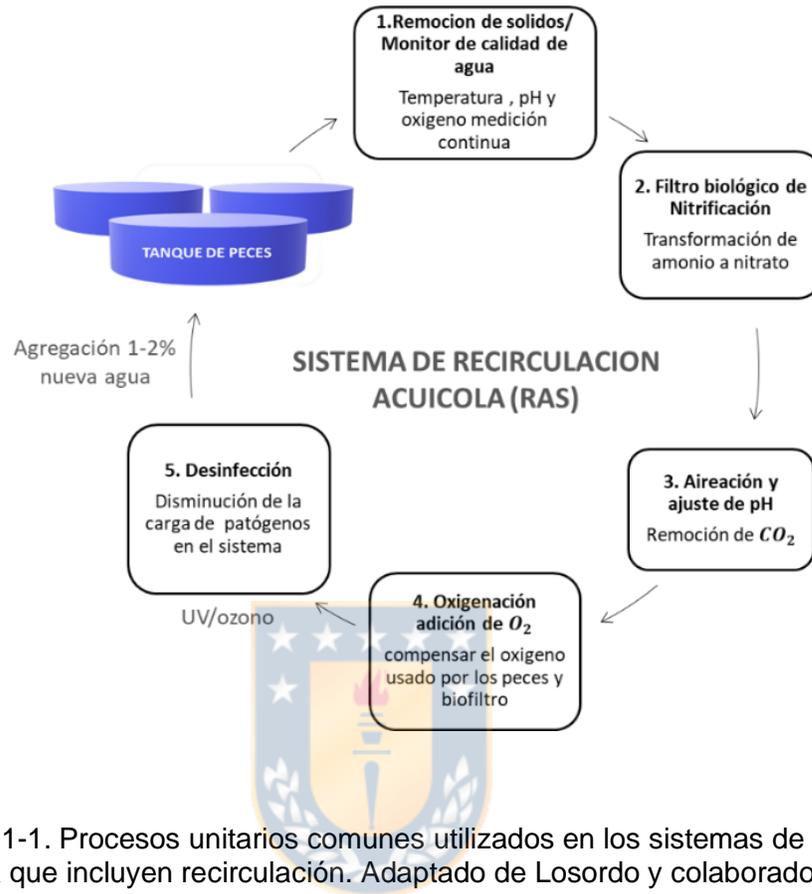


Ilustración 1-1. Procesos unitarios comunes utilizados en los sistemas de producción de acuicultura que incluyen recirculación. Adaptado de Losordo y colaboradores (1998).

## 1.2. Bacterias Nitrificantes en RAS

Los peces generan productos de desecho con alto contenido de nitrógeno como resultado de su nutrición y alimento no consumido. Estos productos son tóxicos para los animales criados en cautividad y son estresores ambientales que causan una disminución del apetito, reducen las tasas de crecimiento y la muerte a altas concentraciones (Kroupova *et al.*, 2005; Mommsen y Walsh, 1992; Nazar *et al.*, 2013). Por lo tanto, la filtración biológica efectiva de estos productos es crítica

para la producción de peces en RAS. El proceso por el cual los compuestos nitrogenados se eliminan aeróbicamente mediante un filtro biológico o biofiltro se llama nitrificación aeróbica. Este es un proceso de dos pasos, donde el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) se oxida primero a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y luego el nitrito se oxida a nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) (Ilustración 1-2) (Ebeling y Timmons, 2012), el cual, es realizado principalmente por dos consorcios bacterianos diferentes, que son microorganismos quimiolitótrofos aerobios interdependientes. Estos grupos de bacterias filogenéticamente distintos, conocidos como oxidantes de amonio (BOA) y oxidantes de nitrito (BON), realizan colectivamente la nitrificación y controlan los niveles de amoníaco en el RAS (Beman *et al.*, 2010).

Las bacterias oxidantes de amonio (BOA) se caracterizan por ser bacterias Gramnegativas, con paredes celulares multicapa y movilidad por medio de flagelos. Comprenden dos grupos filogenéticamente distintos (Head *et al.*, 1993; Teske *et al.*, 1994). El primer grupo se encuentra dentro de la subclase  $\gamma$  de las Proteobacterias y contempla el género *Nitrosococcus*: *Nitrosococcus oceani* y *halophilus* (Koops *et al.*, 1991). El segundo grupo se encuentra dentro de la subclase  $\beta$  de las Proteobacterias y contempla los géneros *Nitrosospira* y *Nitrosomonas*. Los miembros de los tres géneros del grupo de *Nitrosospira* están estrechamente relacionados entre sí (Head *et al.*, 1993; Woese *et al.*, 1984), mientras que el grupo *Nitrosomonas* revela al menos cinco linajes de descendencia distintos (Pommerening-Röser *et al.*, 1996). Se describen 14 especies: *Nitrosospira briensis*, *Nitrosovibrio tenuis*, *Nitrosolobus multiformis*,

*Nitrosomonas* species: *N. europaea*, *N. eutropha*, *N. halophila*, *N. ureae*, *N. oligotropha*, *N. marina*, *N. aestuarii*, *N. communis*, *N. nitrosa*, *N. cryotolerans* y *N. mobilis* (Jones *et al.*, 1988; Koops *et al.*, 1991). En estas, la oxidación de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) es iniciada por la enzima amonio monooxigenasa (AMO), esto lo realizan codificando el gen *amoA*, correspondiente a la subunidad  $\alpha$  de la enzima AMO, que es responsable de catalizar la oxidación de  $\text{NH}_4^+$  hasta hidroxilamina ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ), paso limitante de la velocidad de nitrificación. De hecho, la codificación de la subunidad de *amoA*, se ha utilizado como un marcador funcional para el seguimiento de oxidantes de amonio en muestras ambientales (Francis *et al.*, 2005; Rotthauwe *et al.*, 1997). Los sustratos de la AMO son el  $\text{NH}_4^+$ , el  $\text{O}_2$ , y 2 electrones. El  $\text{O}_2$  es reducido a  $\text{H}_2\text{O}$  por una parte y por otra es incorporado a la  $\text{NH}_2\text{OH}$ . Este último intermediario es oxidado hasta  $\text{NO}_2^-$  por la enzima hidroxilamina reductasa HAO (codificado por los genes *haoAB*) (Sedlacek *et al.*, 2016). Dos de los cuatro electrones derivados, son requeridos para la actividad de la AMO y los otros dos son para generación de energía.

Las bacterias oxidantes de nitrito (BON) se dividen en cuatro grupos filogenéticamente distintos. El grupo principal, que pertenece a la subclase  $\alpha$  de las Proteobacterias, está representado por un solo género, *Nitrobacter*. Dentro de este género se han descrito cuatro especies, *Nitrobacter winogradskyi*, *Nitrobacter hamburgensis*, *Nitrobacter vulgaris* y *Nitrobacter alkalicus* (Bock y Koops, 1992; Sorokin *et al.*, 1998). El segundo grupo *Nitrococcus mobilis* de la subclase  $\gamma$  de las proteobacterias, tercer grupo *Nitrospina gracilis* de la subclase

de las proteobacterias (Watson y Waterbury, 1971) y el cuarto grupo contiene las dos especies del género *Nitrospira*, *Nitrospira marina* y *Nitrospira moscoviensis* (Ehrich *et al.*, 1995; Watson *et al.*, 1986). La oxidación de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) es iniciada por la enzima nitrito oxidoreductasa (NXR), que se halla asociada a la membrana en todos los oxidadores de  $\text{NO}_2^-$ . Durante la oxidación de  $\text{NO}_2^-$  que esta enzima cataliza, el oxígeno adicional del  $\text{NO}_3^-$  es obtenido del  $\text{H}_2\text{O}$ , liberando 2 electrones para generación de energía (Bock y Wagner, 2006) (Ilustración 1-2).



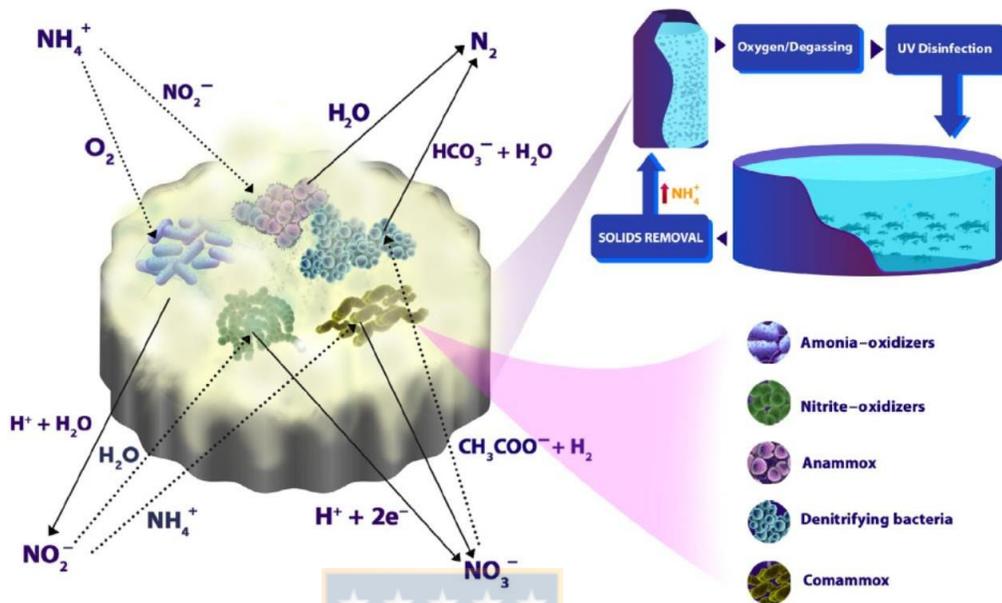


Ilustración 1-2 Diagrama esquemático de un biofiltro nitrificante de un prototipo de sistema de recirculación acuícola. En un RAS, el agua fluye desde un tanque de peces a través del proceso de tratamiento y luego se devuelve al tanque. La mayoría de los biofiltros RAS utilizan soportes que permiten la formación de biopelículas a partir de diferentes comunidades bacterianas, siendo responsables de muchos ciclos biogeoquímicos en los ecosistemas acuáticos, especialmente en el ciclo del nitrógeno. En los soportes, se identifican las diferentes comunidades bacterianas que participan en el ciclo del nitrógeno. Las reacciones químicas no están equilibradas (Ruiz *et al.*, 2020).

### 1.3. Biofiltración nitrificante en RAS

Los biofiltros nitrificantes, son compartimentos físicos que se distribuyen en diferentes partes en un RAS e incluyen un medio o sistema para la unión y crecimiento microbiano (Martins *et al.*, 2010; Molleda *et al.*, 2008; Suhr y Pedersen, 2010). El cultivo y mantenimiento de bacterias nitrificantes tiene un

papel importante en la operación de recirculación de sistemas de acuicultura (RAS) para la producción de especies acuáticas (Malone, 2013).

El manejo de los filtros biológicos comienza con el proceso de aclimatación, donde debe ocurrir la inoculación con las bacterias nitrificantes adecuadas. La biomasa bacteriana y el metabolismo deben elevarse a los niveles requeridos para la eliminación del Nitrógeno Amoniacal Total (NAT) ( $\text{N-NH}_3$  y  $\text{N-NH}_4^+$ ), especie altamente tóxica producido como desechos por los peces, el cual debe ser removido del sistema a una tasa igual a la que es producido para mantener niveles seguros para el crecimiento de los peces (Losordo *et al.*, 1998; Wheaton *et al.*, 1994). Los sedimentos de estanques o los suelos no contaminados pueden servir como fuentes naturales de las bacterias deseadas (DeLong y Losordo, 2012). El uso de agua o medios activos desde un sistema operativo podrá acelerar este proceso. Las bacterias en el interior del biofiltro pueden ser cultivadas en suspensión o en forma fija. Esta última se caracteriza por la adherencia bacteriana a un sustrato físico (una grava, arena o soportes poliméricos) con el fin de formar una biopelícula bacteriana estable y viable (Emparanza, 2009; Malone, 2013). Alternativamente, almacenar el sistema con bajas densidades de peces pequeños y proporcionar niveles reducidos de alimento producirá una concentración limitada de amoníaco que establecerá el filtro lentamente sin dañar al pez (Van Gorder, 2000). Una vez que el filtro alcanza la aclimatación total, se puede agregar el resto de los peces y aumentar los niveles de alimentación (Van Gorder, 2000). Sin embargo, este proceso toma un

largo tiempo (4-8 semanas) para establecer una capacidad estable de nitrificación y de una población de nitrificadores en el biofiltro (Emparanza, 2009; Kumar *et al.*, 2013; Malone y Pfeiffer, 2006). Las alteraciones en la concentración de NAT en el sistema generan una situación de estrés para las bacterias nitrificantes que resulta en una fuerte situación de estrés para los peces en cultivo, debido al aumento en la concentración de nitrito, causada por la insuficiente eficacia de los biofiltros (Svobodova *et al.*, 2005). Los altos niveles de amoníaco, o más comúnmente de nitritos, socavan los objetivos de producción comercial, ya que los impactos tóxicos se manifiestan a través de un crecimiento deficiente o enfermedades crónicas en los peces de cultivo (Cheng *et al.*, 2004; Malone y Pfeiffer, 2006; Manthe *et al.*, 1985; Svobodova *et al.*, 2005). Existen otros factores fisicoquímicos que afectan la supervivencia de los peces, como el oxígeno disuelto, la temperatura, la salinidad y el pH, que se pueden controlar fácilmente, mientras que el proceso de biofiltración es de difícil manejo debido a su largo periodo de aclimatación y su rendimiento basado fundamentalmente en las interacciones de las comunidades microbianas en entornos dinámicos (Ruan *et al.*, 2015). Siendo una etapa limitante y una problemática en la operación del RAS. (Brailo *et al.*, 2019).

#### 1.4. Formación de biopelículas nitrificantes en biofiltro-RAS

Las biopelículas pueden comprender una única especie microbiana o múltiples especies microbianas (Tilahun *et al.*, 2016). La formación de biopelículas es un proceso mediante el cual los microorganismos se adaptan a un estilo de vida agregado en una superficie para formar microcolonias que conducen a la producción y secreción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) (Meyerreil, 1994; Tilahun *et al.*, 2016). En el ambiente, este proceso es más complejo, donde ocurre dispersión y asentamiento de nuevas especies generando biopelículas diversas (Decho, 1990). El desarrollo de biopelículas a partir de células libres implica cambios profundos en muchos procesos reguladores que resultan en cambios fenotípicos en el comportamiento (Dickschat, 2010; Roder *et al.*, 2016). Dentro de estas comunidades se integran las actividades metabólicas y secuencias de desarrollo, no muy diferente a los detectados en organismos multicelulares. Sin embargo, las interacciones en estos agregados pueden ser más complejas (Stoodley *et al.*, 2002). Las estrechas interacciones de las bacterias oxidantes de amoníaco y nitrito se reflejan en una simbiosis mutualista en la que existe cooperación metabólica, también, conocida como sintrofia entre ambos grupos bacterianos. Las BON dependen del nitrito producido por los oxidantes de amoniaco y BOA se benefician de la disminución de nitritos generada por el consumo de este por BON, siendo el exceso de nitrito inhibidor del crecimiento de BOA (Stein y Arp,

1998). La cercanía espacial de los nitrificadores, que a menudo se observa en flóculos de lodo activado en reactores nitrificantes es conocido como formación de "agregados de nitrificación" (Pommerening-Röser y Koops, 2005), se ha observado que las condiciones oligotróficas parecen estimular la excreción de sustancias exopoliméricas y favorecer la formación de flóculos o biopelículas. El resultado de la reducción de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) a óxido nítrico (NO), es capaz de desencadenar la formación de biopelículas en *N. europaea* (Schmidt *et al.*, 2004), BON que libera NO podría reclutar células BOA para formar agregados de nitrificación (Arp y Bottomley, 2006). Por lo tanto, el NO liberado en los agregados de nitrificación podría modular el modo de crecimiento y el metabolismo de ambos simbioses a favor de la interacción mutualista (Ilustración 1-3). Recientemente, se encontró que la interacción (comunicación) entre bacterias conocida como quórum sensing (QS), podría desencadenar cambios fisiológicos en *Nitrobacter* a las altas densidades celulares en los agregados de nitrificación. Los autoinductores difusibles incluso podrían permitir la comunicación interespecies entre los nitrificadores (Mellbye *et al.*, 2015). La matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) alrededor de un agregado de nitrificación probablemente sea producida por ambos socios (Arp y Bottomley, 2006) (Ilustración 1-3).

