



**Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas**

Evaluación de las comunidades microbianas en sedimentos de un área de uso acuícola (Fiordo Puyuhuapi, Chile) y su posible rol como reservorio de *Piscirickettsia salmonis* asociado al proceso productivo.

POR SORAYA BETZABETH VILLAGRÁN CHACÓN

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción para optar al grado de Magíster en Ciencias con Mención en Microbiología

Profesor Tutor

Dr. Víctor Campos Araneda
Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Microbiología
Universidad de Concepción

Profesor co-tutor

Dr. Rodrigo González Saldía
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Departamento de Oceanografía
Universidad de Concepción

Marzo, 2024

Concepción, Chile.

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

© (2024), Soraya Betzabeth Villagrán Chacón

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesor Guía

Dr. Víctor Campos Araneda
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Profesor Co-Guía

Dr. Rodrigo González Saldía
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:

Dr. Apolinaria García Cancino
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Ítalo Fernández Fonseca
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Rubén Moraga Mamani
Facultad de Recursos Naturales Renovables
Universidad Arturo Prat

Director de Programa

Dr. Gerardo González Rocha
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

A mi querido esposo, hijo, padres y amigos que estuvieron conmigo en todo momento alentándome y apoyándome, gracias, los amo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad de Concepción por darme la oportunidad de realizar este Magister, en especial a la Facultad de Ciencias Biológicas Departamento de Microbiología, Laboratorio de Microbiología Ambiental, donde recibí el apoyo de profesores y académicos. También agradecer al Laboratorio de Bioquímica y Biotecnología de Organismos Marinos, Departamento de Oceanografía a través de su Plataforma de Observación Costera, donde recibí ayuda de docentes, técnicos y estudiantes.

Destaco de forma especial la ayuda y compromiso de mi profesor guía Dr. Víctor Campos y mi profesor co-guía Dr. Rodrigo González, de ambos aprendí mucho y fueron un apoyo fundamental en todo momento, gracias por creer y apoyar mi investigación.

Agradezco a mi profesora Dra. Apolinaria García (Profe Pola), por su apoyo, ayuda, consejos y ser un referente para seguir adelante.

Agradezco a mis queridos compañeros de Magister Luciano (Lupi), Christian, Bárbara y Héctor, gracias por la ayuda, por la motivación, por las palabras de aliento. Gracias por los momentos vividos, por su solidaridad y cariño.

Agradezco a mi trabajo en CIEP (Centro de Investigación en Ecosistemas de la Patagonia) y de manera especial al director de CIEP Dr. Giovanni Daneri, por darme la facilidad para realizar este Magister, para poder viajar a Concepción y contar con los horarios para realizar mis ramos, gracias por la oportunidad.

Agradezco a ANID Regional R20F0002 con el proyecto Patser que ejecuta CIEP, ya que gracias a este proyecto fue posible integrarme a las campañas de monitoreo en el Fiordo Puyuhuapi, donde pude realizar mi trabajo en terreno de toma de muestras.

Agradecimientos al proyecto PI2022029, Universidad de las Américas (UDLA), liderado por la investigadora Dra. Paulina Aguayo, que facilitó los fondos para realizar la secuenciación metagenómica de las muestras.

Agradezco a mis familiares y amigos, que siempre estuvieron pendiente de mi estudio, dándome palabras de aliento y apoyo.

Agradezco de manera especial a mis amores, mi esposo César Peyrin y mi hijo Salvador Peyrin, agradezco su amor, su apoyo, su infinita paciencia porque muchas veces mamá estaba estudiando y ellos supieron comprender y valorar mi esfuerzo.

Agradezco a mis padres, María Chacón y Juan Villagrán, por el apoyo, los consejos y por estar presentes en mi vida, por entregarme las herramientas para saber salir adelante a las adversidades.

Dar gracias a las personas que me acogieron en Concepción durante mi estadía, a mi querida suegri Carmen Urrutia y mi amiga de la vida Valeska Salazar, por todo el cariño y apoyo.

Agradezco a Dios, por colocar en mi camino a estas maravillosas personas que de una u otra manera me ayudaron para poder lograr esta ansiada meta.

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	v-vi
TABLA DE CONTENIDOS.....	vii-viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	x-xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUCCIÓN.....	1-19
1. Salmonicultura.....	1-3
2. Microorganismos asociados a los Fiordos.....	4-6
3. Microorganismos en los sedimentos y su rol en el ciclo biogeoquímico.....	7-11
4. <i>Piscirickettsia salmonis</i>	11-15
5. Microorganismos y secuenciación masiva.....	16
6. PCR en tiempo real.....	16-17
7. Biomasa microbiana activa (ATP).....	17-18
8. Modelo Geográfico R con PBS mapping.....	18-19
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	19-21
1. Pregunta de investigación.....	19
2. Hipótesis.....	20
3. Objetivos.....	20-21
3.1. Objetivo general.....	20
3.2. Objetivos específicos.....	21
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22-29
1. Área de estudio.....	22-23
2. Obtención de muestras de sedimento.....	24
3. Determinación de parámetros fisicoquímicos.....	24-25
4. Extracción de ADN genómico.....	25
5. Secuenciación masiva del gen 16S rRNA (Illumina Myseq).....	26

6.	Determinación de <i>Piscirickettsia salmonis</i> PCR en tiempo real	26-27
7.	Biomasa microbiana activa (ATP).....	27
8.	Análisis geoestadístico.....	27-28
9.	Análisis estadísticos y análisis de comunidades bacterianas	28-29
	RESULTADOS.....	29-53
1.	Parámetros fisicoquímicos	29
1.1.	Determinación de Carbono en sedimentos	30
1.2.	Determinación de Nitrógeno en sedimentos.....	31
1.3.	Determinación de Potencial redox en sedimentos.....	32-33
1.4.	Determinación de Materia Orgánica en sedimentos.....	33-34
1.5.	Determinación de Fosforo en sedimentos	33-35
2.	<i>Piscirickettsia salmonis</i>	35-36
3.	Correlación parámetros fisicoquímicos con <i>Piscirickettsia salmonis</i>	37
3.	Biomasa microbiana (ATP)	38
4.	Análisis de las comunidades bacterianas	39-46
5.	Análisis geoestadístico.....	46-53
	DISCUSIÓN	54-60
	CONCLUSIONES	61-62
	PROYECCIONES.....	62-63
	BIBLIOGRAFÍA.....	64-76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resultados de parámetros fisicoquímicos en las tres estaciones de muestreo en las tres fechas de muestreo.....	29
Tabla 2. Coeficiente de correlación de Pearson de <i>Piscirickettsia salmonis</i> con los parámetros fisicoquímicos (P, C, N, Redox y MOT) y correlación entre las parámetros.	37
Tabla 3. Abundancia de phyla bacteriano en porcentaje en las tres estaciones de muestreo.....	39

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Lugar de estudio, Mapa de Chile con Región de Aysén destacada, fiordo Puyuhuapi y estaciones de muestreo ubicadas cerca de Puerto Cisnes.....	23
Figura 2. Gráfico de concentraciones de Carbono en donde se aprecian las diferencias significativas de % de Carbono en las tres estaciones muestreadas, con un $p < 0,05$	30
Figura 3. Gráfico de concentraciones de nitrógeno, en donde se aprecian las diferencias significativas de % de Nitrógeno en las tres estaciones muestreadas, con un $p < 0,05$	31
Figura 4. Gráfico de medición de Potencial Redox, en donde se aprecian las diferencias significativas de Potencial Redox en las tres estaciones muestreadas, con un $p < 0,01$	33
Figura 5. Gráfico de concentración de Materia Orgánica, en donde no se aprecian las diferencias significativas de Materia Orgánica Total (% MOT) en las tres estaciones muestreadas.	34
Figura 6. Gráfico de concentración de Fosforo, en donde se aprecian diferencias significativas de Fosforo (mg/Kg) en las tres estaciones muestreadas con un $p < 0,01$	35
Figura 7. Gráfico de detección de <i>Piscirickettsia salmonis</i> , en donde se aprecian las diferencias significativas de <i>P. salmonis</i> (N° copias/g sed húmedo) en las tres estaciones muestreadas, con un $p < 0,05$	36
Figura 8. Gráfico de concentración de ATP en las dos fechas de muestreos que se realizó el análisis, noviembre 2022 y abril 2023.....	38
Figura 9. Diagrama de racimo de abundancia relativa de los taxas más abundantes (superior al 1%) asignado a las familias bacterianas obtenidas en las estaciones E0, E1 y EC.	41
Figura 10. Diagrama de frecuencia de Estación 0, en donde se aprecia la abundancia relativa por familia de bacterias.....	42
Figura 11. Diagrama de frecuencia de Estación 1, en donde se aprecia la abundancia relativa por familia de bacterias.....	43
Figura 12. Diagrama de frecuencia de Estación Control (EC), en donde se aprecia la abundancia relativa por familia de bacterias.....	44
Figura 13. Cluster dendrograma Bray Curtis en donde se aprecia la similitud entre estaciones acompañado con los índices de Shannon y dominancia de Simpson.	45

Figura 14. Mapa de burbuja con las concentraciones de <i>Piscirickettsia salmonis</i> en las tres estaciones (E0, E1 y EC) en las tres fechas de muestreo.....	48
Figura 15. Mapa de burbujas con las concentraciones encontradas de Carbono, en las tres estaciones muestreadas en las tres fechas de muestreo	49
Figura 16. Mapa de burbujas con las concentraciones encontradas de Fosforo, en las tres estaciones muestreadas en las tres fechas de muestreo	50
Figura 17. Mapa de burbujas con las concentraciones encontradas de Nitrógeno, en las tres estaciones muestreadas en las tres fechas de muestreo	51
Figura 18. Mapa de burbujas con las concentraciones encontradas de Potencial Redox, en las tres estaciones muestreadas en las tres fechas de muestreo	52
Figura 19. Mapa de burbujas con las concentraciones encontradas de Materia orgánica, en las tres estaciones muestreadas en las tres fechas de muestreo	53

RESUMEN

La salmonicultura es una actividad que impacta los sedimentos a través de los residuos de la alimentación. Los microorganismos juegan un rol fundamental en el reciclaje de la materia orgánica; sin embargo, el efecto de la salmonicultura sobre la composición microbiana aún es poco conocido. En particular, *Piscirickettsia salmonis* es una bacteria patógena presente en los cultivos durante largo tiempo en Chile. En este trabajo se estudiaron las comunidades microbianas asociadas al sedimento (metagenómica) y particularmente *P. salmonis* (qPCR), ya que el sedimento podría ser un posible reservorio. Así también, se determinaron los parámetros fisicoquímicos del sedimento (C, N, P, Redox y Materia Orgánica Total), en el área de estudio del fiordo Puyuhuapi. El programa de muestreo fue desde el inicio del periodo productivo (primavera 2022) hasta el otoño 2023. Se obtuvieron muestras en un gradiente desde las balsas jaulas de un centro productivo y hasta 7 kilómetros distante de él. Los resultados demuestran que existe un incremento significativo ($p < 0,05$), en la concentración de C, N, P y Redox, en los sedimentos a través del tiempo y una correlación significativa ($p < 0,05$) de estos parámetros con la señal molecular (Log) de la presencia de *P. salmonis*. Así también, se observó un incremento de la diversidad de bacterias asociadas a la degradación anaeróbica de materia orgánica bajo la balsa jaula. Finalmente se determinó un incremento de la señal molecular de *P. salmonis* en los sedimentos del área de estudio a través del tiempo, siendo este el primer indicio de que esta matriz ambiental pudiese actuar como un reservorio, asociado al proceso productivo de la cría de salmón.

ABSTRACT

Salmon farming is an activity that affects sediments through feed waste. Microorganisms play a fundamental role in the recycling of organic matter; however, the effect of salmon farming on microbial composition is still poorly known. In particular, *Piscirickettsia salmonis* is a pathogenic bacteria present in crops for a long time in Chile. In this work, the microbial communities associated with the sediment (metagenomics) and particularly *P. salmonis* (qPCR) were studied, since the sediment could be a possible reservoir. Likewise, the physicochemical parameters of the sediment (C, N, P, Redox and Total Organic Matter) were determined in the study area of the Puyuhuapi Fjord. The sampling program was from the beginning of the productive period (spring 2022) to autumn 2023. Samples were obtained in a gradient from the cage ponds of a production center and up to 7 kilometers away from it. The results demonstrate that there is a significant increase ($p < 0.05$) in the concentration of C, N, P and Redox, in the sediments over time and a significant correlation ($p < 0.05$) of these parameters with the molecular signal (Log) of the presence of *P. salmonis*. Likewise, an increase in the diversity of bacteria associated with the anaerobic degradation of organic matter was observed under the cage raft. Finally, an increase in the molecular signal of *P. salmonis* was determined in the sediments of the study area over time, this being the first indication that this environmental matrix could act as a reservoir, associated with the productive process of salmon farming.

INTRODUCCIÓN

1. Salmonicultura

La acuicultura constituye una importante fuente de producción de alimentos que contribuye a reducir la presión sobre otros recursos. En el caso de Chile, la acuicultura se ha transformado en uno de los sectores económicos de mayor dinamismo (O’Ryan & Pereira, 2015). Esta industria puede contribuir al desarrollo económico a través del incremento sostenido de su producción, el desarrollo de mercados a nivel nacional e internacional, la generación de nuevas oportunidades de empleos directos e indirectos, así como también mediante otros efectos positivos que se transmiten a las industrias relacionadas. Es bien sabido que muchos recursos pesqueros han sido sobreexplotados y que muchos están actualmente agotados y no pueden satisfacer la demanda mundial de productos del mar. En este contexto, la acuicultura mundial es vista como una industria clave para satisfacer la creciente demanda de alimentos para el consumo humano. Actualmente, la acuicultura suministra más del 50% de todos los productos del mar producidos para el consumo humano, habiendo aumentado la producción 20 veces entre 1970 y 2010 (de 2,6 a 60,4 millones de toneladas por año) con una tasa de crecimiento anual promedio de 7,8% (Troell *et al.*, 2014), dando como resultado la industria de producción de alimentos de más rápido crecimiento en el mundo (FAO, 2014). En Chile la salmonicultura es la principal actividad acuícola, actualmente, el salmón es la mayor exportación distinta del cobre

producen 990 mil toneladas de salmónidos al año, exportando más de 4.300 millones de dólares en 2020, consolidando a Chile como el segundo país productor a nivel mundial después de Noruega, concentrando el 26% de la producción mundial (FAO, 2020). Existe, no obstante, efectos no deseados como subproductos de esta actividad económica, entre otros, impactos negativos sobre el sistema ambiental y natural, competencia por el uso del espacio geográfico, y cambios sociales relacionados con fenómenos migratorios (Phillips, 2010).

La salmonicultura se da preferentemente en las regiones Los Lagos y Aysén, dado las características geográficas y oceanográficas que estas zonas presentan, siendo lugares propicios para dicha actividad (López, 2016). Su aumento ha influido directamente en el medio ambiente donde se desarrolla y pesa la gran amplitud y magnitud de sus efectos ambientales, el conocimiento de esto en Chile es vago en la mayoría de los casos, dado que muchas veces está basado en estudios que no cumplen con estándares técnicos que permitan dar cuenta real de la situación ambiental (Buschmann, 2001). Dentro de las fuentes de contaminación se puede mencionar, el uso indiscriminado de antibióticos en comparación a otros países, debido a que no sólo se les suministra a los peces enfermos, sino que también a los sanos, creando una resistencia a futuros medicamentos. Estos antibióticos potencialmente seleccionan y modifican la distribución ambiental de bacterias resistentes a los antibióticos (Shah *et al.*, 2014). Se han detectado cantidades elevadas de bacterias resistentes a los antibióticos tanto en la columna de agua como en los sedimentos marinos debajo de jaula de cultivo (Cabello *et al.*, 2016). Junto con esto se registran impactos por los desechos orgánicos de peces y los residuos de la alimentación, cuyo efecto principal es la eutroficación de las aguas.

El aumento de nutrientes afecta directamente a la producción de salmones, permitiendo el aumento en la frecuencia e intensidad de las floraciones de microalgas, las cuales al concluir su ciclo, sedimentan y se acumulan en el fondo (Salgado, 2011).

El alimento para peces, la materia fecal y los productos de excreción no consumidos se acumulan en los sedimentos debajo de las jaulas de peces y forman una capa de sedimento negro blando (Buschmann et al., 2006). Estos sedimentos tienen un pH más bajo, concentraciones más altas de materia orgánica y una mayor acumulación de nutrientes, en particular compuestos de fósforo y nitrógeno, que las áreas de referencia. Estos insumos orgánicos modifican las propiedades físicas y químicas del sedimento e influyen en los procesos biogeoquímicos, que alteran la estructura de las comunidades microbianas bentónicas (Fodelianakis et al., 2015).

Las comunidades bacterianas presentes en los sedimentos marinos cumplen la importante función ecológica del ciclo de nutrientes, la mineralización, la degradación y la diagénesis de la materia orgánica (Buschmann et al., 2008). Estas comunidades también juegan un papel vital en la transformación de los contaminantes (Benoit et al., 2003); sin embargo, se desconoce cómo los insumos de la salmonicultura en Chile modifican estas comunidades bacterianas. El uso de antimicrobianos para prevenir y controlar patógenos en la acuicultura del salmón es común en Chile y ha resultado en un aumento de la resistencia a los antibióticos de las bacterias en el medio ambiente (Buschmann et al., 2012).

2. Microorganismos asociados al Fiordos Puyuhuapi.

La zona de los canales y fiordos australes chilenos es una de las más vastas extensiones estuarinas de nuestro planeta, ocupando un área de 240.000 km² (Pantoja *et al.*, 2011). Los ecosistemas subantárticos, como la plataforma interna del sur de Chile (41° a 56° S), se caracterizan por un complejo sistema de fiordos, canales, golfos y bahías. Como zona de estudio se seleccionó el fiordo Puyuhuapi, ubicado en la región de Aysén formado producto del retroceso de dos glaciares que permitió el ingreso de las aguas marinas a su interior y se extiende desde la localidad de Puyuhuapi en el norte (44° 19'S-72°33'O), hasta el canal Moraleda en el sur (44°57'S-73°21'O), donde conecta con el océano abierto (Seguel, 2019). La circulación del agua en el fiordo Puyuhuapi sigue un patrón estuarino caracterizado por un flujo superficial hacia el mar de aguas más dulces del continente y una intrusión de aguas oceánicas a través de los canales Jacaf y Moraleda. Las condiciones hipóxicas por debajo de los 120 m de profundidad son promovidas por la remineralización de la materia orgánica y la presencia de los umbrales de Jacaf y Puyuhuapi que limitan la ventilación (Silva & Vargas, 2014).

El Fiordo Puyuhuapi tiene una longitud aproximada de 105 kilómetros, con profundidades que varían entre los 50 metros en la cabeza del fiordo hasta los 260 metros en el sector central. Este canal no presenta islas en su interior.

El pasaje Galvarino representa un estrechamiento, disminuyendo el ancho del canal de 2 kilómetros a 200 metros (Salvo, 2012).

El fiordo Puyuhuapi, al igual que otros fiordos y canales de la zona austral del país, ha sido escenario del desarrollo de la salmonicultura. Esta actividad no está exenta de costos ambientales, ya que se estima que, en términos espaciales, la 'huella ecológica' (o impacto ambiental) generada por un centro de cultivo de salmónes, puede llegar hasta 10.000 veces al entorno de la actividad misma, ya que conllevan a la modificación del ambiente directo y circundante; por ejemplo, mediante la liberación de alimento no consumido por los peces, que produce variaciones en la concentración de nutrientes, turbidez, concentraciones de oxígeno, conductividad y pH en la columna de agua (Buschmann *et al.*, 2001). De los nutrientes incorporados al ambiente marino, se ha estimado que el 80 — 88% del carbono, 52 — 95% del nitrógeno y 85% del fósforo terminan como químicos disueltos o material particulado en el ambiente marino (Bentzon-Tilia *et al.*, 2016). Estos compuestos se acumulan en el sedimento, lo que disminuye los niveles de oxígeno disponible, aumenta la producción de gases tóxicos, como los sulfuros, por actividad anaeróbica, lo que impacta la diversidad biológica de los sedimentos, permitiendo únicamente la sobrevivencia de aquellos organismos capaces de vivir en estas condiciones (Niklitschek *et al.*, 2013).

