



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ingeniería

## **Metagenómica de un sistema acuapónico**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

**Doctor en Ingeniería**

Presenta la

**M. en C. Perla Valeria Munguía Fragozo**

Dirigido por:

**Dr. Ramón Gerardo Guevara González**

Querétaro, Qro. Diciembre 2019



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ingeniería  
Doctorado en Ingeniería

Metagenómica de un sistema acuapónico

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Doctor en Ingeniería

Presenta

Perla Valeria Munguía Fragozo

Dirigido por:

Dr. Ramón Gerardo Guevara González

Dr. Ramón Gerardo Guevara González

Presidente

Dr. Andrés Cruz Hernández

Secretario

Dr. Irineo Torres Pacheco

Vocal

Dr. Manuel Toledano Ayala

Suplente

Dr. Juvenal Rodríguez Rodríguez

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Agosto 2019

México

**Dedicatorias**

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## Agradecimientos

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## Resumen

Hoy en día nuestro actual estilo de vida genera una gran demanda de los servicios y productos del ecosistema, además de provocar la sobreexplotación de los recursos no renovables como el agua, entre otros. Al mismo tiempo la creciente población humana presiona los sistemas de producción agroalimentaria para una mayor producción de alimento y como consecuencia de ello, la inseguridad alimentaria aumenta. Por estas razones es de suma importancia migrar a modelos de producción alimentarios sustentables. La acuaponía es un ejemplo de producción sustentable cuyas ventajas son el ahorro de agua, tierra cultivable, fertilizantes y energía. Los sistemas acuapónicos integran el cultivo de especies acuáticas y plantas, si bien esta tecnología no es nueva, recientemente se ha regresado la mirada a ellos por las razones mencionadas. El principal componente en un sistema acuapónico son los microorganismos y su importancia radica en el hecho de que son los que median el flujo y balance de los nutrientes permitiendo que se lleven a cabo ciclos biogeoquímicos en estos sistemas, sin embargo hasta hace muy poco se han comenzado a estudiar y es mucho lo que aún desconocemos de ellos ¿Quiénes están? ¿En qué cantidad? ¿Cómo interactúan? ¿Cómo se desarrollan en este ambiente? ¿Qué riesgo representan en la seguridad alimentaria? Por esta razón, el objetivo en este trabajo fue conocer el metagenoma de los microorganismos a lo largo del desarrollo de un sistema acuapónico utilizando herramientas modernas de análisis. La comunidad microbiana fue dominada por microorganismos procariontes con un 81.96%. Esta porción de la comunidad estuvo compuesta de 81.78% por *Bacteria* y 0.18% por *Archaea*. El resto de la comunidad estuvo compuesta por eucariontes en un 18.03% con 17.53% por Fungi y 0.50% por Protistas. El filo más abundante en todas las etapas del desarrollo del sistema acuapónico fueron *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, TM7 y *Acidobacteria* por procariontes y *Ascomycota* y *Basidiomycota* por eucariontes. Se encontraron microorganismos con metabolismos relacionados a fijación de nitrógeno, desnitrificación, oxidación de amonio y nitrito, reducción de nitrato, azufre, microorganismos quitinolíticos, celulolíticos y algunos conocidos por degradación de contaminantes. Además, la diversidad

de microorganismos procariontes incrementa con el tiempo mientras que la de los eucariontes disminuye.

**Palabras clave:** (Bioinformática, Comunidad Microbiana, Diversidad Taxonómica, Diversidad Funcional.)

## Summary

Today our current lifestyle generates a great demand for ecosystem services and products, as well as the overexploitation of non-renewable resources such as water. At the same time, the growing human population pressures food production systems for greater food production and consequently, food insecurity increases. For these reasons, it is very important to migrate to sustainable food production models. Aquaponics is a great example of sustainable production whose advantages are saving water, arable land, fertilizers, and energy. Aquaponic systems integrate the cultivation of aquatic species and plants, although this technology is not new, they have recently returned their gaze to them for specific reasons. The main component in an aquaponic system is the microorganisms and its importance lies in the fact that they are the ones that mediate the flow and balance of the nutrients that are carried out to a biogeochemical cycle in these systems, however until recently they have begun to study and there is much that still unknown about them. How are they? How many species are they? How do they interact? How does it develop in this environment? What risk does it represent in food security? For this reason, the objective of this work was to characterize the microbial prokaryotic and eukaryotic portions during an aquaponic system development using a metagenomic approach. The composition of microbial community was 81.96% prokaryotes, 81.78% by Bacteria and 0.18% by Archaea. The rest of the community was composed of eukaryotes in 18.03% with 17.53% by fungi and 0.50% by Protista. The most abundant phyla in all stages for the development of the aquaponic system were *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, TM7 and *Acidobacteria* for prokaryotes, and *Ascomycota* and *Basidiomycota* for eukaryotes. The most representative metabolisms by microbial community presented in this work were

nitrogen fixation, denitrification, ammonia, and nitrite oxidation, nitrate reduction, sulfur, methylotrophic, chitinolytic and cellulolytic metabolism as well as pollutant degradation metabolism. Moreover, the diversity of the microbial community increased over time for the prokaryotic portion and decreased for the eukaryotic portion.

**Keywords:** (Bioinformatic, Microbial Community, Taxonomic diversity, Functional diversity)

## Contenido

ÍNDICE DE CUADROS .....	10
ÍNDICE DE FIGURAS .....	11
<b>I. INTRODUCCIÓN / PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>13</b>
1.1. DIVERSIDAD MICROBIANA EN SISTEMAS ACUAPÓNICOS .....	15
1.2. METAGENÓMICA .....	16
1.3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
1.4. JUSTIFICACIÓN .....	18
1.7. ORGANIZACIÓN DE LA TESIS.....	19
<b>II. ANTECEDENTES.....</b>	<b>21</b>
2.1. SISTEMAS DE PRODUCCIÓN INTEGRADOS.....	21
2.1.1. <i>Producción acuapónica a nivel mundial</i> .....	21
2.1.2. <i>Ventajas y desventajas de la producción acuapónica</i> .....	23
2.1.3. <i>Funcionamiento de un sistema acuapónico</i> .....	25
2.1.4. <i>Ciclo productivo de sistemas acuapónicos</i> .....	26
2.2. DIVERSIDAD MICROBIANA DE UN SISTEMA ACUAPÓNICO .....	27
2.2.2. <i>Microorganismos patógenos en sistemas acuapónicos</i> .....	30
2.2.3. <i>Análisis de comunidades microbianas con técnicas moleculares</i> .....	31
2.3. METAGENÓMICA DE COMUNIDADES MICROBIANAS.....	33
<b>III. HIPÓTESIS.....</b>	<b>36</b>
<b>IV. OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
GENERAL.....	36
PARTICULARES.....	36
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
3.1. UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO .....	37
3.2. MATERIAL BIOLÓGICO.....	37
3.3. ANÁLISIS AMBIENTAL Y FISICOQUÍMICO DE LOS SISTEMAS ACUAPÓNICOS .....	37
3.4. ANÁLISIS DE LA COMUNIDAD MICROBIANA DE LOS SISTEMAS ACUAPÓNICOS .....	38
3.4.1 <i>Extracción de material genético</i> .....	41