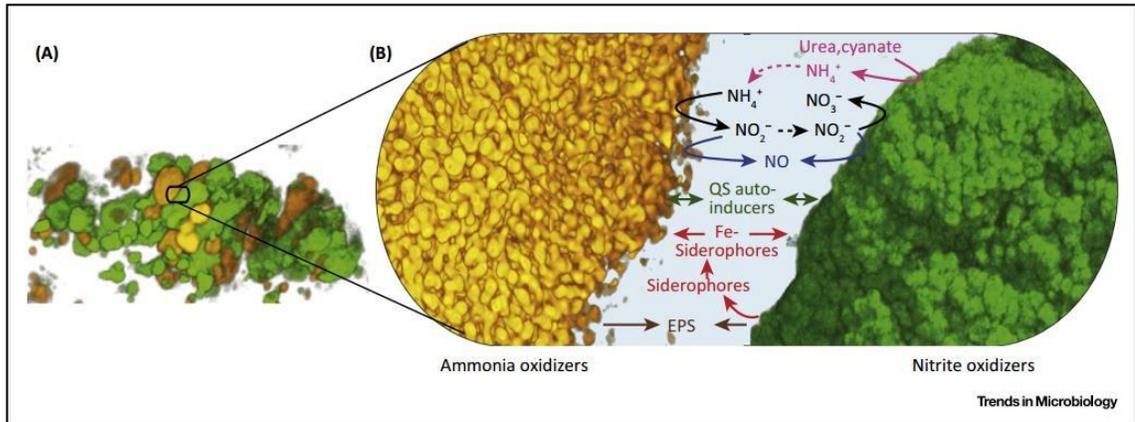


Ilustración 1-3. Esquematación de un agregado de nitrificación. (A) Agregado formado por bacterias oxidantes de amoníaco (BOA) y agrupaciones de células de oxidación de nitrito (BON) en biopelículas (B) interacciones que ocurren entre grupos. EPS, sustancias poliméricas extracelulares; QS, detección de quórum. EPS (Exopolisacáridos); QS quorum sensing. (Daims *et al.*, 2016)

### 1.5. Señalización intercelular en bacterias nitrificantes

Numerosas especies bacterianas entre ellas bacterias nitrificantes correlacionan actividad de grupo con la dependencia de densidad celular mediante un sistema de señalización intercelular conocido como quorum sensing (QS) (Fuqua *et al.*, 1994; Ng y Bassler, 2009). Este sistema está ligado a la capacidad bacteriana para sintetizar constitutivamente pequeñas moléculas señal intracelularmente (Schaefer *et al.*, 1996), que posteriormente son pasivamente (Kaplan y Greenberg, 1985), o activamente difundidas en el medio ambiente circulante en la biopelícula. Por lo tanto, la acumulación de las moléculas señal es en consonancia con el aumento de la población bacteriana y al alcanzar la densidad

de población un umbral “quorum”, los niveles correspondientes de señal son capaces de inducir una respuesta sincronizada en la expresión génica de la población bacteriana (Pearson *et al.*, 1999). Se ha reportado que bacterias nitrificantes, presentan moléculas de señalización de QS de tipo N-acil-homoserina lactona (AHL) o autoinductor del tipo 1(AI-1) (Manefield y Turner, 2002). Los autoinductores son sintetizados por proteínas *LuxI* a baja densidad celular, pero una vez que las células bacterianas crecen y solo cuando hay suficiente señal AHL presente, los autoinductores se unen a las proteínas *LuxR*, activando la transcripción de genes *lux* CDABEG que regulan la expresión de genes diana QS-dependientes (Ilustración 1-4) (Chen *et al.*, 2002; Eberhard *et al.*, 1981; Engebrecht *et al.*, 1983; Engebrecht y Silverman, 1984; Stevens *et al.*, 1994). Dado que la expresión de *luxI* es activado por el *luxR* unido al autoinductor, se genera un bucle auto-inductor de retroalimentación positiva para hacer cumplir la sincronía cuando la población de células varía de baja a una alta densidad celular (Ilustración 1-4) (Ng y Bassler, 2009).

Las estructuras AHLs tienen un anillo de homoserina lactona en común, la cadena lateral acilo de diferentes AHLs puede variar en longitud, grado de sustitución y saturación (Ilustración 1-4). La hidrofobicidad global de la molécula es un equilibrio entre el anillo de homoserina lactona hidrófilo y la cadena lateral hidrófoba. El carácter anfipático de las AHLs les permite navegar por la bicapa de fosfolípidos de la membrana celular, así como por los ambientes acuosos

intracelulares y extracelulares. Todas las AHLs actualmente identificadas tienen cadenas laterales que varían de 4 a 14 carbonos de longitud (Parsek *et al.*, 1999; Val y Cronan, 1998).

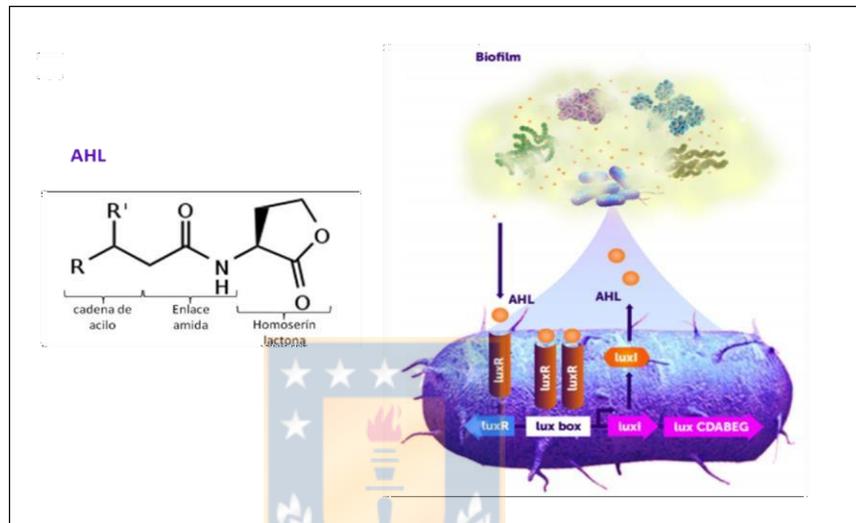


Ilustración 1-4. Representación esquemática del sistema QS dependiente de la acil-homoserina lactona (AHL) como se ejemplifica por el sistema *LuxI / LuxR* para *Vibrio fischeri*. Algunas bacterias pueden modificar su comportamiento de manera coordinada, utilizando un método de comunicación de célula a célula que afecta la expresión génica y fisiológica. El sistema QS funciona de la siguiente manera: el gen *luxI* codifica una proteína sintasa que cataliza la síntesis de AHL (círculos naranjas) posteriormente LuxR al unirse a AHL une una secuencia corta denominada caja lux y activa la transcripción del operón lux CDABEG aguas abajo, que contiene el gen *luxI* que codifica la AHL sintasa. La concentración de moléculas de AHL aumenta a medida que la población de bacterias crece. Muchas bacterias, incluidas las especies nitrificantes, desnitrificantes y heterotróficas, coordinan sus actividades metabólicas con respecto a los cambios en la densidad celular a través del sistema de señalización QS (Li y Nair, 2012; Ruiz *et al.*, 2020).

Como antecedentes de la presencia de QS mediado por AHLs en bacterias nitrificantes, se tiene que *Nitrosomonas europaea*, bacteria oxidante de amonio,

produce AHLs del tipo N-3-oxohexanoil -L-homoserina lactona (OHHL), los resultados experimentales obtenidos por (Batchelor *et al.*, 1997) sugieren que la rápida recuperación de poblaciones de biopelícula en estado de inanición se debe a la producción y acumulación de OHHL a niveles que no son posibles en suspensiones de células de baja densidad. Además, se ha detectado que la cepa *N. europaea* Schmidt produce al menos tres moléculas señal tipo AHLs: N-hexanoil-L-homoserina lactona (C6-AHL), N-octanoil-L-homoserina lactona (C8-AHL) y N-decanoil-L-homoserina lactona (C10-AHL), mientras que *Nitrospira multififormis* presenta un gen (*nmul*) que participa de la síntesis de una proteína con alto nivel de similitud a la familia de proteínas sintasas de AHLs, y experimentalmente se han identificado dos moléculas señal: N-tetradecanoil-L-homoserina lactona (C14-AHL) y N-3-oxotetradecanoil-L-homoserina lactona (oxo-C14-AHL) en cultivos bacterianos de esta cepa (Batchelor *et al.*, 1997; Burton *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2014).

En bacterias oxidantes de nitrito se han detectado autoinductores del tipo AHLs (Mellbye *et al.*, 2015). El sistema quorum podría desencadenar cambios fisiológicos en *Nitrobacter* a altas densidades celulares en agregados de nitrificación y la difusión de autoinductores incluso podría permitir la comunicación inter-especie entre nitrificadores (Mellbye *et al.*, 2015). Existen precedentes de homólogos de las proteínas *LuxI* y *LuxR* en un clon metagenómico del phylum *Nitrospirae* y de la bacteria *Nitrospira "Candidatus defluvii"* (Nasuno *et al.*, 2012). Además, se ha determinado que la bacteria nitrito-

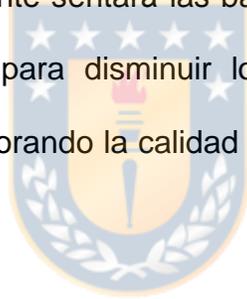
oxidante aerobia *Nitrobacter winogradskyi* contiene genes homólogos a *luxI* y *luxR* en su genoma (*nwi0626* y *nwi0627*, respectivamente), estando la expresión de *nwiI* y *nwiR* correlacionada con la producción de dos distintas AHLs durante el cultivo: N- decanoil- L homoserina lactona (C10-AHL) y una AHL monoinsaturada (C10: 1-HSL) ambos dependientes de la densidad poblacional (Mellbye *et al.*, 2015; Starkenburg *et al.*, 2006). En poblaciones mixtas de bacterias que llevan a cabo la oxidación anaerobia de amonio (anammox) se ha detectado sistema quorum mediado por AHLs (De Clippeleir *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2015). Estudios recientes realizados en biofiltración de recirculación acuícola orientados a detección de QS utilizando poblaciones bacterianas nitrificantes mostraron que la presencia de autoinductores del tipo AHLs tales como N - octanoil- L-homoserina lactona (C8 -AHL) y N-3-oxooctanoil-L-homoserina lactona (oxo C8-AHL) impulsó a las bacterias a la supervivencia.

Otra forma de regular el rendimiento de la biopelícula es a través de moléculas capaces de alterar los autoinductores QS. Estas moléculas se conocen como inhibidores de QS (Quorum Quenching QQ) y pueden inactivar enzimáticamente los autoinductores de QS, como AHLs (Dickschat, 2010). En los últimos años, se ha identificado una variedad de inhibidores de QS en varias bacterias Gram negativas y Gram positivas (Zhang y Li, 2016). Estos inhibidores de QS son moléculas clave para comprender el concepto de QQ en la regulación de fenotipos de detección de quórum (QS) al interrumpir la comunicación bacteriana (Dong y Zhang, 2005; Grandclement *et al.*, 2016; Romero *et al.*, 2015).

Actualmente, existe poca información sobre sistema quorum sensing e inhibidores de QS en comunidades bacterianas complejas presentes en biofiltros RAS (Ruiz *et al.*, 2020), son necesarios mayores estudios centrados en la ecología, formación de biopelículas y relación de QS y QQ en comunidades bacterianas nitrificantes presentes en biofiltros RAS.

Por lo tanto, surge la siguiente interrogante: Una comunidad nitrificante enriquecida desde biofiltro-RAS, ¿presenta sistema quorum sensing tipo 1?

El contestar esta interrogante sentará las bases para la potencial utilización de AHLs como herramienta para disminuir los tiempos de aclimatación de la biopelícula nitrificante, mejorando la calidad del agua y beneficiando la industria acuícola asociada a RAS.



## 2. HIPÓTESIS

La comunidad nitrificante enriquecida desde biofiltro de sistema de recirculación acuícola de salmónidos sintetiza autoinductores de tipo Acil homoserina lactonas (AHLs).



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo general

Detectar presencia de autoinductores de tipo AHL en comunidad bacteriana nitrificante enriquecida desde biofiltro en RAS

#### 3.2. Objetivos específicos

1. Establecer cinéticas de oxidación de amonio, nitrito y nitrato en sistemas discontinuo (*Batch*) de comunidad bacteriana nitrificante enriquecida desde biofiltro-RAS
2. Caracterizar grupos dominantes nitrificantes en comunidad bacteriana enriquecida desde biofiltro-RAS.
3. Detectar presencia de moléculas autoinductoras de tipo AHLs en biopelícula de comunidad nitrificante enriquecida desde biofiltro-RAS.



## 4. MATERIALES Y METODOS

### 4.1. Comunidad bacteriana, cepas biosensores y condiciones de cultivo.

#### 4.1.1. Comunidad bacteriana nitrificante

La comunidad bacteriana nitrificante fue aislada desde soportes de polietileno provenientes de un biofiltro-RAS empresa Sealand Aquaculture S.A. ubicada en Parga, Región de Los Lagos, Chile. Las muestras fueron almacenadas en recipientes estériles con buffer PBS (NaCl 8 g/L, KCl 0.2 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 6H<sub>2</sub>O 1.44 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24 g/L, pH 7.5) para su transporte y procesamiento en el laboratorio de Biopelículas y Microbiología Ambiental Centro de Biotecnología, Universidad de Concepción. El cultivo se realizó en medio para enriquecimiento de sales de amonio AMS ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3.3 g/L, MgSO<sub>4</sub> 0.51 g/L, CaCl<sub>2</sub> 0.74 mg/L, FeSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 2.5 mg/L, CuSO<sub>4</sub> 0.08 mg/L, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O 0.90 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O 1.12 g/L, NaOH (2N) 1.12 g/L) (Chung *et al.*, 2007) y la incubación en condiciones de oscuridad, aireación constante (9 mg/L) y temperatura ambiente (25±1°C).

#### 4.1.2. Cepas biosensores de sistema quorum sensing con capacidad de detección de AHLs

Para los ensayos de detección de AHLs se utilizaron las cepas: *Pseudomonas putida* EL105 (RPL4las), *Pseudomonas putida* EL106 (RPL4cep) y *Escherichia coli* MT102 (pKR – C12), las cuales contienen plásmidos sensores de AHL basados en proteínas fluorescentes verdes (GFP) que son capaces de auto-propagarse dentro de las comunidades microbianas por medio de la conjugación y responden a un amplio rango de moléculas AHL. La presencia de AHL se midió con la emisión de fluorescencia verde a longitud de onda de excitación de 474 nm y detección de emisiones a 515 nm (Lumjiaktase *et al.*, 2010). Las cepas reporteras contienen vectores con resistencia a los siguientes antibióticos: kanamicina (100 µg/ml), Rifampicina (50 µg/ml) para *Pseudomonas* y Gentamicina (25 µg/ml) para *Escherichia coli*, permitiendo su selección. Las cepas fueron cultivadas en medio de cultivo Luria Bertani (LB) (LB broth Miller, Merck) incubadas en agitación constante 120 rpm y temperatura de 27±1 °C.

#### 4.1.3. Biosensor quorum quenching (QQ)

El biosensor *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 fue utilizado para la detección de QQ. Cepa capaz de controlar la producción de violaceína (pigmento violeta) mediante sistema QS a través de la respuesta a moléculas autoinductoras como C6-HSL, C4-HSL y moléculas análogas como vainillina (4-

hidroxi-3-metoxibenzaldehído) (McLean *et al.*, 2004). Fue cultivado en medio de cultivo Luria Bertani (LB broth Miller, Merck) adicionado con cloruro de sodio (NaCl 0,5% p/v), en condición de agitación constante 120 rpm y temperatura de  $27\pm 1$  °C.

#### 4.2. Cultivo bacteriano en sistema de reactores discontinuos (*Batch*)

##### 4.2.1. Procesamiento de la muestra

Desde soportes de polietileno modelo K1 provenientes de un biofiltro RAS empresa Sealand Aquaculture S.A. se recuperó la comunidad bacteriana adherida a través de una remoción mecánica con bisturí, homogenización en vortex (Scilogex MX-S) y sonicación (sonicador, 1510 Branson) durante 5 minutos. Posteriormente se midió la viabilidad inicial de la comunidad bacteriana utilizando el kit LIVE/DEAD® BacLight™ (Thermo-Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) a través de su visualización por microscopía de epifluorescencia (Chung *et al.*, 2007; Valdebenito y Urrutia, 2016).

#### 4.2.2. Cultivo bacteriano planctónico en sistema de reactores discontinuos (*batch*)

La comunidad nitrificante recuperada en el punto 4.2.1. se inoculo a concentración de  $10^5$  cel/ml en reactores de sistema discontinuos (*batch*) de 2L para obtener cultivos planctónicos enriquecidos. Se incubo en medio de sales de amonio AMS (Chung *et al.*, 2007) en condiciones de oscuridad, aireación constante (9 mg/l) y temperatura ambiente ( $25\pm 1^\circ\text{C}$ ).

#### 4.2.3. Formación de biopelículas en soportes de polietileno en reactores discontinuos (*batch*).

La comunidad bacteriana nitrificante se cultivó (inóculo de  $10^5$  cel/ml) en reactores de 2 L en sistema batch con soportes de polietileno (anillos de  $259,2\text{ mm}^2$ ), correspondiente al 60% del volumen total de reactor, durante 60 días para la formación de biopelículas en condiciones descritas en el punto anterior (4.2.2) (Valdebenito y Urrutia, 2016).

#### 4.2.4. Medición concentraciones de (N-NH<sub>4</sub>), (N-NO<sub>2</sub>) y (N-NO<sub>3</sub>) y crecimiento bacteriano.