Los fiordos y canales de la Patagonia chilena son ecosistemas con una alta producción de materia orgánica y flujo vertical de carbón, donde la degradación de la materia orgánica es realizada principalmente por la comunidad bacteriana (Montero *et al.*, 2011).

Esta comunidad es capaz de procesar una proporción significativa del carbón orgánico que ingresa al sistema, ofreciendo una ruta permanente y fundamental para la transferencia de materia orgánica hacia niveles tróficos superiores (Montero *et al.*, 2011).

Los microorganismos responden a los cambios ambientales modificando su estructura comunitaria y sus características funcionales. En este contexto, los cambios en la calidad y el suministro de materiales alóctonos asociados con las variaciones en los regímenes de entrada de agua dulce y/o el cultivo de salmones en fiordos Patagónicos pueden tener consecuencias directas en las comunidades microbianas costeras (Karl, 2007).

La composición de la comunidad procariótica durante un ciclo anual en un muestreo en el fiordo Puyuhuapi, se encontró comunidades bacterianas *Actinomycetales*, *Rhodobacteraceae*, *Cryomorphaceae* y *Flavobacteriaceae* asociadas con aguas dulces estuarinas, mientras que *Cenarchaeaceae* y *Oceanospirillales* eran representativas de las aguas subantárticas modificadas presentes en el fiordo (Gutiérrez *et al.*, 2018).

En las aguas de los fiordos, las variaciones espaciales (a través del fiordo) y estacionales en la composición de la comunidad microbiana se han relacionado con la disponibilidad de nutrientes (Storesund *et al.*, 2015) y, en los fiordos glaciares, con la variación en la descarga de agua derretida (Gutiérrez *et al.*, 2015).

3. Microorganismos en los sedimentos y su rol en el ciclo Biogeoquímico

Las comunidades bacterianas presentes en los sedimentos marinos cumplen la importante función ecológica del ciclo de nutrientes, la mineralización, la degradación y la diagénesis de la materia orgánica (Buschmann *et al.*, 2009). Estas comunidades también juegan un papel vital en la transformación de los contaminantes; sin embargo, se desconoce cómo los insumos de la salmonicultura en Chile modifican estas comunidades bacterianas. El uso de antimicrobianos para prevenir y controlar patógenos en la acuicultura del salmón es común en Chile, ha resultado en un aumento de la resistencia a los antibióticos de las bacterias en el medio ambiente (Buschmann *et al.*, 2012).

Las comunidades microbianas brindan información útil sobre el cambio ambiental. Los microorganismos están presentes en prácticamente todos los entornos y suelen ser los primeros organismos en reaccionar a los cambios químicos y físicos en el medio ambiente. Los cambios en las comunidades microbianas suelen ser un precursor de los cambios en la salud y la viabilidad del medio ambiente en general (Lima, 2018). Los cambios en las comunidades de bacterias del sedimento dentro y alrededor de las operaciones acuícolas son complejos y provocan una alteración debido a la descomposición de los productos resultantes de los insumos y las materias primas que promuevan la proliferación de bacterias, cuya fuente de alimento es la materia orgánica. Este proceso afecta la interacción química, física y estructural de la relación agua-sedimento en los ecosistemas acuáticos (Burbano *et al.*, 2021). Por lo tanto, la atención científica para comprender las complejidades ambientales y caracterizar los

impactos es fundamental.

Los microorganismos son generalmente los primeros en responder a los cambios químicos y físicos en el medio ambiente y, debido a su bajo nivel trófico, pueden usarse como indicadores de cambios ambientales (Zak *et al.*, 2011). Los sedimentos debajo de las piscifactorías brindan herramientas adecuadas para monitorear la respuesta de las comunidades bacterianas a las perturbaciones de la acuicultura, porque los insumos y la carga orgánica se monitorean y depositan constantemente, y se conoce el sitio de deposición (Fodelianakis *et al.*, 2015).

Los microorganismos son componentes ecológicamente importantes y funcionalmente diversos de los ambientes que sustentan una variedad de procesos y funciones de los ecosistemas (Clark *et al.*, 2018). Las bacterias contribuyen en gran medida a los procesos biogeoquímicos y la circulación de nutrientes en los ecosistemas acuícolas (Madsen, 2011). Las comunidades bacterianas de sedimentos degradan la materia orgánica en los sedimentos por mineralización (Chen *et al.*, 2018), y desempeñan un papel clave en la descomposición de la materia orgánica disuelta en el agua y depositan los metabolitos de las bacterias degradadas en los sedimentos en forma de partículas de materia orgánica (Winton *et al.*, 2019).

Los efectos potenciales de los desechos orgánicos de la acuicultura del salmón sobre la actividad y la estructura comunitaria de los microorganismos han recibido poca atención (Montero *et al.*, 2021). Los sedimentos son el principal sumidero de contaminantes antropogénicos en los ecosistemas acuáticos y desde allí estas sustancias son reintroducidas continuamente en la columna de agua por medio de resuspensión y transferencia trófica, facilitando su

bioacumulación y por tanto efectos adversos en la biota (Barraza, 2019). En ecosistemas de fiordos, la salmonicultura suministra sustratos disueltos alóctonos a través de la disolución de partículas orgánicas derivadas de heces y alimentación (Wang *et al.*, 2012). Este material orgánico se considera altamente degradable (Nimptsch *et al.*, 2015) y podría proporcionar sustratos orgánicos para la actividad microbiana (Kamjunke *et al.*, 2017). Dado que los sedimentos constituyen sumideros de contaminantes y fuentes de éstos al variar las condiciones ambientales, principalmente pH, potencial redox, cantidad de materia orgánica, temperatura, contenido de oxígeno, entre otros (Barroso *et al.*, 2022). Algunas características geoquímicas y fisicoquímicas de los sedimentos marinos pueden ayudar a comprender el sistema de corrientes, el estado de la condición óxido-reductora en el fondo, la densidad de la población de la fauna bentónica, la actividad de los microorganismos y la naturaleza del depósito sedimentario (Martínez, 2016). La disminución de la concentración de oxígeno disuelto afecta la muerte o migración de la macrofauna que generalmente son responsables de la bioirrigación de los sedimentos, por lo que las condiciones anóxicas se propagan más severamente (Chávez-Crooker & Obreque-Contreras, 2010). Un ambiente sedimentario permite que se lleven a cabo múltiples procesos microbianos por la existencia de diferentes condiciones redox y aceptores de electrones intrínsecos.

En sedimentos reducidos existen microorganismos enzimáticamente activos capaces de sobrevivir en ambientes ya sea con un pH alto o bajo y en condiciones de oxidación o reducción (Rios, 2015). Las comunidades bacterianas marinas

pueden tener diferentes niveles de sensibilidad o tolerancia a los cambios de pH/pCO₂ en función de su resiliencia fisiológica, que está determinada por su exposición ambiental a condiciones homogéneas o heterogéneas de pH/pCO₂ (Aguayo *et al.*, 2020). El enriquecimiento orgánico también puede resultar en una mayor abundancia de bacterias y virus patógenos asociados con detritos orgánicos (Chávez-Crooker y Obreque-Contreras, 2010). Los microorganismos intervienen en muchos procesos importantes en el medio ambiente acuático, incluidos autpurificación, reciclaje de nutrientes y desarrollo de tolerancia a metales pesados (León *et al.*, 2018). Los procesos microbianos juegan un papel importante en el mantenimiento de la química del agua y sedimento. Estos procesos microbianos están influenciados por la calidad del agua, parámetros como amonio, nitrito, nitrato, sulfuro y oxígeno disuelto (Fernández *et al.*, 2008). El subsuelo marino puede albergar millones de microorganismos procariotas (Whitman *et al.*, 1998), Además, es bien sabido que las poblaciones microbianas responden rápidamente a los cambios ambientales, por lo que podrían ser útiles para evaluar alteraciones en las condiciones bentónicas, es decir, los efectos de la piscicultura en los sedimentos subyacentes (Luna *et al.*, 2012).

En los sedimentos fuertemente enriquecidos en materia orgánica y empobrecidos en oxígeno, como los que se encuentran en los centros de cultivos, los flujos de mineralización de carbono son impulsados completamente por bacterias anaeróbicas, que aumentan la acumulación y las emisiones de sulfuro (Hargrave *et al.*, 2008).

Si bien la calidad de las aguas superficiales es una medida útil para evaluar la diversidad microbiana y la salud general de los ecosistemas acuáticos, los estudios han demostrado que los sedimentos suelen ser reservorios más robustos de diversas poblaciones microbianas, incluidos patógenos, así como bacterias indicadoras ecológicas (Abia *et al.*, 2019).

4. *Piscirickettsia salmonis*

La septicemia Rickettsial Salmonídea (SRS) o piscirickettsiosis es una enfermedad sistémica producida por la bacteria intracelular *Piscirickettsia salmonis* (*P. salmonis*), la cual es responsable de la alta mortalidad en la industria de cultivo de especies salmonídeas en Chile (Lannan & Fryer, 1993). Los primeros brotes de *piscirickettsiosis* en Chile se presentaron a fines del año 1989, aunque se ha sugerido que ésta habría estado presente desde 1981. Inicialmente se describió sólo en salmón Coho (Síndrome del salmón Coho), pero pronto fueron afectadas todas las especies salmonídeas cultivadas en Chile, llegando a producir hasta un 90% de mortalidad en algunos centros de cultivo (Cvitanich *et al.*, 1991). En 1990 se aisló el organismo desde una línea celular de embrión de

Salmón Rey y fue clasificado como una rickettsia (Fryer *et al.*, 1992). La patogenicidad de este organismo fue confirmada en 1991 por el cumplimiento de los postulados de Koch (Ingraham & Ingraham 1998). El aislado chileno ha sido clasificado como *Piscirickettsia salmonis*, un nuevo género de rickettsia y una nueva especie bacteriana (Fryer *et al.*, 1992). Los signos clínicos externos de SRS en peces incluyen coloración corporal oscura y acentuada palidez branquial consecuencia de anemia severa, marcada exoftalmia bilateral, masas eritematosas, erosiones cutáneas, pequeñas manchas blancas, úlceras y extensas áreas descamadas (Larenas *et al.*, 1996). Los signos internos más comunes de infección son: esplenomegalia y renomegalia. Además se puede presentar ascitis hemorrágica sobre la grasa visceral, estómago, vejiga natatoria y en la musculatura corporal (Cvitanich *et al.*, 1991). La infección sistémica también afecta otros órganos como hígado, ovario y branquias (Wilhem *et al.*, 2006). Las lesiones microscópicas más importantes se encuentran en el hígado, riñón, bazo e intestino y también se pueden observar cambios patológicos en cerebro, corazón, ovario y branquias (Chen *et al.*, 2000). *P. salmonis* puede ser transmitida horizontalmente a peces sanos, que cohabitan con peces inoculados en ausencia de vectores o por contacto directo (Fryer & Hedrick, 2003), existiendo un sinergismo con la densidad poblacional y el estrés. Los sitios de entrada más probables del agente, serían piel y branquias intactas. La alta mortalidad obtenida en peces inyectados en forma subcutánea sugiere que los ectoparásitos pueden jugar un rol importante en la transmisión natural de la enfermedad (Smith *et al.*, 1999).

La temperatura más favorable para producir la enfermedad en condiciones experimentales es de 14° C, lo cual es cercano a la temperatura óptima de replicación *in vitro* de la bacteria, que va entre los 15° C a 18° C. Su multiplicación *in vitro* disminuye bajo los 10° C y sobre los 21° C y se detiene sobre los 25° C (Larenas *et al.*, 1997). También se ha demostrado experimentalmente que *P. salmonis* puede ser transmitida desde machos o hembras de trucha arcoiris infectados, a su prole (Larenas *et al.*, 1996). La bacteria se une a la superficie de las ovas por medio de extensiones tipo pseudópodos que aparentemente emergen desde la membrana externa y se unen al corion de la ova (Larenas *et al.*, 2003). Los peces infectados de forma vertical se pueden transformar en portadores asintomáticos de la enfermedad. Sin embargo, no se sabe si estos peces desarrollan signos clínicos de la enfermedad luego de una subsiguiente exposición al agente o si se vuelven refractarios a la infección (Larenas *et al.*, 2003). La respuesta celular innata es el mecanismo protector más importante en peces y *P. salmonis* es capaz de infectar, sobrevivir, replicarse y propagarse en la línea celular RTS11 (trucha arcoiris) de células tipo macrófago/monocitos lo que demuestra que la bacteria tiene la capacidad de infectar, sobrevivir y propagarse dentro de macrófagos de salmónidos y células tipo monocitos. La infección de células del sistema inmune innato de salmónidos sin inducir una respuesta importante de muerte celular puede conducir a la persistencia de la bacteria *P. salmonis* y consecuentemente a su diseminación a otros tejidos, favoreciendo la evasión de la primera línea de defensa contra patógenos (Rojas *et al.*, 2009).

P. salmonis es un patógeno/patobionte, oportunista/endógeno ambiental, cuya capacidad para producir enfermedad es fuertemente y desencadenada por condiciones ambientales que inciden en la salud de sus huéspedes salmones, sugiere que la aparente mayor virulencia de *P. salmonis* en Chile involucra factores ambientales externos (Barthlomew *et al.*, 2017).

Las comunidades bacterianas presentes en los sedimentos marinos cumplen la importante función ecológica del ciclo de los nutrientes, la mineralización, la degradación y la diagénesis de la materia orgánica (Buschmann *et al.*, 2009).

Debido a que las comunidades microbianas responden rápidamente a la variación ambiental, la identificación de cambios en la composición y función microbiana de los sedimentos representa un indicador útil de los impactos de la acuicultura en los ambientes costeros. Se ha sospechado la existencia de reservorios marinos de *P. salmonis*, pero estos siguen siendo relativamente desconocidos. Actualmente, no hay información sobre la distribución de *P. salmonis* en el medio marino fuera del pez huésped, en particular, su presencia en el agua, sedimentos, biopelículas, entre otros. Aunque existe evidencia anecdótica sobre la participación de parásitos externos e isópodos, no se sabe en qué medida estos organismos desempeñan un papel en la transmisión de la enfermedad (Steven *et al.*, 2019).

P. salmonis puede sobrevivir hasta 14 días en agua salada, solo un estudio informó bacterias de vida libre después de hasta 40 días en el agua de mar que

rodea un centro con brote de enfermedad (Olivares & Marshall, 2010). Se sabe que *P. Salmonis* está inactivo por encima de 20°C y el óptimo para la replicación es entre 15-18°C. No hay información disponible hasta la fecha sobre la prevalencia de *P. salmonis* alrededor de los centros de peces. Bacterias marinas como *Vibrio vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *Yersinia ruckeri*, *Flavobacterium psychrophilum*, y *Aeromonas salmonicida* han sido detectadas en agua y sedimentos alrededor de centros de producción. Sin embargo, no se dispone de información sobre la presencia o el potencial de supervivencia de *P. salmonis* en el agua y los sedimentos. Es posible que *P. salmonis* sobreviva en sedimentos acuáticos que pueden resuspenderse en la columna de agua con el tiempo (Steven *et al.*, 2019).

En un estudio llevado a cabo en el Mar Adriático, se comprobó la presencia de vibrios en la zona costera y su asociación con el sedimento, encontrándose las cepas de *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio parahaemolyticus* con una persistencia de los vibrios en el agua de mar y como reservorio acuático adicional que es el sedimento (Harriague *et al.*, 2008).

La existencia de peces silvestres asintomáticos infectados con *P. salmonis* demuestra que la bacteria puede persistir sin ser detectada en ambientes marinos durante largos periodos de tiempo, por lo tanto *P. salmonis* puede ser un patógeno oportunista de transmisión ambiental bien adaptado (Avendaño, 2021).

5. Microorganismos y secuenciación masiva

Para determinar los microorganismos en una muestra, se parte del ADN que se extrae, se amplifica y se secuencian los genes que codifican para la subunidad 16S del ARN (ácido ribonucleico) ribosomal, molécula antigua ya propuesta por Carl Woese en 1975, pero presente en todas las bacterias actuales, y cuya estructura y función han permanecido constantes a lo largo del tiempo. La subunidad 16S del ARN ribosomal es considerada como la diana universal para la identificación bacteriana, por sus características y propiedades que permiten la caracterización taxonómica de las bacterias, pudiendo discernir hasta nivel de género y en algunos casos de especie (Valenzuela *et al.*, 2015). Con la utilización del gen de referencia, las técnicas moleculares de secuenciación masiva y las herramientas para análisis de datos, se ha podido conseguir información sobre los microorganismos, con un nivel de detalle sin precedente en cuanto a taxonomía y función de los microorganismos, recuperando la mayor diversidad posible de especies, aunque son precisos más estudios para reconocer a los microorganismos en su entorno natural (Suárez *et al.*, 2019).

6. PCR en tiempo real

qPCR se ha utilizado ampliamente en la ecología microbiana para determinar la abundancia de genes en diferentes ambientes. Por otra parte, la

transcripción inversa del ARN en ADNc se combina con qPCR y RT-qPCR para cuantificar la expresión génica. Por lo tanto, qPCR y RT-qPCR representan métodos rápidos y eficaces para la cuantificación de números de genes y / o de transcripción dentro de las muestras ambientales. Los microorganismos en los sedimentos experimentan varios procesos en los ecosistemas, incluyendo la mineralización de la materia orgánica, la degradación de los contaminantes y el ciclo biogeoquímico de los macronutrientes como el nitrógeno (Fogel *et al.*, 2019). Tiempo real de reacción en cadena de polimerasa también conocida como PCR cuantitativa (q-PCR) es una herramienta ampliamente utilizada en la ecología microbiana de cuantificar la abundancia de genes de grupos taxonómicos y funcionales en muestras ambientales. Utilizado en combinación con una reacción de transcriptasa inversa (RT-q-PCR), también se puede emplear para cuantificar la transcripción de genes. q-PCR hace uso de la química de detección fluorescentes altamente sensibles que permiten la cuantificación de los amplicones de PCR durante la fase exponencial de la reacción (Tatti *et al.*, 2016).

7. Biomasa microbiana viva (ATP)

Adenosintrifosfato (ATP) tiene varias características únicas que lo convierten en un indicador confiable de la biomasa microbiana en ambientes acuáticos. La presencia de ATP es una molécula marcadora de células metabólicamente activas (Templer *et al.*, 2011).

Los sedimentos debajo de las balsas jaulas entregan información importante para monitorear la respuesta de las comunidades bacterianas a las perturbaciones ambientales, porque los insumos y la carga orgánica se monitorean y depositan constantemente, y se conoce el sitio de deposición (Fodelianakis *et al.*, 2015). Las comunidades bacterianas de sedimentos degradan la materia orgánica en los sedimentos por mineralización (Chen *et al.*, 2018), y desempeñan un papel clave en la descomposición de la materia orgánica disuelta en el agua y depositan los metabolitos de las bacterias degradadas en los sedimentos en forma de partículas de materia orgánica (Winton *et al.*, 2019). La degradación de la materia orgánica es un proceso inherente en todos los microorganismos y la medición de adenosina 5'-trifosfato (ATP) en sedimentos nos entrega una estimación de la biomasa microbiana viva o activa (Holm-Hansen & Booth 1966). La concentración de ATP se utiliza como indicador de biomasa viva en estudios ecológicos de microorganismos acuáticos (Karl, 1993).

8. Modelo Geográfico R con PBS mapping.

R es un sistema integrado al que se añaden complementos que reciben el nombre de paquetes (packages). En este caso se utilizó el paquete PBSmapping (<https://cran.r-project.org/web/packages/PBSmapping/>).

El paquete de software PBS Mapping amplía los lenguajes estadísticos R y S-PLUS para incluir funciones de trazado bidimensional similares a las comúnmente disponibles en un Sistema de Información Geográfica (SIG) (Schnute *et al.*, 2015).

Un paquete es un conjunto de funciones que mantienen algún tipo de relación entre ellas, y que generalmente vienen acompañadas de archivos de ayuda y de ficheros de datos. Se utilizó el paquete para la construcción de cartogramas de los resultados obtenidos. En el presente trabajo se realizó un estudio del sedimento en un centro de cultivo del fiordo Puyuhuapi, realizando un muestreo bajo el centro de cultivo y con un gradiente distante de 1 y 7 kilómetros del centro de cultivo, donde se midió los parámetros fisicoquímicos, diversidad microbiana y cuantificación molecular de la bacteria *Piscirickettsia salmonis*.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Pregunta de investigación

¿Influirá el cultivo de salmónes sobre las comunidades bacterianas en los sedimentos permitiendo la presencia de especies patógenas como *Piscirickettsia salmonis*?