3.4.2. <i>Procesamiento de secuencias crudas</i> .....	43
3.4.3. <i>OTUs y análisis de la comunidad</i> .....	44
3.4.4. <i>Índices de diversidad</i> .....	44
<b>VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>45</b>
4.1. MEDICIONES AMBIENTALES Y FISICOQUÍMICAS .....	45
4.2. COMUNIDAD MICROBIANA EN LOS SISTEMAS ACUAPÓNICOS .....	47
<b>VII. CONCLUSIONES</b> .....	<b>65</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>66</b>

Dirección General de Bibliotecas UAG

## Índice de cuadros

Tabla 1: Cuadro comparativo de sistemas acuapónicos y sistemas de cultivo tradicional .....	24
Tabla 2: Tiempos de muestreo por etapa y fecha de análisis de cada uno. ....	39
Tabla 3: Resultados promedio de mediciones fisicoquímicas del agua de los sistemas acuapónicos y ambientales .....	45
Tabla 4: Concentración y pureza de las muestras de ADN.....	48
Tabla 5: Resultados de secuenciación de la porción procarionte de la comunidad microbiana en sistemas acuapónicos. ....	49
Tabla 6: Resultados de secuenciación de la porción eucarionte de la comunidad microbiana en sistemas acuapónicos. ....	49
Tabla 7: Composición taxonómica de la comunidad microbiana de los sistemas acuapónicos.....	51
Tabla 8: Filos presentes en el sistema acuapónico, etapa en la que están presentes y etapas en donde tuvieron mayor representatividad en la comunidad microbiana del sistema acuapónico (rojo). ....	53
Tabla 9: Diversidad microbiana de la porción procarionta de la comunidad del sistema acuapónico .....	50
Tabla 10: Diversidad microbiana de la porción eucarionta de la comunidad del sistema acuapónico .....	50

## Índice de figuras

Figura 1: Esquema de un sistema acuapónico y sus componentes físicos y biológicos. ....	14
Figura 2: Cultivo integrado en culturas ancestrales; a la izquierda las chinampas de la cultura azteca ya la derecha el cultivo de arroz en China .....	22
Figura 3: Países que contribuyen a la producción bajo sistemas acuapónicos tanto a nivel comercial a pequeña escala como a nivel de investigación. ....	22
Figura 4: Unidad experimental: estanque acuícola, biofiltro, sistema de recirculación de agua y sensores de monitoreo. ....	38
Figura 5: Etapas del ciclo productivo de los sistemas acuapónicos experimentales y puntos de muestreo en el tiempo. ....	40
Figura 6: Puntos de muestreo en cada unidad experimental. ....	40
Figura 7: Proceso de filtración: Cada muestra se filtró varias veces a fin de separar por tamaño celular a los microorganismos. A la izquierda se muestra la filtración inicial; en medio se presenta la filtración de 1.6 micras y finalmente, la filtración de 0.22 micras. ....	41
Figura 8: Filtros utilizados para recuperar los microorganismos (5, 1.6 y 0.22 micrómetros de izquierda a derecha). ....	41
Figura 9: Comportamiento de la temperatura ambiental y la temperatura del agua en los sistemas acuapónicos. ....	46
Figura 10: Comportamiento de fosfatos, nitratos, nitritos y amonio en el agua de los sistemas acuapónicos. ....	47
Figura 11: Etapas del ciclo acuapónico y los <i>phyla</i> encontrados en una sola etapa o en común en dos o más etapas en la porción procarionta (izquierda) y en la porción eucarionta (derecha). ....	52
Figura 12: Abundancias relativas de los filos procariontes encontrados en las cuatro etapas del desarrollo del sistema acuapónico. ....	56
Figura 13: Abundancias relativas de los filos eucariontas encontrados en las cuatro etapas del desarrollo del sistema acuapónico. ....	58
Figura 14: Abundancias relativas de los géneros procarionta encontrados en las cuatro etapas del desarrollo del sistema acuapónico. ....	59
Figura 15: Abundancias relativas de los géneros eucariontas encontrados en las cuatro etapas del desarrollo del sistema acuapónico. ....	60

Figura 16: Rarefacción presente en las diferentes etapas del desarrollo de los sistemas acuapónicos para la porción procarionte (izquierda) y eucarionte (derecha). ..... 51

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## **I. Introducción / planteamiento del problema y justificación**

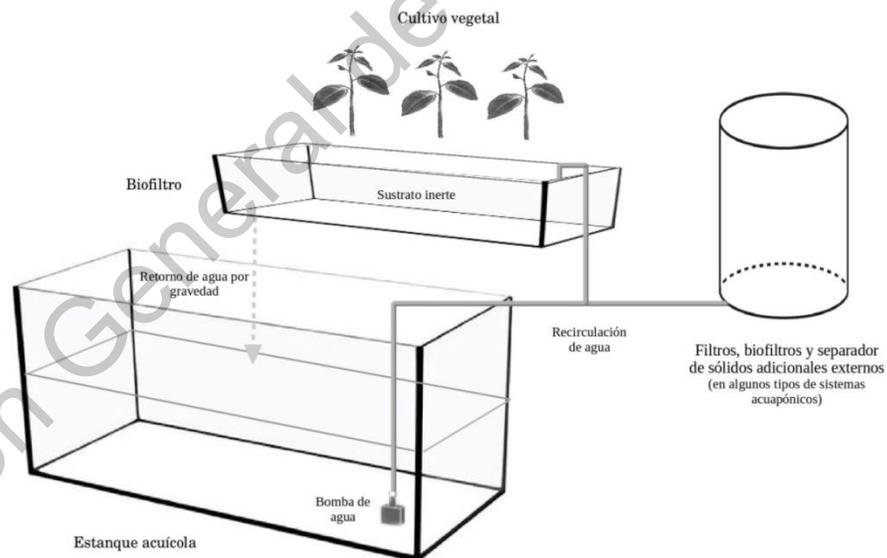
La evolución de los sistemas de producción de alimentos han permitido el incremento de la población humana y se estima que en los próximos 50 años, la población continuará creciendo alrededor de los 9.7 mil millones de personas (ONU, 2017). Como consecuencia, se necesitará incrementar la tierra cultivable, el consumo de agua, energía y servicios del ecosistema. Sin embargo, todos estos recursos son limitados o no renovables. (Beddington, 2011). Se calcula que para alimentar a la población humana será necesario más de 800 millones de hectáreas de tierra cultivable que no hay disponibles en la Tierra. Sin una estrategia alternativa para enfrentar el problema de producción de alimentos, los conflictos ecológicos y sociales pueden ser nuestro futuro cercano (Despommier, 2011; Turcios et al. 2014). Esto nos lleva a plantearnos la siguiente pregunta ¿cómo vamos a producir nuestros alimentos cuando los recursos sean limitados tanto para el crecimiento de la población mundial como para la producción del alimento que ésta misma necesita?