Cada 7 días se tomaron muestras de 15ml desde reactores planctónicos y de biopelículas para cuantificar amonio (N-NH<sub>4</sub>), nitrito (N-NO<sub>2</sub>) y nitrato (N-NO<sub>3</sub>) mediante espectrometría. La técnica se basó en EPA 354.1 y 350.1, usando kit

Spectroquant (Merck) donde los test de nitrito y amonio son homologables a técnicas EPA 354.1 y 350.1, respectivamente. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se graficó la concentración de N-NH<sub>4</sub>, N-NO<sub>2</sub> y N-NO<sub>3</sub> en mg/L versus el tiempo en días. Para evaluar el crecimiento bacteriano se tomaron 3 soportes y se suspendieron en PBS (NaCl 8 g/l, KCl 0.2 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 6H<sub>2</sub>O 1.44 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24 g/l, pH 7.5), posteriormente se desprendió la biopelícula mediante agitación (vortex, Scilogex MX-S) y sonicación (sonicador 1510 Branson) durante 5 minutos. Los análisis de crecimiento bacteriano se realizaron cada 7 días utilizando microscopia de epifluorescencia, en una primera etapa se mezcló 100 µL de muestra con 100 µL de tinción Live/Dead (Kit de Viabilidad BacLigth™ LIVE/DEAD (Invitrogen™, USA), se incubó por 15 min en oscuridad. Posteriormente la muestra se concentró por filtración (filtros de policarbonato negros 0,22 µM, Merck) y se observó en microscopio de epifluorescencia (Olympus BX51) utilizando longitudes de onda excitación/emisión indicadas en el kit de viabilidad. Las imágenes fueron procesadas a través del programa ImageJ (National Institutes of Health). Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se graficó para cultivo planctónico recuento microbiológico (log (cel/ml)) versus el tiempo en días y para biopelículas recuento microbiológico (log (cel/mm<sup>2</sup>)) versus el tiempo en días. Los cálculos de los parámetros cinéticos se realizaron con Sigma Plot versión 12.0 y la tasa de crecimiento específica ( $\mu_{max}$ ) y el tiempo generacional (g) se calcularon utilizando las siguientes ecuaciones:

$$(1) \mu = \frac{\ln\left(\frac{X_2 - X_1}{t_2 - t_1}\right)}{t_2 - t_1}$$

$$(2) g = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Donde X es el número de células y t es el tiempo (Thandar *et al.*, 2016).

#### 4.2.5. Microscopia láser confocal (CLSM)

El análisis microscópico de las biopelículas se realizó directo desde soporte de polietileno con biopelículas nitrificantes de 60 días de incubación en Centro de Microscopía Avanzada Bío-Bío, Universidad de Concepción. Se tomó muestra de 3 soportes de polietileno y fueron lavados con PBS (NaCl 8 g/L, KCl 0.2 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 6H<sub>2</sub>O 1.44 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24 g/L, pH 7.5), a los soportes con biopelículas se les agregó en la superficie 100 µL de tinción Live/Dead (Kit de Viabilidad BacLight™ LIVE/DEAD (Invitrogen™, USA) y se incubaron durante 15 minutos en cámara oscura. Para el análisis microscópico de las biopelículas se utilizó un microscopio láser confocal espectral dos fotones (LSM780 NLO Zeiss). Se obtuvieron imágenes y se observaron diferentes campos de la superficie de los soportes de polietileno en aumentos de 10x, 40x y 100x utilizando longitudes de onda de 488 y 532nm. Además, se analizaron las imágenes y se realizaron reconstrucciones tridimensionales utilizando el software ZEN 2011 SP3 (black edition).

#### 4.3. Detección y caracterización de la comunidad microbiana nitrificante mediante PCR-DGGE-Secuenciación masiva (principales grupos bacterianos en cultivos nitrificantes)

##### 4.3.1. Extracción de ácidos nucleicos

Para la extracción de DNA se tomaron 50 ml de muestra desde biofiltro-RAS y cultivos nitrificantes, se sometió a sonicación (ultra cleaner Sonic) durante 5 minutos en frío y posteriormente la muestra fue centrifugada por 15 minutos con el fin de formar un pellet visible, el cual se lavó con solución salina (PBS) y se le realizó extracción de DNA genómico mediante PowerSoil DNA isolation kit (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se cuantificó, midió la pureza e integridad del ADN mediante la relación 260/280 utilizando NanoQuant Plate™ (Tecan F200 infinite pro) y electroforesis en gel de agarosa 1,2%.

##### 4.3.2. Detección de genes nitrificantes mediante PCR

Se amplificaron genes específicos mediante PCR convencional, gen para la enzima amonio monooxigenasa (*amoA*) y gen para la enzima nitrito oxido reductasa (*nxrA*) con el fin de identificar la presencia de estos en muestras de biofiltro-RAS y cultivo nitrificante. Para la amplificación del gen *amoA* y *nxrA* la composición del mix de PCR fue el siguiente: volumen final de 20 uL,

conteniendo 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 0,5 mM de cada partidor, 1X de buffer, 0,025 U/μL de taq DNA polimerasa y 1,0 μL de templado de ADN. La reacción de PCR se realizó en termociclador Veriti (Thermo Fisher Scientific), cuyas condiciones de PCR fueron para gen *amoA*: 2 minutos a 94°C, seguido de 40 ciclos a 94°C durante 30 s, a 54°C durante 30 s y a 72°C por 30s. (Shimomura *et al.*, 2012). Y para gen *nxA*: 3 min a 94 ° C, seguido de 35 ciclos a 94 ° C durante 30 s, 55 ° C durante 45 s, 72 ° C durante 45 s y 72 ° C durante 5 min (Wertz *et al.*, 2008). Los partidores utilizados se describen en la tabla siguiente (Tabla 4-1), estos fueron revisados utilizando el software Oligo Analyzer IDT.

Grupo bacteriano	Nombre	Secuencia (5'-3')	Referencia
<b>Bacterias oxidantes de amonio (gen <i>amoA</i>)</b>	amoA-1F	GGGGTTTCTACTGGTGGT	(Shimomura <i>et al.</i> , 2012)
	amoA-2R	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC	
<b>Bacterias oxidantes de nitrito (gen <i>nxA</i>)</b>	F1370 F1 <i>nxA</i>	CAGACCGACGTGTGCGAAAG	(Wertz <i>et al.</i> , 2008)
	F2843 R2 <i>nxA</i>	TCCACAAGGAACGGAAGGTC	

Tabla 4-1. Partidores utilizados en este estudio para la amplificación de genes *amoA* y *nxA*.

#### 4.3.3. Ensayo PCR-DGGE

En muestra proveniente directo de biofiltro-RAS y muestras de cultivos nitrificantes enriquecidos en condiciones de laboratorio antes descritas, se amplificó el gen ribosomal 16S de bacterias utilizando los partidores que se describen en la tabla 4-2. Cada reacción de PCR se realizó en termociclador Veriti (Thermo Fisher Scientific) para un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ , conteniendo 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM dNTPs, 0,5 mM de cada partidador, 1X de buffer, 0,025 U/ $\mu\text{L}$  de taq DNA polimerasa y 1,5  $\mu\text{L}$  de templado de ADN. Las condiciones del programa de PCR para la primera amplificación fue: una etapa de denaturación inicial a 95°C durante 5 min, 35 ciclos consistentes en 1 min a 94°C, 1 min a 60°C, 2 min a 72°C y finalmente una extensión a 72°C durante 10 min. La segunda amplificación, PCR anidada se programó con una etapa inicial de denaturación a 95°C durante 2 min, 28 ciclos consistentes en 30 s a 94°C, 30 s a 55°C y 30 s a 72°C, con una etapa de extensión final a 72°C durante 3 min. La integridad del producto de PCR se visualizó en gel de agarosa 1,2% (p/v) bajo luz UV (Nicolaisen y Ramsing, 2002). El DGGE de los productos de PCR generados se realizó utilizando el sistema D-Gene (BioRad). Se preparó gel de poliacrilamida al 7,5% con un gradiente de denaturación de 30 – 60% de urea – formamida, según instrucciones del fabricante (BioRad). La electroforesis se realizó en buffer TAE 1X a un voltaje constante de 60 V a 60°C durante 16 h. El gel fue teñido con

tinción nitrato de plata para ser visualizado y documentado (Uvitec, Cambridge) (Muyzer *et al.*, 1993).

#### 4.3.4. Secuenciación de bandas en DGGE.

En forma paralela, DGGE obtenido de manera similar al anterior, fue teñido con bromuro de Etidio (0,01% v/v) durante 30 minutos. Posteriormente el gel fue visualizado en transiluminador UV desde donde se seleccionaron, cortaron y recuperaron las bandas con mayor resolución y se amplificaron nuevamente (condiciones antes descritas) (Muyzer *et al.*, 1993). Los productos de PCR obtenidos fueron enviados a servicio de secuenciación de ADN de MacroGen, Corea.

Grupo bacteriano	PCR	Nombre	Secuencia (5'-3')	Referencia
<b>Bacteria Universal Gen ADNr16s</b>	Primera Rx. PCR	341F	CCTACGGGAGGCAGCAG	(Lane, 1991)
		907R	CCGTCAATTCMTTTRAGTTT	
	Segunda Rx. PCR	341F* GC	CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCC GCCCCGCC CGGGGGTTTCTACTGGTGGT	(Muyzer <i>et al.</i> , 1993)
		R534	ATTACCGCGGCTGCTGG.	

Tabla 4-2. Partidores utilizados en ensayo PCR- DGGE comunidad bacteriana nitrificante.

#### 4.3.5. Análisis de secuencias

Las secuencias de ADN obtenidas en el punto anterior fueron limpiadas y alineadas con secuencias de la base de datos de NCBI, utilizando la herramienta informática BLAST (National Center for Biotechnology Information; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Se seleccionó las secuencias con un porcentaje de identidad mayor al 87% y un E-value menor que  $10^{-4}$  (Tamura *et al.*, 2013).

#### 4.3.6. Comparación genómica de comunidades bacterianas nitrificantes

Se realizó una comparación de la composición taxonómica a nivel de genero entre la biopelícula de la muestra original del biofiltro RAS (B-RAS) y la biopelícula de la misma comunidad enriquecida en medio AMS después de 60 días (B-AMS). 50 ml de cultivos nitrificantes fueron sonicados (ultra cleaner Sonic) por 5 min en frío y centrifugados a 10.000 rpm por 15 min. Desde el pellet se extrajo el ADN total mediante PowerSoil DNA isolation kit (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se cuantificó, midió la pureza e integridad del ADN mediante la relación 260/280 utilizando NanoQuant Plate™ (Tecan F200 infinite pro) y electroforesis en gel de agarosa 1,2%. La secuenciación metagenómica 16S de extractos de ADN (> 60 ng / $\mu$ l y 260/280 ~ 1.8) se realizó mediante la construcción de biblioteca de amplicones utilizando los cebadores 16S (V3-V4) Bact\_341F:

CCTACGGGNGGCWGCAG y Bact\_805R: GACTACHVGGGTATCTAATCC y la polimerasa de índice de fusión de Herculase II XT ADN XT Herculase II kit V2 en forma de planta illumina (Macrogen, Corea).

#### 4.3.7. Evaluación de calidad de lecturas y Pre- proceso

La calidad de las lecturas en bruto se evaluó por medio del programa fastqc (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Las primeras 25 pares de bases en el extremo 5' de las lecturas en bruto fueron cortadas, removiendo partidores (secuencias repetidas), por medio del programa prinseq-lite.pl (<http://prinseq.sourceforge.net/>).

#### 4.3.8. Denoising y detección de quimeras

Por medio del programa DADA2 (Callahan *et al.*, 2016) implementado en la plataforma de trabajo qiime2 (Bolyen *et al.*, 2019) se utilizó para corregir las lecturas y detectar quimeras.

#### 4.3.9. Generación de OTUs y Asignación taxonómica

La elaboración de tablas de OTUs y tablas de asignación taxonómica se realizó por medio de subrutinas de qiime2 se generaron los cluster de OTUs, utilizando un criterio de similitud de secuencia del 97% y la asignación taxonómica,

utilizando como base de datos de referencia la de SILVA 132 (<https://www.arb-silva.de/documentation/release-132/>), filtrada sólo para bacterias.

#### 4.4. Ensayos de detección de sistema QS

##### 4.4.1. Detección de autoinductores de tipo AHLs mediante reporteros fluorescentes

Con el fin de seleccionar el reportero con mayor sensibilidad para la detección de AHL, se realizó experimento de testeo de reporteros, se utilizaron cepas *Pseudomonas putida* EL105 (RPL4las), *Pseudomonas putida* EL106 (RPL4cep) y *Escherichia coli* MT102 (pKR – C12). Las bacterias fueron incubadas en medio de cultivo Luria Bertani (LB broth Miller, Merck) 12h a 27 °C (120 rpm) con los antibióticos correspondientes. El experimento fue realizado en placas negras de 96 pocillos, cada pocillo fue inoculado con 270 µL de caldo LB, AHL-C6 (125 nM) y 10 µL de suspensión bacteriana de 10<sup>7</sup> UFC/ml. Se utilizaron los controles negativos del solvente dimetil sulfoxido (DMSO) (270 µL medio de cultivo + 20 µL solvente+ 10 µL inóculo bacteriano) y del medio de cultivo (n=3). El experimento se realizó durante 24h y se midió fluorescencia emitida cada 2 h usando el lector de placas de microtitulación TECAN F200 infinite pro con una longitud de onda de excitación de 474 nm y detección de emisión a 515 nm. Los datos se obtuvieron mediante el software i-control™ Microplate Reader. Las unidades de

fluorescencia específicas se definen como unidades de fluorescencia relativa (UFR) corregidas para la fluorescencia de fondo por unidad de OD.450.

#### 4.4.2. Detección de moléculas de tipo AHLs en cultivo nitrificante utilizando reportero *Pseudomonas putida* EL106 (RPL4cep)

Se utilizó el reportero de quorum sensing *Pseudomonas putida* EL106 (RPL4cep), el cual se recuperó desde cepario -80°C en medio LB (Luria Bertani broth Miller, Merck) con Rifampicina 100µg/ml, e incubó durante 48 horas a temperatura de 27°C. Posteriormente se centrifugó a 5.500rpm, por 15 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó dos veces con medio de cultivo LB para eliminar el antibiótico, para evitar interferencia en la detección de fluorescencia. Se tomó comunidad nitrificante desde reactor y concentró mediante centrifugación 8000 rpm por 10 min, el pellet bacteriano fue recuperado y resuspendido en 5 ml de medio según correspondió. Se incubó la comunidad nitrificante en medio AMS (Inóculo) en co-cultivo con reportero (inóculo) en medio LB en tubos de 15 ml, con volumen final de 5 ml en proporción 1:1 a una concentración de 10<sup>8</sup> cel/ml de reportero y de comunidad nitrificante por un periodo de 72 h a 27°C sin agitación. El tratamiento fue: reportero de AHLs + comunidad nitrificante en medio 50% LB+ 50% AMS (medio mixto que favorece viabilidad de reportero y comunidad nitrificante), controles negativos: reportero AHLs + comunidad nitrificante en medio 100% medio LB (medio que favorece viabilidad del reportero), reportero AHLs +comunidad nitrificante en medio 100 %

AMS (medio que favorece viabilidad comunidad nitrificante) y control positivo: reportero AHLs +250 nM AHL- C8 en medio 50% LB+ 50% AMS. El experimento se realizó por triplicado y las mediciones de fluorescencia fueron en placas negras de 96 pocillos a las 24, 48 y 72 horas para la detección unidades de fluorescencia relativa (URF) utilizando el lector de placas de micro titulación TECAN F200 infinite pro con una longitud de onda de excitación de 474 nm y detección de emisión a 515 nm. Los datos fueron obtenidos mediante el software i-control™ Microplate Reader.

#### 4.4.3. Obtención de extractos totales desde biopelículas nitrificantes

Para la obtención de extractos desde biopelículas nitrificantes, se utilizó el método descrito por Wang (2011) con modificaciones. Se tomaron muestras de 10 soportes en 300 ml de cultivo de biopelículas y se realizó sonicación (sonicador, 1510 Branson) durante 5 minutos. Se recuperó el sobrenadante por centrifugación a 5.000 rpm durante 20 minutos, este fue filtrado (0,22 µm) y extraído con volúmenes iguales de solución acetato de etilo (Ethyl acetate, grado HPLC, Merck) con 0,5% Ácido acético glacial, tres veces. Posteriormente se recuperó la fase orgánica obtenida por decantación y se agregará MgSO<sub>4</sub> anhidro a la fase orgánica recuperada para eliminar la fase acuosa arrastrada. Finalmente, los extractos fueron concentrados por evaporación rotatoria a (40-45°C) y suspendidos en acetato de etilo para su almacenamiento a -20°C (Shaw

*et al.*, 1997). Se realizaron extracciones por solvente de sobrenadante bacteriano desde cultivo de biopelículas nitrificantes cada 12 días.

#### 4.4.4. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos de las pruebas de presencia de AHL de la comunidad nitrificante (prueba ANOVA de una vía y prueba t de Student) se realizaron con Sigma Plot versión 12.0.