2. Hipótesis

El impacto antropogénico del cultivo del salmón en el ecosistema de fiordos de la Patagonia chilena modifica la diversidad microbiana de los sedimentos afectados, permitiendo la acumulación de microorganismos patógenos para la acuicultura como *P. salmonis*.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Caracterizar las comunidades bacterianas asociadas con el sedimento impactado por la actividad del cultivo del salmón y cuantificar la presencia molecular de la bacteria *Piscirickettsia salmonis* en sedimentos del fiordo Puyuhuapi.

3.2 Objetivos específicos

- 1) Determinar la diversidad y abundancia relativa de las comunidades microbianas en el sedimento de un centro de cultivo de salmónes en el fiordo Puyuhuapi.
- 2) Determinar las asociaciones entre las características fisicoquímicas del sedimento y las comunidades bacterianas producto del impacto de la actividad acuícola.

- 3) Determinar la presencia molecular de la bacteria patógena *Piscirickettsia salmonis* en sedimentos intervenidos mediante PCR en tiempo real.
- 4) Determinar la dispersión de la bacteria *Piscirickettsia salmonis* asociada a los factores fisicoquímicos ambientales, mediante un modelo de geográfico R con PBS mapping.

MATERIALES Y MÉTODOS

En esta sección se detalla la metodología experimental llevada a cabo junto con la instrumentación utilizada para realizar los correspondientes ensayos y análisis.

1. Área de estudio

El área de estudio correspondió al fiordo Puyuhuapi (figura 1), donde se realizaron tres campañas de muestreo (septiembre 2022; noviembre 2022 y abril 2023). Las muestras fueron obtenidas de sedimentos en una gradiente desde el centro de cultivo en tres sitios: E0 bajo balsa jaula de cultivo ($44^{\circ}44'42.00''\text{S}$; $72^{\circ}43'26.58''\text{O}$); E1 a 1 km del centro ($44^{\circ}44'21.65''\text{S}$; $72^{\circ}44' 02.76''\text{O}$) y EC estación control a 7 km del centro ($44^{\circ}40'38.77''\text{S}$; $72^{\circ}43'43.87''\text{O}$).

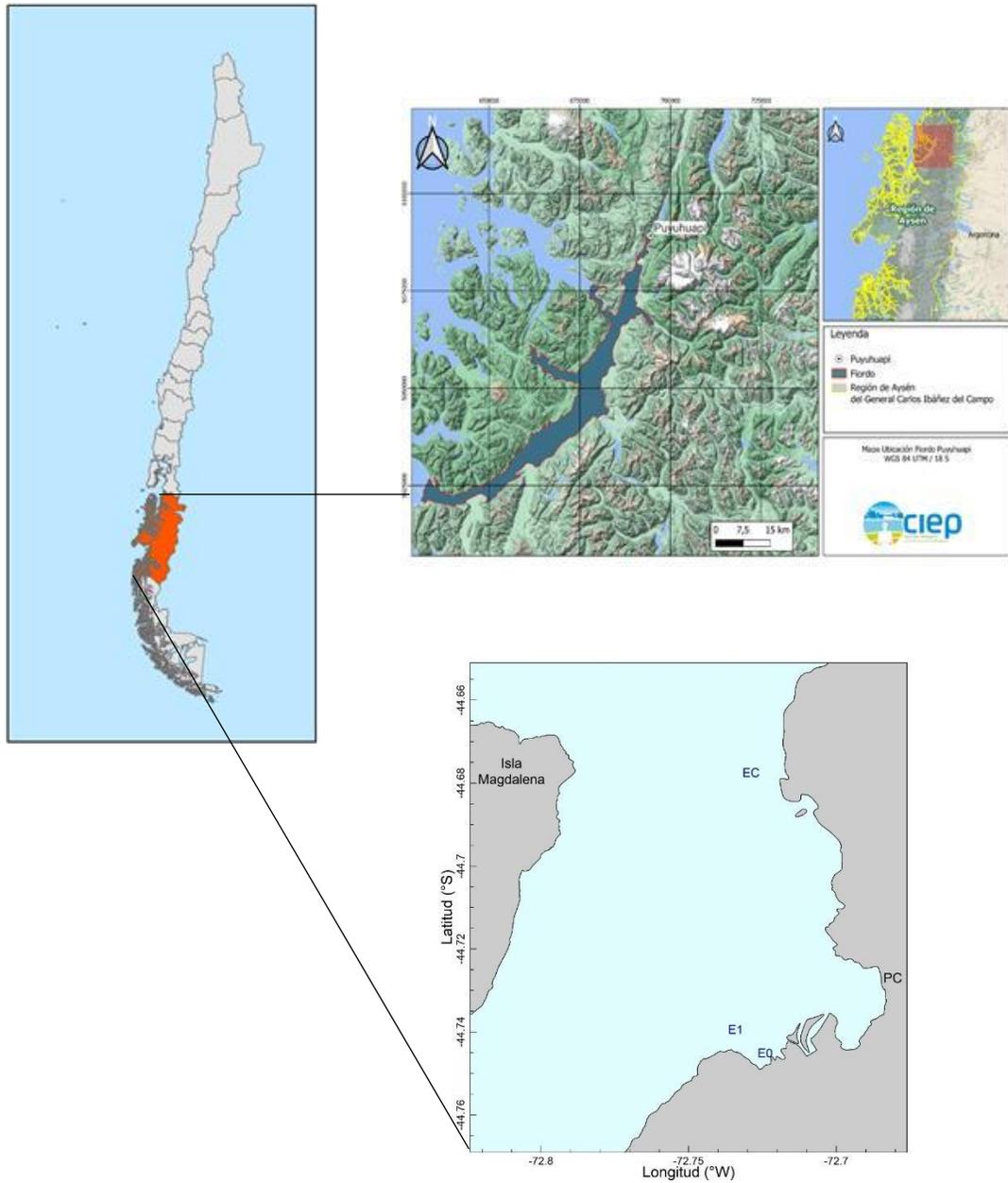


Figura 1. Área de estudio, Mapa de Chile con Región de Aysén destacada, fiordo Puyuhuapi y estaciones de muestreo (E0, E1 y EC).

2. Obtención de muestras de sedimentos

Los sedimentos fueron recolectados con una draga Van Veen a partir de los puntos de muestreo seleccionados. Desde cada punto se recolectaron muestras de sedimentos en triplicado de los 5 primeros centímetros. Para análisis de bacterias cada muestra fue almacenada en frascos plásticos estériles de 15 mL de capacidad (Falcón), preservadas con ARN later hasta su extracción de ADN, la cual se realizó con Power Soil DNA Isolation kit (Mo Bio Laboratories) según las especificaciones del fabricante.

Para la determinación de los parámetros fisicoquímicos las muestras fueron colocadas en bolsas plásticas protegidas de la luz y posteriormente congeladas a -20°C hasta su análisis.

3. Determinación de Parámetros Fisicoquímicos

De las variables fisicoquímicas, el contenido de materia orgánica en sedimento se determinó por el método de calcinación (Luczack *et al.*, 1997). La metodología utilizada es aquella descrita en la resolución N°3411/06 de la Subsecretaría de Pesca. Los resultados serán presentados como promedios de porcentaje en peso (%) de materia orgánica para cada una de las estaciones de muestreo y sus réplicas.

Las mediciones de potencial de óxido-reducción se realizaron en el sedimento con equipo pH metro marca Horiba, para las mediciones de carbono y nitrógeno se analizaron en un equipo elemental Leco, modelo Truspec, el cual realizó la medición en base al método de combustión directa de Dumas, el que se caracteriza por realizar una pirólisis completa de la muestra y medición del contenido de nitrógeno y carbono de los gases de combustión.

Para los análisis de Fósforo en sedimento, se realizaron las mediciones por el método Olsen, que utiliza extractantes químicos que solubilizan o forman complejos con los cationes que retienen al Fósforo. La medición de la muestra se realizó en un espectrofotómetro UV-VIS Marca Shimadzu a una longitud de onda de 882 nm.

4. Extracción de ADN genómico

El ADN genómico se extrajo por triplicado de cada muestra de sedimento usando PowerSoil Kit de aislamiento de ADN (MO-BIO Laboratories, Inc., EE. UU.), según las instrucciones del fabricante. Los extractos se agruparán posteriormente. La calidad y la concentración del ADN fueron comprobadas por espectroscopía UV/VIS (NanoDrop ND-1000, Peqlab, Erlangen, Alemania). El ADN se utilizó como plantilla para la secuenciación de alto rendimiento.

5. Secuenciación masiva del gen 16S rRNA (Illumina MySeq)

La secuenciación de Illumina se realizó en Genoma Mayor, Universidad Mayor, Santiago, Chile. Los datos sin procesar se analizaron utilizando el software de análisis bioinformático Mothur (versión 1.35.1; <https://mothur.org>). Se descartaron lecturas inferiores a 200 pb. La eliminación de ruido de las lecturas se logró utilizando el comando “pre.cluster” de la plataforma Mothur para eliminar secuencias probablemente causadas por errores y ensamblar lecturas que difieren solo en 2 pb. Las secuencias quiméricas se identificaron y eliminaron mediante el algoritmo UCHIME.

6. Determinación de *Piscirickettsia salmonis* mediante PCR en tiempo Real

La cuantificación de *Piscirickettsia salmonis* en las muestras de sedimento se realizó mediante PCR en tiempo real. Para esto se preparó una mezcla de reacción compuesta por 10 µL de TaqMan Universal PCR Master Mix 2X (contenía la enzima Taq polimerasa, dNTPs 10mM, MgCl₂ 6mM, Buffer Taq 10X) y 1,2 µL de ADN extraído. A cada tubo se le agregó del stock de cada partidor (partidor Forward 5'-TGATTTTATTGTTTAGTGAGAATGA-3' y partidor Reverse 5'-AAATAACCTAAATTAATCAAGGA-3') y sonda específica Taqman *P. salmonis* 6FAMTTTGTTCCTTAACAATGTGGTMGBNFQ, obteniendo un volumen final de reacción de 20 µL. El número de copias del gen ribosomal de

Piscirickettsia salmonis se determinó por interpolación de los valores de Ct en una curva de calibración para el gen ADNr 16s. Los resultados fueron expresados como número de copias por gramo de sedimento húmedo (Nºcopias/g sed húmedo).

7. Biomasa microbiana viva (ATP)

Para la detección del ATP, se evaluó la biomasa microbiana total (TMB), compuesta por bacterias dentro de las capas de muestras de sedimento de 0-5 cm (Fabiano & Danovaro 1998). Inmediatamente después del muestreo, se extrajo submuestras por triplicado en una solución amortiguadora (TRIS). El ATP se cuantificó utilizando el ensayo de bioluminiscencia (Holm-Hansen & Booth 1966, Karl 1993) en un equipo Luminómetro medidor de ATP marca Glomax 20/20, usando como estándar el complejo Luciferin-Luciferasa.

8. Análisis Geoestadístico

Se aplicó un análisis geoestadístico para describir la variación espacial de los resultados de la pesquisa de *Piscirickettsia salmonis* y resultados fisicoquímicos. Se realizó la construcción de mapas utilizando programa R, que es un software de referencia para estudios biomédicos, ambientales y bioinformáticos que permite graficar y mapear evaluando la distribución de muestras variables a una escala temporal y espacial.

Un paquete es un conjunto de funciones que mantienen algún tipo de relación entre ellas, y que generalmente vienen acompañadas de archivos de ayuda y de ficheros de datos. Se utilizó el paquete para la construcción de cartogramas de los resultados obtenidos.

9. Análisis estadísticos y Análisis de Comunidades bacterianas.

Para análisis de *Piscirickettsia salmonis* y análisis fisicoquímicos se utilizó el software DATAtab para los cálculos estadísticos utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis considerando diferencias significativas con un $p < 0.05$. Este estadístico se acompañó con la prueba post hoc de Dunn-Bonferroni.

Para determinar la correlación entre *Piscirickettsia salmonis* y los parámetros fisicoquímicos, se utilizó el Coeficiente de correlación de Pearson, que cuantifica la intensidad de la relación entre dos variables. Entregando un valor en la escala de 1 a 0, donde más cercano a 1 es mayor su relación.

Para los análisis de las comunidades microbianas se determinó en función de la composición y la abundancia relativa de los diferentes taxones presentes en cada muestra. El entorno R se utilizó para representar gráficamente las abundancias relativas, considerando sólo los abundantes taxones (abundancia relativa al 1% de la comunidad en todas las muestras). Para el análisis de la diversidad, las muestras fueron seleccionadas con el menor número de lecturas en todo el conjunto de datos y el índice de diversidad (Diversidad de Shannon) y el índice de dominancia (Simpson), se obtuvieron utilizando USEARCH. Para comparar

las composiciones de la comunidad bacteriana a través de grupos de muestras, se realizaron análisis de similitudes de Bray-Curtis, y se utilizaron matrices de similitud para obtener un gráfico CLUSTER, usando PRIMER 7 (Primer-E, Ltd. Albany, Nueva Zelanda).

RESULTADOS

1. Parámetros Físicoquímicos

Para caracterizar la calidad del sedimento en las tres estaciones de muestreo, se realizaron análisis de los parámetros físicoquímicos como: carbono, nitrógeno, materia orgánica, fósforo y potencial redox.

Tabla 1. Resultados de parámetros físicoquímicos en las tres estaciones de muestreo en las tres fechas de muestreo.

Estaciones de Muestreo	Fósforo (mg/Kg)	Carbono (%)	Nitrógeno (%)	Potencial Redox (mV)	MOT %
Estación E0 septiembre 2022	5,13	0,93	0,11	-124	4,59
Estación E1 septiembre 2022	4,90	0,66	0,07	-104	4,03
Estación EC septiembre 2022	4,27	0,38	0,03	-110	5,41
Estación E0 noviembre 2022	18,11	1,07	0,18	-177	6,32
Estación E1 noviembre 2022	15,12	0,90	0,13	-158	5,92
Estación EC noviembre 2022	12,69	0,42	0,05	-145	6,5
Estación E0 abril 2023	29,42	1,82	0,22	-220	6,96
Estación E1 abril 2023	22,04	1,13	0,15	-208	4,67
Estación EC abril 2023	17,19	0,55	0,06	-154	5,54

E0: estación bajo centro de cultivo; E1: estación a 1 Km del centro; EC: estación control a 7 Km del centro.

1.1 Determinación de Carbono en sedimento.

Las mayores concentraciones de Carbono se encontraron en la estación E0 debajo al centro de cultivo, en las 3 fechas de muestreo, con valores de 0,93% en septiembre 2022; 1,07% en noviembre 2022 y 1,82% en abril 2023.

De acuerdo con los resultados obtenidos, observados en la figura 2. La prueba de Kruskal-Wallis ha mostrado que hay diferencia significativa entre las categorías de la variable independiente Estaciones de Muestreo con respecto a la variable dependiente Carbono (%), $p=0,02$.

La prueba de Dunn-Bonferroni ha demostrado que los resultados son significativamente diferentes entre E0 y EC con un valor de $p<0,05$.

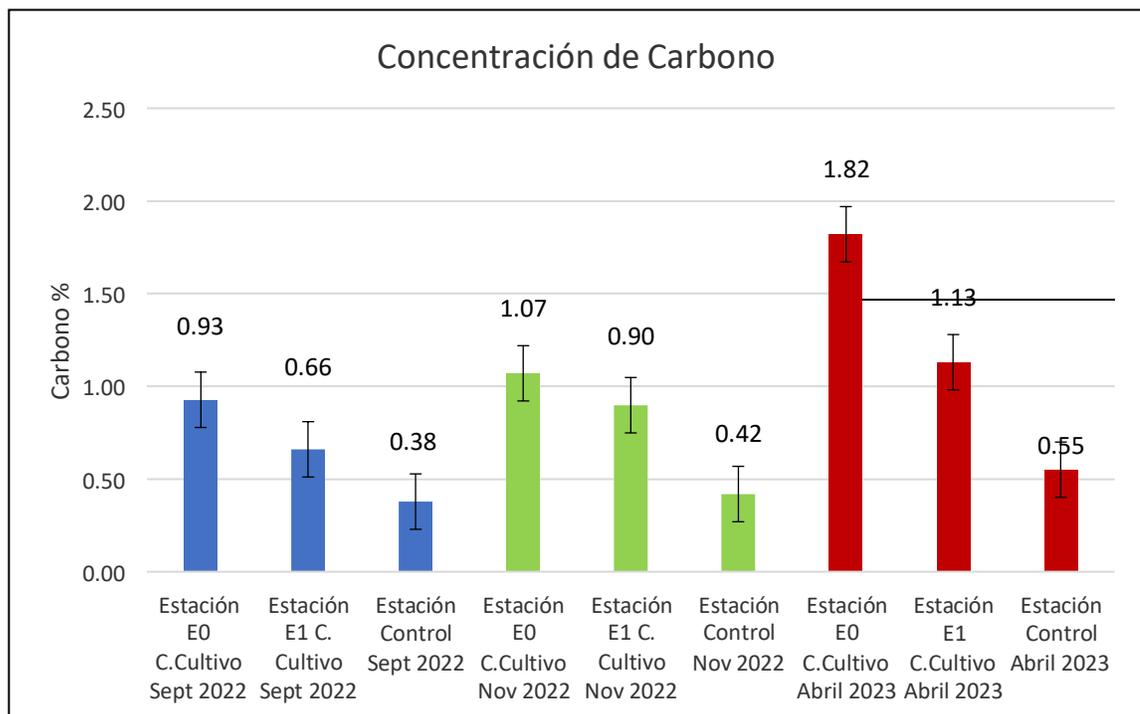


Figura 2: Gráfico de concentraciones de Carbono en donde se aprecian las diferencias significativas de % de Carbono en las tres estaciones muestreadas, con un $p< 0,05$.

1.2 Determinación de Nitrógeno en sedimento.

Las mayores concentraciones de Nitrógeno se encontraron en la estación E0 debajo al centro de cultivo, en las 3 fechas de muestreo, con valores de 0,107% en septiembre 2022; 0,180% en noviembre 2022 y 0,223% en abril 2023.

De acuerdo con los resultados obtenidos, observados en la figura 3. La prueba de Kruskal-Wallis ha mostrado que hay diferencia significativa entre las categorías de la variable independiente Estaciones de Muestreo con respecto a la variable dependiente Nitrógeno (%), $p=0,028$.

Para ver donde están estas diferencias, se utilizó la prueba de Dunn-Bonferroni, la cual demostró que los resultados son significativamente diferentes entre E0 y EC con un valor de $p<0,05$.

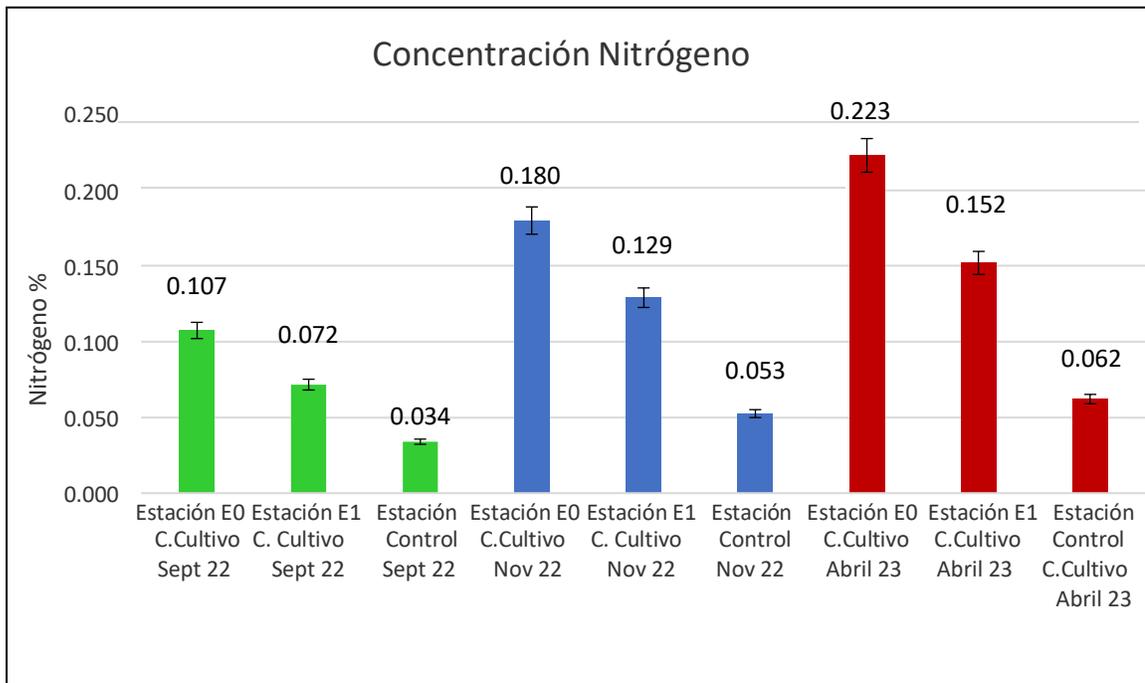


Figura 3: Gráfico de concentraciones de Nitrógeno, en donde se aprecian las diferencias significativas de % de Nitrógeno en las tres estaciones muestreadas, con un $p<0,05$.