Es necesario migrar a modelos agroalimentarios basados en una producción sustentable en donde la explotación de recursos sea mínima, pero para ello necesitamos conocerlos y desarrollarlos técnica y económicamente (Despommier, 2011; Greenfeld, 2018). La acuaponía es un sistema de producción de alimentos sostenible que puede desempeñar un papel importante en el abordaje de desafíos globales como la escasez de agua, la seguridad alimentaria, la huella urbana, la reducción en el uso de energía y la demanda de alimentos (Goddek et al.2015). En este sistema, podemos producir dos o más productos alimenticios diferentes (plantas y algunas especies acuáticas para consumo humano) con el mismo volumen de agua. Además, presenta una importante reducción en el uso de fertilizantes y dado que la producción por ciclo en estos sistemas puede llegar a ser variada, permite aumentar la calidad nutricional en la producción de alimentos (Greenfeld, 2018, König et al. 2018).

La acuaponía es un sistema multitrófico integrado que combina elementos de recirculación de la acuicultura e hidroponía, en donde el agua de las peceras que se enriquece en nutrientes se utiliza para el crecimiento de las plantas. Es un proceso natural de tamaño reducido.

Los sistemas acuapónicos integran el cultivo de peces y plantas por medio de un sistema semi-cerrado de recirculación que consta de componentes físicos y biológicos (Figura 1). Una mayor cantidad de componentes físicos permite un mejor manejo en el sistema, sin embargo incrementa el costo de producción y la tecnología necesaria para mantener el proceso. A menor cantidad de componentes, el sistema se vuelve más complejo y difícil de manejar, sin embargo el sistema se vuelve robusto y los costos de producción y tecnológicos disminuyen (Diver, 2006, Rakocy *et al.*, 2006).

El componente biológico clave para comprender el proceso de producción bajo acuaponia son los microorganismos (biofiltro). Estos son los responsables de crear un vínculo entre los componentes físicos y biológicos, por lo que son un componente fundamental para el sistema. La ausencia de los microorganismos impide el ciclado de nutrientes provocando una pérdida en el equilibrio del sistema, por ejemplo los nutrientes se acumulan hasta llegar a niveles tóxicos afectando principalmente a la especie acuática (Tyson *et al.*, 2011).



**Figura 1** **Figura 2** **Figura 3:** Esquema de un sistema acuapónico y sus componentes físicos y biológicos.

Por esta razón, la etapa de mayor importancia para el desarrollo de un sistema acuapónico es la *activación del biofiltro*. La activación del biofiltro consiste en la colonización de los microorganismos ocasionada por la acumulación de la materia de desecho de los peces en

ese compartimento. El biofiltro es el componente físico en donde crecen los microorganismos que llevan a cabo la transformación de la materia. Estos empiezan a consumirla y metabolizarla, regresando al medio otro tipo de compuestos que son formas asimilables para las plantas, las cuales tomarán esta materia, permitiendo la disminución de la concentración de los nutrientes en el medio acuático (Tyson *et al.*, 2011).

### **1.1. Diversidad microbiana en sistemas acuapónicos**

Los microorganismos tienen un papel fundamental en todos los procesos ecológicos del planeta, son importantes catalizadores en los procesos biogeoquímicos que permiten el flujo de los nutrientes en la Tierra; y que hacen posible la vida tal como la conocemos. Además, estos son la porción viva de mayor diversidad genética que existe en el planeta (Whitman *et al.*, 1998). Actualmente se estima que de toda la diversidad microbiana que existe en el planeta, sólo hemos sido capaces de conocer aproximadamente el 1% de esta (*ibídem*). Esto se debía principalmente a que no se contaba con la capacidad tecnológica para analizar la mayoría de los microorganismos en el laboratorio. De los diversos ambientes naturales que existen, cada uno de ellos posee características ambientales, físicas, químicas y biológicas únicas que proveen de un nicho muy particular para el crecimiento de diversos microorganismos en donde dos o más poblaciones de diferentes especies actúan conjuntamente como una *comunidad* en un sistema complejo donde todos se benefician de las actividades de los demás (López *et al.*, 2007, Rurangwa & Verdegem, 2015).

En los sistemas de recirculación acuícola o RAS (por sus siglas en inglés), que son sistemas análogos a los sistemas acuapónicos y que han sido mayormente estudiados, el componente con mayor concentración de microorganismos es el biofiltro ( $7.3 \times 10^6 \pm 7.25 \times 10^6 \text{ g}^{-1}$  de medio, Leonard *et al.*, 2000) y se ha encontrado que los grupos bacterianos en el/los biofiltro(s) varían en función del tipo de agua (mar, dulce, etc.), especies acuáticas introducidas (bagre, carpa, pez globo, etc.) y componentes físicos adicionales en el sistema (filtros, esterilizadores, etc.) (Sugita *et al.*, 2005); sin embargo algunos grupos bacterianos parecen encontrarse en casi todos los tipos de RAS (Itoi *et al.* 2006, Itoi *et al.* 2007, Tal *et al.* 2006, Schneider *et al.* 2007). El biofiltro es el sustrato que filtra de manera mecánica los

restos sólidos provenientes de los peces y en acuaponia sirve de soporte para el crecimiento de las plantas (Tyson *et al.*, 2011). Por esta razón, se cree que el biofiltro de los sistemas acuapónicos será el componente con mayor cantidad de microorganismos.

El conocimiento de la diversidad microbiana que se posee de los sistemas acuapónicos es mucho más escaso y recientemente ha sido un tema al que se le ha puesto mayor atención (Schmautz *et al.*, 2016; Mathilde Eck 2017). Inicialmente, las preguntas planteadas fueron en relación al tema de seguridad alimentaria ¿los sistemas acuapónicos poseen microorganismos patógenos para el humano? Considerando que en especies acuáticas podemos encontrar microorganismos dañinos para el hombre como *Salmonella* sp., *E. Coli* o *Vibrio cholerae*, se analizó la carga bacteriana de estas especies en los vegetales, el agua y el pescado, así como en componentes físicos de los sistemas acuapónicos (Fox *et al.*, 2012) y se realizó un análisis comparativo de la carga de *E. coli* y *Salmonella* sp. en lechugas orgánicas producidas en suelo y lechugas producidas acuapónicamente (Sirsta *et al.*, 2013). En 2015, nosotros proponemos el estudio de las comunidades microbianas de los sistemas acuapónicos utilizando herramientas modernas de análisis (tecnologías “ómicas”), las cuales son independientes del cultivo de microorganismos en el laboratorio (Munguia-Fragozo *et al.*, 2015). Un año después, Schmautz y colaboradores publican la caracterización de la diversidad microbiana en los diferentes compartimentos de un sistema acuapónico utilizando herramientas metagenómicas. En este trabajo se encontró que las heces de los peces contenían una comunidad separada dominada por bacterias del género *Cetobacterium*, mientras que las muestras de raíces de plantas, biofiltro y perifiton eran más similares entre sí pero poseían una mayor diversidad.

El conocimiento de la diversidad microbiana en sistemas acuapónicos, como podemos ver, es muy escaso y aún quedan muchas dudas por resolver, más aún cuando los microorganismos juegan un papel tan importante en el funcionamiento de los sistemas.

## **1.2. Metagenómica**

Actualmente una herramienta de análisis que nos permitirá incrementar el conocimiento de la diversidad microbiana que existe realmente en los diversos ambientes en un momento

determinado y sin la necesidad de cultivarlos en el laboratorio es la *metagenómica*. El término deriva del concepto estadístico de *meta-análisis* (el proceso donde se combinan análisis estadísticos separados) y la genómica, que es el análisis del material genético de un organismo (Schloss & Handelsman, 2003). Esta herramienta derivada de la biología molecular y la bioinformática, permite el análisis taxonómico y funcional de secuencias de comunidades microbianas mediante la secuenciación del complemento genómico total (ADN ambiental) de todos los organismos presentes en una comunidad (Bonilla-Rosso *et al.*, 2012). También se le conoce como genómica ambiental o ecogenómica (Munguia-Fragozo *et al.*, 2015).