#### 4.4.5. Detección de efecto QQ en extractos de bacterias nitrificantes en la cepa reportera *C. violaceum* ATCC 12472

Se utilizó reportero *C. violaceum* ATCC 12472 para determinar efecto QQ de los extractos nitrificantes cada 12 días. El reportero se incubó durante 18 h a 27°C, transcurrido el periodo de tiempo 5 ml de LB (Luria Bertani) semisólido (0,7% agar) previamente derretido (45°C) fue mezclado con inóculo de 10<sup>6</sup> UFC/ml del reportero y vertido en placa petri. Los extractos fueron impregnados en discos de papel (10 mm) a una concentración de 500 µg y dispuestos sobre la placa de agar semisólido como se describe previamente (McLean *et al.*, 2004). Estos se incubaron durante 48 h a 27°C, estableciéndose como efecto positivo para QQ, la ausencia de la pigmentación violeta en torno al disco con los compuestos. Como control positivo se utilizó 70 µg/ml de vainillina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

4.4.6. Cuantificación del % de inhibición de violaceína en cepa reportera  
*Chromobacterium violaceum* ATCC 12472

Para la cuantificación el % de inhibición de violaceína del reportero *C. violaceum* ATCC 12472 frente al extracto de biopelículas nitrificantes. Se determinó por el método de dilución seriada utilizando placa de 96 pocillos utilizando el reportero *C. violaceum* ATCC 12472 frente a diluciones seriadas del extracto total. Cada pocillo fue inoculado con 270  $\mu\text{L}$  de caldo LB, 20  $\mu\text{L}$  de extracto y 10  $\mu\text{L}$  de suspensión bacteriana de  $10^7$  ufc/ml. Se utilizaron controles: control positivo del medio de cultivo (290  $\mu\text{L}$  medio de cultivo + 10  $\mu\text{L}$  inóculo bacteriano), control positivo del solvente utilizado (270  $\mu\text{L}$  medio de cultivo + 20  $\mu\text{L}$  solvente+ 10  $\mu\text{L}$  inóculo bacteriano), control negativo del extracto (280  $\mu\text{L}$  medio de cultivo + 20  $\mu\text{L}$  extracto) y un control negativo solo del medio de cultivo utilizado, por triplicado. La microplaca fue incubada a 27°C por 24 h. El experimento se realizó llevando a cabo el procedimiento descrito por (Blosser y Gray, 2000) con modificaciones, en el cual el pigmento de violaceína se extrajo en etanol del cultivo líquido de *C. violaceum* ATCC 12472 y fue medido por absorbancia a 585nm en equipo Tecan Infinite® F200. El porcentaje de inhibición de violaceína fue calculado según la fórmula: %Inh. Violaceína = (control OD585 nm – test OD585 nm/control OD585 nm)  $\times$  100.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Cultivo bacteriano nitrificante en sistema de reactores discontinuos

(Batch)

Como se describió en el punto 4.2.1 se obtuvo muestras cuyo detalle se muestra en la tabla 5-3.

Procedencia	Código	Descripción
Sealand Aquaculture S.A. Parga, Región de Los Lagos, Chile	Biofiltro 1	Frasco 500 ml con soportes de polietileno colonizados por biopelículas bacterianas, suspendidas en agua de biofiltro. Alta presencia de materia orgánica.
	Biofiltro 2	

Tabla 5-3. Muestras de biofiltro- RAS obtenidas desde Sealand Aquaculture S.A

<b>Recuento de la viabilidad bacteriana en muestras de biofiltro-RAS</b>		
Código	Recuento vivas (cel/mm <sup>2</sup> )	Recuento muertas (cel/mm <sup>2</sup> )
Biofiltro 1	6,06x10 <sup>7</sup>	1,4x10 <sup>6</sup>
Biofiltro 2	5,3x10 <sup>5</sup>	2,2x10 <sup>5</sup>

Tabla 5-4. Recuento viabilidad bacteriana muestras de biofiltro- RAS obtenidas desde soportes K1 Sealand Aquaculture S.A.

#### 5.1.1. Cultivo planctónico y de biopelículas nitrificantes en sistema de reactores discontinuos (*batch*)

La comunidad nitrificante obtenida desde biofiltro-RAS creció en condiciones planctónicas durante 36 días en reactor discontinuo (*batch*) a altas concentraciones de amonio (699 ±5 mg/L). En estas condiciones mostró crecimiento exponencial con una tasa específica de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) un valor de  $0.094 \pm 0.002 \text{ d}^{-1}$  ( $R^2: 0,98$ ), mientras que el tiempo generacional calculado fue de 7,4 d. La curva de crecimiento del recuento bacteriano se observa en la Ilustración 5-5A y las curvas de consumo de amonio y producción de nitrito y nitrato de la comunidad nitrificante planctónica se observan en la Ilustración 5-5B.

La comunidad nitrificante creció en condiciones óptimas para la formación de biopelículas durante 65 días en reactor discontinuo (*batch*) a altas concentraciones de amonio ( $749 \pm 18$  mg/L). En estas condiciones mostró un crecimiento exponencial con una tasa específica de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ) de  $0.198 \pm 0.004$  d<sup>-1</sup> ( $R^2$ : 0,99) calculada entre los tiempos de 0 a 35 días y el tiempo generacional calculado fue de 3,5 d (Ilustración 5-5C, tabla 5-5).

Las curvas de consumo de amonio y producción de nitrito y nitrato de la comunidad nitrificante en biopelículas se observan en la Ilustración 5-5D. La tasa de consumo de amonio fue de  $9.246 \pm 0.2383$  mg/L /día ( $R^2$ : 0,98), esta fue calculada entre los tiempos de 0 a 65 días, en los cuales mostró un descenso lineal (Tabla 5-5). Las tasas de producción de nitrito y nitrato fueron de  $0.044 \pm 0.007$  mg/L /día ( $R^2$ : 0,79) y  $4.232 \pm 0.363$  mg/L /día ( $R^2$ : 0,93), respectivamente estas fueron calculadas entre los tiempos de 42 a 65 días para nitrito y entre 24 a 65 días para nitrato, los cuales mostraron un crecimiento lineal (Tabla 5-5). Mientras que el coeficiente de rendimiento ( $Y_{X/S}$ ) calculado fue de  $0,005 \pm 0,0001$  mol NH<sub>4</sub>\*Log cel<sup>-1</sup> ( $R^2$ : 0,98).

Finalmente, la tasa específica de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ) y el tiempo generacional es significativamente mayor (ANOVA,  $P \leq 0,01$ ) en las biopelículas nitrificantes soportadas en polietileno en relación con las tasas alcanzadas por el cultivo planctónico.

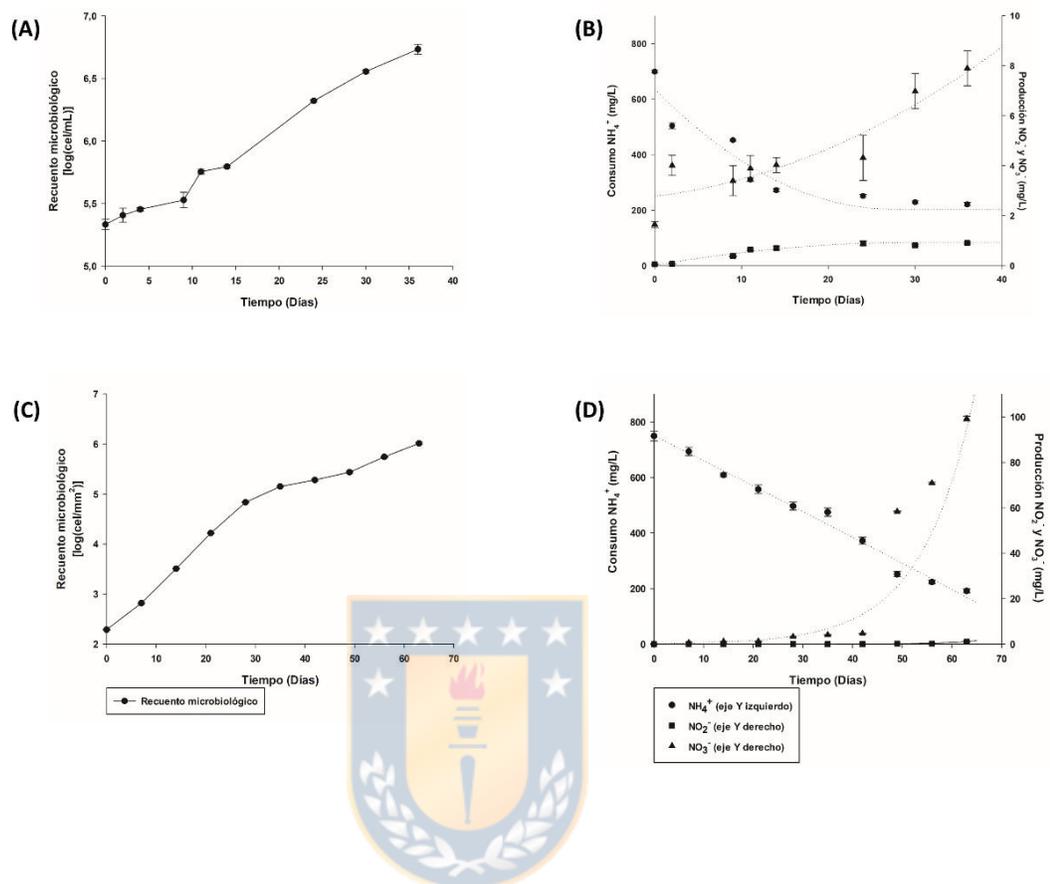


Ilustración 5-5. Curvas de crecimiento y cinéticas de consumo/producción de  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$  en comunidad bacteriana nitrificante cultivada en reactores discontinuos (*batch*) en medio AMS (A) Curva de crecimiento de cultivo planctónico obtenida por recuento de bacterias mediante microscopia de epifluorescencia con tinción Bac Light. (●) células vivas  $\text{ml}^{-1}$ . (B) Concentraciones de  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$  en mg/L versus tiempo en días en cultivo planctónico. (●) consumo de  $\text{NH}_4^+$  (eje derecho), (■) producción de  $\text{NO}_2^-$  (eje izquierdo) y (▲) producción de  $\text{NO}_3^-$  (eje izquierdo). (C) Curva de crecimiento de biopelículas nitrificantes en soportes de polietileno obtenida por microscopia de epifluorescencia con tinción Bac light. (●) log (células vivas / $\text{mm}^2$ ). (D) Concentraciones de  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$  en mg/L versus tiempo en días en biopelículas nitrificantes en soportes de polietileno. (●) consumo de  $\text{NH}_4^+$  (eje derecho), (■) producción de  $\text{NO}_2^-$  (eje izquierdo) y (▲) producción de  $\text{NO}_3^-$  (eje izquierdo).

Parámetros	Cultivo biopelícula	
	Valor	R <sup>2</sup>
tasa específica de crecimiento $\mu_{\max}$ (d <sup>-1</sup> )	0.198 ± 0.004	0,99
Tiempo Generacional Ln2* $\mu^{-1}$ (d)	3,5	--
Coefficiente de rendimiento mol NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> *Log cel <sup>-1</sup>	0,005 ± 0,0001	0,98
Tasa consumo de NH <sub>4</sub> mg* L <sup>-1</sup> *d <sup>-1</sup>	9.246 ± 0.2383	0,98
Tasa producción de NO <sub>2</sub> mg*L <sup>-1</sup> *d <sup>-1</sup>	0.044 ± 0.007	0,79
Tasa de producción de NO <sub>3</sub> mg*L <sup>-1</sup> *d <sup>-1</sup>	4.232 ± 0.363	0,93

Tabla 5-5. Parámetros cinéticos obtenidos de curvas de crecimiento de cultivo de biopelículas nitrificantes.



### 5.1.2. Microscopía epifluorescencia de muestra biofiltro-RAS, cultivo planctónico y microscopia láser confocal (CLSM) de biopelícula nitrificante

Mediante microscopia de epifluorescencia se obtuvieron imágenes de muestra directa de biofiltro-RAS, cultivos planctónicos a través del tiempo 10 y 30 días de incubación y biopelículas soportadas en polietileno. En la Ilustración 5-6 se visualizan imágenes microscópicas de epifluorescencia con tinción vivas (verde) y muertas (rojo). En la muestra de biofiltro -RAS, se produce un cambio en la morfología en relación con los cultivos planctónicos con medio de cultivo de alta

concentración de amonio ( $749 \text{ mg N-NH}_4^+$ ), al día 30 se visualizan agregaciones o flóculos de nitrificación.

En la Ilustración 5-7, la biopelícula formada en soporte fue visualizada mediante CLSM a los 60 días de incubación en cultivo *batch*. El soporte se marcó con tinción vivas (verde) y muertas (rojo) y se visualizó con aumento de 40x evidenciándose una biopelícula de  $8 \mu\text{m}$  de grosor con mayor proporción de células vivas.



Ilustración 5-6. Microscopia de epifluorescencia de comunidad bacteriana. Tinción LIVE/DEAD® (BacLight TM). Células vivas color verde y células muertas color rojo Aumento 1000x. (A) comunidad bacteriana biofiltro-1. (B) Cultivo planctónico 10 días (C) Cultivo planctónico 30 días. Flecha blanca indica formación de floculo de nitrificación.

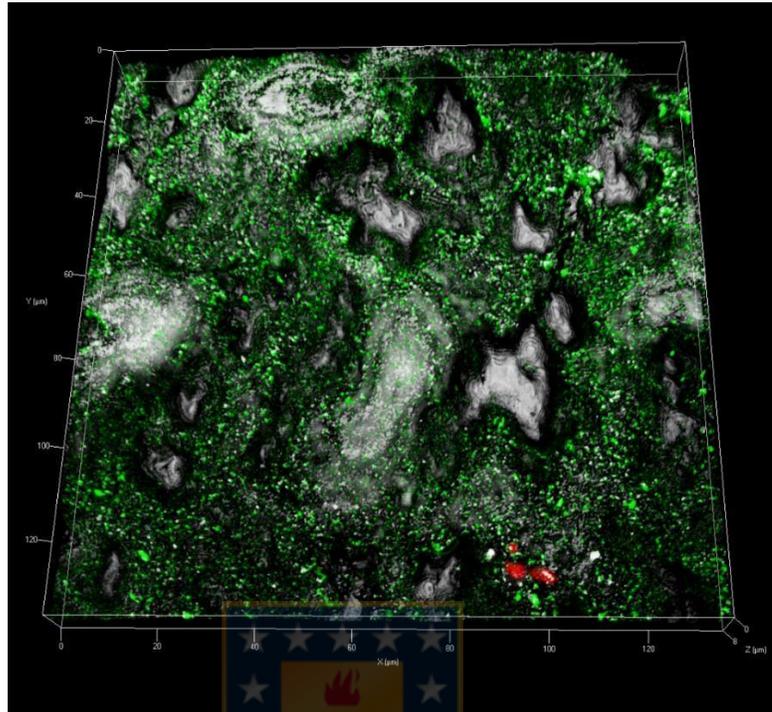


Ilustración 5-7. Micrografía obtenida utilizando microscopio láser confocal espectral dos fotones (aumento 40x) de biopelícula nitrificante soportada en polietileno después de 60 días de incubación en medio AMS. Tinción vivas y muertas, Células vivas color verde y células muertas color rojo.

## 5.2. Caracterización de principales grupos bacterianos en cultivos nitrificantes

Extractos de ADN de las muestras directa biofiltro-RAS, cultivo planctónico nitrificante (30 días de incubación) y cultivo de biopelículas nitrificantes (0,30 y 60 días de incubación) se analizaron para evaluar su calidad y concentración, las cuales fueron apropiadas para ensayos posteriores (tabla 5-6)

Código	Muestra	Razón 260/280	Concentración (ng/μl)
B-RAS	Biofiltro - RAS	1,88	262,6
P-AMS	Planctónico 30 días	1,88	111,8
B-AMS 0 DIAS	Biopelícula 0 días	1,88	57,9
B-AMS 30 DIAS	Biopelículas 30 días	1,85	219,0
B-AMS 60 DIAS	Biopelículas 60 días	1,86	108,8

Tabla 5-6. Concentración y pureza de ADN obtenida utilizando NanoQuant Plate™ del equipo Tecan F200 infinite pro en muestras de ADN obtenido directo desde muestras de biofiltro RAS y de cultivos en reactores *batch* planctónicos y de biopelículas nitrificantes a escala de laboratorio.



### 5.2.1. Detección mediante PCR convencional de genes asociados a nitrificación bacteriana.

Se detectaron genes asociados al proceso de nitrificación Gen *amoA* (gen amonio monooxigenasa) y gen *nxrA* (gen nitrito oxido reductasa) mediante PCR convencional en muestras de ADN obtenido directo biofiltro-RAS (B-RAS), cultivo planctónico nitrificante de 30 días de incubación (P-AMS) y cultivo de biopelículas nitrificantes tiempo 0, 30 y 60 días de incubación (B-AMS) (Ilustración 5-8), los amplicones resultantes fueron un amplicón de 491 pb del gen *amoA* y un

amplificación de 322 pb para el gen *nxrA* en muestras B-RAS, P-AMS, B-AMS 0 DIAS, B-AMS 30 DIAS, B-AMS 60 DIAS.



Ilustración 5-8. Detección mediante PCR de genes involucrados en nitrificación en muestras de biofiltro, cultivo planctónico y biopelículas nitrificantes. Control positivo (gen *amoA*) *Nitrosomonas europaea*, control negativo *Pseudomonas putida*, (-) Blanco, B-RAS (Biofiltro-RAS), P-AMS (cultivo planctónico de 30 días), B-AMS (biopelícula 0 días), B-AMS (biopelícula 30 días), B-AMS (biopelícula 60 días), Ladder 100pb. A) Amplificación gen *amoA* fragmento de 491pb B) Amplificación gen *nxrA* de 322pb.