1.3 Determinación de Potencial Redox en sedimento.

Los valores encontrados en Potencial Redox, corresponden a valores negativos, en donde más negativo es el valor, más reducido e intervenido se encuentra el sedimento.

En este estudio los valores de Potencial Redox fueron negativos en las 3 estaciones, demostrándose la reducción del sedimento incluso en la estación control. Pero donde los valores fueron aún más negativos correspondió a la estación E0 debajo del centro, con valores de: -124 mV en septiembre 2024; -177 mV en noviembre del 2022 y -220 mV en abril del 2023.

Junto con esto se puede apreciar el aumento de la reducción del sedimento en el tiempo, en todas las estaciones de muestreo.

De acuerdo con los resultados obtenidos, observados en la figura 4. La prueba de Kruskal-Wallis ha mostrado que existen diferencias significativas entre las categorías de la variable independiente Estaciones de Muestreo con respecto a la variable dependiente Potencial Redox (mV) con un $p < 0,01$.

La prueba de Dunn-Bonferroni demostró diferencias significativas entre estaciones con un valor de $p < 0,05$.

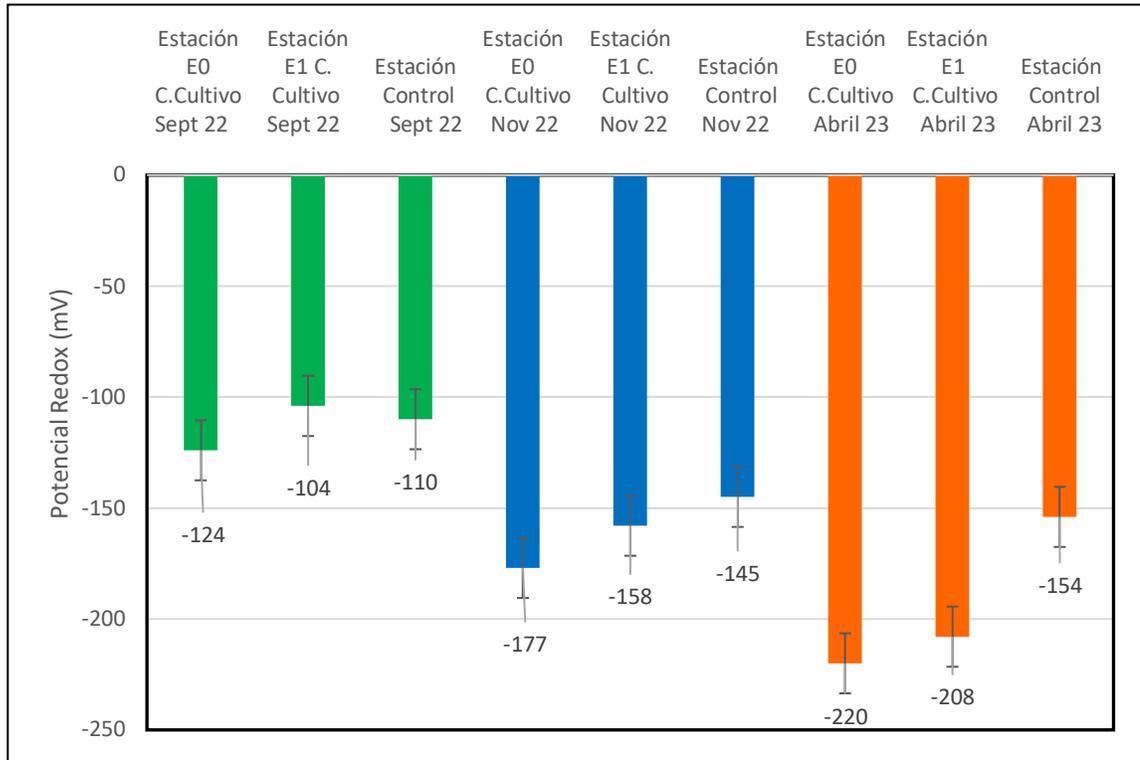


Figura 4: Gráfico de medición de Potencial Redox, en donde se aprecian las diferencias significativas de Potencial Redox en las tres estaciones muestreadas, con un $p < 0.01$.

1.4 Determinación de Materia Orgánica Total en sedimento.

En cuanto a la Materia Orgánica Total (MOT), las concentraciones encontradas no fueron significativamente distintas entre estaciones, lo que se puede apreciar en el gráfico de la figura 5. Esto fue corroborado por los resultados obtenidos en la prueba de Kruskal-Wallis, el cual demostró que no hay diferencias significativas con un $p = 0,102$.

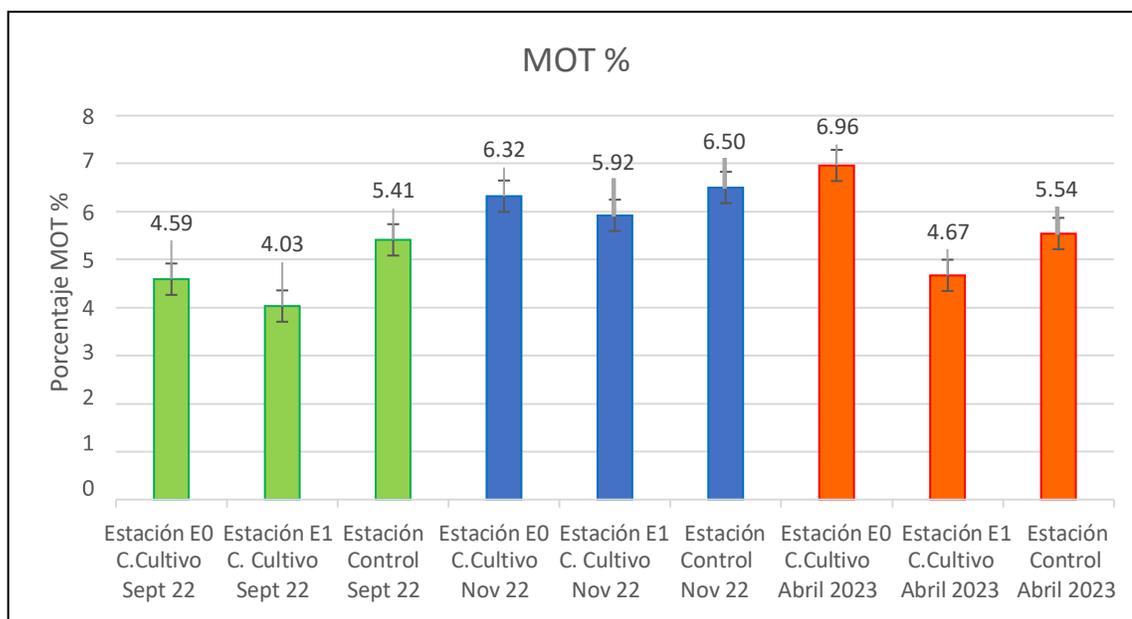


Figura 5: Gráfico de concentración de Materia Orgánica, en donde no se aprecian las diferencias significativas de Materia Orgánica Total (% MOT) en las tres estaciones muestreadas.

1.5 Determinación de Fosforo en sedimento

Las mayores concentraciones de Fosforo se encontraron en la estación E0 debajo al centro de cultivo, en las 3 fechas de muestreo, con valores de 5,1342 mg/Kg en septiembre 2022; 18,1125 mg/Kg en noviembre 2022 y 29,4206 mg/Kg en abril 2023.

De acuerdo con los resultados obtenidos, observados en la figura 6. La prueba de Kruskal-Wallis ha demostrado que hay diferencias significativas entre las estaciones de Muestreo con respecto a la variable dependiente Fósforo (mg/Kg), con un valor de $p < 0,01$.

La prueba de Dunn-Bonferroni corroboró las diferencias significativas entre estaciones con un valor de $p < 0,05$.

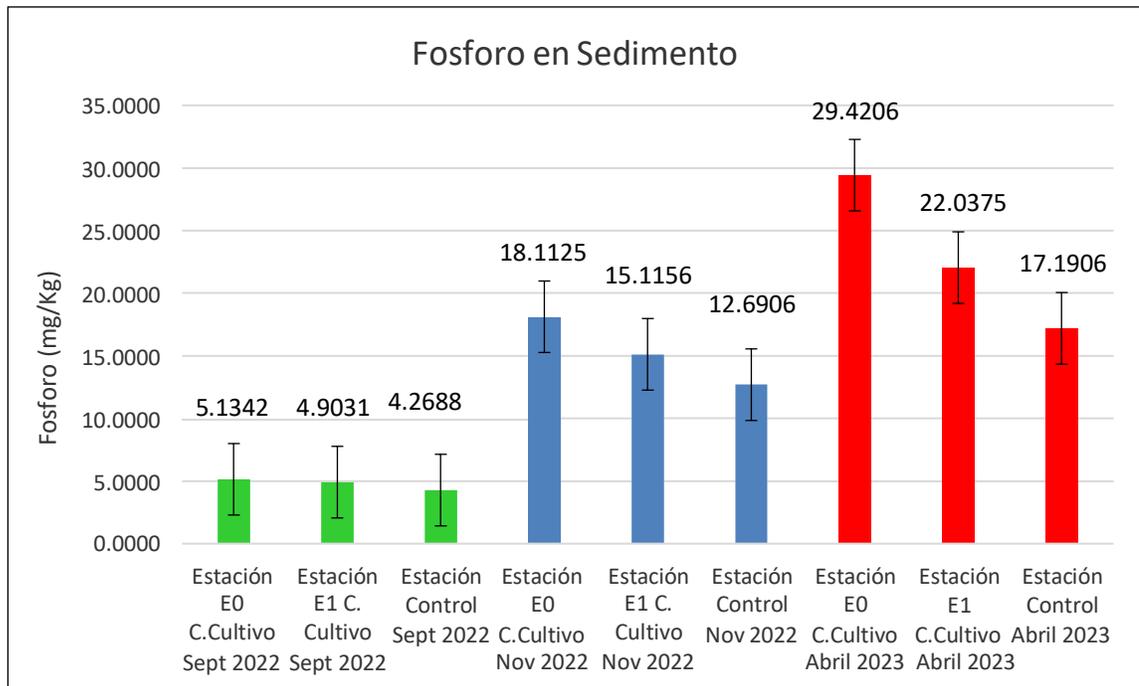


Figura 6: Gráfico de concentración de Fósforo, en donde se aprecian diferencias significativas de Fósforo (mg/Kg) en las tres estaciones muestreadas con un $p = < 0,01$.

2. *Piscirickettsia salmonis*

De las tres estaciones muestreadas la que obtuvo mayor señal de ADN captada, correspondió a la Estación E0 debajo del centro de cultivo, con valores de: $6,23 \times 10^5$ en septiembre 2022; $1,29 \times 10^8$ en noviembre 2022 y $5,09 \times 10^8$ en abril 2023.

Cabe destacar que en las otras dos estaciones (E1 y EC), hubo un aumento de la señal en abril del 2023, con valores de $2,48 \times 10^7$ para estación E1 y $1,03 \times 10^5$ para estación EC (Estación control).

De acuerdo a los resultados obtenidos, observados de la figura 7. La prueba de Kruskal Wallis ha demostrado que hay diferencia significativa entre las estaciones de muestreo con respecto a la variable dependiente *Piscirickettsia salmonis* (N° copias/g sed húmedo), con un $p=0,012$. Junto con esto, se aplicó la prueba de Dunn-Bonferroni, la cual demostró que los resultados son significativamente diferentes entre E0 y EC con un valor de $p < 0,05$.

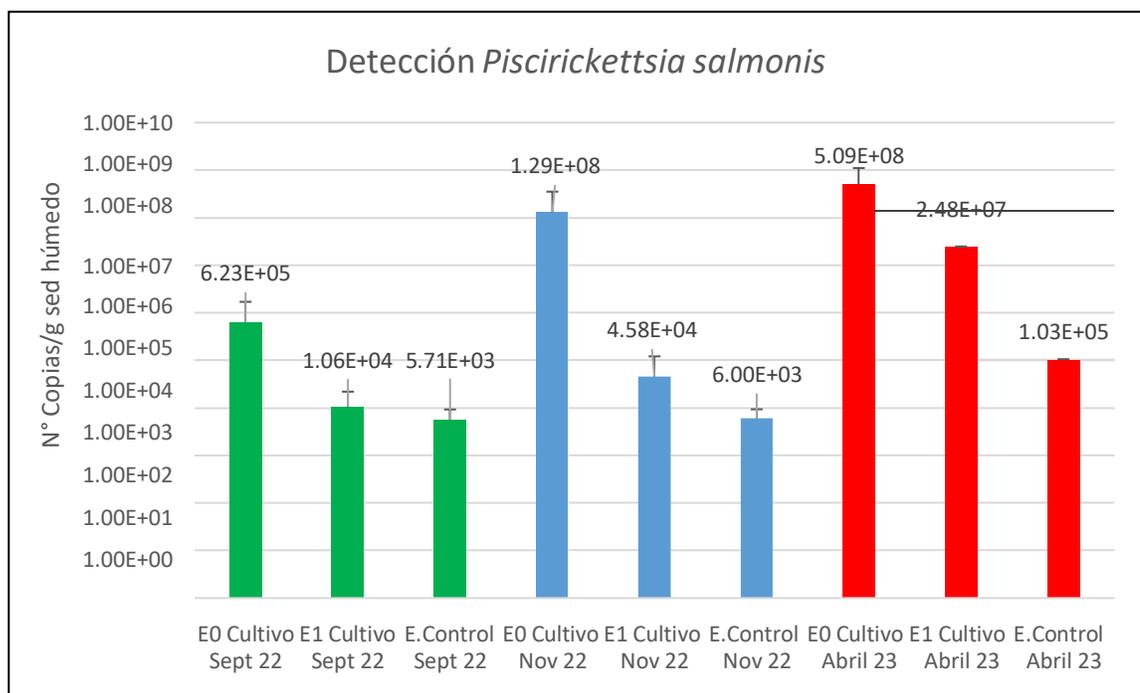


Figura 7: Gráfico de detección de *Piscirickettsia salmonis*, en donde se aprecian las diferencias significativas de *P. salmonis* (N° copias/g sed húmedo) en las tres estaciones muestreadas, con un $p < 0,05$.

3. Correlación Parámetros fisicoquímicos con *Piscirickettsia salmonis*

El logaritmo del número de copias del gen de *Piscirickettsia salmonis* determinado por gramos de sedimento húmedo se correlaciona significativamente (Pearson; $p < 0,05$) con todos los parámetros fisicoquímicos analizados a excepción de MOT, siendo la más alta correlación con Nitrógeno con 0,93; seguido por Carbono con 0,89; Potencial Redox con 0,84 y finalmente Fósforo con 0,78. También se realizó la determinación de la correlación entre los parámetros (ver tabla 2).

Tabla 2: Coeficiente de correlación de Pearson de *Piscirickettsia salmonis* con los parámetros fisicoquímicos (P, C, N, Redox y MOT) y correlación entre las parámetros.

Coeficiente de correlación de Pearson		<i>Piscirickettsia salmonis</i> (n°copias/g sed húm)	Fósforo (mg/Kg)	Carbono (%)	Nitrógeno (%)	Potencial Redox (mV)	MOT %
<i>Piscirickettsia salmonis</i> (n°copias/g sed húm)	Porcentaje correlación	1	0,78	0,89	0,93	0,84	0,34
	valor-p		0,014	0,001	<.001	0,005	0,368
Fósforo (mg/Kg)	Porcentaje correlación	0,78	1	0,76	0,78	0,97	0,61
	valor-p	0,014		0,017	0,013	<.001	0,083
Carbono (%)	Porcentaje correlación	0,89	0,76	1	0,96	0,8	0,34
	valor-p	0,001	0,017		<.001	0,01	0,374
Nitrógeno (%)	Porcentaje correlación	0,93	0,78	0,96	1	0,83	0,4
	valor-p	<.001	0,013	<.001		0,006	0,284
Potencial Redox (mV)	Porcentaje correlación	0,84	0,97	0,8	0,83	1	0,53
	valor-p	0,005	<.001	0,01	0,006		0,146
MOT %	Porcentaje correlación	0,34	0,61	0,34	0,4	0,53	1
	valor-p	0,368	0,083	0,374	0,284	0,146	

4. Biomasa microbiana viva (ATP)

En cuanto a los resultados de ATP se aplicó la prueba estadística Mann-Whitney U-test en donde las concentraciones encontradas fueron significativamente distintas entre los muestreos de noviembre 2022 y abril 2023 con un $p=0,025$.

De acuerdo al grafico de ATP (figura N°8), podemos apreciar las concentraciones de ATP en las dos últimas fechas de muestreo.

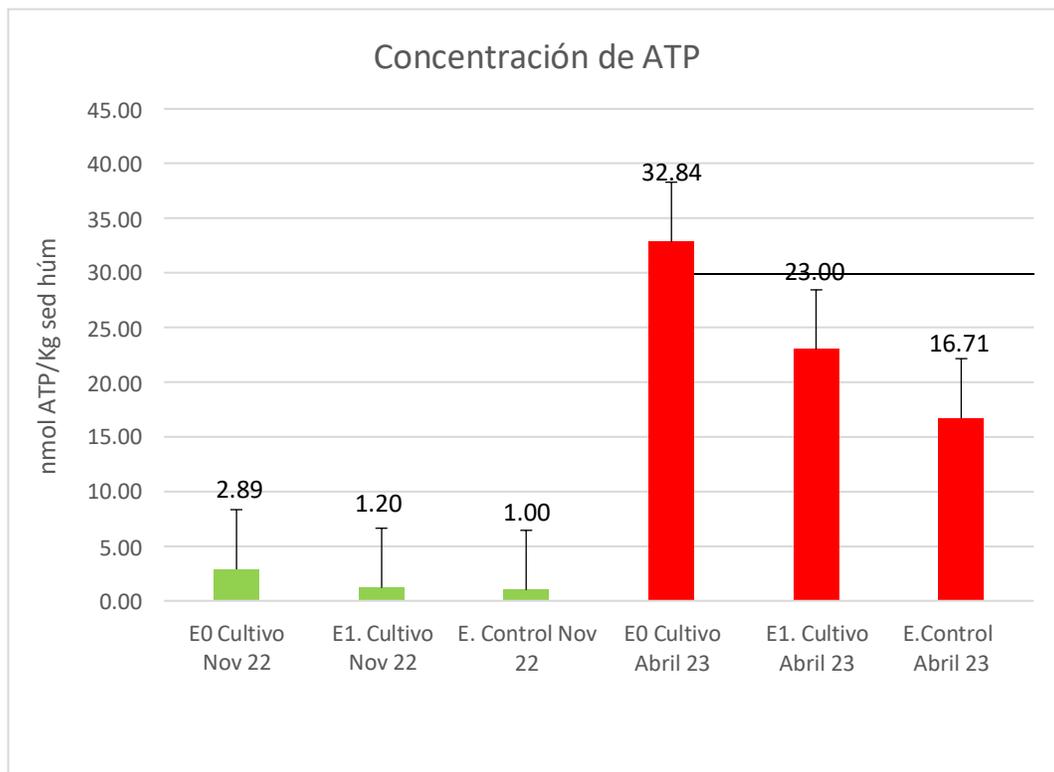


Figura 8: Gráfico de concentración de ATP en las dos fechas de muestreos que se realizó el análisis, noviembre 2022 y abril 2023.