El crecimiento de los microorganismos en los diversos sistemas de cultivo artificiales y naturales se analizaba mediante técnicas de “caja-negra”, es decir, de manera indirecta midiendo la tasa de respiración de los microorganismos o mediante la tasa de generación o remoción de determinadas formas químicas, producto del metabolismo de ciertos microorganismos, sin embargo, estas técnicas no permiten conocer la composición del consorcio microbiano, sus abundancias, su distribución y menos aún sus interacciones y sus relaciones funcionales (Bonilla-Rosso *et al.*, 2008).

Gracias a la explosión de las técnicas “ómicas”, el análisis de ambientes como los biofiltros en los sistemas RAS y más recientemente algunos compartimentos de los sistemas acuapónicos han podido ser analizados utilizando estas herramientas (Xiang *et al.*, 2013; Rurangwa & Verdegem, 2015; Schmutz *et al.*, 2016). Algunas especies de estos grupos bacterianos están involucradas en ciclos biogeoquímicos del nitrógeno, azufre y fósforo (Schreier *et al.*, 2010). Se ha encontrado que el tipo de agua (de mar, salobre, dulce, etc.) y la especie acuática introducen sus propias poblaciones microbianas (Rurangwa & Verdegem, 2015). En este trabajo se utiliza como especie acuática renacuajos de rana toro (*Lithobates catesbeianus*) y como especie vegetal chile serrano (*Capsicum annum*). Por tanto los renacuajos de rana introducirán su propia microflora. Además, los sistemas acuapónicos poseen un componente vivo adicional a diferencia de los sistemas de recirculación tradicionales, las plantas. Estas también introducirán su propia microflora en el sistema. Caracterizar la comunidad microbiana en sistemas acuapónicos permite ayudar a

conocer la composición del biofiltro, que permite el desarrollo de estos sistemas de alta complejidad.

La metagenómica permite conocer las especies microbianas que componen a una comunidad en determinado momento, esto con el fin de comprender, optimizar y mejorar los procesos dependientes de las comunidades microbianas en cualquier sistema biológico (Munguia-Fragozo *et al.*, 2015).

### **1.3. Planteamiento del problema**

La importancia de los microorganismos en los sistemas acuapónicos radica en el hecho de que gracias a ellos, la acuaponía es un sistema multitrófico integrado en donde los desechos de una especie son reciclados para convertirse en aportes (fertilizantes, alimentos) para otra. Aunque se conocen y utilizan los mecanismos enzimáticos de ciertos grupos de bacterias como las nitrificantes, se desconoce la diversidad microbiana presente en las diferentes etapas del ciclo productivo de un sistema acuapónico y cómo es su interacción con el resto de los componentes biológicos y el entorno fisicoquímico. Se desconoce si la transformación de los compuestos de desecho de la especie acuática en acuaponía está condicionada a los cambios en las abundancias de las especies microbianas o a procesos de sucesión microbiana y cómo es la evolución la diversidad de la comunidad microbiana a través del tiempo, a lo largo de los ciclos.

### **1.4. Justificación**

Es de suma importancia conocer la riqueza y diversidad microbiana que existe durante el desarrollo de un sistema acuapónico, las especies presentes en cada etapa del ciclo productivo y cómo puede esto impactar en la productividad del sistema dado que, de esta diversidad depende el flujo y balance de los nutrientes para los tres componentes vivos del sistema. No sabemos si la composición de la comunidad microbiana está predominada por una especie y esto haga que el sistema pueda considerarse simple y ser susceptible de optimización en el campo de la ingeniería o si por el contrario, la comunidad sea rica y

diversa y esta complejidad de interacciones ecológicas lo hagan robusto (o frágil). De la misma manera se desconoce si es posible el manejo del estrés en el sistema a fin de mejorar y optimizar el cultivo de las especies productivas o si estos sistemas posean especies que contribuyan de manera especializada. Más aun considerando que los componentes vivos integrados provienen de diversos niveles tróficos.

Mientras se mantenga en un equilibrio dinámico en el sistema en general, la acuaponía permite una optimización en el consumo de agua, espacio y energía, así como un mayor aprovechamiento de nutrientes. Además habrá alimento de origen natural para la especie acuática por lo que no dependerá exclusivamente del alimento suministrado, lo que conlleva a un incremento en la tasa de crecimiento de los animales y al tener una tasa de transformación de compuestos óptima la salud de peces y plantas se mantendrá adecuadamente.

Conocer la diversidad microbiana permite eventualmente una mejora la producción por lo que la principal motivación para esta investigación es la aportación de conocimientos sobre la composición de la comunidad microbiana asociada a un sistema acuapónico y su relación con el entorno ambiental y fisicoquímico del mismo mediante un enfoque genómico aplicado a la ecología de la producción.

En la actualidad existe una importante demanda de recurso tales como el agua, espacio y energía debido al incremento en la población mundial y sus actividades, principalmente la producción agroalimentaria. Por esta razón es necesario buscar alternativas sustentables de producción de alimentos con la premisa de la minimización de estos recursos sin dejar de lado la calidad nutritiva. Es deseable además que este tipo de sistemas permitan la producción a nivel local, en zonas aisladas, poco fértiles y que sean accesibles para cualquier persona, permitiendo de esta manera una seguridad alimentaria (Beddington, 2011).

### **1.7. Organización de la tesis**

Esta tesis está organizada en cuatro capítulos que corresponden a las diferentes etapas del proceso de investigación. El presente Capítulo introdujo en el tema de investigación y el

planteamiento del problema a abordar, como se vio anteriormente. El Segundo Capítulo corresponde a la revisión bibliográfica que se ha hecho durante todo el periodo de investigación y del cual deriva un artículo de revisión que se incluye en Anexos. Este apartado se encuentra organizado por temas que constituyen la fundamentación teórica de sistemas acuapónicos, factores ambientales y fisicoquímicos de importancia, calidad del agua, componentes biológicos de los sistemas acuapónicos, microorganismos en sistemas acuapónicos, ciclo productivo, etc. Así como la fundamentación teórica para el estudio de microorganismos, estudios tradicionales, estudios metagenéticos y herramientas bioinformáticas para el análisis de comunidades microbianas. El Tercer Capítulo presenta las metodologías utilizadas en para la caracterización y análisis fisicoquímico del ambiente y del sistema acuapónico experimental, así como la metodología utilizada para el análisis metagenómico y meta-transcriptómico de la comunidad microbiana. Finalmente se presenta la metodología de análisis bioinformático y estadístico realizados en este proyecto. El Cuarto Capítulo y último expone los resultados y evidencias encontradas con respecto a los objetivos planteados, la discusión de los mismos y las conclusiones globales de esta tesis.