### 5.2.2. Caracterización molecular mediante PCR-DGGE de comunidad bacteriana nitrificante.

Se obtuvo complejos perfiles del gen 16S rRNA en gel poliacrilamida (DGGE) - tinción nitrato de plata de muestras B-RAS, P-AMS, B-AMS (Ilustración 5-9). Desde los geles se logró recuperar las bandas más densas, las cuales fueron secuenciadas y con esta información se logró obtener una aproximación a la

composición microbiana las bacterias más abundantes. La composición microbiana en las muestras analizadas está formada por tres filos principales. Proteobacteria, subdividido en las clase gamma y beta – proteobacteria, *Bacteroidetes*, subdividido en *Flavobacteriia* y *Cytophagia* y *Nitrospirae* subdividido en la clase *Nitrospira* (tablas 5-7, 5-8)

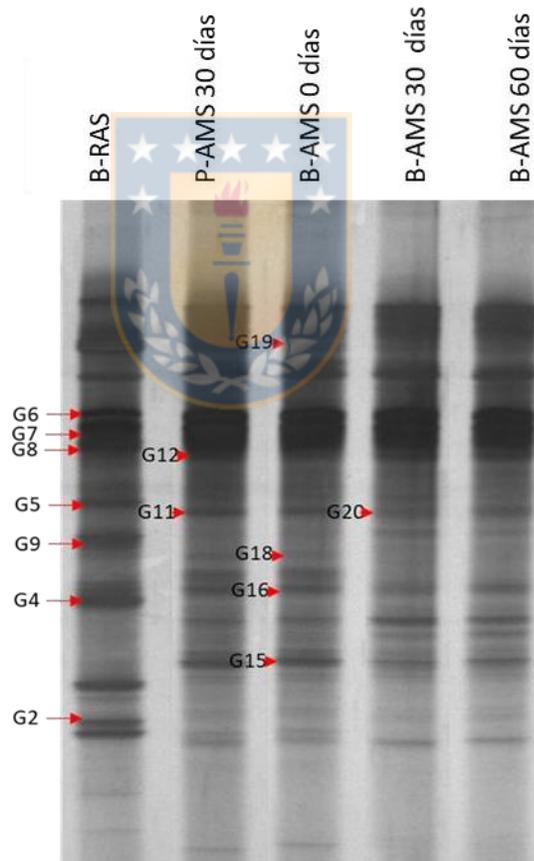


Ilustración 5-9. Perfiles del gen 16S rRNA en gel poliacrilamida (DGGE) -tinción nitrato de plata. Bandas marcadas (flecha roja) fueron cortadas y secuenciadas (Macrogen, inc). Carril 1. B-RAS (muestra directa), carril 2. P-AMS (30 días), carril 3. B-AMS (0 días), carril 4. B-AMS (30 días), carril 5. B-AMS (60 días).

<b>BANDA GEL</b>	<b>IDENTIFICACION</b>	<b>CODIGO</b>	<b>IDENTIDAD %</b>
G-2	<i>Burkholderia sp.</i>	JF522217.1	84,95
G-4	<i>Burkholderia sp.</i>	JF522217.1	90,0
G-5	<i>Pseudoxanthomonas sp.</i>	HF912314.1	96,35
G-6	<i>Variovorax sp.</i>	MK587664.1	96,89
G-7	<i>Variovorax sp.</i>	MN315416.1	97,33
G-8	<i>Variovorax sp.</i>	MN208477.1	100
G-9	<i>Rhodanobacter lindaniclasticus</i>	MH209632.1	97,10
G-11	<i>Nitrospira sp.</i>	KF465624.1	90,29
G-12	<i>Bacteroidetes</i>	JN653169.1	88,24
G-15	<i>Bacteroidetes</i>	DQ167039.1	86,21
G-16	<i>Rivibacter sp.</i>	MF687442.1	90,27
G-18	<i>Aquiflexum sp.</i>	FM176448.1	87,30
G-19	<i>Flavobacterium sp.</i>	MK863541.1	93,75
G-20	<i>Nitrospira sp.</i>	JQ900200.1	99,07

Tabla 5-7. Análisis de las secuencias del gen 16S rRNA obtenidas de las bandas de DGGE (Ilustración 5-9), con las secuencias de la base de datos Genebank.

Taxonomía	Filo	Clase	Orden	Familia	Genero	Identidad %
Bacteria	Proteobacteria	Gamma Proteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Pseudoxanthomonas	96,35
				Rhodanobacteraceae	Rhodanobacter lindaniclasticus	97,10
		Beta proteobacteria	Nitrosomonadales	Nitrosomonadaceae	Nitrosomonas	91,92
				Burkholderiales	Comamonadaceae	Variovorax
			Burkholderiales no clasificados		Rivibacter	90,27
			Burkholderiaceae		Burkholderia	90,0
	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Flavobacterium	93,75
		Cytophagia	Cytophagales	Cyclobacteriaceae	Aquiflexum	87,30
	Nitrospirae	Nitrospira	Nitrospirales	Nitrospiraceae	Nitrospira	99,07

Tabla 5-8. Estructura de la comunidad bacteriana presente en biofiltro-RAS, cultivo planctónico y de biopelículas nitrificantes.



### 5.2.3. Comparación de comunidades bacterianas nitrificantes mediante secuenciación masiva

La secuenciación del fragmento 16S (V3-V4) generó 55191360 pares de bases en las muestras de biopelícula de la muestra original del sistema RAS (B-RAS) y 45475682 pares de bases de la biopelícula de la misma comunidad enriquecida en medio rico en sales de amonio AMS después de 60 días (B-AMS). Desde cada una se obtuvieron 438 y 680 OTUs (Ilustración 5-10), con 423 OTUs exclusivos de las muestras B-RAS y 665 de B-AMS, solo 15 OTUs estuvieron presentes en ambas muestras (Ilustración 5-10). Se observa que un 1,36% (15 secuencias)

son compartidas en ambas muestras (Ilustración 5-11). La muestra original B-RAS contiene el 38,41% de los OTUs totales los cuales se encuentran en concentraciones no detectables en la muestra enriquecida B-AMS 60 días, esta última con 60,23% de OTUS exclusivos. En la Ilustración 5-11, se presentan los 30 OTUs más abundantes. En la muestra original (B-RAS) la composición microbiana está formada principalmente Proteobacteria con representantes mayoritarios (97,83%) en las clases Gammaproteobacteria (Betaproteobacteriales) y Alfaproteobacteria (Rhizobiales), los géneros más abundantes en estas muestras fueron *Acidovorax* (16,21%), *Rhodopseudomonas* (11,85%), *Hyphomicrobium* (8,62%), *Variovorax* (8,09%), *Sphingomonas* (7,74%). En cambio, en las muestras enriquecidas (B-AMS), las mayoritarias pertenecen a Bacteroidetes (Flavobacteriales), Nitrospirae (Nitrospirales) y Gammaproteobacteria (Betaproteobacteriales) con los representantes Unassigned Flavobacteriaceae (12,77%), *Nitrospira* (14,87%) y *Nitrosomonas* (4,67%) entre otros (Ilustración 5-11), en esta última comunidad, Proteobacteria solo está representada en un 37,48%.

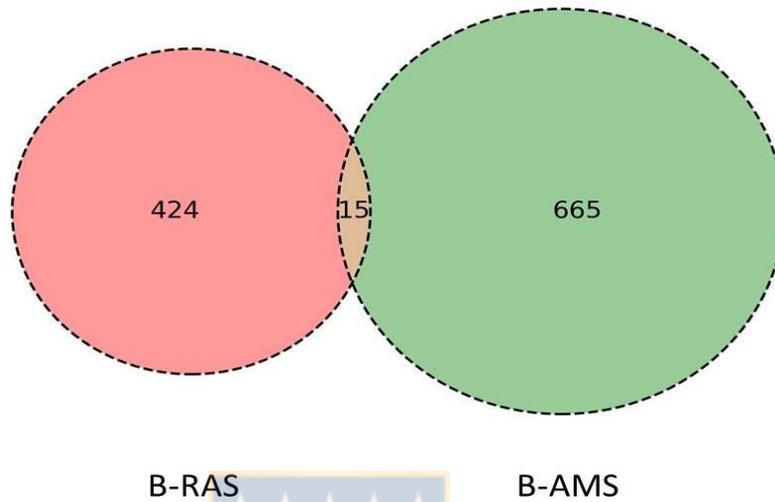


Ilustración 5-10. Diagrama de Venn representando el número de OTUs únicos y coincidente de cada muestra. (B-RAS) Muestra directa biofiltro RAS. (B-AMS) cultivo biopelícula nitrificante en sistema discontinuo (*batch*)

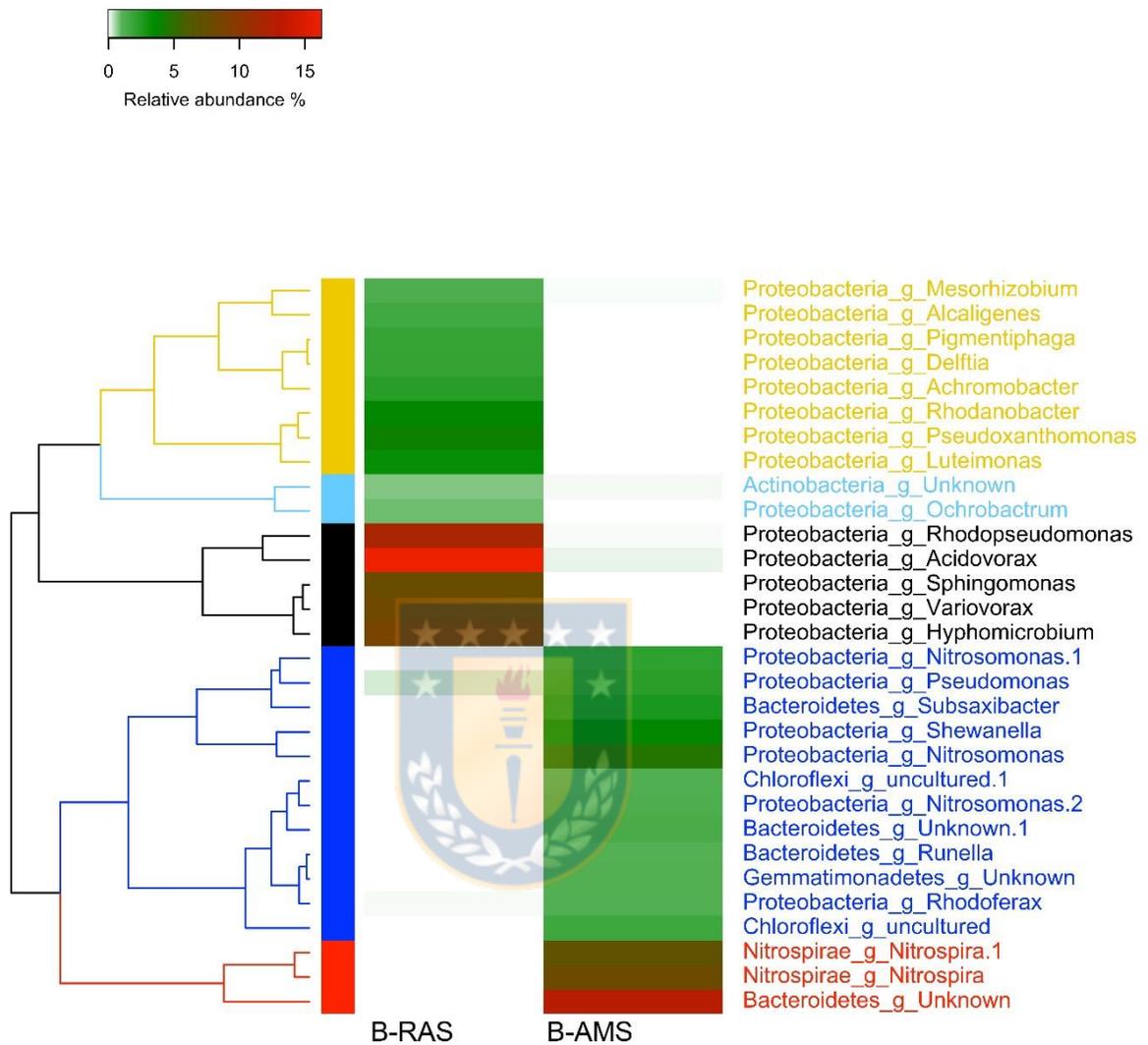


Ilustración 5-11 Heat Map en base a la abundancia relativa de los 30 OTUs más abundantes del total. La escala de abundancia relativa va de 0 (blanco) a 16,21 (rojo) (máximo individual - *Acidovorax*). B-RAS corresponde a muestra directa biofiltro RAS y B-AMS cultivo biopelícula nitrificante en sistema discontinuo (*batch*).

### 5.3. Detección de sistema QS en comunidad bacteriana nitrificante

#### 5.3.1. Detección de autoinductores de tipo AHLs mediante reporteros fluorescentes

La detección de AHL-C8 (250 nM) mediante 3 reporteros de amplio espectro se muestra en la Ilustración 5-12. En las cepas reporteras *Pseudomonas putida* EL105 (RPL4las) y *Pseudomonas putida* EL106 (RPL4cep) fue significativamente mayor la fluorescencia emitida (ANOVA,  $P \leq 0,01$ ) respecto al control, a diferencia de *Escherichia coli* MT102 (pKR – C12) donde el control con solvente (DMSO) produce alta fluorescencia basal que impide la detección de AHL-C8 en las condiciones ensayadas.

Entre las cepas *P. putida* EL105 (RPL4las) y *P. putida* EL106 (RPL4cep) fue significativamente mayor la fluorescencia emitida por la segunda (ANOVA,  $P \leq 0,01$ ), siendo este el reportero seleccionado para los experimentos de detección de AHLs en comunidad nitrificante.

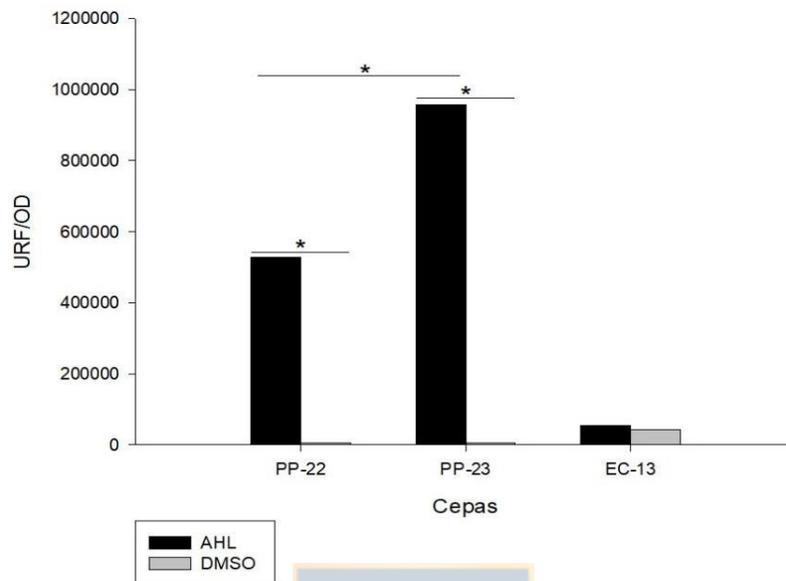


Ilustración 5-12. Detección de AHL-C8 mediante 3 reporteros de AHLs de amplio espectro. PP-22= *Pseudomonas putida* EL105 (RPL4las), PP-23= *Pseudomonas putida* EL106 (RPL4cep) y EC-13= *Escherichia coli* MT102 (pKR – C12). AHL-C8 (150 uM), control= DMSO (solvente de AHL-C8) (Barra de error: desviación estándar, ANOVA  $P \leq 0,01$ ,  $n=3$ ).

### 5.3.2. Detección de moléculas de tipo AHLs en cultivo nitrificante utilizando reportero *P. putida* EL106 (RPL4cep)

Se evaluó la presencia de AHLs en la comunidad bacteriana nitrificante, en ensayo de co-cultivo de la comunidad nitrificante activa frente a reportero de quorum sensing *Pseudomonas putida* EL106 (RPL4cep). Se utilizó medio de cultivo compuesto por 50% medio LB (Luria Bertani, broth Miller, Merck) y 50% medio AMS (medio de sales de amonio) para favorecer el crecimiento de la comunidad nitrificante y del reportero. Se detectó fluorescencia verde a las 24, 48 y 72 h (Ilustración 5-13), mostrando diferencias significativas en comparación con el control negativo ( $P < 0,001$ ). Lo que indica la producción de AHLs desde la comunidad nitrificante. La producción de AHLs en el tratamiento decrece un 43% en un tiempo de 48 horas a diferencia del control positivo al cual se le añadió AHL-C8 de forma exógena que tiene un comportamiento creciente de 91% en un tiempo de 48 horas.