5. Análisis de las comunidades bacterianas.

Se trabajó con la abundancia relativa al 1% de la comunidad en todas las muestras. Para comparar las composiciones de la comunidad bacteriana a través de grupos de muestras, se realizaron análisis de similitudes de Bray-Curtis, y se utilizaron matrices de similitud para obtener un gráfico CLUSTER, usando PRIMER 7.

Para los cálculos de diversidad y abundancia se trabajó con los índices de Shannon e Índice de diversidad de Simpson.

Los phyla con mayor abundancia en las tres estaciones correspondieron a *Actinobacteria* y *Proteobacteria*, con porcentajes de *Actinobacteria* de 16,91% para E0; 13,33% para E1 y 1,35% para EC. En cuanto a *Proteobacteria* los porcentajes correspondieron a 60,08% para E0; 54,88% para E1 y 88,79% para EC (Tabla 3).

Tabla 3: Abundancia de phyla bacteriano en porcentaje en las tres estaciones de muestreo.

Phyla	E0 %	E1 %	EC %
<i>Actinobacteria</i>	23,19	15,14	1,36
<i>Bacteroidetes</i>	5,57	8,22	1,27
<i>Chloroflexi</i>	3,22	4,13	0,05
<i>Firmicutes</i>	8,82	10,20	7,62
<i>Proteobacteria</i>	82,39	62,32	89,69

La abundancia de familias de bacterias en las estaciones E0, E1 y EC se puede apreciar en el diagrama de racimo (Figura 9) y en los diagramas de frecuencia (Figura 10, 11 y 12).

Las familias con mayor abundancia en la Estación E0 (debajo centro de cultivo) correspondió a: *Actinobacteria* con 13,32%; *Desulfobulbaceae* 6,88%; *Desulfuromonadales* 5,62%; *Deltaproteobacteria* 8,61% y *Xanthomonadaceae* 7,70%. Para la Estación E1 (a 1 kilómetro del centro) las familias más abundantes correspondieron a: *Actinobacteria* con 8,55%; *Porphyromonadaceae* 5%; *Sphingomonadaceae* 8,20% y *Desulfobulbaceae* 9,48%. En cuanto a la Estación EC (Control) las familias más abundantes correspondieron a *Gammaproteobacteria* con 72,48% y *Rhodocyclaceae* 5,26%.



Figura 9: Diagrama de abundancia relativa de los taxos más abundantes (superior al 1%) asignado a las familias bacterianas obtenidas en las estaciones E0, E1 y EC.

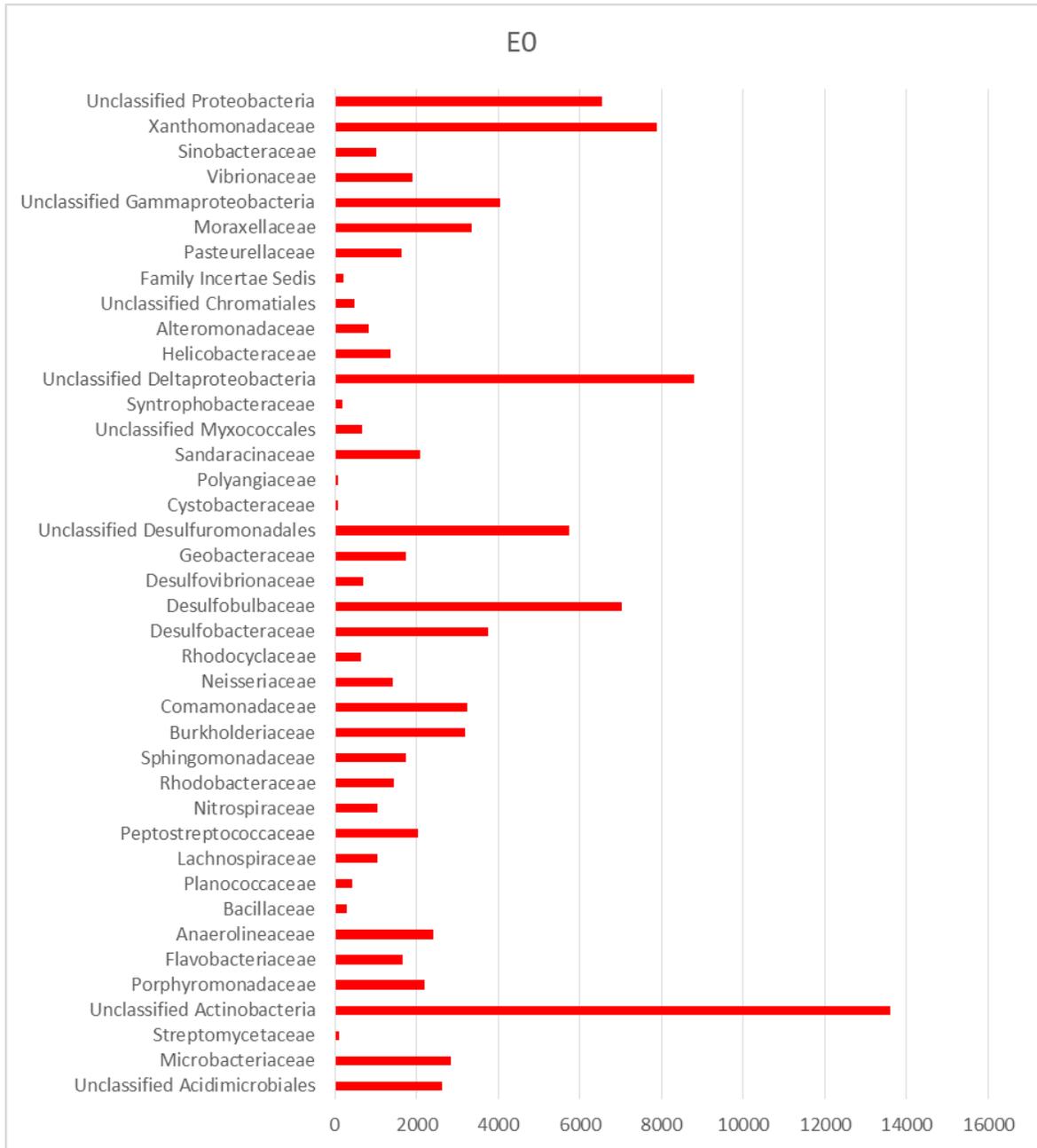


Figura 10: Diagrama de frecuencia de Estación 0, en donde se aprecia la abundancia relativa por familia de bacterias.

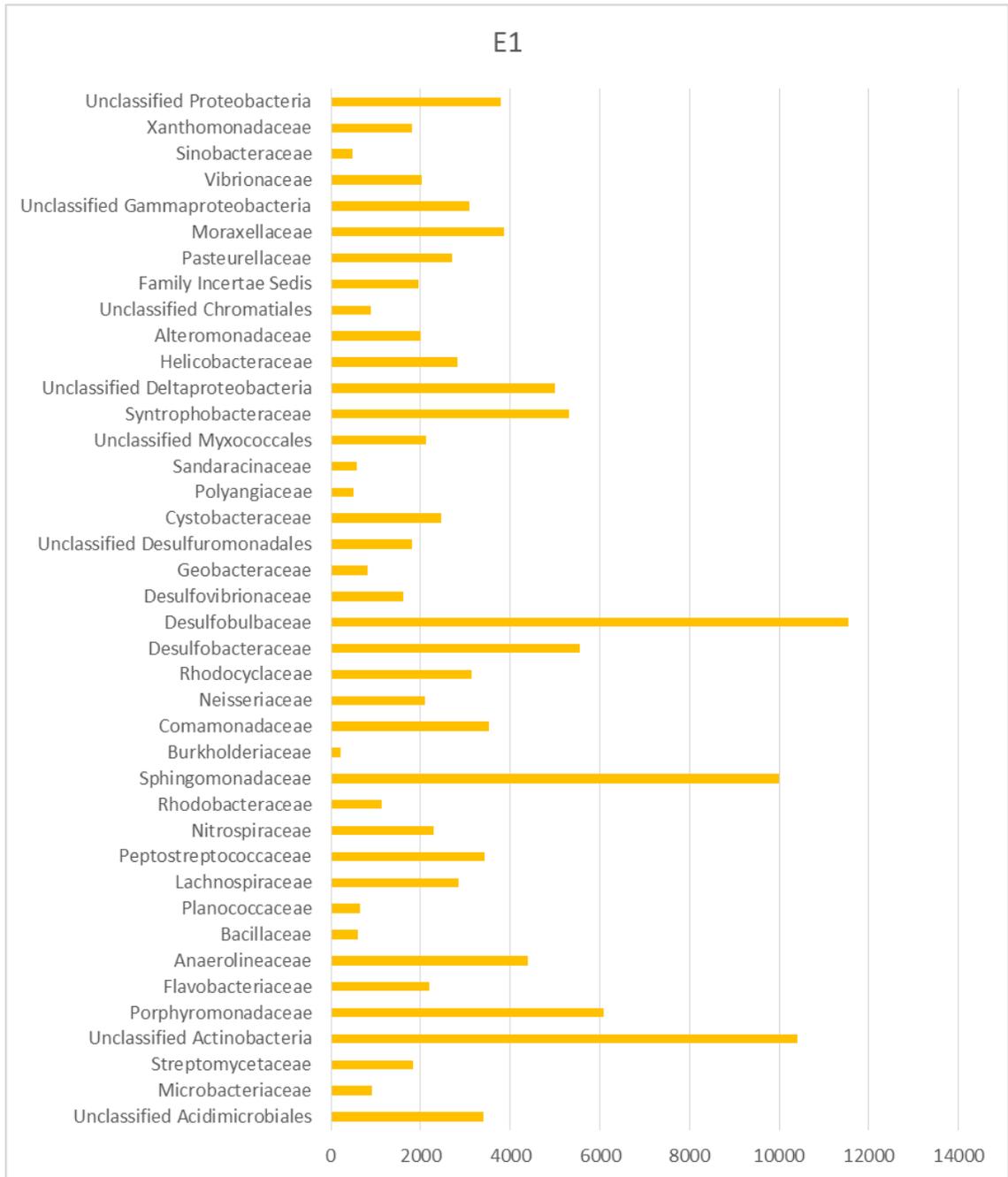


Figura 11: Diagrama de frecuencia de Estación 1, en donde se aprecia la abundancia relativa por familia de bacterias.

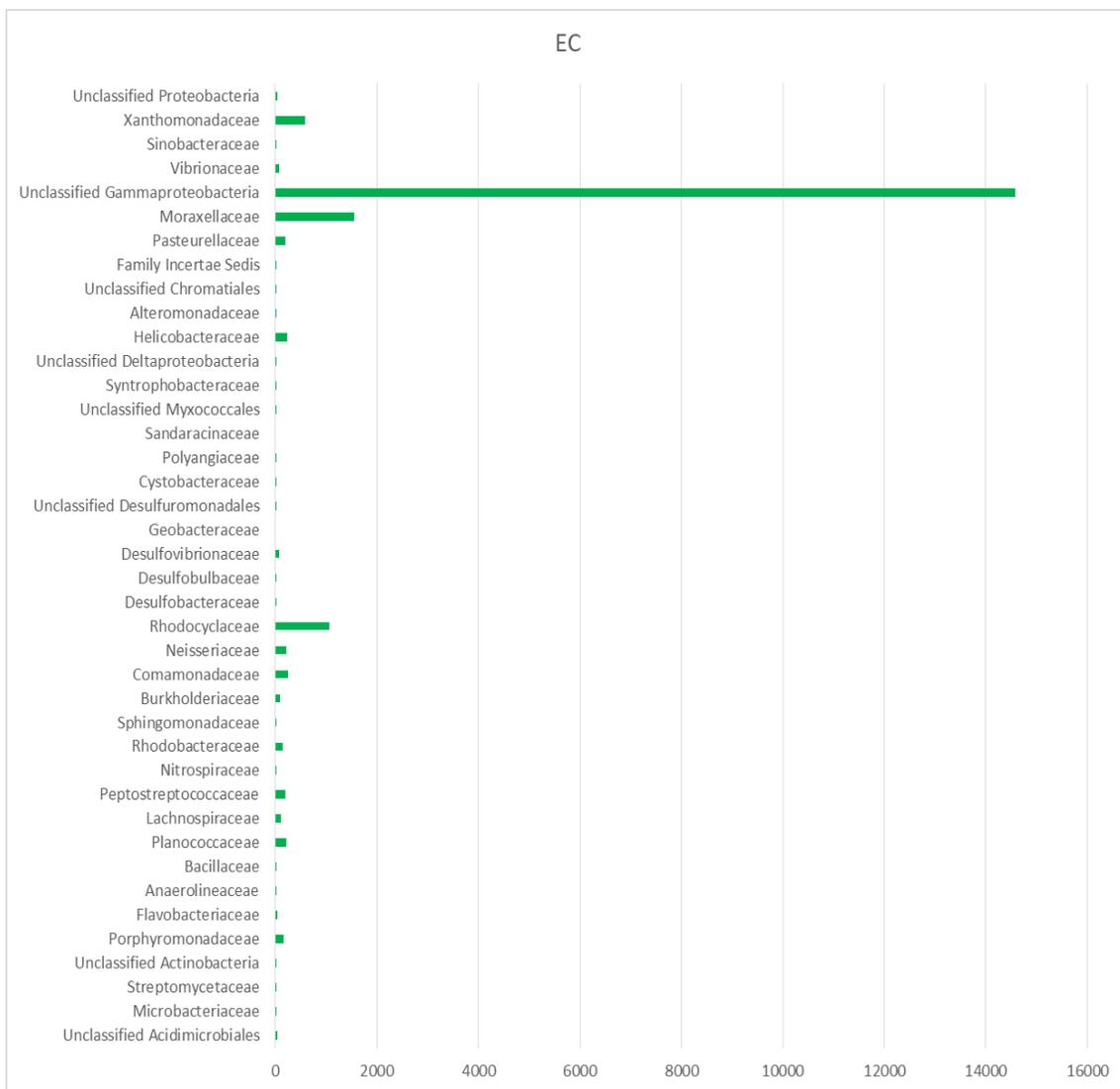
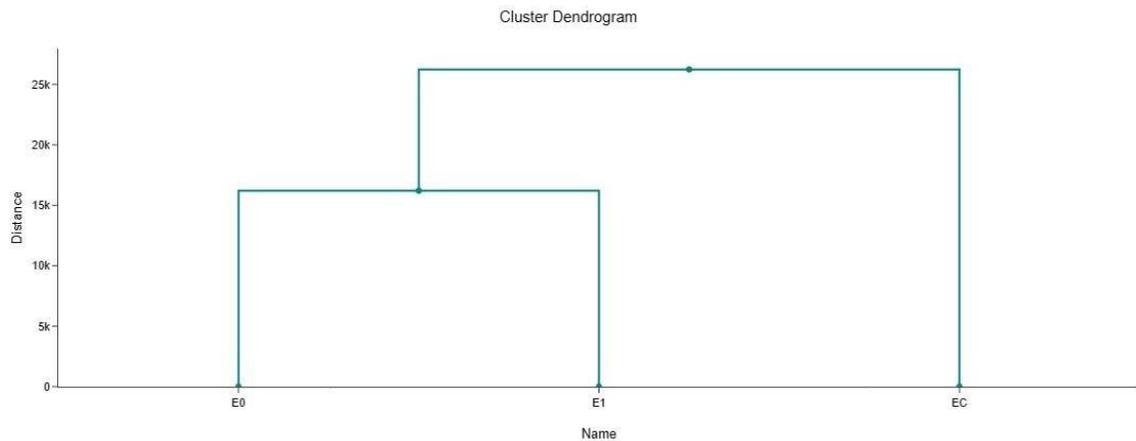


Figura 12: Diagrama de frecuencia de Estación Control (EC), en donde se aprecia la abundancia relativa por familia de bacterias.



	Estación 0	Estación 1	Estación Control
Índice de Shannon	3,076	3,331	1,136
Índice de Diversidad de Simpson	0,935	0,955	0,424

Figura 13: Cluster dendrograma Bray Curtis en donde se aprecia la similitud entre estaciones acompañado con los índices de Shannon y dominancia de Simpson.

Se realizó un diagrama de conglomerados que representa similitudes en la composición de la comunidad bacteriana a nivel de familia (Figura 13). Este diagrama mostró que las comunidades bacterianas presentes en la estación E0 y E1 se agruparon, con un alto porcentaje de similitud del 61,55%. En cuanto a estación E0 con respecto a la EC (estación control) la similitud fue de 14,43 % y E1 con respecto a EC fue de 14,02%, por lo cual se demostró que la estación EC presento una baja similitud con ambas estaciones.

Los cálculos del índice de Shannon demuestran que existe una mayor diversidad en las estaciones E0 y E1, con valores de 3,076 para E0 y 3,331 para E1, versus el valor de EC (Estación Control) de solo 1,136.

Esto se ve respaldado por el Índice de Simpson, que entrega resultados de dominancia de especies, donde podemos apreciar que las mayores dominancias fueron en las estaciones E0 y E1, con valores de 0,935 y 0,955 respectivamente. La estación EC presentó una baja dominancia con un valor de 0,424 lo que corroboraría la dominancia de una especie en esta estación, lo que se observó en el diagrama de racimo (Figura 9) y en el diagrama de frecuencia (Figura 12), con dominancia de la familia *Gammaproteobacteria*.

6. Análisis Geoestadístico

Se utilizó el software modelo R complementado con el paquete PBS mapping para obtener mapas de burbujas con las concentraciones de *Piscirickettsia salmonis* y los parámetros fisicoquímicos.

Para todos los mapas creados, se caracterizaron las concentraciones de los parámetros analizados con colores. En donde el color rojo corresponde a la mayor concentración, naranja concentración medio-alto, amarillo a una media concentración y verde una baja concentración.

En el mapa de burbujas de *Piscirickettsia salmonis*, se puede apreciar la señal de la bacteria en las tres estaciones y en las tres fechas de muestreo, donde se aprecia una señal baja con los menores valores en la estación E1, en la primera fecha de muestreo correspondiente a septiembre 2022. Para la estación control EC, la señal se caracterizó con verde para las dos primeras fechas (septiembre 2022 y noviembre 2022). La estación E0 (debajo del centro) no presentó señal baja en verde, en la primera fecha obtuvo una señal amarilla (septiembre 2022) y señal naranja y roja en las dos siguientes fechas (noviembre 2022 y abril 2023).

En la última fecha de muestreo (abril 2023) la estación E1 obtuvo una señal naranja y la estación control (EC) una señal amarilla, esto demuestra que la bacteria es diseminada hacia otros lugares del fiordo, cercanos al centro de cultivo (Ver figura 14).

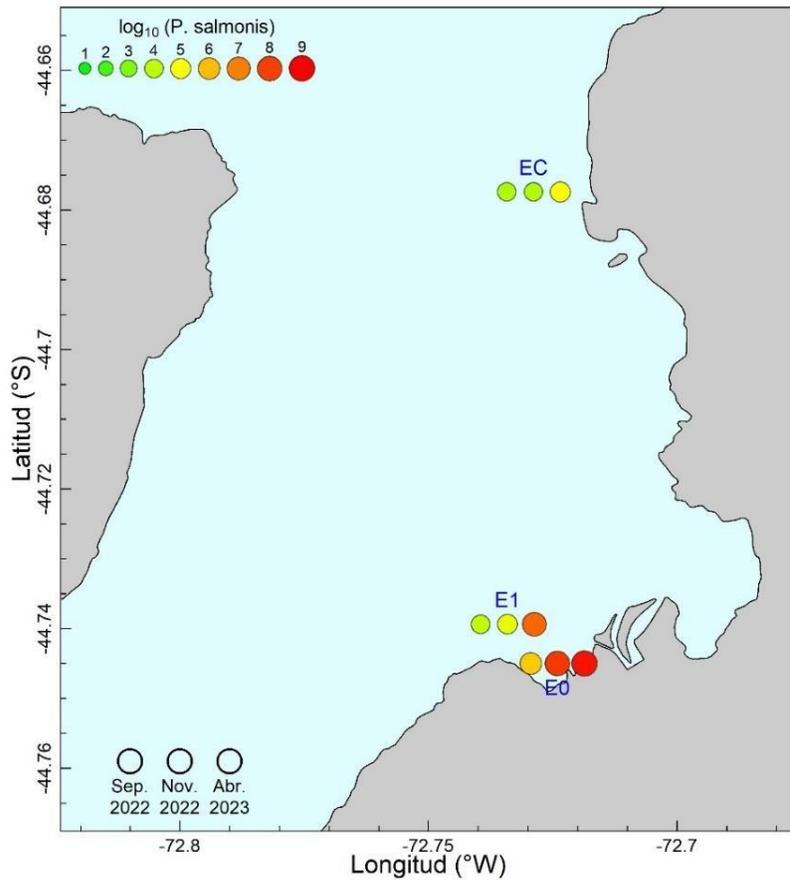


Figura 14: Mapa de burbuja con las concentraciones de *Piscirickettsia salmonis* en las tres estaciones (E0, E1 y EC) en las tres fechas de muestreo.