## **II. Antecedentes**

En esta sección se describen los conocimientos en los que está fundamentada esta tesis. La primera sección presenta un panorama general acerca de la acuaponía, lo que es, orígenes, el funcionamiento de estos sistemas, sus componentes biológicos y los ciclos que la componen. La segunda sección presenta una revisión acerca del microbioma de un sistema acuapónico, en qué consiste, quienes los componen teóricamente, y cómo se han analizado a lo largo de la historia. Finalmente se hace una revisión acerca de lo que es la metagenómica, sus alcances, desventajas, entre otros.

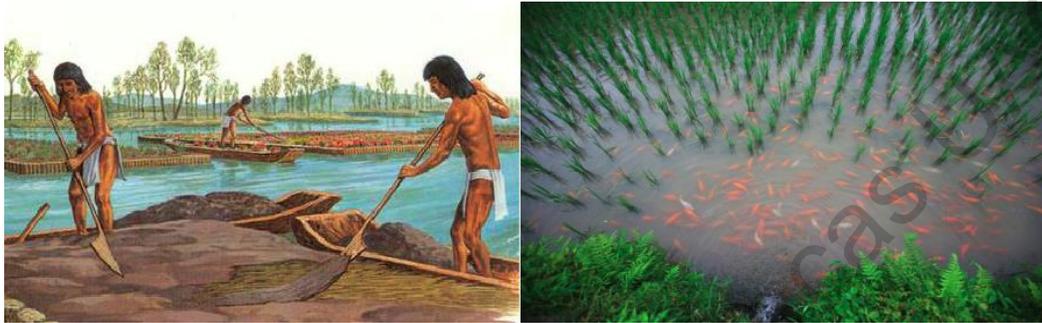
### **2.1. Sistemas de producción integrados**

En la historia de la civilización humana, diversas culturas como la china, la azteca, la inca, etc. han desarrollado sistemas agroalimentarios integrados en donde se producen o utilizan especies acuáticas y se cultivan plantas de interés comercial. (Figura 2) (Jones, 2002, Lewis *et al.*, 1978). Desde hace casi cuatro décadas, la comunidad científica se interesa por este tipo de sistemas comienza a estudiarlos y analizarlos desde diversas perspectivas: diseño, materiales de construcción, productividad, compatibilidad de especies acuáticas y vegetales, economía, ingeniería ecológica, calidad de agua, dinámica nutrimental, etc. (Alatorre, 2014). Actualmente a este tipo de sistemas lo conocemos como acuaponía (Naegel, 1977). El término de *acuaponía* proviene de dos vocablos, *acua* que proviene de acuicultura y *ponía* que proviene de hidroponía (Rakocy *et al.*, 2006).

#### **2.1.1. Producción acuapónica a nivel mundial**

La producción acuapónica a nivel mundial ha consistido en producción comercial a pequeña escala y producción con fines de investigación. La producción acuapónica a pequeña escala se ha incrementado a nivel mundial como resultado de éstas investigaciones así como el creciente interés en la agricultura sustentable y la producción de alimentos en zonas cercanas a la urbe o en la misma (Love *et al.*, 2015). Dentro de los países que han

contribuido a la investigación acuapónica se encuentra principalmente Estados Unidos, Hawai, Australia, Israel, Islandia, Holanda y Bélgica.



**Figura 4: Cultivo integrado en culturas ancestrales; a la izquierda las chinampas de la cultura azteca ya la derecha el cultivo de arroz en China**

Por otro lado, los países con producción comercial a pequeña escala son Estados Unidos, Australia, Canadá, Hawai y Reino Unido principalmente y en menor proporción Cuba, Belice, Brasil, China, Ghana, Hungría, India, Israel, Italia, Japón, Corea, Malasia, Malta, Portugal, Sudáfrica, Trinidad y Tobago y Uganda (Figura 3) (Love *et al.*, 2015, Fox *et al.*, 2012).



**Figura 5: Países que contribuyen a la producción bajo sistemas acuapónicos tanto a nivel comercial a pequeña escala como a nivel de investigación.**

Uno de los grupos de trabajo más destacados en materia de acuaponía a nivel nacional se encuentra a cargo del Dr. Julio Manuel Segovia Quintero, en el CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada) este grupo cuenta con un sistema acuapónico tipo NFT (del inglés Nutrient Flow Technique) que llevan analizándolo por más de cuatro años. A nivel internacional, los grupos más fuertes de trabajo son en Estados Unidos el grupo del Dr. James Rakocy, en la Universidad de Wisconsin; el grupo del Dr. Tyson, en la Universidad de Florida; el grupo del Dr. Thompson, en la Universidad Johns Hopkins en Baltimore, Maryland; el grupo del Dr. Schreier en la Universidad de Maryland. Otros países con investigación y/o producción en materia de acuaponía son Israel con el Dr. Van Rijn de la Universidad Hebrea de Jerusalén y el Dr. Avnimelech del Instituto de Tecnología de Jerusalén quienes se enfocan al análisis de la dinámica de nutrientes en agua en sistemas de recirculación acuícola y acuaponía; Australia con el Dr. Leonard quienes se enfocan en el diseño de sistemas acuapónicos. Si bien la producción de acuaponía a nivel mundial se ha incrementado, aún es necesaria más investigación en esta área con la finalidad de poder optimizar su producción y sustentabilidad.

### **2.1.2. Ventajas y desventajas de la producción acuapónica**

Las principales ventajas que presenta la acuaponía frente a sistemas tradicionales de producción alimentaria tanto acuícola como agrícola se describen en el cuadro 1.

Por otro lado, la principal desventaja de un sistema acuapónico es la complejidad del sistema. Ésta se incrementa al no separar cada proceso por lo que mantener el equilibrio en el sistema para todos y cada uno de los componentes biológicos se vuelve muy difícil y lo que en muchas ocasiones hace que se requiera de personal calificado. Además los requerimientos de la especie acuática y/o la especie vegetal se encuentran limitados en un mismo momento por las limitaciones geográficas. Dependiendo del diseño del sistema, este puede llegar a incrementar los gastos energéticos para mover el agua. Otra desventaja es que la producción de plantas se encuentra limitado por el número de peces.

**Tabla 1: Cuadro comparativo de sistemas acuapónicos y sistemas de cultivo tradicionales**

<b>Recurso/ Sistema</b>	<b>Acuaponia</b>	<b>Acuicultura</b>	<b>Hidroponia</b>
<b>Agua</b>	No hay agua de desecho, sólo se agrega el agua que se ha perdido por evaporación	10% del volumen de agua se desecha diariamente Agua de desecho causa eutrofización de cuerpos de agua	La descarga de agua tiene un alto contenido de sales y químicos
<b>Nutrientes</b>	El alimento y el desecho de los peces reemplazan los costosos nutrientes de las plantas. No hay desperdicio de nutrientes	El alimento de los peces es el principal gasto de la acuicultura	El costo de los nutrientes para las plantas es alto
<b>Energía</b>	Bombeo de volúmenes de agua menores	Bombeo de gran volumen de agua	Gasto energético alto para irrigación, ventilación
<b>Tecnología</b>	No es necesaria alta tecnología ni amplio conocimiento técnico	Requiere amplio conocimiento técnico	Requiere alta tecnología y conocimiento técnico
<b>Espacio</b>	Área de cultivo puede crecer verticalmente	Área de cultivo crece horizontalmente	
<b>Producto</b>	Vegetal (es) Especie(s) acuática	Especie(s) acuática	Vegetal (es)

El diseño del sistema es la clave para poder simplificarlo y manejarlo eficientemente a fin de que la mayoría de las personas pueda manejar y mantener un sistema acuapónico. Por ejemplo, determinar el radio plantas-animales y el tipo de cada especie a combinar en el sistema permite establecer un balance natural entre ellos que facilita el manejo cultural. Otro caso es el diseño en cuanto a gasto energético, el sistema puede diseñarse de tal manera que se utilice la gravedad para recircular el agua en algunos puntos del sistema, de esta manera el consumo disminuirá considerablemente. Estableciendo este y otros elementos de diseño que disminuyan el nivel de complejidad y compensen o mejoren las desventajas del mismo, la producción agroalimentaria bajo sistemas acuapónicos representa una alternativa de producción sustentable que puede permitir una independencia agroalimentaria. Sobre todo para aquellas regiones subdesarrolladas, zonas con suelos poco fértiles o zonas urbanas con alta densidad poblacional (Martins *et al.*, 2010, Somerville *et al.*, 2014).