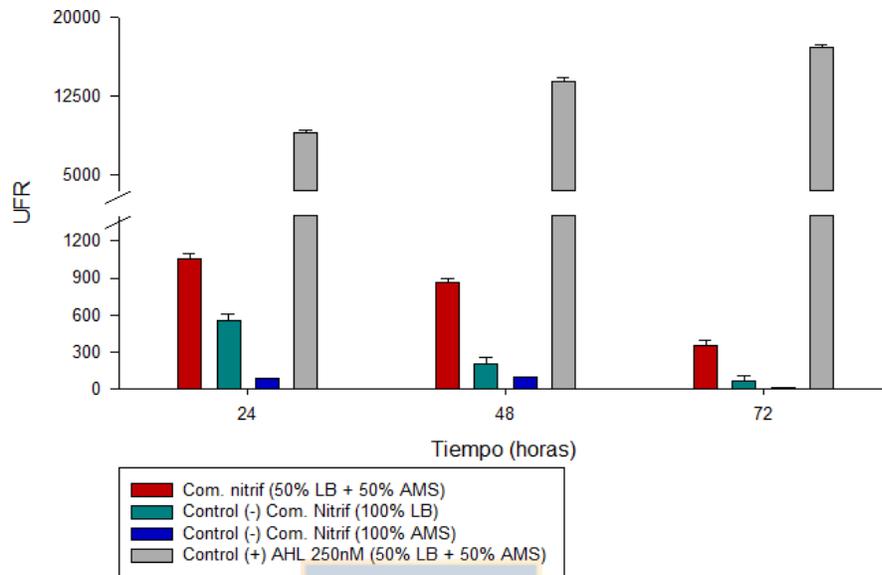


Ilustración 5-13. Detección de AHLs en comunidad nitrificante mediante reportero *P. putida* EL106 (RPL4cep). Tratamiento reportero en co-cultivo con comunidad nitrificante en medio de cultivo 50% LB y 50% AMS (color rojo), control negativo reportero en co-cultivo con comunidad nitrificante en medio 100% LB (color verde), control negativo reportero en co-cultivo con comunidad nitrificante en medio 100% AMS (color azul) y control positivo reportero en co-cultivo con comunidad nitrificante en medio de cultivo 50% LB y 50% AMS con adición exógena de 250 nM de AHL-C8 (color plomo). LB (caldo Luria bertuani), AMS (medio amonio). Barra de error: desviación estándar. ANOVA  $P \leq 0,01$ ,  $n=3$ )

### 5.3.3. Efecto QQ de extractos bacterianos nitrificantes frente a reportero

#### *C. violaceum* ATCC 12472.

Se obtuvieron 5 extractos totales (solvente acetato de etilo) desde cultivo de biopelículas nitrificantes soportadas en polietileno (B-AMS) en sistema *batch* a través de 60 días de cultivo (Tabla 5-9)

<b>Código</b>	<b>Tiempo (días)</b>	<b>Concentración extracto obtenido (mg/ml)</b>
T1	1	0,0012
T2	12	0,0023
T3	24	0,0018
T4	48	0,0041
T5	60	0,0026

Tabla 5-9. Extractos totales (solvente acetato de etilo) obtenidos desde cultivo de biopelículas nitrificantes en sistema discontinuo (*batch*), mediante extracción líquido-líquido.

Para la evaluación de la capacidad de QQ de los extractos obtenidos a distintos tiempos de formación de biopelícula nitrificante, se realizaron ensayos de difusión en discos utilizando reportero *C. violaceum* ATCC 12472. El efecto QQ del reportero *C. violaceum* ATCC 12472, se detectó mediante la pérdida de coloración violeta alrededor de los discos impregnados con los extractos. Se visualizaron halos de inhibición de violaceína generados por extractos obtenidos a los 24, 36, 48 y 60 días de incubación de la biopelícula nitrificante. El extracto que generó un mayor halo de inhibición fue de 41,23 mm (500 µg) y fue obtenido a los 48 días de incubación de la biopelícula nitrificante (Tabla 5-10; Ilustración 5-14).

Tiempo (días)	Diámetro (mm)	Concentración ( $\mu\text{g}$ )
1	$9 \pm 0$	500
12	$11,16 \pm 0,05$	500
24	$17,16 \pm 0,05$	500
48	$41,23 \pm 0,15$	500
60	$25,26 \pm 0,15$	500

Tabla 5-10. Inhibición de violaceína en cepa reportera *C. violaceum* 12472 frente a discos con extractos de sobrenadante de biopelículas nitrificantes aisladas desde RAS.





Ilustración 5-14. Detección de inhibición de sistema QS mediante cepa reportera *C. violaceum* 12472. T1: extracto obtenido a los 12 días de incubación de la biopelícula nitrificante, T2: extracto obtenido a los 24 días de incubación de la biopelícula nitrificante, T3: extracto obtenido a los 36 días de incubación de la biopelícula nitrificante, T4: extracto obtenido a los 48 días de incubación de la biopelícula nitrificante, T5: extracto obtenido a los 60 días de incubación de la biopelícula nitrificante, control negativo (control -): acetato de etilo (Ethyl acetate, grado HPLC, Merck), control positivo (control +): vainillina 70 ( $\mu\text{g/ml}$ ) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

#### 5.3.4. Cuantificación del % de inhibición de violaceína en reportero

##### *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472.

Considerando los resultados obtenidos en el ensayo cualitativo de inhibición de violaceína (ver 5.3.3), se seleccionó el extracto que generó un mayor efecto QQ en reportero *C. violaceum* ATCC 12472 y se cuantificó el porcentaje de inhibición

de violaceína. El extracto T4 (Ilustración 5-15A) fue capaz de inhibir la producción de violaceína del reportero sin afectar la viabilidad de la cepa reportera. 500µg/ml de extracto inhibieron un 98,4% de violaceína (Ilustración 5-15B)

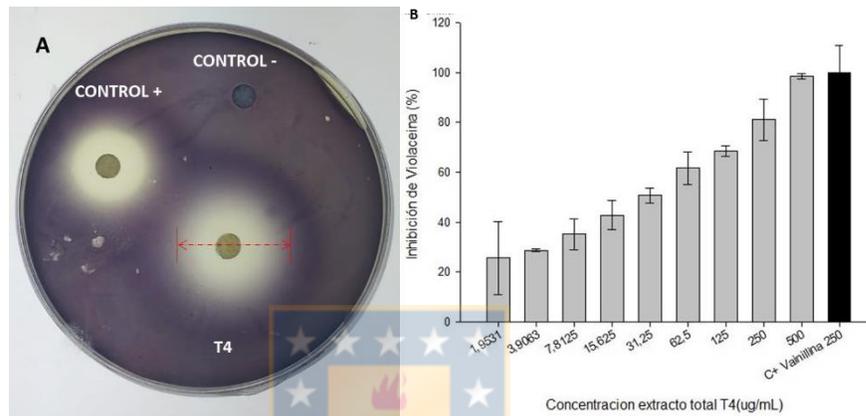


Ilustración 5-15. Inhibición de violaceína mediante cepa reportera *C. violaceum* ATCC 12472. (A) Ensayo actividad biosensora en placa de agar de *C. violaceum* ATCC 12472 frente a extracto T4: a los 48 días de incubación de la biopelícula nitrificante control negativo (control -): acetato de etilo (Ethyl acetate, grado HPLC, Merck), control positivo (control +): vainillina 250 (µg/ml)

## 6. DISCUSION

Los sistemas QS o moléculas de señalización asociadas con comunidades nitrificantes complejas que pertenecen a biofiltros-RAS han sido poco investigados (Ruiz *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2016). En esta tesis se evaluó la prevalencia de QS y QQ en una comunidad bacteriana nitrificante aislada de un biofiltro-RAS de salmónidos, enriquecida con altas concentraciones de amonio. La comunidad de bacterias recuperadas de un biofiltro RAS industrial, fue enriquecida inicialmente en estado planctónico a alta concentración de amonio, para observar su capacidad de consumir amonio, y posteriormente se evaluó este consumo en su estado de biopelículas. La formación de biopelículas mostró un crecimiento exponencial, una tasa específica de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) de  $0.198 \pm 0.04 \text{ d}^{-1}$  ( $R^2$ : 0,99) y tiempo generacional de 3,5 días. Rangos similares fueron reportados previamente, para miembros pertenecientes a los linajes *Nitrosomonas oligotropha* y *Nitrospira*, los cuales presentaron tiempos generacionales de 1,17- 2,0 y 0,75 - 4,8 días respectivamente (Bollmann *et al.*, 2013; Suwa *et al.*, 1994). Respecto a la tasa de consumo de amonio fue de  $9.246 \pm 0.2383 \text{ mg/L /día}$  ( $R^2$ : 0,98) y la tasa máxima de incorporación de amonio ( $\text{pmol NH}_4^* \text{cel}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) calculada fue de  $0.0002 \pm 0.00001$  en biopelículas, resultados similares fueron reportados por Thandar y colaboradores (2016) en donde se obtuvieron tasas de  $0,01 \pm 0.002$  y  $0,0009 \pm 0.00003 \text{ pmol NH}_4^* \text{cel}^{-1} \text{h}^{-1}$  en cultivos puros de *Nitrosomonas mobilis* Ms1 y *Nitrosomonas europaea*

ATCC19718 respectivamente, mientras que Belser y Schmidt (1980) reportaron tasas de  $0,0041 \text{ pmol NH}_4^* \text{cel}^{-1} * \text{h}^{-1}$  en cultivo puro de *Nitrosospira* AV2 y  $0,023 \text{ pmol NH}_4^* \text{cel}^{-1} * \text{h}^{-1}$  en cultivo puro de *Nitrosolobus* AV3. Se ha descrito que la tasa máxima de incorporación de amonio puede variar según las condiciones de cultivo e incluso entre las mismas especies (Belser y Schmidt, 1980; Prosser, 1990) Siendo la concentración total de nitrógeno amoniacal (TAN) uno de los factores más importantes para considerar en el cultivo de biopelículas nitrificantes, diseño y operación de biofiltros (Chen *et al.*, 2006; Feng *et al.*, 2019).

En cuanto a la morfología el cultivo nitrificante planctónico enriquecido con amonio (P-AMS) presento agregaciones o “flóculos de nitrificación” a los 30 días de incubación, los cuales se visualizaron mediante microscopia óptica con tinción de células vivas y muertas (Baclight) (Ilustración 5-6). Este comportamiento ya ha sido reportado por otros investigadores (Stein y Arp, 1998), los que sugieren que la “coagregación” espacial se debe a la simbiosis mutualista propia en la nitrificación bacteriana, donde BON dependen del nitrito producido por BOA y al mismo tiempo las BOA se benefician de la desintoxicación de nitritos por BON.

La formación de biopelícula nitrificante en soportes de polietileno (B- AMS), se visualizó mediante CLSM con tinción baclight. A los 60 días de incubación, se observó una amplia cobertura del material (soporte polietileno) por parte de las bacterias con grosor de  $8 \mu\text{m}$  (Ilustración 5-7) y una distribución no uniforme. Se ha descrito que la nitrificación se logra con mayor eficiencia en sistemas de biopelículas, ya que permiten la coexistencia e interacción de varios gremios microbianos y la formación de gradientes de nutrientes y oxígeno (Flemming *et*

*al.*, 2016). Además, el proceso lento de formación y desarrollo de biopelícula nitrificante en la superficie de material de soporte coincide con lo descrito por otros investigadores con anterioridad (Furumai y Rittmann, 1994; Picioleanu *et al.*, 2001; Tsuneda *et al.*, 2001).

El análisis de perfiles del ADNr 16S mediante técnica PCR-DGGE, permitió la obtención rápida y simultánea de resultados, entregando un panorama general de la población de microorganismos presentes (Muyzer *et al.*, 1993). El hallazgo de Proteobacteria, Bacteroidetes y Nitrospirae como los filos bacterianos dominantes en ensayo PCR-DGGE de las muestras de B-RAS, P-AMS y B-AMS coinciden con investigaciones recientes de biofiltros RAS (Gonzalez-Silva *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2016; Ruan *et al.*, 2015). Las principales bacterias dentro del filo Proteobacteria que se han identificado en comunidades RAS pertenecen a géneros nitrificantes y desnitrificantes (Marchant *et al.*, 2018; Schreier *et al.*, 2010), mientras que los miembros del filo Bacteroidetes se espera contribuyan a la degradación y el consumo de materia orgánica en la comunidad RAS (Kirchman, 2002). Siendo de importancia la clase Flavobacteriia dentro del filo Bacteroidetes como principales contribuyentes a la reducción del óxido nitroso, el último paso durante la desnitrificación (Kuypers *et al.*, 2018) y el filo Nitrospirae que se compone principalmente de bacterias oxidantes de nitrito quimiolitotróficas (Spieck y Bock, 2001).

En el análisis de comparación genómica entre B-RAS y B-AMS, se obtuvo que el cultivo en laboratorio a altas concentraciones de amonio (749 mg/L N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) contribuyó de manera importante en el reemplazo de microorganismos. En los 60 días que duró el enriquecimiento, las muestras directas de biofiltro RAS (B-RAS) se caracterizaron por una comunidad formada principalmente por los géneros *Acidovorax*, *Rhodopseudomonas*, *Hyphomicrobium*, *Variovorax*, *Sphingomonas*, *Pseudoxanthomonas*, *Rhodanobacter*, *Luteimonas*, que en su conjunto constituyeron el 75.5% de la abundancia relativa, fueron reemplazadas por *Nitrospira*, *Flavobacteriaceae* (unassigned genus), *Nitrosomonas*, *Shewanella*, *Pseudomonas*, *Caldilineaceae* (género no asignado y no cultivado), otras *Flavobacteriaceae* (*Subsaxibacter*, *Winogradskyella*, *Maribacter*, *Flavobacterium*, *Cellulophaga*), *Pseudorhodobacter* con aproximadamente 65% de contribución en la abundancia (Ilustración 5-11). El efecto de la alta concentración de amonio en los cambios de diversidad de las comunidades microbianas ya ha sido demostrado por diversos investigadores (Ni *et al.*, 2010; Zekker *et al.*, 2012), produciendo importantes cambios operacionales en el rendimiento de reactores biológicos. En este trabajo, las bacterias nitrificantes en mayor abundancia fueron *Nitrospira* (17.67%) y *Nitrosomonas* (10.37%), oxidante de amonio y oxidante de nitrito, respectivamente, géneros de abundancia y relevancia en biofiltros-RAS (Lee *et al.*, 2016). El medio de cultivo enriquecido con amonio también permitió detectar *Planctomycetes*, con un 1.81% de participación. Los *Planctomycetes* son ubicuos en el suelo, el agua dulce y el

océano, pero también en los biofiltros nitrificantes en RAS (Brailo *et al.*, 2019; Kessel *et al.*, 2010). Este filo contiene bacterias anaeróbicas oxidantes de amonio (anammox) y bacterias aeróbicas quimiolitotrófas (Fuerst y Sagulenko, 2011), sin embargo, ninguno de los géneros de la rama de anammox dentro de los *Planctomycetes* (Sonthiphand *et al.*, 2014) fue reconocida en este trabajo. Estos análisis proporcionaron información sobre los contribuyentes bacterianos críticos presentes en biopelículas nitrificantes y la contribución de las altas concentraciones de amonio en aumentar la abundancia relativa de bacterias asociadas al proceso de nitrificación, lo que podría proporcionar un método alternativo para establecer rápidamente el desarrollo de comunidades en el biofiltro-RAS en etapa de puesta en marcha.

La presencia de moléculas de tipo AHLs en comunidad nitrificante proveniente de biofiltro-RAS utilizando la cepa reportera *P. putida* EL106 (RPL4cep), capaz de detectar de forma específica moléculas de AHL de amplio rango de cadenas (Lumjiaktase *et al.*, 2010), se evaluó mediante ensayo de co-cultivo de la comunidad nitrificante proveniente de biofiltro RAS y el reportero y en este se detectó la presencia de moléculas de tipo AHL en la comunidad nitrificante en las condiciones ensayadas. Lo cual se relaciona con la presencia de QS (genes *luxR* y *luxI*) encontrada en los géneros más abundantes de la comunidad bacteriana nitrificante mediante la búsqueda en la base de datos del NCBI y/o bibliográficamente. Se ha señalado la presencia de N-acil homoserina lactonas

en los géneros *Mesorhizobium*, *Pseudomonas*, *Rhodopseudomonas*, *Acidovorax* y *Sphingomonas* (Chen *et al.*, 2013; Fan *et al.*, 2011; Schaefer *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2004). La presencia de genes *luxI* y *luxR* se han identificado en los géneros *Mesorhizobium* y *Pseudomonas* (Chen *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2004) y el gen activador *luxR* se ha reportado para los géneros *Achromobacter*, *Shewanella* y *Nitrospira* (Mellbye *et al.*, 2017; Morohoshi *et al.*, 2008), mientras que para los géneros *Nitrospira* y *Delftia* se ha informado presencia del gen homólogo *luxI* (Chen y Hickey, 2011; Mellbye *et al.*, 2017) e identificado moléculas de señalización (Balasundararajan y Dananjeyan, 2019; Malešević *et al.*, 2019; Mellbye *et al.*, 2017). Para el género *Nitrosomonas*, se han detectado moléculas de tipo N-acil homoserina lactona mediante los reporteros *Chromobacterium violaceum*, *Agrobacterium tumefaciens* y espectrometría de masas (Burton *et al.*, 2005). La detección de autoinductores (AHLs) y los reportes de genes *luxI* y *luxR* en la comunidad nitrificante investigada podría tener un papel funcional entre los grupos nitrificantes en los biofiltros de RAS y podría fortalecer el comportamiento cooperativo en la comunidad microbiana, mejorando el asentamiento y la optimización de los biofiltros en los sistemas de recirculación de acuicultura.