En relación al Carbono, el mapa de burbuja muestra la mayor concentración en rojo (alto) para la estación E0 (debajo del centro) en la última fecha de muestreo (abril 2023). Con concentraciones en naranja (medio-alto) para las E1 en la última fecha de muestreo (abril 2023). Concentraciones amarillas (media) en la estación E1 muestreo noviembre 2022 y estación E0 en las fechas de muestreo de septiembre 2022 y noviembre 2022. Las concentraciones más bajas en verde fueron encontradas en la estación E1 en la primera fecha de muestreo (septiembre 2022) y en las fechas de la estación control (E0) correspondiente a

septiembre 2022, noviembre 2022 y abril 2023 (ver figura 15).

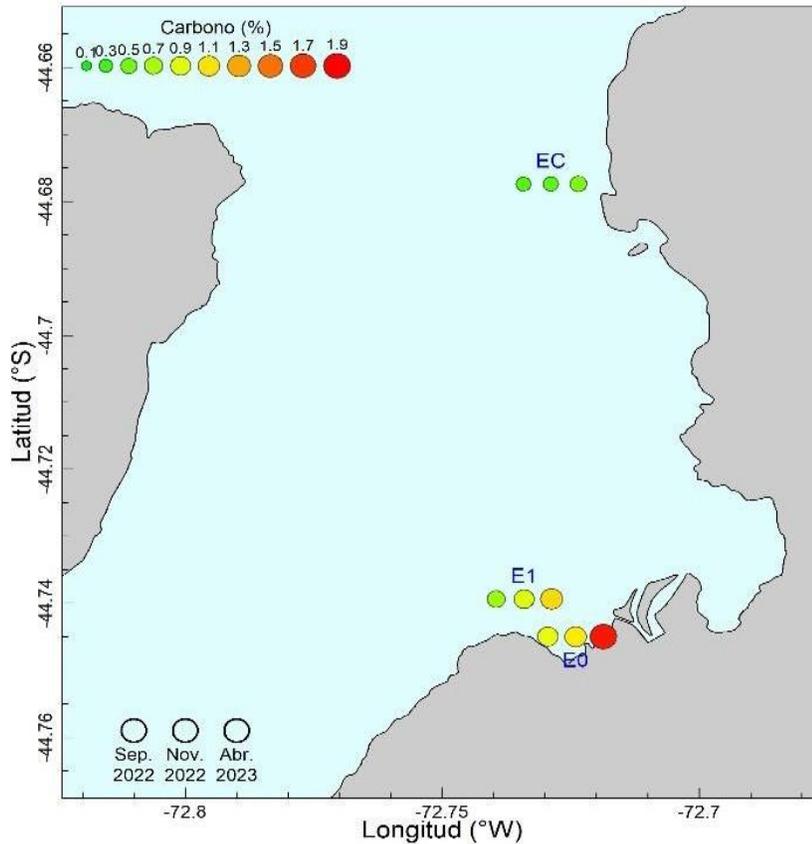


Figura 15: Mapa de burbujas con las concentraciones encontradas de Carbono, en la tres estaciones (E0, E1 y EC) en las tres fechas de muestreo.

En relación al Fosforo, el mapa de burbuja muestra la mayor concentración en rojo (alto) para la estación E0 (debajo del centro) en la última fecha de muestreo (abril 2023). Con concentraciones en naranja (medio-alto) para la estación E1 en la última fecha de muestreo (abril 2023). Concentraciones amarillas (media) en las estaciones E0 y E1 en la segunda fecha de muestreo de noviembre 2022 y en estación EC en la última fecha de muestreo abril 2023. Las concentraciones más bajas en verde fueron encontradas en las estaciones E0 y E1 en la primera

fecha de muestreo (septiembre 2022) y en estación control (E0) en la primera y segunda fecha de muestreos correspondientes a septiembre 2022 y noviembre 2022 (ver figura 16).

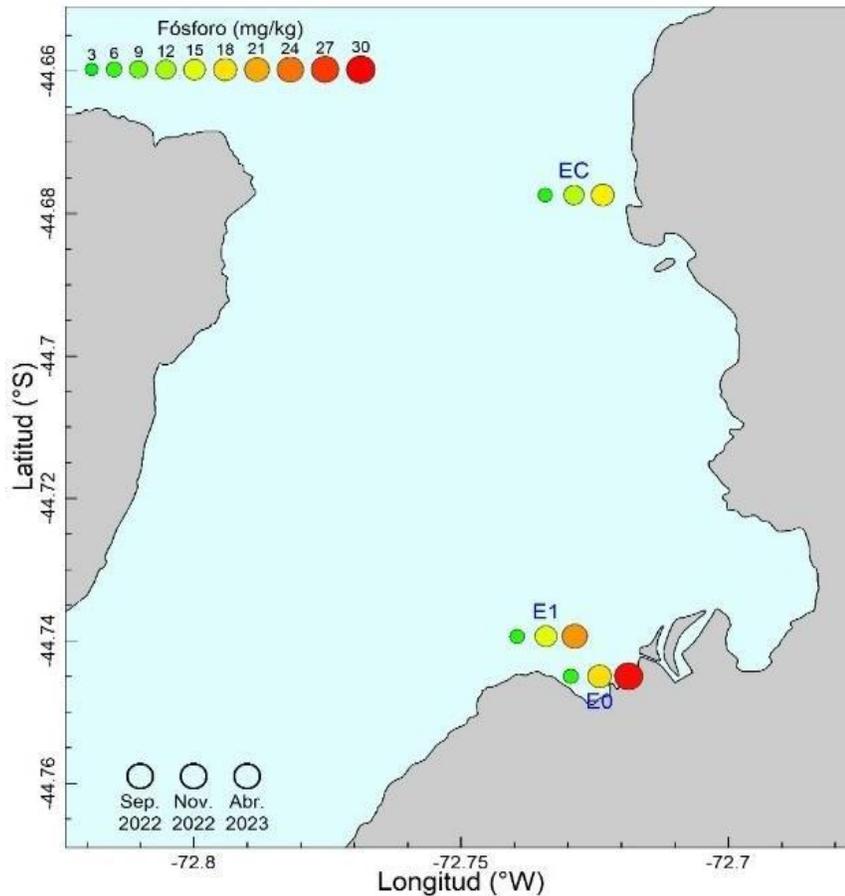


Figura 16: Mapa de burbujas con las concentraciones encontradas de Fosforo, en las tres estaciones (E0, E1 y EC) en las tres fechas de muestreo.

En relación al Nitrógeno, el mapa de burbuja muestra la mayor concentración en rojo (alto) para la estación E0 (debajo del centro) en la última fecha de muestreo (abril 2023). Con concentraciones en naranja (medio-alto) para la estación E1 en

la última fecha de muestreo (abril 2023) y estación E0 en la segunda fecha de muestreo noviembre 2022. Concentraciones amarillas (media) en las estaciones E0 primera fecha de muestreo septiembre 2022 y en la estación E1 en la segunda fecha de muestreo de noviembre 2022. Las concentraciones más bajas en verde fueron encontradas en las estaciones E1 en las tres fechas de primera fecha de muestreo (septiembre 2022) y en estación control (E0) en las tres fechas de muestreo correspondientes a septiembre 2022, noviembre 2022 y abril 2023 (ver figura 17).

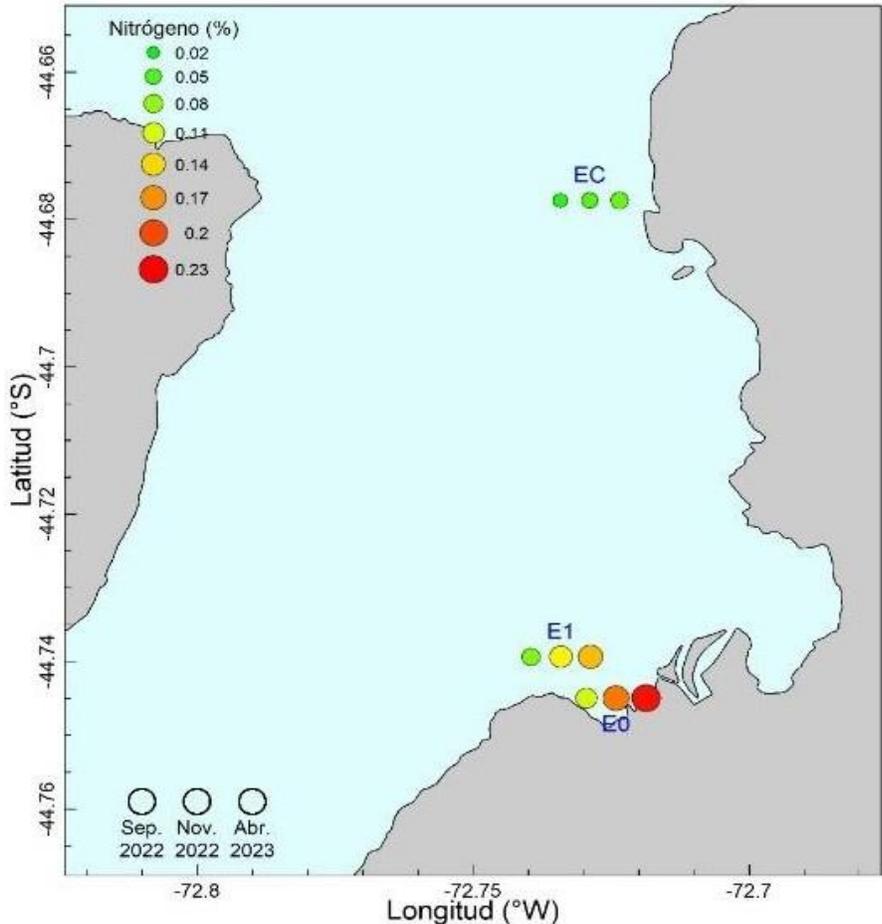


Figura 17: Mapa de burbujas con las concentraciones encontradas de Nitrógeno en las tres estaciones (E0, E1 y EC) en las tres fechas de muestreo

De acuerdo al mapa de burbujas obtenido para potencial redox, los resultados indican mayores concentraciones en rojo para E0 y E1 para el último muestreo (abril 2023). Concentraciones naranjas (medio-alto) para estación E1 segunda fecha de muestreo noviembre 2022. Concentraciones amarillas (medio) para estación E1 segunda fecha de noviembre 2022 y EC en la última fecha de muestreo abril 2023. Concentraciones en verde (baja) fueron encontradas en la primera fecha de muestreo septiembre 2022 para las tres estaciones y segunda fecha de muestreo noviembre 2022 para estación control EC (ver figura 18).

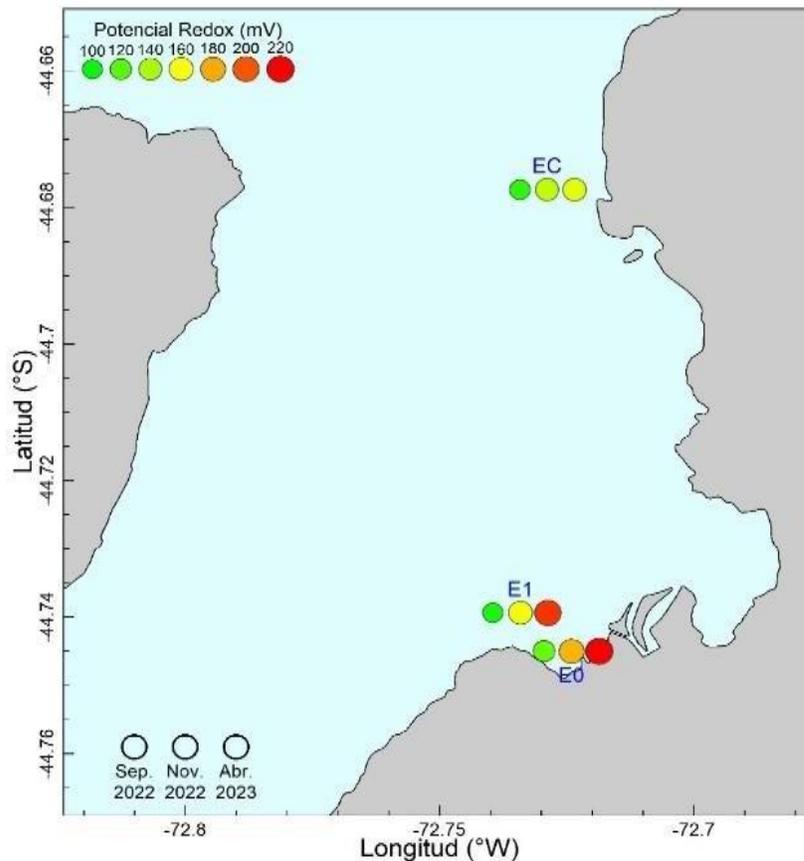


Figura 18: Mapa de burbujas con las concentraciones encontradas de Potencial Redox, en las tres estaciones muestreadas en las tres fechas de muestreo.

En cuanto a las concentraciones de Materia Orgánica, no hubieron diferencias marcadas entre estaciones, lo que fue corroborado por la prueba estadística Kruskal Wallis y se refleja en el mapa de burbujas, en donde podemos apreciar colores similares en las tres estaciones, con concentraciones altas (rojas) y medio altas (naranjas), que comprueban que el parámetro de Materia Orgánica no presento grades diferencias entre estaciones y fechas (ver figura 19).

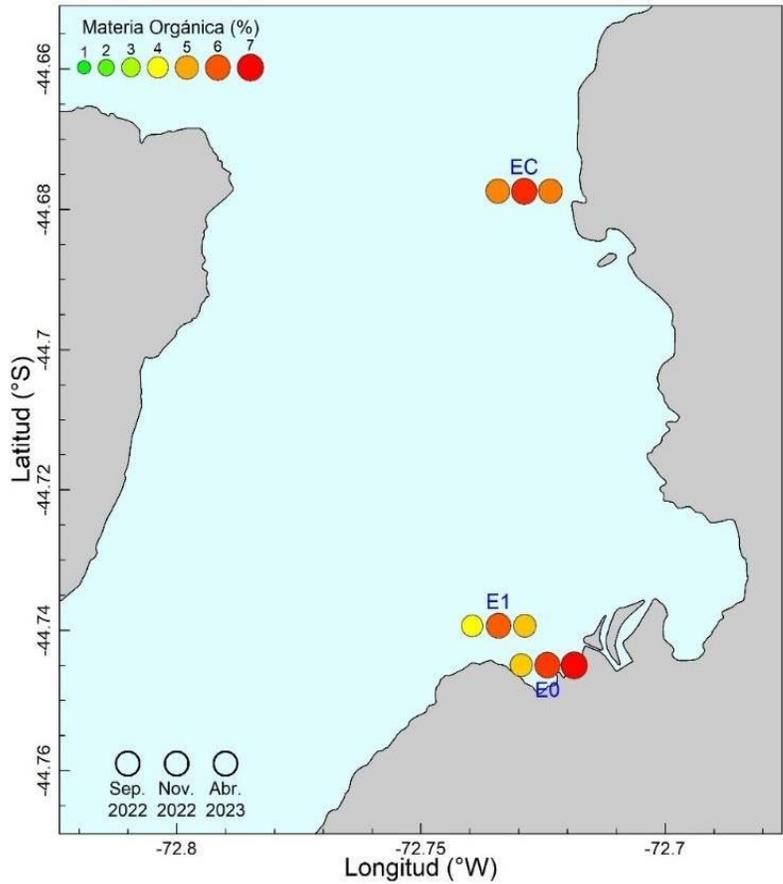


Figura 19: Mapa de burbujas con las concentraciones encontradas de Materia Orgánica en las tres estaciones muestreadas en las tres fechas de muestreo.

DISCUSIÓN

Se ha determinado que en el sedimento en áreas adyacentes a los centros de cultivo, la mayor acumulación de nutrientes es producto de las fecas y el alimento no consumido por los peces cultivados, aumentando las concentraciones de fósforo, carbono y nitrógeno, modificando las propiedades fisicoquímicas del sedimento influyendo en los procesos biogeoquímicos, que alteran la estructura de las comunidades microbianas (Hornick & Buschmann, 2018).

En el presente trabajo, la estación E0 (bajo la balsa jaula), es donde se encontró las mayores concentraciones de fósforo, carbono, nitrógeno y un sedimento altamente reducido (potencial redox). Esto corresponde a lo esperado, ya que es un sector que está recibiendo constantemente enriquecimiento de material orgánico, formando una capa de sedimento negro blando y que altera la estructura de las comunidades microbianas bentónicas (Rosenberg, 2001).

Los residuos orgánicos son arrastrados hacia otros lugares, lo que pudimos apreciar en la estación E1 (a 1 kilómetro del centro de cultivo) y en la estación control EC (a 7 kilómetros del centro de cultivo), lo que demostró que también corresponden a sedimentos intervenidos. La búsqueda de una estación control (EC) no fue fácil, esto debido a que el fiordo Puyuhuapi posee en este momento un gran número de concesiones acuícolas activas, por lo cual una estación control sin impacto ambiental no es posible encontrar.

Estos resultados son importantes ya que la degradación microbiana es una vía de transformación para los contaminantes orgánicos en el medio ambiente, y puede proporcionar condiciones favorables para su degradación (Fenner *et al.*, 2013).

La estructura de las comunidades bacterianas es sensible a los cambios en las condiciones ambientales, especialmente cuando se someten a aportes de nutrientes relacionados con la actividad antropogénica como la acuicultura (Hornick & Buschmann, 2018).

En las comunidades bacterianas presentes en este estudio, el phyla dominante en las tres estaciones de muestreo correspondió a *Proteobacteria* (tabla 3).

En las estaciones E0 y E1, hubo una similitud en la diversidad encontrada, con la presencia de los *phyla: Actinobacteria, Bacteroidetes y Firmicutes*. La estación control EC presento una baja diversidad microbiana, distinto a lo esperado, con un mayor presencia de los *phyla Proteobacteria y Firmicutes*. El origen de estas bacterias se puede explicar por un estudio realizado por Coca *et al.* (2023), que indican que las bacterias intestinales en el salmón del Atlántico pertenecen principalmente a los *phyla Proteobacteria, Fusobacteria, Firmicutes, Bacteroidota, Actinobacteria y Verrucomicrobia*. De estos, tres phyla fueron encontrados en las estaciones muestreadas, lo que corrobora la relación entre lo que elimina el salmón en cultivo mediante las heces y lo que llega al fondo marino y se convierte en posible reservorio.

Considerando un umbral del 1% de abundancia relativa (León *et al.*, 2018), la diversidad estuvo representada en 40 Familias, de las cuales las familias más abundantes correspondieron para estación E0 a las familias: *Actinobacteria*, *Desulfobulbaceae*, *Desulfuromonadales*, *Deltaproteobacteria* y *Xanthomonadaceae*. Para la estación E1 las familias más abundantes fueron: *Actinobacteria*, *Porphyromonadaceae*, *Sphingomonadaceae* y *Desulfobulbaceae*. Para la estación control EC fueron solo dos las familias más abundantes, correspondiente a *Gammaproteobacteria* y *Rhodocyclaceae* (ver gráficos 10, 11 y 12). Las familias de bacterias encontradas crecen en sedimentos reducidos y con alto enriquecimiento orgánico, como es el caso de *Desulfobulbaceae*, que actúan como bacterias que acoplan la reducción de oxígeno en la superficie del sedimento a la oxidación de sulfuros en capas anóxicas más profundas (Pfeffer *et al.*, 2012).