### 2.1.3. Funcionamiento de un sistema acuapónico

Para que un sistema acuapónico produzca biomasa animal y vegetal es necesario el correcto funcionamiento de sus componentes físicos y biológicos, así como un equilibrio de variables en el medio ambiente. Las variables ambientales más importantes que influyen en el desarrollo de estos sistemas son la **temperatura** por que influye directamente en la velocidad del metabolismo de todos los componentes vivos; la **luz** que permite el crecimiento de organismos autótrofos, la **humedad relativa** y el **flujo de aire** para un adecuado intercambio gaseoso (Somerville *et al.*, 2014).

El agua es el medio en común para los componentes biológicos por lo que es importante mantenerla calidad de la misma (Tyson *et al.*, 2011, Somerville *et al.*, 2014, Buzby & Lin, 2014).

Las variables más importantes en el medio acuático son de igual manera la **temperatura**, el **pH** que influye en las formas químicas de diversos compuestos, el **oxígeno disuelto** que es esencial para el crecimiento de los peces y las plantas y la concentración de compuestos

**fosfatos, amonio, nitrito y sulfuro de hidrógeno** (Rakocy *et al.*, 2006, Tyson *et al.*, 2011).

Los componentes biológicos de los sistemas acuapónicos son: la **especie acuática** que sirve como fuente de alimento para el humano y produce diversos desechos metabólicos, el amonio es el de mayor importancia debido a la alta toxicidad del compuestos para esta especie (Tyson *et al.*,2011); las **plantas** que sirven como filtro para recuperar algunos compuestos químicos disueltos en el medio (fosfatos, nitratos, amonio, etc.) previamente transformados por los microorganismos (Huet *al.*, 2015) y es el segundo producto para consumo humano; y finalmente los **microorganismos** que crecen que son el componente vivo más importante porque permiten el desarrollo del sistema acuapónico, crecen principalmente en el sustrato pero también en el estanque de cultivo de la especie acuática (Schreier *et al.*, 2010).El manejo integral de la calidad del agua, las variables ambientales y los componentes biológicos permitirán el éxito en el desarrollo de estos sistemas ya que se encuentran interconectados e interrelacionados. Un mal manejo en la calidad de agua o cualquier componente o variable afectará finalmente la producción de biomasa animal y vegetal.

#### **2.1.4. Ciclo productivo de sistemas acuapónicos**

El ciclo productivo de un sistema acuapónico lo podemos dividir en 3 etapas principales:

- 1) Inicialización
- 2) Activación
- 3) Cultivo acuapónico

La primer etapa consiste en inicializar el cultivo de la especie acuática, la cual comenzará a desechar materia al medio acuático, permitiendo que aumenten la concentración de compuestos como amonio y fosfatos (Diver, 2006, Rakocy *et al.*, 2006). Este aumento en la concentración de materia en el agua es movido por medio de la recirculación a la cama del biofiltro en donde se acumula y permite la colonización de los microorganismos, los cuales empiezan a consumirla y metabolizarla, regresando otro tipo de compuestos al medio que,

de la misma manera, comienzan a acumularse; esta etapa es la activación del biofiltro (Timmons *et al.*, 2002., Shete *et al.*, 2013, Tyson *et al.*, 2011).

Una vez que haya materia transformada acumulada, producto del metabolismo de los microorganismos y que son a su vez formas asimilables para las plantas, se coloca el tercer componente vivo, las plantas, las cuales asimilarán esta materia en sus tejidos, permitiendo la disminución de la concentración de los nutrientes del medio acuático (Tyson *et al.*, 2011).

La acuaponía debe su funcionamiento a las relaciones ecológicas entre los componentes bióticos y abióticos del sistema a fin de mantener la calidad del medio común (el agua) en óptimas condiciones (Alatorre-Jácome, 2014). Cada componente biológico en el sistema acuapónico tiene requerimientos fisicoquímicos específicos, por ejemplo, las bacterias necesitan un pH de 8.5 para poder llevar a cabo la metabolización de los compuestos nitrogenados, mientras que las plantas requieren un pH de 5.5-6.5 y los peces de 7 a 7.5 unidades. (Tyson *et al.*, 2011).

El componente responsable de crear un vínculo entre la especie acuática y la vegetal son los microorganismos, por lo que son un componente fundamental para el sistema (Tyson *et al.*, 2011, Yusoff *et al.*, 2011, Rurangwa & Verdegem, 2015).

## **2.2. Diversidad microbiana de un sistema acuapónico**

El conjunto de microorganismos presentes en un mismo ambiente, ecosistema o nicho ecológico componen el **microbioma** o consorcio microbiano. El microbioma de los sistemas acuapónicos remueve la materia de desecho del cultivo acuático, transformándolo en fertilizante para las plantas. Este flujo es el que permite el ciclado de nutrientes en el sistema acuapónico (Diver, 2006, Rakocy *et al.*, 2006, Tyson *et al.*, 2011). Esto es conocido como biofiltración y aprovecha los procesos metabólicos microbianos (Bai *et al.*, 2005, Yusoff *et al.*, 2011). Por esta razón el componente más importante en los sistemas acuapónicos es el biofiltro. El biofiltro, así como la totalidad del sistema acuapónico presenta un gradiente de nutrientes y oxígeno, es decir, presenta diversos microambientes que van a permitir diferentes entornos de crecimiento para algunos tipos de

microorganismos (Leonard *et al.*, 2000, Revsbech *et al.*, 2006, Schreier *et al.*, 2010, Rurangwa & Verdegem, 2015). Las comunidades microbianas en los sistemas acuáticos son tan complejos como los cambios en el tiempo y en las variables ambientales (Sugita *et al.*, 2005, Itoi *et al.*, 2007, Gilbert *et al.*, 2012). Debido a estas características, el biofiltro es el componente físico que presenta la mayor cantidad de microorganismos cultivables (Rurangwa & Verdegem, 2015) y seguramente de no cultivables también.