En cuanto a la evaluación de la presencia de QQ en los extractos totales obtenidos de B-AMS utilizando la cepa reportera *C. violaceum* ATCC 12472. La inhibición de violaceína (pigmento violeta) en la cepa reportera se produjo entre los tiempos 24-60 días de incubación de la biopelícula nitrificante, el mayor halo de inhibición fue de  $41.23 \pm 0.15$  mm y se obtuvo a los 48 días, periodo en que

la biopelícula se encontraba en fase de crecimiento exponencial-tardía. La producción de violaceína de la cepa reportera está regulada por sistema QS a través de las moléculas autoinductoras AHL-C6 y AHL-C4. La inhibición de la producción de violaceína y el proceso de QQ, se puede deber a una inhibición competitiva de moléculas de AHL (distintas de AHL-C6 y AHL-C4) a la proteína receptora *CviR*, un homólogo de *LuxR* en *C. violaceum* ATCC 12472 (Blosser y Gray, 2000), efecto inhibitorio sobre síntesis de sintasa de AHL (transcripción de *luxR*) y/o a la degradación de la molécula señal por enzimas N-acil homoserina lactonasa y N-acil homoserina lactona acilasa (Chen *et al.*, 2013; Murugayah y Gerth, 2019). Los resultados obtenidos se condicen con la presencia de actividad QQ en los extractos totales ensayados y se relacionan con la búsqueda de actividad QQ (base de datos del NCBI) en los géneros más abundantes identificados en la comunidad nitrificante. La presencia de la enzima N-acil homoserina lactona acilasa se ha reportado en los géneros *Variovorax*, *Shewanella* y *Pseudomonas* (Leadbetter y Greenberg, 2000; Morohoshi *et al.*, 2008; Sio *et al.*, 2006) y N-acil homoserina lactonasa en los géneros *Sphingomonas*, *Achromobacter*, *Hyphomicrobium*, *Nitrospira*, *Luteimonas* y *Rhodopseudomonas* (Balasundararajan y Dananjeyan, 2019).

La elevada prevalencia de genes asociados a sistema de QS y QQ, y el balance entre AHLs-QS and AHLs-QQ en comunidades nitrificantes (Feng *et al.*, 2019) podrían estar regulando el proceso de nitrificación en algunos miembros de las comunidades presentes en biofiltros RAS de agua dulce.

## 7. CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES

1. La biopelícula nitrificante de 65 días en reactor discontinuo (*Batch*) a alta concentración de amonio presentó un crecimiento exponencial con una tasa específica de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) de  $0.198 \pm 0.004 \text{ d}^{-1}$  ( $R^2: 0.99$ ), tiempo generacional de 3,5 días y tasa consumo de amonio de  $9.246 \pm 0.2383 \text{ mg/L /día}$  ( $R^2: 0,98$ ).
2. La composición microbiana de la comunidad está formada por tres filos principales Proteobacteria, Bacteroidetes, y Nitrospirae y la utilización de altas concentraciones de amonio en el cultivo de estas, contribuyó en un aumento de la abundancia relativa de bacterias asociadas al proceso de nitrificación.
3. Se detectó la presencia de AHLs en biopelículas nitrificantes y se relacionó con el reporte de genes QS (genes *luxR* y *luxI*) para los géneros más abundantes de la comunidad bacteriana nitrificante.
4. Se detectó la presencia de moléculas QQ en extractos totales obtenidos desde cultivo de biopelícula nitrificante y se relacionó con el reporte de actividad QQ en los géneros más abundantes identificados en la comunidad nitrificante.

Finalmente, se acepta la hipótesis planteada en esta tesis de que la comunidad nitrificante enriquecida desde biofiltro de sistema de recirculación acuícola de salmónidos sintetiza autoinductores de tipo Acil homoserina lactonas (AHLs). Además, de forma complementaria se detectó presencia de actividad QQ en la comunidad nitrificante.

Si bien, la detección de moléculas de tipo AHLs y el proceso de QQ en sistemas-RAS se presenta en esta investigación como un aporte inicial, es información fundamental para comprender el papel de los sistemas de quórum en comunidades de biofiltros-RAS. Mientras que, la identificación de moléculas señal producidas, su efecto en la nitrificación, la formación de biopelículas y el uso potencial de AHLs como herramienta para reducir el tiempo de aclimatación de la biopelícula nitrificante es necesario que sean exploradas en investigaciones futuras.

## 8. GLOSARIO

<b>QS</b>	Quorum Sensing
<b>QQ</b>	Quorum Quenching
<b>AMOA</b>	Enzima amonio monooxigenasa
<b>NXR</b>	Enzima nitrito oxidoreductasa
<b>BOA</b>	Bacteria oxidante de amonio
<b>BON</b>	Bacteria oxidante de nitrito
<b>ANAMMOX</b>	Oxidación anaerobia de amonio
<b>RAS</b>	Sistema de Recirculación Acuícola
<b>NAT</b>	Nitrógeno Amoniacal Total
<b>EPS</b>	Exopolisacaridos
<b>AHL</b>	N-acil homoserina lactona
<b>C8-AHL</b>	N -octanoil- L-homoserina lactona
<b>OXO C8-AHL</b>	N-3-oxooctanoil-L-homoserina lactona
<b>C10-AHL</b>	N- decanoil- L homoserina lactona
<b>C10: 1-AHL</b>	N- decanoil- L homoserina lactona monoinsaturada
<b>C6-AHL</b>	N-hexanoil-L- homoserina lactona
<b>UFR</b>	unidades de fluorescencia relativa
<b>OTUs</b>	OTUs Unidades taxonómicas operativas
<b>AMS</b>	Sales de amonio medio

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, N., and Thompson, S. (2019). The blue dimensions of aquaculture: A global synthesis. *Sci Total Environ* 652, 851-861.
- Arp, D.J., and Bottomley, P.J.J.M.-A.S.f.M. (2006). Nitrifiers: more than 100 years from isolation to genome sequences. 1, 229-234.
- Arvanitoyannis, I.S., and Kassaveti, A. (2008). Fish industry waste: treatments, environmental impacts, current and potential uses. 43, 726-745.
- Badiola, M., Mendiola, D., and Bostock, J. (2012). Recirculating Aquaculture Systems (RAS) analysis: Main issues on management and future challenges. *Aquacultural Engineering* 51, 26–35.
- Balasundararajan, V., and Dananjeyan, B. (2019). Occurrence of diversified N-acyl homoserine lactone mediated biofilm-forming bacteria in rice rhizosphere. *Journal of basic microbiology* 59, 1031-1039.
- Batchelor, S., Cooper, M., Chhabra, S., Glover, L.A., Stewart, G., Williams, P., and Prosser, J.I.J.A.E.M. (1997). Cell density-regulated recovery of starved biofilm populations of ammonia-oxidizing bacteria. 63, 2281-2286.
- Belser, L.W., and Schmidt, E.X. (1980). Growth and oxidation kinetics of three genera of ammonia oxidizers. *FEMS Microbiology Letters* 7, 213-216.
- Beman, J.M., Sachdeva, R., and Fuhrman, J.A. (2010). Population ecology of nitrifying archaea and bacteria in the Southern California Bight. *Environmental microbiology* 12, 1282-1292.
- Blosser, R.S., and Gray, K.M. (2000). Extraction of violacein from *Chromobacterium violaceum* provides a new quantitative bioassay for N-acyl homoserine lactone autoinducers. *Journal of microbiological methods* 40, 47-55.
- Bock, E., and Koops, H. (1992). The genus *Nitrobacter* and related genera In: *The Prokaryotes* (Balows, A., Trüper, HG, Dworkin, KH, Harder, W. and Schleifer, KH, Eds.) (Springer, New York), pp. 2302-2309.
- Bock, E., and Wagner, M.J.T.p. (2006). Oxidation of inorganic nitrogen compounds as an energy source. 2, 457-495.
- Bollmann, A., Sedlacek, C.J., Norton, J., Laanbroek, H.J., Suwa, Y., Stein, L.Y., Klotz, M.G., Arp, D., Sayavedra-Soto, L., Lu, M., *et al.* (2013). Complete genome

sequence of *Nitrosomonas* sp. Is79, an ammonia oxidizing bacterium adapted to low ammonium concentrations. *Standards in genomic sciences* 7, 469-482.

Bolyen, E., Rideout, J.R., Dillon, M.R., Bokulich, N.A., Abnet, C.C., Al-Ghalith, G.A., Alexander, H., Alm, E.J., Arumugam, M., Asnicar, F., *et al.* (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature biotechnology* 37, 852-857.

Brailo, M., Schreier, H.J., McDonald, R., Maršić-Lučić, J., Gavrilović, A., Pećarević, M., and Jug-Dujaković, J.J.A. (2019). Bacterial community analysis of marine recirculating aquaculture system bioreactors for complete nitrogen removal established from a commercial inoculum. *503*, 198-206.

Burton, E., Read, H., Pellitteri, M., and Hickey, W.J.A.E.M. (2005). Identification of acyl-homoserine lactone signal molecules produced by *Nitrosomonas europaea* strain Schmidt. *71*, 4906-4909.

Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., and Holmes, S.P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* 13, 581-583.

Chen, F., Gao, Y., Chen, X., Yu, Z., and Li, X. (2013). Quorum quenching enzymes and their application in degrading signal molecules to block quorum sensing-dependent infection. *Int J Mol Sci* 14, 17477-17500.

Chen, S., and Hickey, W.J. (2011). Development of Tools for Genetic Analysis of Phenanthrene Degradation and Nanopod Production by *Delftia* sp. Cs1-4. *Front Microbiol* 2, 187-187.

Chen, S., Ling, J., and Blancheton, J.-P. (2006). Nitrification kinetics of biofilm as affected by water quality factors. *Aquacultural Engineering* 34, 179-197.

Chen, X., Schauder, S., Potier, N., Van Dorsselaer, A., Pelczer, I., Bassler, B.L., and Hughson, F.M. (2002). Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature* 415, 545-549.

Cheng, W., Hsiao, I.S., and Chen, J.C. (2004). Effect of nitrite on immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Diseases of aquatic organisms* 60, 157-164.

Chung, J., Rittmann, B.E., Wright, W.F., and Bowman, R.H.J.B. (2007). Simultaneous bio-reduction of nitrate, perchlorate, selenate, chromate, arsenate, and dibromochloropropane using a hydrogen-based membrane biofilm reactor. *18*, 199-209.

Crab, R., Avnimelech, Y., Defoirdt, T., Bossier, P., and Verstraete, W. (2007). Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture* 270, 1-14.

Daims, H., Lücker, S., and Wagner, M.J.T.i.m. (2016). A new perspective on microbes formerly known as nitrite-oxidizing bacteria. *24*, 699-712.

De Clippeleir, H., Defoirdt, T., Vanhaecke, L., Vlaeminck, S.E., Carballa, M., Verstraete, W., Boon, N.J.A.m., and biotechnology (2011). Long-chain acylhomoserine lactones increase the anoxic ammonium oxidation rate in an OLAND biofilm. *90*, 1511-1519.

Decho, A.W. (1990). Microbial exopolymer secretions in ocean environments - their role(s) in food webs and marine processes. *Oceanogr Mar Biol* 28, 73-153.

DeLong, D.P., and Losordo, T. (2012). How to start a biofilter (Southern Regional Aquaculture Center).

Dickschat, J.S. (2010). Quorum sensing and bacterial biofilms. *Nat Prod Rep* 27, 343-369.

Dong, Y.H., and Zhang, L.H. (2005). Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *J Microbiol* 43, 101-109.

Ebeling, J., and Timmons, M. (2012). Recirculating Aquaculture Systems. *Aquaculture Production Systems*, 245-277.

Eberhard, A., Burlingame, A.L., Eberhard, C., Kenyon, G.L., Nealson, K.H., and Oppenheimer, N.J. (1981). Structural identification of autoinducer of photobacterium-fischeri luciferase. *Biochemistry* 20, 2444-2449.

Ehrich, S., Behrens, D., Lebedeva, E., Ludwig, W., and Bock, E.J.A.o.M. (1995). A new obligately chemolithoautotrophic, nitrite-oxidizing bacterium, *Nitrospira moscoviensis* sp. nov. and its phylogenetic relationship. *164*, 16-23.

Emparanza, E.J.J.A.e. (2009). Problems affecting nitrification in commercial RAS with fixed-bed biofilters for salmonids in Chile. *41*, 91-96.

Engbrecht, J., Nealson, K., and Silverman, M. (1983). Bacterial bioluminescence - isolation and genetic-analysis of functions from vibrio fischeri. *Cell* 32, 773-781.

Engbrecht, J., and Silverman, M. (1984). Identification of genes and gene-products necessary for bacterial bioluminescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 81, 4154-4158.

Fan, J., Qian, G., Chen, T., Zhao, Y., Liu, F., Walcott, R., and Hu, B. (2011). The acyl-homoserine lactone (AHL)-type quorum sensing system affects growth rate, swimming motility and virulence in *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27, 1155-1166.

Feng, F., Liu, Z.-G., Song, Y.-X., Jiang, C.-K., Chai, X.-L., Tang, C.-J., and Chai, L.-Y. (2019). The application of aged refuse in nitrification biofilter: Process performance and characterization. *The Science of the total environment* 657, 1227-1236.

Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., and Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology* 14, 563-575.

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.

Fuerst, J.A., and Sagulenko, E. (2011). Beyond the bacterium: planctomycetes challenge our concepts of microbial structure and function. *Nature reviews Microbiology* 9, 403-413.

Fuqua, W.C., Winans, S.C., and Greenberg, E.P. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of bacteriology* 176, 269-275.

Furumai, H., and Rittmann, B.E. (1994). Evaluation of multiple-species biofilm and floc processes using a simplified aggregate model. *Water Science and Technology* 29, 439-446.

Gao, J., Ma, A., Zhuang, X., and Zhuang, G.J.A.E.M. (2014). An N-acyl homoserine lactone synthase in the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosospira multiformis*. *80*, 951-958.

Gonzalez-Silva, B.M., Jonassen, K.R., Bakke, I., Østgaard, K., and Vadstein, O. (2016). Nitrification at different salinities: Biofilm community composition and physiological plasticity. *Water Research* 95, 48-58.

Grandclement, C., Tannieres, M., Morera, S., Dessaux, Y., and Faure, D. (2016). Quorum quenching: role in nature and applied developments. *Fems Microbiol Rev* 40, 86-116.

Guimarães, A.S., Travassos, P., Filho, P.W.M.E.S., Gonçalves, F.D., and Costa, F. (2009). Impact of aquaculture on mangrove areas in the northern Pernambuco

Coast (Brazil) using remote sensing and geographic information system. *Aquaculture Research* 41(6), 828–838.

Gutierrez-Wing, M.T., and Malone, R.F.J.A.e. (2006). Biological filters in aquaculture: trends and research directions for freshwater and marine applications. 34, 163-171.

Head, I.M., Hiorns, W.D., Embley, T.M., McCarthy, A.J., and Saunders, J.R.J.M. (1993). The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences. 139, 1147-1153.

Huang, Z., Wan, R., Song, X., Liu, Y., Hallerman, E., Dong, D., Zhai, J., Zhang, H., and Sun, L. (2016). Metagenomic analysis shows diverse, distinct bacterial communities in biofilters among different marine recirculating aquaculture systems. *Aquaculture International* 24, 1393-1408.

Jones, R.D., Morita, R.Y., Koops, H.-P., and Watson, S.W.J.C.j.o.m. (1988). A new marine ammonium-oxidizing bacterium, *Nitrosomonas cryotolerans* sp. nov. 34, 1122-1128.

Kaplan, H.B., and Greenberg, E.J.J.o.b. (1985). Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. 163, 1210-1214.

Kawasaki, N. (2016). Release of Nitrogen and Phosphorus from Aquaculture Farms to Selangor River, Malaysia. *International Journal of Environmental Science and Development* 7, 113-116.

Kessel, M., Harhangi, H., Pas-Schoonen, K., Vossenberg, J., Flik, G., Jetten, M., Klaren, P., and Op den Camp, H. (2010). Biodiversity of N-cycle bacteria in nitrogen removing moving bed biofilters for freshwater recirculating aquaculture systems. *Aquaculture* 306, 177-184.

Kirchman, D.L. (2002). The ecology of Cytophaga-Flavobacteria in aquatic environments. *FEMS Microbiol Ecol* 39, 91-100.

Koops, H., Böttcher, B., Möller, U., Pommerening-Röser, A., and Stehr, G.J.M. (1991). Classification of eight new species of ammonia-oxidizing bacteria: *Nitrosomonas communis* sp. nov., *Nitrosomonas ureae* sp. nov., *Nitrosomonas aestuarii* sp. nov., *Nitrosomonas marina* sp. nov., *Nitrosomonas nitrosa* sp. nov., *Nitrosomonas eutropha* sp. nov., *Nitrosomonas oligotropha* sp. nov. and *Nitrosomonas halophila* sp. nov. 137, 1689-1699.

Kroupova, H., Machova, J., and Svobodova, Z. (2005). Nitrite influence on fish: a review. *Veterinarni Medicina* 50, 461-471.

Kumar, V.R., Sukumaran, V., Achuthan, C., Joseph, V., Philip, R., Singh, I.B.J.I.B., and Biodegradation (2013). Molecular characterization of the nitrifying bacterial consortia employed for the activation of bioreactors used in brackish and marine aquaculture systems. *78*, 74-81.

Kuypers, M.M.M., Marchant, H.K., and Kartal, B. (2018). The microbial nitrogen-cycling network. *Nature Reviews Microbiology* *16*, 263-276.

Lane, D. (1991). 16S/23S rRNA Sequencing. (Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., Eds., *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic*: John Wiley and Sons).

Leadbetter, J.R., and Greenberg, E.P. (2000). Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*. *J Bacteriol* *182*, 6921-6926.