Las *Actinobacterias* son responsables del reciclaje de la materia orgánica, desintegrando aquellos compuestos resistentes que las bacterias comunes y los hongos filamentosos no pueden descomponer, desempeñando un papel fundamental en el ciclo del carbono. Las *Deltaproteobacteria* son bacterias reductoras de sulfato. Las *Desulfuromonadales*, *Porphyromonadaceae*, *Sphingomonadaceae* y *Xanthomonadaceae* se caracterizan por su potencial reductor de metales así como su habilidad para la degradación de hidrocarburos (Miranda *et al.*, 2021). Köster & Meyer-Reil (2001), indican que los sedimentos marinos se ven afectados por la interacción de factores geológicos, biológicos,

hidrológicos y fisicoquímicos y biológicos como reservorios de nutrientes acumulando pesticidas, antibióticos y metales pesados.

Estos resultados se vieron respaldados por los índices de Shannon e índice de Simpson, con valores que muestran una alta diversidad en E0 y E1 y una baja diversidad en estación Control EC (índice de Shannon). En cuanto al Índice de dominancia de Simpson, los resultados encontrados demuestran una alta dominancia en las estaciones E0 y E1 y una baja dominancia en EC (ver figura 13). Una investigación realizada por Caruso *et al.* (2016), respaldan los resultados que las comunidades microbianas reaccionan rápidamente a los cambios ambientales modulando su composición y metabolismo lo que en consecuencia demuestra un efecto significativo en la biodiversidad y el equilibrio del ecosistema acuático marino. Esto conlleva al aumento de bacterias potencialmente patógenas (Resende *et al.*, 2015), aparición de bacterias anaeróbicas reductoras de sulfatos y nitratos y desaparición de bacterias estrictamente aeróbicas (Santander-de León *et al.*, 2017).

Las *Gammaproteobacterias* son bacterias fijadoras de nitrógeno y juegan un papel muy importante en la descomposición de la materia orgánica. La familia *Rhodocyclaceae* tiene amplias capacidades metabólicas y puede degradar múltiples fuentes de carbono, como muchos compuestos aromáticos (Smalley *et al.*, 2015). Estos resultados se ven respaldados por los estudios realizados por Li *et al.* (2020), donde enfatizan que los contaminantes también afectan la

composición de las comunidades microbianas en el medio ambiente, ya que la mayoría de los microorganismos se suprimen o mueren bajo los efectos inhibidores y tóxicos de los contaminantes, lo que sólo permite que la población dominante sobreviva.

Como podemos constatar en este estudio, en los sedimentos de centros de cultivo y lugares próximos, existe un aumento de bacterias asociadas a ambientes anaeróbicos reductoras de sulfatos y nitratos. Esto también se ve reflejado con los resultados que estuvimos de adenosintrifosfato (ATP) en las dos últimas fechas de muestreo, donde pudimos estimar la biomasa microbiana viva o activa en sedimentos, con valores muy superiores de actividad microbiana en abril 2023 que en noviembre 2022 (ver figura 8).

La determinación de la bacteria de *Piscirickettsia salmonis* en el sedimento, fue uno de los objetivos de esta tesis, ya que existen escasos estudios de la bacteria en el sedimento. Por lo cual, encontrarla en las tres estaciones de muestreo (incluida la estación control) y que su señal aumente en el tiempo, indica que no sólo puede persistir a través del tiempo, sino que también se incrementa a medida que los cultivos se desarrollan en el área.

Los resultados obtenidos en *Piscirickettsia salmonis* fueron trabajados en escala logarítmica, ya que las diferencias de la señal captada entre estaciones fue con varios ordenes de magnitud de diferencia, por lo cual para poder graficar se usó la escala mencionada (figura 7).

Al encontrar la señal molecular (ADN) de *P. salmonis* y que su señal aumente a medida que transcurre el proceso productivo, es una evidencia a favor de que los sedimentos podrían ser un reservorio (Huerta, 2020). El tercer muestreo de E0 (estación debajo del centro) en abril 2023, fue de tres de órdenes de magnitud mayor la señal molecular que el primer muestreo en septiembre 2022, que correspondió a 7 meses transcurrido de la puesta en marcha del cultivo (ver figura 7).

Estudios realizados por Coca *et al.* (2023), indican que la microbiota intestinal de peces en cultivo, contiene una gran variedad de bacterias patógenas, incluida *Piscirickettsia salmonis*. Por lo cual podemos inferir, que es una de las vías en que llega la bacteria al sedimento, producto de la decantación al fondo marino de las fecas de peces infectados.

Que la bacteria esté presente en otros sitios y no sólo en la estación más próxima a la balsa jaula (Estación E0), demuestra que la bacteria puede ser transportada hacia otros lugares producto de las corrientes y circulación de las aguas o una segunda posibilidad, como se trata de un barrio de producción acuícola donde los brotes epidémicos generalmente afectan a todo un barrio y no solo a un centro, la bacteria acumulada en los sedimentos distante al centro de estudio puede provenir de diversas fuentes (otros centros). De esta manera, esta bacteria podría considerarse endémica en el área de cultivo estudiada.

En el presente estudio, se provee evidencia que demuestra que los factores ambientales tienen un impacto significativo en la estructura de las comunidades

microbianas. Así también, las correlaciones significativas observadas entre el número de copias del gen de *Piscirickettsia salmonis* determinado y las concentraciones de N, P, C y Potencial Redox, indican que el incremento de la concentración de la señal molecular en el tiempo está asociado al incremento de estos parámetros fisicoquímicos también a través del tiempo. En otras palabras, ambos procesos de acumulación parecen estar acoplados y relacionados con el transcurso del desarrollo del cultivo de peces en el área. Esta observación, es una evidencia de que la bacteria puede estar latente como reservorio en los sedimentos y que al tener las condiciones propicias (por ejemplo resuspensión), podría potencialmente infectar a nuevos cultivos en la fase productiva subsiguiente de un barrio de producción acuícola.

CONCLUSIONES

El fiordo de Puyuhuapi muestra un impacto antropogénico en sus sedimentos de la industria del salmón, lo que dificulta encontrar áreas de control apropiadas. Los parámetros físico-químicos analizados de los sedimentos bajo las jaulas de cultivo de salmón y áreas adyacentes muestran una alta acumulación de materia orgánica que podría facilitar la permanencia de bacterias patógenas, como *P. salmonis*. Así, los sedimentos, incluidos los de la estación de control, son un posible reservorio de bacterias patógenas, incluida *P. salmonis*.

La diversidad de comunidades bacterianas fue mayor debajo de las jaulas de salmón (estación E0) y a 1 km de las jaulas de salmón (estación E1) en comparación con la estación de control. La diversidad bacteriana encontrada en la estación E0 estuvo asociada a oxidación de sulfuros, degradación de materia orgánica, degradadores de hidrocarburos y reducción de metales, entre otros. Por tanto, las comunidades microbianas responden a cambios ambientales, como la constante incorporación de nutrientes que afectan a los taxones presentes en esos sedimentos.

El aumento de Carbono, Nitrógeno y Fósforo durante el proceso de producción de salmón y la correlación significativa del Carbono, Nitrógeno y Fósforo y el potencial redox con el aumento de *P. salmonis* en los sedimentos sugiere que el aumento ocurre durante el cultivo del salmón y refuerza la idea de que *P. Salmonis* se acumula durante ese tiempo, convirtiendo el sedimento en un

potencial reservorio ambiental.

La composición de la comunidad microbiana refleja una capacidad metabólica potencial para la degradación de una alta carga de materia orgánica, dado el tipo de taxa encontradas en el presente trabajo. Esto podría tener incidencia en los ciclos biogeoquímicos, ya que la composición de la comunidad microbiana estaría respondiendo a los aportes de nutrientes relacionados con la actividad acuícola.

PROYECCIONES

La SRS ha sido sujeto de múltiples estudios y esquemas de control para sobrellevar sus efectos, destacando métodos preventivos como el uso de vacunas, la selección genética de familias de salmones más tolerantes a la infección y tratamientos potencialmente curativos como es el uso de antibióticos, siendo esta última la estrategia más común. La cual no ha dado los resultados esperados, ya que *P. salmonis* sigue siendo una de las principales causas de mortalidad en el cultivo de salmones. Para corregir esta tendencia, la industria debe invertir más en investigación y desarrollo para optimizar sus procesos, ya no sólo en términos de producir más al menor costo económico, sino que también al menor costo colateral, basando su producción en evidencia científica.

En este estudio, se determinó la señal molecular de la bacteria *P. salmonis* en el sedimento y se demostró que esta señal se incrementa en el tiempo a medida que transcurre el proceso del cultivo de peces, lo que constituye un hallazgo

importante, ya que esta observación es un primer indicio de que el sedimento acumula este patógeno durante dicho proceso, pudiendo transformar a esta matriz en un potencial reservorio ambiental.

Para continuar con la investigación sería importante evaluar la viabilidad de la bacteria *P. salmonis* en el sedimento y su capacidad infectiva del sedimento al huésped. Para evaluar la viabilidad de la bacteria desde el sedimento, se pondrían utilizar técnicas como dilución en placa de suelo (Ellaiah et al., 1996), método de extracción celular en el sedimento (Kallmeyer et al., 2008), entre otras técnicas.

Para evaluar la capacidad infectiva de *P. salmonis* en el sedimento, sería necesario realizar experimentos controlados, en donde se someta a los salmones a la bacteria aislada desde el sedimento, realizando experimentos de desafío evaluando todas las condiciones como temperatura, tiempo, etapa de vida del salmón etc.

Otro hallazgo importante de este estudio, es la importancia en que la industria salmonera debe evaluar sus técnicas para limpieza del sedimento, ya que la presencia de *P. salmonis* en el sedimento como posible reservorio, no sería aconsejable técnicas donde se intervenga el sedimento, que actualmente la industria utiliza. Por lo cual estrategias como dragar, oxigenar o remover el sedimento, podrían ser contraproducentes, ya que provocaría la dispersión o diseminación de la bacteria hacia otras áreas.

BIBLIOGRAFIA

- Abia, A. L. K., Alisoltani, A., Ubomba-Jaswa, E., & Dippenaar, M. A. (2019). Microbial life beyond the grave: 16S rRNA gene-based metagenomic analysis of bacteria diversity and their functional profiles in cemetery environments. *Science of The Total Environment*, 655, 831-84.
- Aguayo, P., Campos, V. L., Henríquez, C., Olivares, F., De la Iglesia, R., Ulloa, O., & Vargas, C. A. (2020). The influence of pCO₂-driven ocean acidification on open ocean bacterial communities during a short-term microcosm experiment in the eastern tropical South Pacific (ETSP) off northern Chile. *Microorganisms*, 8(12), 1924.
- Avendaño-Herrera, R. (2021). Salmon aquaculture, *Piscirickettsia salmonis* virulence, and one health: Dealing with harmful synergies between heavy antimicrobial use and piscine and human health comment on. *Aquaculture*, 532, 736062.
- Barraza Quiroz, D. R. (2019). Calidad ambiental marina costera de la bahía de Cartagena asociada con elementos traza en sedimentos (Master's thesis, Universidad de Cartagena).
- Barroso, G. G., Delgado, N. A. R., Galindo, R. S., Mendoza, R. H., Haro, J. A. R., & Álvarez, O. Q. (2022). Evaluación de la contaminación por As, Ni, Cu, Pb, Zn y Cr en sedimentos de la zona marino-costera asociada a la terminal marítima de nuevitas, Cuba. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 38, 81-94.
- Bartholomew, J. E. R. R. I., Arkush, K. D., & Soto, E. (2017). *Piscirickettsia salmonis*. *Fish viruses and Bacteria*, 272-285.
- Basta, T., Buerger, S., & Stolz, A. (2005). Structural and replicative diversity of large plasmids from sphingomonads that degrade polycyclic aromatic compounds and xenobiotics. *Microbiology*, 151(6), 2025-2037.
- Belli, T. J., Battistelli, A. A., Costa, R. E., Vidal, C. M. S., Schlegel, A. E., & Lapolli, F. R. (2019). Evaluating the performance and membrane fouling of an electro-membrane bioreactor treating textile industrial wastewater. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16, 6817-6826.
- Bentzon-Tilia, M., Traving, S. J., Mantikci, M., Knudsen-Leerbeck, H., Hansen, J. L., Markager, S., & Riemann, L. (2016). Significant N₂ fixation by heterotrophs, photoheterotrophs and heterocystous cyanobacteria in two

temperate estuaries. *The ISME journal*, 9(2), 273-285.

Bissett, A., Bowman, J., & Burke, C. (2006). Bacterial diversity in organically-enriched fish farm sediments. *FEMS Microbiology Ecology*, 55(1), 48-56.

Bravo, S.; M. Campos. (1989). Síndrome del salmón coho. *Chile Pesquero* 54: 47-48.

Briee, C., Moreira, D., & López, P. (2007). Archaeal and bacterial community composition of sediment and plankton a suboxic freshwater pond. *Research in Microbiology*, 158: 213 – 227

Burbano-Gallardo, E., Nivia-Duque, G., Imues-Figueroa, M., González-Legarda, E., Gómez-Delgado, M., & Pantoja-Díaz, J. (2021). Efecto de cultivos piscícolas en los sedimentos y la proliferación de comunidades bacterianas nitrificantes en el lago Guamuez, Colombia. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, 22(2).

Buschmann, A. H. (2001). Impacto ambiental de la acuicultura: el estado de la investigación en Chile y el mundo: un análisis bibliográfico de los avances y restricciones para una producción sustentable en los sistemas acuáticos. *Terram*.

Buschmann, A., & Pizarro, R. (2001). El costo ambiental de la salmonicultura en Chile. *Análisis de Políticas Públicas*, 5, 1-8.

Buschmann, A.H., Riquelme, M., Hernández-González, D., Varela, J.E., Jiménez, L.A., Henríquez, P.A., Vergara, R., Guíñez & L. Filún. (2006). A review of the impacts of salmon farming on marine coastal ecosystems in the southeast Pacific. *ICES J. Mar. Sci.*, 63: 1338-1345.

Buschmann, A. H., Cabello, F., Young, K., Carvajal, J., Varela, D. A., & Henríquez, L. (2009). Salmon aquaculture and coastal ecosystem health in Chile: analysis of regulations, environmental impacts and bioremediation systems. *Ocean & coastal management*, 52(5), 243-249.

Buschmann, A. H., Tomova, A., López, A., Maldonado, M. A., Henríquez, L. A., Ivanova, L., & Cabello, F. C. (2012). Salmon aquaculture and antimicrobial resistance in the marine environment.

- Cabello, F. C., Godfrey, H. P., Buschmann, A. H., & Dölz, H. J. (2016). Aquaculture as yet another environmental gateway to the development and globalisation of antimicrobial resistance. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(7), e127-e133.
- Cao, J., Li, Y., Zhang, G., Yang, C., & Cao, X. (2013). Effect of Fe (III) on the biotreatment of bioleaching solutions using sulfate-reducing bacteria. *Int J Miner Process*.125:27–33.
- Caruso, G., Azzaro, M., Caroppo, C., Decembrini, F., Monticelli, L. S., Leonardi, M., & La Ferla, R. (2016). Microbial community and its potential as descriptor of environmental status. *ICES Journal of Marine Science*, 73(9), 2174-2177.
- Chang, Y. J., Peacock, A. D., Long, P. E., Stephen, J. R., McKinley, J. P., Macnaughton, S. J., & White, D. C. (2001). Diversity and characterization of sulfate-reducing bacteria in groundwater at a uranium mill tailings site. *Applied and environmental microbiology*, 67(7), 3149-3160.
- Chávez-Crooker, P., & Obreque-Contreras, J. (2010). Bioremediation of aquaculture wastes. *Current opinion in Biotechnology*, 21(3), 313-317.
- Chen, M. F., Yun, S., Marty, G. D., McDowell, T. S., Appersen, M. L. H. J. A., Guenther, T. A., & Hedrick, R. P. (2000). A *Piscirickettsia salmonis*-like bacterium associated with mortality of white seabass *Atractoscion nobilis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 43(2), 117-126.
- Chen, X., Feng, M., Ke, F., Pan, J., Fan, F., Wang, Y., & Li, W. (2018). Source and biogeochemical distribution of organic matter in surface sediment in the deep oligotrophic Lake Fuxian, China. *Aquatic geochemistry*, 24, 55-77.
- Clark, D. R., Ferguson, R. M., Harris, D. N., Matthews Nicholass, K. J., Prentice, H. J., Randall, K. C., & Dumbrell, A. J. (2018). Streams of data from drops of water: 21st century molecular microbial ecology. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Water*, 5(4), e1280.
- Clarke K. R., R. N. Gorley. 2001. PRIMER v5: User manual/ tutorial. PRIMER-E, Plymouth, UK.
- Cvitanich, J.; O. Garate; C.E. Smith. (1991). The isolation of a rickettsia-like organism causing disease and mortality in Chilean salmonids and its confirmation by Koch's postulate. *J. Fish Dis*. 14: 121-145.

- Coca, Y., Godoy, M., Pontigo, J. P., Caro, D., Maracaja-Coutinho, V., Arias-Carrasco, R., ... & Burbulis, I. (2023). Bacterial networks in Atlantic salmon with Piscirickettsiosis. *Scientific Reports*, 13(1), 17321.
- Cortés Hernández, K. P. (2021). Variabilidad ambiental y su influencia moduladora en la diversidad y composición taxonómica de las comunidades microbianas presentes en el agua y sedimentos de dos fiordos de la Patagonia Norte.
- Dilly, O., Bloem, J., Vos, A., & Munch, J. (2004). Bacterial diversity in agricultural soils during litter decomposition. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 468-4.
- Ellaiah P, Kalyan D, Rao VS, Rao BV (1996). Isolation and characterization of bioactive Actinomycetes from marine sediments. *Hindustan Antibiot. Bull.* 38:48-52.
- Fabiano, M., & Danovaro, R. (1998). Enzymatic activity, bacterial distribution, and organic matter composition in sediments of the Ross Sea (Antarctica). *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), 3838-3845.
- FAO. (2020). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción. Roma. 243 págs. (disponible en <https://doi.org/10.4060/ca9229es>).
- FAO. (2014). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2014. Roma. 223 págs. (disponible en www.fao.org/3/a-i3720S/index.html).
- Fernandez Da Silva, C., Ballester, E., Monserrat, J., Geracitano, L., Wasielesky Jr, W., & Abreu, P. C. (2008). Contribution of microorganisms to the biofilm nutritional quality: protein and lipid contents. *Aquaculture Nutrition*, 14(6), 507-514.
- Fenner, K., Canonica, S., Wackett, L. P., & Elsner, M. (2013). Evaluating pesticide degradation in the environment: blind spots and emerging opportunities. *Science*, 341(6147), 752-758.
- Fodelianakis, S., Papageorgiou, N., Karakassis, I., & Ladoukakis, E. D. (2015). Community structure changes in sediment bacterial communities along an organic enrichment gradient associated with fish farming. *Annals of Microbiology*, 65(1), 331-338.
- Fogel, G., Collins, C., Li, J., & Brunk, C. (1999). Prokaryotic Genome Size and SSU rDNA Copy Number: Estimation of Microbial Relative Abundance from a Mixed Population. *Microbial Ecology*. 38(2):93-113.