En un sistema acuapónico se introduce un componente vivo adicional al que tiene un RAS tradicional, las plantas. Estas pueden introducir su propia microflora al sistema lo cual hace muy interesante el estudio de los cambios de la diversidad microbiana. Han sido aisladas e identificadas bacterias oxidadoras de amonio como *Nitrosomonas communis* que son introducidas por las raíces de las plantas en un sistema acuapónico (Tokuyama *et al.*, 2004). Uno de los grupos bacterianos más estudiados por su importancia para llevar a cabo una parte del ciclo biogeoquímico del nitrógeno y por su utilidad en la remoción de compuestos de desecho en los RAS son los procariontes nitrificantes (Revsbech *et al.*, 2006). La nitrificación autotrófica nitrificante remueve suficiente amonio como para mantener una calidad del agua apropiada para el cultivo de la especie acuática, sin embargo estos microorganismos son sensibles a altos niveles de amonio y materia orgánica por lo que la tasa de remoción del amonio disminuye considerablemente (Jun & Wenfeng, 2009). Para mejorar esto, se adicionan componentes que separen las etapas de la oxidación de nitrógeno lo que hace al sistema en general más susceptible a los cambios en todos y cada uno de los procesos y que se eleve el costo del proceso de remoción (Yong-Xiang *et al.*, 2014, Padhiet *al.*, 2013).

Por el contrario, en los sistemas acuapónicos no es necesario separar en diferentes componentes los diversos procesos de nitrificación aunque esto implique que el proceso se vuelva más complejo debido a que el medio en común que es el agua debe tener las condiciones fisicoquímicas que necesitan los tres diferentes componentes vivos cuyas necesidades son diferentes, sin embargo, cuando el sistema llega a un equilibrio y debido a que este equilibrio está basado en relaciones ecológicas el sistema acuapónico es mucho más robusto que un sistema con más componentes y que un RAS tradicional.

Por otra parte los procariontes heterotróficos constituyen un factor importante en términos de consumo de oxígeno y compiten con los autotróficos, patógenos de peces. Algunas poblaciones de este tipo de microorganismos se piensa que tienen efectos positivos contra poblaciones de microorganismos patógenos para el humano (Michaud *et al.*, 2006). Las bacterias heterotróficas presentan tasas de crecimiento mayores que los autótrofos y pueden usar como fuente de carbono, substratos orgánicos para la conversión de amonio a nitrógeno gaseoso bajo condiciones de aerobiosis (Joo *et al.*, 2005, Yong-Xiang *et al.*, 2014). Se ha reportado que la principal fuente de bacterias heterotróficas se encuentra en el biofiltro y son probablemente los procariontes ideales para el proceso de nitrificación-de nitrificación en sistemas acuapónicos (Revsbech *et al.*, 2006, Padhi *et al.*, 2013).

Otro proceso, aunque menos estudiado, es el de la nitrificación heterotrófica llevada a cabo por eucariontes como diatomeas, algas y hongos. Estos organismos han sido asociados con la reducción asimilatoria de nitrato en RAS y plantas de tratamiento, removiendo amonio, así como nitritos y proteínas (Van Rijn *et al.*, 2006, Yusoff *et al.*, 2011). Estos microorganismos eucariontes han tenido una relación importante en el mecanismo de patogenicidad con plantas superiores en ambientes húmedos. Hasta ahora no hay reportes de análisis de organismos eucariontes ni en sistemas RAS ni en sistemas acuapónicos. La caracterización microbiana en este campo se ha hecho con el fin de detectar la presencia de organismos patógenos para humanos y especies acuáticas (Fox *et al.*, 2012, Sirsat & Neal, 2013, Martins *et al.*, 2013).

El análisis de la diversidad microbiana realizado en los sistemas RAS se ha hecho con técnicas moleculares como la amplificación y posterior secuenciación del gen 16s rARN o bien por técnicas de DGGE/TGGE que se describen más adelante. Estos trabajos han caracterizado la composición de la comunidad microbiana, principalmente en los biofiltros utilizando técnicas modernas, sin embargo estas herramientas presentan como desventaja la sobreestimación de las especies en mayor abundancia y la subestimación de las especies en menor abundancia. Las poblaciones en menor abundancia pueden tener un papel importante en las interacciones de la comunidad o las que se encuentran en mayor abundancia pueden no ser importantes, por lo que estas técnicas impiden observar con precisión el papel de todas y cada una de las especies en las interacciones microbianas de un sistema acuapónico.

Esto hace necesario el análisis de estas comunidades con herramientas modernas que permitan observar las poblaciones tanto abundantes como las no abundantes.

### **2.2.2. Microorganismos patógenos en sistemas acuapónicos**

Como se dijo anteriormente, los sistemas acuapónicos han sido usados como sistemas de producción agro-sustentables. Sin embargo, es tema de discusión una mejora en lo que respecta a la sustentabilidad a través de la gestión e integración de los componentes vivos (Tyson *et al.*, 2011). Esto se debe a la importancia de la seguridad alimentaria en los sistemas de producción de alimentos. Tanto en la agricultura como en acuicultura, una de las consideraciones más críticas es evaluar la salud de los alimentos en los procesos de cosecha y post-cosecha (Fox *et al.*, 2012, Sirsat & Neal, 2013).

Sabemos que dentro de toda la carga microbiana que puede tener un sistema acuapónico, sobretodo en el biofiltro, y que llevan a cabo transformaciones de materia orgánica y desperdicio de los peces, habrá presencia de microorganismos que puedan ser patógenos para las plantas y los animales acuáticos pero de mayor importancia son aquellos microorganismos patógenos para los seres humanos. Con el propósito de saber si existen este tipo de microorganismos, se han hecho algunos trabajos de análisis de patógenos de humano los cuales han utilizado microorganismos indicadores como *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. para saber la calidad del agua y de los productos del sistema acuapónico (Fox *et al.*, 2012, Sirsat & Neal, 2013).

En ningún trabajo reportado hasta el momento se ha encontrada una carga microbiana que represente un problema de seguridad alimentaria. Los resultados muestran que el contenido de estos microorganismos en cada componente del sistema y los productos acuapónicos es incluso menor que el de productos hortícolas comerciales convencionales y orgánicos. Esto hace pensar que debido a que los productos acuapónicos tienen un mínimo de tratamiento post-cosecha, la contaminación de los productos convencionales y orgánicos provenga en el manejo del producto durante el proceso de empaque y transporte de los mismos (Fox *et al.*, 2012, Sirsat & Neal, 2013).

De los trabajos mencionados anteriormente, el perfil microbiológico se realizó analizando únicamente dos bacterias relacionadas a patogenicidad en humanos. Sin embargo, no considera microorganismos patógenos para la especie acuática o para las plantas, lo cual puede llegar a afectarla productividad de presentarse este tipo de microorganismos. Además, ambos trabajos utilizan métodos microbiológicos tradicionales. El análisis microbiológico utilizando metodologías microbiológicas modernas como herramientas moleculares permitirá un análisis más profundo de los microorganismos patógenos en los sistemas acuapónicos.

En algunos sistemas RAS, se han utilizado herramientas moleculares y se han encontrado microorganismos patógenos para peces como algunas cepas de *Bacillus* sp. (como *B. mycoides*), *Aeromonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Edwardsiella* sp., *Comomonas* sp. Y *Flavobacterium* sp. (Schneider *et al.*, 2007). Otros microorganismos encontrados están relacionados a patogenicidad humana *Vibrio*, *Erwinia*, *Coxiella* y *Aeromonas* (Schreier *et al.*, 2010). Las especies de *Vibrio* se han aislado en diferentes ambientes acuáticos como agua dulce, estuarina y oceánica, sin embargo es probable que la mayoría de ellos sean saprófitos (Leonard *et al.*, 2000). Con base en este argumento, la bioseguridad de un sistema acuapónico dependerá de un adecuado manejo y control de los microorganismos oportunistas (Rurangwa & Verdegem, 2015).