Lee, D.-E., Lee, J., Kim, Y.-M., Myeong, J.-I., and Kim, K.-H. (2016). Uncultured bacterial diversity in a seawater recirculating aquaculture system revealed by 16S rRNA gene amplicon sequencing. *J Microbiol* *54*, 296-304.

Li, Z., and Nair, S.K.J.P.S. (2012). Quorum sensing: how bacteria can coordinate activity and synchronize their response to external signals? *21*, 1403-1417.

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

Lumjiaktase, P., Aguilar, C., Battin, T., Riedel, K., and Eberl, L. (2010). Construction of Self-Transmissible Green Fluorescent Protein-Based Biosensor Plasmids and Their Use for Identification of N-Acyl Homoserine-Producing Bacteria in Lake Sediments. *Appl Environ Microbiol* *76*, 6119-6127.

Malešević, M., Di Lorenzo, F., Filipić, B., Stanisavljević, N., Novović, K., Senerovic, L., Polović, N., Molinaro, A., Kojić, M., and Jovčić, B. (2019). *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing inhibition by clinical isolate *Delftia tsuruhatensis* 11304: involvement of N-octadecanoylhomoserine lactones. *Sci Rep* *9*, 16465-16465.

Malone, R. (2013). Recirculating aquaculture tank production systems: a review of current design practice (Mississippi: Southern Regional Aquaculture Center), pp. 12 pp.

Malone, R.F., and Pfeiffer, T.J.J.A.e. (2006). Rating fixed film nitrifying biofilters used in recirculating aquaculture systems. *34*, 389-402.

Manefield, M., and Turner, S.L.J.M. (2002). Quorum sensing in context: out of molecular biology and into microbial ecology. *148*, 3762-3764.

- Manthe, D.P., Malone, R.F., and Perry, H. (1985). Water quality fluctuations in response to variable loading in a commercial closed blue crab shedding system. *J Shellfish Res* 3, 175-182.
- Marchant, H.K., Tegetmeyer, H.E., Ahmerkamp, S., Holtappels, M., Lavik, G., Graf, J., Schreiber, F., Mussmann, M., Strous, M., and Kuypers, M.M.M. (2018). Metabolic specialization of denitrifiers in permeable sediments controls N<sub>2</sub>O emissions. *20*, 4486-4502.
- Martins, C.I.M., Eding, E.H., Verdegem, M.C.J., Heinsbroek, L.T.N., Schneider, O., Blancheton, J.P., d'Orbcastel, E.R., and Verreth, J.A.J. (2010). New developments in recirculating aquaculture systems in Europe: A perspective on environmental sustainability. *Aquacultural Engineering* 43, 83-93.
- McGee, M.V., and Cichra, C. (2000). Principles of water recirculation and filtration in aquaculture (University of Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and ...).
- McLean, R.J., Pierson, L.S., 3rd, and Fuqua, C. (2004). A simple screening protocol for the identification of quorum signal antagonists. *Journal of microbiological methods* 58, 351-360.
- Mellbye, B.L., Bottomley, P.J., and Sayavedra-Soto, L.A.J.A.E.M. (2015). Nitrite-oxidizing bacterium *Nitrobacter winogradskyi* produces N-acyl-homoserine lactone autoinducers. *81*, 5917-5926.
- Mellbye, B.L., Spieck, E., Bottomley, P.J., and Sayavedra-Soto, L.A. (2017). Acyl-Homoserine Lactone Production in Nitrifying Bacteria of the Genera *Nitrosospira*, *Nitrobacter*, and *Nitrospira* Identified via a Survey of Putative Quorum-Sensing Genes. *Appl Environ Microbiol* 83, e01540-01517.
- Meyerreil, L.A. (1994). Microbial life in sedimentary biofilms - the challenge to microbial ecologists. *Marine Ecology Progress Series* 112, 303-311.
- Molleda, M., Thorarensen, H., and Johannsson, R. (2008). Water Quality in Recirculating Aquaculture Systems (RAS) for Arctic Charr (*Salvelinus alpinus* L.) Culture. (Fisheries Training Programme: The United Nation University).
- Mommsen, T.P., and Walsh, P.J. (1992). Biochemical and environmental perspectives on nitrogen metabolism in fishes. *Experientia* 48, 583-593.
- Morohoshi, T., Nakazawa, S., Ebata, A., Kato, N., and Ikeda, T. (2008). Identification and characterization of N-acylhomoserine lactone-acylase from the

fish intestinal *Shewanella* sp. strain MIB015. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **72**, 1887-1893.

Murugayah, S.A., and Gerth, M.L. (2019). Engineering quorum quenching enzymes: progress and perspectives. *Biochem Soc Trans* **47**, 793-800.

Muyzer, G., de Waal, E.C., and Uitterlinden, A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* **59**, 695-700.

Nasuno, E., Kimura, N., Fujita, M.J., Nakatsu, C.H., Kamagata, Y., and Hanada, S. (2012). Phylogenetically novel LuxI/LuxR-type quorum sensing systems isolated using a metagenomic approach. *Appl Environ Microbiol* **78**, 8067-8074.

Nazar, A., Jayakumar, R., and Tamilmani, G. (2013). *Recirculating Aquaculture Systems*. Central Marine Fisheries Research Institute.

Ng, W.L., and Bassler, B.L. (2009). Bacterial Quorum-Sensing Network Architectures. *Annual Review of Genetics* **43**, 197-222.

Ni, S.-Q., Lee, P.-H., Fessehaie, A., Gao, B.-Y., and Sung, S. (2010). Enrichment and biofilm formation of Anammox bacteria in a non-woven membrane reactor. *Bioresour Technol* **101**, 1792-1799.

Nicolaisen, M.H., and Ramsing, N.B. (2002). Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria. *Journal of microbiological methods* **50**, 189-203.

Parsek, M.R., Val, D.L., Hanzelka, B.L., Cronan, J.E., and Greenberg, E.J.P.o.t.N.A.o.S. (1999). Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *96*, 4360-4365.

Pearson, J.P., Van Delden, C., and Iglewski, B.H.J.J.o.b. (1999). Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *181*, 1203-1210.

Picioreanu, C., van Loosdrecht, M.C., and Heijnen, J.J. (2001). Two-dimensional model of biofilm detachment caused by internal stress from liquid flow. *Biotechnology and bioengineering* **72**, 205-218.

Pommerening-Röser, A., and Koops, H.-P.J.M.r. (2005). Environmental pH as an important factor for the distribution of urease positive ammonia-oxidizing bacteria. *160*, 27-35.

- Pommerening-Röser, A., Rath, G., Koops, H.-P.J.S., and Microbiology, A. (1996). Phylogenetic diversity within the genus *Nitrosomonas*. *19*, 344-351.
- Proisy, C., Viennois, G., Sidik, F., Andayani, A., Enright, J.A., Guitet, S., Gusmawati, N., Lemonnier, H., Muthusankar, G., Olagoke, A., *et al.* (2018). Monitoring mangrove forests after aquaculture abandonment using time series of very high spatial resolution satellite images: A case study from the Perancak estuary, Bali, Indonesia. *Marine Pollution Bulletin* *131*, 61-71.
- Prosser, J.I. (1990). Autotrophic Nitrification in Bacteria. In *Advances in Microbial Physiology*, A.H. Rose, and D.W. Tempest, eds. (Academic Press), pp. 125-181.
- Pulvenis, J.-F. (2020). El estado mundial de la pesca y la acuicultura (SOFIA) (FAO, Roma, Italy: FAO).
- Roder, H.L., Sorensen, S.J., and Burmolle, M. (2016). Studying Bacterial Multispecies Biofilms: Where to Start? *Trends in Microbiology* *24*, 503-513.
- Romero, M., Mayer, C., Muras, A., and Otero, A. (2015). Silencing Bacterial Communication Through Enzymatic Quorum-Sensing Inhibition. In *Quorum Sensing vs Quorum Quenching: A Battle with No End in Sight*, V.C. Kalia, ed. (New Delhi: Springer India), pp. 219-236.
- Rosenthal, H. (1986). Flow-through and Recirculation Systems: Report of the Working Group on Terminology, Format and Units of Measurement (FAO, Roma, Italy: FAO).
- 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.
- Ruan, Y.-J., Guo, X.-S., Ye, Z.-Y., Liu, Y., and Zhu, S.-M.J.N.A.J.o.A. (2015). Bacterial community analysis of different sections of a biofilter in a full-scale marine recirculating aquaculture system. *77*, 318-326.
- Ruiz, P., Vidal, J.M., Sepúlveda, D., Torres, C., Villouta, G., Carrasco, C., Aguilera, F., Ruiz-Tagle, N., and Urrutia, H. (2020). Overview and future perspectives of nitrifying bacteria on biofilters for recirculating aquaculture systems. *12*, 1478-1494.
- Schaefer, A.L., Greenberg, E.P., Oliver, C.M., Oda, Y., Huang, J.J., Bittan-Banin, G., Peres, C.M., Schmidt, S., Juhaszova, K., Sufrin, J.R., *et al.* (2008). A new class of homoserine lactone quorum-sensing signals. *Nature* *454*, 595-599.

Schaefer, A.L., Val, D.L., Hanzelka, B.L., Cronan, J.E., and Greenberg, E.J.P.o.t.N.A.o.S. (1996). Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing: acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein. *93*, 9505-9509.

Schmidt, I., van Spanning, R.J., and Jetten, M.S. (2004). Denitrification and ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea* wild-type, and NirK- and NorB-deficient mutants. *Microbiology (Reading, England)* *150*, 4107-4114.

Schneider, O. (2010). The Netherlands: best practices in managing ecosystem impacts in aquaculture through RAS technologies. *Advancing the Aquaculture Agenda*, 259-273.

Schreier, H.J., Mirazoyan, N., and Saito, K. (2010). Microbial diversity of biological filters in recirculating aquaculture systems. *Curr Opin Biotechnol* *21*, 318-325.

Sedlacek, C.J., Nielsen, S., Greis, K.D., Haffey, W.D., Revsbech, N.P., Ticak, T., Laanbroek, H.J., and Bollmann, A.J.A.E.M. (2016). Effects of bacterial community members on the proteome of the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas* sp. strain Is79. *82*, 4776-4788.

Shaw, P.D., Ping, G., Daly, S.L., Cha, C., Cronan, J.E., Rinehart, K.L., and Farrand, S.K. (1997). Detecting and characterizing *N*-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *94*, 6036-6041.

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.

Sio, C.F., Otten, L.G., Cool, R.H., Diggle, S.P., Braun, P.G., Bos, R., Daykin, M., Cámara, M., Williams, P., and Quax, W.J. (2006). Quorum quenching by an *N*-acyl-homoserine lactone acylase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Infection and immunity* *74*, 1673-1682.

Sonthiphand, P., Hall, M., and Neufeld, J. (2014). Biogeography of anaerobic ammonia-oxidizing (Anammox) bacteria. (*Front Microbiol: Front Microbiol*), pp. 1-14.

Sorokin, D.Y., Muyzer, G., Brinkhoff, T., Kuenen, J.G., and Jetten, M.S.J.A.o.m. (1998). Isolation and characterization of a novel facultatively alkaliphilic *Nitrobacter* species, *N. alkalicus* sp. nov. *170*, 345-352.

Speick, E., and Bock, E. (2001). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol 1, 2th edn (Springer-Verlag).

Starkenbug, S.R., Chain, P.S., Sayavedra-Soto, L.A., Hauser, L., Land, M.L., Larimer, F.W., Malfatti, S.A., Klotz, M.G., Bottomley, P.J., Arp, D.J., *et al.* (2006). Genome sequence of the chemolithoautotrophic nitrite-oxidizing bacterium *Nitrobacter winogradskyi* Nb-255. *Appl Environ Microbiol* 72, 2050-2063.

Stein, L.Y., and Arp, D.J.J.A.E.M. (1998). Loss of ammonia monooxygenase activity in *Nitrosomonas europaea* upon exposure to nitrite. 64, 4098-4102.

Stevens, A.M., Dolan, K.M., and Greenberg, E.P. (1994). Synergistic binding of the *Vibrio fischeri* luxR transcriptional activator domain and RNA-polymerase to the lux promoter region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 12619-12623.

Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., and Costerton, J.W.J.A.R.i.M. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. 56, 187-209.

Suhr, K.I., and Pedersen, P.B. (2010). Nitrification in moving bed and fixed bed biofilters treating effluent water from a large commercial outdoor rainbow trout RAS. *Aquacultural Engineering* 42, 31-37.

Suwa, Y., Imamura, Y., Suzuki, T., Tashiro, T., and Urushigawa, Y. (1994). Ammonia-oxidizing bacteria with different sensitivities to (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in activated sludges. *Water Research* 28, 1523-1532.

Svobodova, Z., Máchová, J., Poleszczuk, G., Huda, J., Hamackova, J., and Kocour Kroupova, H. (2005). Nitrite poisoning of fish in aquaculture facilities with water-recirculating systems: Three case studies. *Acta Vet Brno* 74, 12-137.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30, 2725-2729.

Tang, X., Liu, S., Zhang, Z., and Zhuang, G.J.C.E.J. (2015). Identification of the release and effects of AHLs in anammox culture for bacteria communication. 273, 184-191.

Teske, A., Alm, E., Regan, J., Toze, S., Rittmann, B., and Stahl, D.J.J.o.b. (1994). Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria. 176, 6623-6630.

Thandar, S.M., Ushiki, N., Fujitani, H., Sekiguchi, Y., and Tsuneda, S. (2016). Ecophysiology and Comparative Genomics of *Nitrosomonas mobilis* Ms1 Isolated from Autotrophic Nitrifying Granules of Wastewater Treatment Bioreactor. 7.

Tilahun, A., Haddis, S., Teshale, A., and Hadush, T. (2016). Review on biofilm and microbial adhesion. *International Journal of Microbiology* 7, 63-73.

Tsuneda, S., Park, S., Hayashi, H., Jung, J., and Hirata, A. (2001). Enhancement of nitrifying biofilm formation using selected EPS produced by heterotrophic bacteria. *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research* 43, 197-204.

Turcios, A.E., and Papenbrock, J. (2014). Sustainable Treatment of Aquaculture Effluents—What Can We Learn from the Past for the Future? 6, 836-856.

Val, D.L., and Cronan, J.E.J.J.o.b. (1998). In vivo evidence that S-adenosylmethionine and fatty acid synthesis intermediates are the substrates for the LuxI family of autoinducer synthases. *180*, 2644-2651.

Valdebenito, E., and Urrutia, H. (2016). Caracterización molecular y estudio funcional de bacterias metanotróficas aisladas desde lagunas y bosques de la Región del Bio Bío, Chile. In *Facultad de Ciencias Biológicas (Repositorio UdeC: Universidad de Concepción)*.

Van Gorder, S. (2000). Small scale aquaculture. (The Alternative Aquaculture Association.).

Verdegem, M. (2013). Nutrient Discharge from aquaculture operations in function of system design and production environment. *Reviews in Aquaculture* 5.

Verdegem, M.C.J., Bosma, R.H., and Verreth, J.A.J. (2006). Reducing Water Use for Animal Production through Aquaculture. *International Journal of Water Resources Development* 22, 101-113.

Wang, H., Zhong, Z., Cai, T., Li, S., and Zhu, J. (2004). Heterologous overexpression of quorum-sensing regulators to study cell-density-dependent phenotypes in a symbiotic plant bacterium *Mesorhizobium huakuii*. *Arch Microbiol* 182, 520-525.

Wang, J., Quan, C., Wang, X., Zhao, P., and Fan, S. (2011). Extraction, purification and identification of bacterial signal molecules based on N-acyl homoserine lactones. *4*, 479-490.

Watson, S.W., Bock, E., Valois, F.W., Waterbury, J.B., and Schlosser, U.J.A.o.M. (1986). *Nitrospira marina* gen. nov. sp. nov.: a chemolithotrophic nitrite-oxidizing bacterium. *144*, 1-7.

Watson, S.W., and Waterbury, J.B.J.A.f.M. (1971). Characteristics of two marine nitrite oxidizing bacteria, *Nitrospina gracilis* nov. gen. nov. sp. and *Nitrococcus mobilis* nov. gen. nov. sp. 77, 203-230.

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.*).

Woese, C., Weisburg, W., Paster, B., Hahn, C., Tanner, R., Krieg, N., Koops, H.-P., Harms, H., Stackebrandt, E.J.S., and Microbiology, A. (1984). The phylogeny of purple bacteria: the beta subdivision. 5, 327-336.

Zekker, I., Rikmann, E., Tenno, T., Saluste, A., Tomingas, M., Menert, A., Loorits, L., Lemmiksoo, V., and Tenno, T. (2012). Achieving nitritation and anammox enrichment in a single moving-bed biofilm reactor treating reject water. *Environ Technol* 33, 703-710.

Zhang, W.W., and Li, C.H. (2016). Exploiting Quorum Sensing Interfering Strategies in Gram-Negative Bacteria for the Enhancement of Environmental Applications. *Front Microbiol* 6, 15.

Zhu, S., Shen, J., Ruan, Y., Guo, X., Ye, Z., Deng, Y., and Shi, M. (2016). The effects of different seeding ratios on nitrification performance and biofilm formation in marine recirculating aquaculture system biofilter. *Environmental science and pollution research international* 23, 14540-14548.

Zohar, Y., Tal, Y., Schreier, H., Steven, C., Stubblefield, J., and Place, A. (2005). Commercially Feasible Urban Recirculating Aquaculture: Addressing the Marine Sector. In, pp. 159-172.