- Fogel, M. L. (2019). Nitrogen isotope biogeochemistry. *Geochemical Perspectives*, 8(2), 135-139.
- Fryer, J.L., Lannan, C., Giovannoni, L., Wood, N. (1992). *Piscirickettsia salmonis* gen. nov., sp. nov. the causative agent of an epizootic disease in salmonid fishes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 42(1): 120-126.
- Fryer, J. L., & Hedrick, R. P. (2003). *Piscirickettsia salmonis*: a Gram-negative intracellular bacterial pathogen of fish. *Journal of fish diseases*, 26(5), 251-262.
- Ghanbari, M., Kneifel, W., & Domig, K. J. (2015). A new view of the fish gut microbiome: advances from next-generation sequencing. *Aquaculture*, 448, 464-475.
- Ghosh, M., Verma, S. C., Mengoni, A., & Tripathi, A. K. (2004). Enrichment and identification of bacteria capable of reducing chemical oxygen demand of anaerobically treated molasses spent wash. *Journal of Applied Microbiology*, 96(6), 1278-1286.
- Guo, J., Chen, D., Potter, D., Rockne, K. J., Sturchio, N. C., Giesy, J. P., & Li, A. (2014). Polyhalogenated carbazoles in sediments of Lake Michigan: a new discovery. *Environmental science & technology*, 48(21), 12807-12815.
- Gutiérrez, M. H., Galand, P. E., Moffat, C., & Pantoja, S. (2015). Melting glacier impacts community structure of Bacteria, Archaea and Fungi in a Chilean Patagonia fjord. *Environmental microbiology*, 17(10), 3882-3897.
- Gutiérrez, M. H., Narváez, D., Daneri, G., Montero, P., Perez-Santos, I., & Pantoja, S. (2018). Linking seasonal reduction of microbial diversity to increase in winter temperature of waters of a Chilean Patagonia fjord. *Frontiers in Marine Science*, 5, 277.
- Hargrave, B. T., Holmer, M., & Newcombe, C. P. (2008). Towards a classification of organic enrichment in marine sediments based on biogeochemical indicators. *Marine Pollution Bulletin*, 56(5), 810-824.
- Harriague, A. C., Di Brino, M., Zampini, M., Albertelli, G., Pruzzo, C., & Misic, C. (2008). Vibrios in association with sedimentary crustaceans in three beaches of the northern Adriatic Sea (Italy). *Marine Pollution Bulletin*, 56(3), 574-579.

- He, H., Chen, Y., Li, X., Cheng, Y., Yang, C., & Zeng, G. (2017). Influence of salinity on microorganisms in activated sludge processes: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 119, 520-527.
- Hoehler, T. M., Bebout, B. M., & Des Marais, D. J. (2001). The role of microbial mats in the production of reduced gases on the early Earth. *Nature*, 412(6844), 324-327.
- Holm-Hansen, O., & Booth, C. (1966). The measurement of adenosine triphosphate in the ocean and its ecological significance. *Limnol Oceanogr* 11: 510-519.
- Hornick, K. M., & Buschmann, A. H. (2018). Insights into the diversity and metabolic function of bacterial communities in sediments from Chilean salmon aquaculture sites. *Annals of Microbiology*, 68(2), 63-77.
- Huerta, E. A. (2020). Presencia de genes de resistencia a antibióticos en el ADN extracelular obtenido de la cadena de producción del melón y su capacidad de inserción en bacterias (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
- Ingraham, J. L., & Ingraham C. A. (1998). *Introducción a la Microbiología*. Editorial Reverté, Barcelona. Página 363.
- Jansson, M., Bergström, A. K., Lymer, D., Vrede, K., & Karlsson, J. (2006). Bacterioplankton growth and nutrient use efficiencies under variable organic carbon and inorganic phosphorus ratios. *Microbial ecology*, 52, 358-364.
- Jordaan, K., & Bezuidenhout, C. C. (2016). Bacterial community composition of an urban river in the North West Province, South Africa, in relation to physico-chemical water quality. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 5868-5880.
- Juutinen, S., Rantakari, M., Kortelainen, P., Huttunen, J. T., Larmola, T., Alm, J., & Martikainen, P. J. (2009). Methane dynamics in different boreal lake types. *Biogeosciences*, 6(2), 209-223.
- Kallmeyer J, Smith DC, Spivack AJ, D-Hondt S (2008) Nuevo procedimiento de extracción de células aplicado a sedimentos subterráneos profundos. *Limnol Oceanogr Métodos* 6:236-245.

- Kamjunke, N., von Tümpling, W., Hertkorn, N., Harir, M., Schmitt-Kopplin, P., Norf, H., & Herzsprung, P. (2017). A new approach for evaluating transformations of dissolved organic matter (DOM) via high-resolution mass spectrometry and relating it to bacterial activity. *Water research*, 123, 513-523.
- Karl, D. M. (1993) Total microbial biomass estimation derived from the measurement of particulate adenosine-5'- triphosphate. In: Kemp P, Sherr B, Sherr E, Cole J (eds) *Handbook of methods in aquatic microbial ecology* Lewis Publishers, Boca Raton, FL, p 359–368
- Karl, D. M. (2007). Microbial oceanography: paradigms, processes and promise. *Nature Reviews Microbiology*, 5(10), 759-769.
- Kawahara, N., Shigematsu, K., Miura, S., Miyadai, T., & Kondo, R. (2008). Distribution of sulfate-reducing bacteria in fish farm sediments on the coast of southern Fukui Prefecture, Japan. *Plankton and Benthos Research*, 3(1), 42-45.
- Kirchman, D. L., Yu, L., & Cottrell, M. T. (2003). Diversity and abundance of uncultured Cytophaga-like bacteria in the Delaware Estuary. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(11), 6587-6596.
- Kleikemper, J., Schroth, M. H., Sigler, W. V., Schmucki, M., Bernasconi, S. M., & Zeyer, J. (2002). Activity and diversity of sulfate-reducing bacteria in a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1516-1523.
- Köster, M., & Meyer-Reil, L. A. (2001). Characterization of carbon and microbial biomass pools in shallow water coastal sediments of the southern Baltic Sea (Norderügsche Bodden). *Marine Ecology Progress Series*, 214, 25-41.
- Lannan, C. N., & Fryer, J. L. (1993). *Piscirickettsia salmonis*, a major pathogen of salmonid fish in Chile. *Fisheries Research*, 17(1-2), 115-121.
- Larenas, J., Astorga, C., Contreras, J., Smith, P. (1996) Detección de *Piscirickettsia salmonis* en ovas fertilizadas provenientes de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), experimentalmente infectadas. *Arch Med Vet* 28:161-166.
- Larenas, J., Contreras, J., Oyanedel, S., Morales, M., & Smith, P. (1997). Efecto de la densidad poblacional y temperatura en truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) inoculadas con *Piscirickettsia salmonis*. *Archivos de medicina veterinaria*, 29(1), 113-119.

- Larenas, J., Bartholomew, J., Troncoso, O., Fernández, S., Ledezma, H., Sandoval, N., & Smith, P. (2003). Experimental vertical transmission of *Piscirickettsia salmonis* and in vitro study of attachment and mode of entrance into the fish ovum. *Diseases of Aquatic Organisms*, 56(1), 25-30.
- León, C., Campos, V., Urrutia, R., & Mondaca, M. A. (2012). Metabolic and molecular characterization of bacterial community associated to Patagonian Chilean oligotrophic-lakes of quaternary glacial origin. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1511-1521.
- Leon, C. G., Moraga, R., Valenzuela, C., Gugliandolo, C., Lo Giudice, A., Papale, M., & Campos, V. L. (2018). Effect of the natural arsenic gradient on the diversity and arsenic resistance of bacterial communities of the sediments of Camarones River (Atacama Desert, Chile). *PloS one*, 13(5), e0195080.
- Li, S., Zhao, B., Jin, M., Hu, L., Zhong, H., & He, Z. (2020). A comprehensive survey on the horizontal and vertical distribution of heavy metals and microorganisms in soils of a Pb/Zn smelter. *Journal of Hazardous Materials*, 400, 123255.
- Lima Paredes, K. A. (2018). Caracterización genética y metabólica de bacterias en ambientes fríos con actividad antropogénica (Doctoral dissertation, Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra).
- Liu, L., Sun, F., Zhao, H., Mi, H., He, S., Chen, Y., & Wang, Z. (2021). Compositional changes of sedimentary microbes in the Yangtze River Estuary and their roles in the biochemical cycle. *Science of The Total Environment*, 760, 143383.
- Lokesh, J., Kiron, V., Sipkema, D., Fernandes, J. M., & Moum, T. (2019). Succession of embryonic and the intestinal bacterial communities of Atlantic salmon (*Salmo salar*) reveals stage-specific microbial signatures. *MicrobiologyOpen*, 8(4), e00672.
- López, M. A. (2016). Enriquecimiento de actividad nitrificante en sedimentos marinos mediante sistemas discontinuos (Doctoral dissertation, Universidad de Concepción).
- Luczak, C., Janquin, M. A., & Kupka, A. (1997). Simple standard procedure for the routine determination of organic matter in marine sediment. *Hydrobiologia*, 345(1), 87-94.

- Luna, G. M., Dell'Anno, A., Pietrangeli, B., & Danovaro, R. (2012). A new molecular approach based on qPCR for the quantification of fecal bacteria in contaminated marine sediments. *Journal of biotechnology*, 157(4), 446-453.
- Madsen, E. L. (2011). Microorganisms and their roles in fundamental biogeochemical cycles. *Current opinion in biotechnology*, 22(3), 456-464.
- Mardones, F. O., Paredes, F., Medina, M., Tello, A., Valdivia, V., Ibarra, R., & Gelcich, S. (2018). Identification of research gaps for highly infectious diseases in aquaculture: the case of the endemic *Piscirickettsia salmonis* in the Chilean salmon farming industry. *Aquaculture*, 482, 211-220.
- Martínez-Campos, G.J. (2016). Contaminación por metales pesados en sedimentos superficiales de seis regiones marino-costera del Oriente de Venezuela. Tesis de Grado. Universidad de Oriente, núcleo de Sucre, Venezuela. 92pp.
- Mikhailov, I. S., Zakharova, Y. R., Bukin, Y. S., Galachyants, Y. P., Petrova, D. P., Sakirko, M. V., & Likhoshway, Y. V. (2019). Co-occurrence networks among bacteria and microbial eukaryotes of Lake Baikal during a spring phytoplankton bloom. *Microbial ecology*, 77, 96-109.
- Miranda, R. M., Aguila-Torres, P., Aranda, C. P., Maldonado, J., & Casado, A. (2021). Taxonomy and diversity of bacterial communities associated with marine sediments from Chilean salmonid farms. *Aquaculture Research*, 52(4), 1605-1620.
- Montero, P., Gutiérrez, M. H., Daneri, G., & Jacob, B. (2021). The Effect of Salmon Food-Derived DOM and Glacial Melting on Activity and Diversity of Free-Living Bacterioplankton in Chilean Patagonian Fjords. *Frontiers in microbiology*, 12, 772900-772900.
- Montero, P., Daneri, G., Tapia, F., Iriarte, J. L., & Crawford, D. (2017). Diatom blooms and primary production in a channel ecosystem of central Patagonia. *Latin american journal of aquatic research*, 45(5), 999-1016.
- Montero, P., Daneri, G., Gonzalez, H. E., Iriarte, J. L., Tapia, F. J., Lizarraga, L., & Pizarro, O. (2011). Seasonal variability of primary production in a fjord ecosystem of the Chilean Patagonia: Implications for the transfer of carbon within pelagic food webs. *Continental Shelf Research*, 31(3-4), 202-215.
- Moreno Perlín, T. (2014). Enriquecimiento de comunidades sulfato reductoras degradadoras de acetato en condiciones ácidas (Master's thesis).

- Navarro, L., Jay, F., Nomura, K., He, S. Y., & Voinnet, O. (2008). Suppression of the microRNA pathway by bacterial effector proteins. *Science*, 321(5891), 964-967.
- Niklitschek, E. J., Soto, D., Lafon, A., Molinet, C., & Toledo, P. (2013). Southward expansion of the Chilean salmon industry in the Patagonian fjords: main environmental challenges. *Reviews in Aquaculture*, 5(3), 172-195.
- Nimptsch, J., Woelfl, S., Osorio, S., Valenzuela, J., Ebersbach, P., von Tuempling, W., & Graeber, D. (2015). Tracing dissolved organic matter (DOM) from land-based aquaculture systems in North Patagonian streams. *Science of the Total Environment*, 537, 129-138.
- Norby, R. J., & Zak, D. R. (2011). Ecological lessons from free-air CO₂ enrichment (FACE) experiments. *Annual review of ecology, evolution, and systematics*, 42, 181-203.
- Northington, R. M., & Saros, J. E. (2016). Factors controlling methane in arctic lakes of southwest Greenland. *PloS one*, 11(7), e0159642.
- Olivares, J., & Marshall, S. H. (2010). Determination of minimal concentration of *Piscirickettsia salmonis* in water columns to establish a fallowing period in salmon farms. *Journal of fish diseases*, 33(3), 261-266.
- Oren, A. (2014). The family rhodocyclaceae. In *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria*. DeLong EF, Lory S., Stackebrandt E., and Thompson FL.
- O'Ryan, R. & M. Pereira. (2015). Participatory indicators of sustainability for the salmon industry: the case of Chile. *Mar. Policy*, 51: 322-330.
- Pantoja, S., Iriarte, J. L., & Daneri, G. (2011). Oceanography of the Chilean Patagonia. *Continental shelf research*, 31(3-4), 149-153.
- Pfeffer, C., Larsen, S., Song, J., Dong, M., Besenbacher, F., Meyer, R. L., & Nielsen, L. P. (2012). Filamentous bacteria transport electrons over centimetre distances. *Nature*, 491(7423), 218-221.
- Phillips, M. (2010). Mariculture overview. *Marine Policy and Economics, a Derivative of Encyclopedia of Ocean Sciences*, Porter Hoagland, 2: 171-178.
- Resende, J. A., Silva, V. L., Cesar, D. E., Del'Duca, A., Fontes, C. O., & Diniz, C. G. (2015). Seasonal dynamics of microbial community in an aquaculture system for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Research*, 46(5), 1233-1240.

- Ríos Valenciana, E. (2015). Reducción biológica de As (V) y sulfato en sedimentos de un sistema hidráulico contaminado con arsénico (Master's thesis).
- Rojas, V., Galanti, N., Bols, N. C., & Marshall, S. H. (2009). Productive infection of *Piscirickettsia salmonis* in macrophages and monocyte-like cells from rainbow trout, a possible survival strategy. *Journal of cellular biochemistry*, 108(3), 631-637.
- Rosenberg, R. (2001). Marine benthic faunal successional stages and related sedimentary activity. *Scientia Marina*, 65 (S2), 107-119.
- Salgado Garrido, P. C. (2011). Distribución espacio-temporal de ensamblajes de quistes de dinoflagelados productores de floraciones algales nocivas en sedimentos costeros del sur de Chile (Región de Los Lagos) durante los últimos 150 años.
- Salvo, V. I. O. (2012). Estimaciones de los tiempos de recambio en fiordos de la provincia de Aysén, Chile (Doctoral dissertation, Universidad de Concepción).
- Sánchez-Baena, A. M., Caicedo-Bejarano, L. D., & Chávez-Vivas, M. (2021). Structure of Bacterial Community with Resistance to Antibiotics in Aquatic Environments. A Systematic Review. *International journal of environmental research and public health*, 18(5), 2348. <https://doi.org/10.3390/ijerph18052348>.
- Santander-de Leon, S. M. S., Nuñal, S. N., Wei, H., Yoshikawa, T., & Maeda, H. (2017). Bacterial community composition shifts in sediments influenced by fish feeds. *Aquaculture Research*, 48(8), 4380-4389.
- Schnute, J. T., Boers, N. M., Haigh, R., & Couture-Beil, A. (2015). User's Guide Revised from Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences 2549.
- Shah, S.Q.A., Cabello, F.C., L'Abée-Lund, T.M., Tomova, A., Godfrey, H.P., Buschmann, A.H., Sørum, H. (2014). Antimicrobial resistance and antimicrobial resistance genes in marine bacteria from salmon aquaculture and non- aquaculture sites. *Environ. Microbiol.* 16, 1310e1320.
- Seguel Rojas, G. R. (2019). Variabilidad meteorológica y oceanográfica en fiordos australes de Chile: caso de estudio, Fiordo Puyuhuapi.
- Silva, N., & Vargas, C. A. (2014). Hypoxia in Chilean patagonian fjords. *Progress in Oceanography*, 129, 62-74.

- Smalley, N. E., Taipale, S., De Marco, P., Doronina, N. V., Kyrpides, N., Shapiro, N., & Kalyuzhnaya, M. G. (2015). Functional and genomic diversity of methylotrophic Rhodocyclaceae: description of *Methyloversatilis discipulorum* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(Pt_7), 2227-2233.
- Smith, P. A., Pizarro, P., Ojeda, P., Contreras, J., Oyanedel, S., & Larenas, J. (1999). Routes of entry of *Piscirickettsia salmonis* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of aquatic organisms*, 37(3), 165-172.
- Steven, A., Aryal, S., Bernal, P., & Bravo, F. (2019) SIMA Austral: an operational information system for managing the Chilean aquaculture industry with international application. *J Oper Oceanogr* 12(Suppl 2):S29–S46
- Storesund, J. E., Erga, S. R., Ray, J. L., Thingstad, T. F., & Sandaa, R. A. (2015). Top-down and bottom-up control on bacterial diversity in a western Norwegian deep-silled fjord. *FEMS microbiology ecology*, 91(7), fiv076.
- Suarez, C., Piculell, M., Modin, O., Langenheder, S., Persson, F., & Hermansson, M. (2019). Thickness determines microbial community structure and function in nitrifying biofilms via deterministic assembly. *Scientific reports*, 9(1), 5110.
- Tatti, E., McKew, B. A., Whitby, C., & Smith, C. J. (2016). Simultaneous DNA-RNA extraction from coastal sediments and quantification of 16S rRNA genes and transcripts by real-time PCR. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (112), e54067.
- Templer, S. P., Wehrmann, L. M., Zhang, Y., Vasconcelos, C., & McKenzie, J. A. (2011). Microbial community composition and biogeochemical processes in cold-water coral carbonate mounds in the Gulf of Cadiz, on the Moroccan margin. *Marine Geology*, 282(1-2), 138-148.
- Troell, M., Naylor, R. L., Metian, M., Beveridge, M., Tyedmers, P. H., Folke, C., & De Zeeuw, A. (2014). Does aquaculture add resilience to the global food system?. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(37), 13257-13263.
- Valenzuela, F., Casillas, R., Villalpando, E., & Vargas, F. (2015). El gen ARNr 16S en el estudio de comunidades microbianas marinas. *Ciencias marinas*, 41(4), 297-313.
- Villasante, A., Ramírez, C., Catalán, N., Opazo, R., Dantagnan, P., & Romero, J. (2019). Effect of dietary carbohydrate-to-protein ratio on gut microbiota in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Animals*, 9(3), 89.

- Wang, X., Olsen, L. M., Reitan, K. I., & Olsen, Y. (2012). Discharge of nutrient wastes from salmon farms: environmental effects, and potential for integrated multi-trophic aquaculture. *Aquaculture Environment Interactions*, 2(3), 267-283.
- Wang, L., Xia, J., Yu, J., Yang, L., Zhan, C., Qiao, Y., & Lu, H. (2017). Spatial variation, pollution assessment and source identification of major nutrients in surface sediments of Nansi Lake, China. *Water*, 9(6), 444.
- Whitman, W. B., Coleman, D. C., & Wiebe, W. J. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(12), 6578-6583.
- Whitman, W.B., Bowen T.L., Boone D.R. (2014) The Methanogenic Bacteria. En: The Prokaryotes Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt e., Thompson F. (eds). Springer, Berlin, Heidelberg, 123-163.
- Wilhelm, V., Miquel, A., Burzio, L. O., Roseblatt, M., Engel, E., Valenzuela, S., & Valenzuela, P. D. (2006). A vaccine against the salmonid pathogen *Piscirickettsia salmonis* based on recombinant proteins. *Vaccine*, 24(23), 5083-5091.
- Winton, R. S., Calamita, E., & Wehrli, B. (2019). Reviews and syntheses: Dams, water quality and tropical reservoir stratification. *Biogeosciences*, 16(8), 1657-1671.
- Yuksel, S. A., Thompson, K. D., Ellis, A. E., & Adams, A. (2001). Purification of *Piscirickettsia salmonis* and associated phage particles. *Diseases of aquatic organisms*, 44(3), 231-235.
- Zak, D. R., Pregitzer, K. S., Burton, A. J., Edwards, I. P., & Kellner, H. (2011). Microbial responses to a changing environment: implications for the future functioning of terrestrial ecosystems. *Fungal Ecology*, 4(6), 386-395.
- Zandt, M.H., Liebner, S. and Welte. C.U. (2020) Roles of Thermokarst lakes in a Warming world. *Trends in Microbiology*, 28 (9). 769-779.
- Zhang, L., Tu, D., Li, X., Lu, W., & Li, J. (2020). Impact of long-term industrial contamination on the bacterial communities in urban river sediments. *BMC microbiology*, 20, 1-16.