### **2.2.3. Análisis de comunidades microbianas con técnicas moleculares**

Desde hace tres décadas se han venido realizando diversos trabajos de caracterización de diversidad microbiana usando técnicas moleculares basadas en PCR y han permitido tener un panorama general acerca de la diversidad microbiana en muestras ambientales. Algunas técnicas que utilizan la PCR como fundamento son la amplificación del gen 16s rARN, 18s rARN, hibridación, DGGE/TGGE, etc. Estas presentan algunas limitaciones y sólo proveen parte de la información de una comunidad microbiana (Muyzer, 1999). La conclusión hecha en este campo es que la mayoría de la diversidad procarionta permanece aún sin conocerse, principalmente porque estas células no pueden crecer bajo condiciones de laboratorio (Handelsman, 2004). La amplificación de los genes 16s o 18s rARN amplifica

regiones hiper-variables de cada gen anclándose a una secuencia altamente conservada entre especies. Hay nueve regiones hiper-variables llamadas V1-V9 que van entre los 50 y 100 pares de bases (pb) de longitud, dependiendo la región. Las regiones hiper-variables son la clave para la identificación universal de microorganismos. Los *primers* son diseñados para amplificar las regiones hiper-variables de los genes 16s y 18s rARN para diferente para un gran número de diferentes especies bacterianas (Nikolaki & Tsiamis, 2013). Los *primers* que se anclan a la región V1-V3 y V7-V9 se recomiendan para obtener una caracterización que represente a toda una comunidad compleja (Kumar *et al.*, 2011). La información que obtenemos con esta técnica nos indica la composición taxonómica en la muestra ambiental (Kemp & Aller, 2004).

Por otro lado, existen muchos ensayos semicuantitativos *in situ* como la técnica de hibridación fluorescente *in situ* o FISH (por sus siglas en inglés), micro autoradiografía por hibridación fluorescente *in situ* o MAR-FISH (por sus siglas en inglés) e hibridación fluorescente *in situ* con deposición catalizada de reporteros o CARD-FISH, etc. que identifican las células procariontas sin necesidad de cultivarlas mediante una hibridación dirigida al rARN con oligonucleótidos marcados con fluoróforos. Estos oligonucleótidos tienen una extensión de 15 a 25 nucleótidos de largo e hibridan covalentemente al 5' terminal del ADN. Después de lavar las muestras las células marcadas son detectadas por microscopía de epifluorescencia o citometría de flujo (Wagner *et al.*, 2003).

Todas las técnicas anteriormente mencionadas, han permitido progresos en el campo de la ecología microbiana acerca de la composición y dinámica las comunidades microbianas de ambientes naturales complejos como un ecosistema o en ecosistemas más simples como la endosimbiosis o ambientes extremos. Sin embargo, existe una amplia discusión acerca de la verdadera contribución de estas técnicas para un mejor entendimiento de la funcionalidad de las comunidades microbianas dentro y como parte de un ecosistema, como el caso de los microorganismos en el ambiente oceánico (Parthasarathy *et al.*, 2007, Gilbert & Dupont, 2011).

### 2.3. Metagenómica de comunidades microbianas

La metagenómica es una herramienta derivada de la biología molecular y la bioinformática que permite el análisis de la diversidad microbiana mediante la secuenciación del complemento genómico total o ácido desoxirribonucleico total (ADN total o ADN ambiental) de todos los organismos presentes en una comunidad (Bonilla-Rosso, 2012). Ésta provee un panorama de la composición genética de la comunidad microbiana, diversidad taxonómica, abundancias, riqueza, etc. Para poder utilizar esta herramienta es imprescindible el uso de la bioinformática (Gilbert & Dupont, 2011).

La metagenómica comenzó a utilizarse desde la década del 2000, permitiendo una caracterización profunda de las comunidades microbianas de muestras ambientales. Estas técnicas permiten el análisis de la totalidad o casi la totalidad de las poblaciones microbianas de la muestra ambiental sin necesidad de cultivarlas en laboratorio. Esta tienen como objeto de estudio la totalidad genética o el conjunto de genes que hay en una muestra ambiental (Handelsman., 2004).

Por otro lado, el desarrollo de metodologías de secuenciación para la clonación de genes o genomas microbianos directamente del ambiente ha abierto las posibilidades para la microbiología ecológica, principalmente considerando que los microorganismos poseen un alto potencial de producción de metabolitos activos enzimas y polímeros y otras herramientas con aplicación biotecnológica (Rodríguez-Valera, 2004). El estudio del ADN ambiental de toda la comunidad es conocido como genómica ambiental, ecogenómica o metagenómica. El contenido genético, enzimático y metabólico es el resultado de una vasta interacción célula-célula y o relaciones sinérgicas o antagónicas que pueden hacer cambiar el comportamiento de la comunidad como un meta-organismo con propiedades emergentes (Konopka, 2009).

Las tecnologías de secuenciación han incrementado la capacidad de secuenciar más pares de bases por segundo (100 veces más capacidad) que el método Sanger. Éstas tecnologías secuencian moléculas de ADN masivamente y en paralelo en una celda de flujo. La secuenciación se lleva a cabo de dos formas, en un tiempo real continuo o en un proceso iterativo paso a paso. En ambos casos a cada templado o molécula de ADN es secuenciado

y puede ser cuantificado a lo largo de la generación de las secuencias (Nikolaki & Tsiamis, 2013). Estas técnicas modernas de secuenciación mejor conocidas como NGS (de Next Generation Sequencing) se centran en la secuenciación de fragmentos largos de ADN como genomas enteros o plásmidos en lugar de genes u operones. Para esto, es necesario fragmentar el ADN total en secuencias superiores a 700 pb o de 3, 8 y 40 kb en el caso de la secuenciación masiva shotgun (Bonilla-Rosso *et al.*, 2008, Nikolaki & Tsiamis, 2013). Después este paso es necesario un análisis bioinformático para ensamblar los fragmentos en secuencias lineales consecutivas que conforman una parte del genoma o un genoma total. El ensamblado superpone los diferentes fragmentos y reconstruye una secuencia lineal completa del genoma conocido como *contigs*. La reconstrucción de genomas enteros es difícil pero posible si la secuencia de fragmentos cubre el genoma entero. El reto de esta estrategia radica en el esfuerzo computacional que se requiere, además del análisis profundo de los resultados para encontrarles sentido biológico y la enorme capacidad de cómputo, generalmente supercomputación (Venter *et al.*, 2004,). Un estudio metagenómico requiere de un análisis gen por gen y el análisis del conjunto de los genes presentes en la muestra ambiental.

El análisis metagenético en combinación con el uso de las tecnologías de NGS promete ser una herramienta poderosa que ayude a comprender la ecología microbiana a un ritmo acelerado. Sin embargo, también se discute esto porque la metagenómica permite el análisis microbiano en ecosistemas de complejidad baja o media pero tampoco ha sido exitoso en ambientes de alta complejidad debido al esfuerzo necesario para lograr heterogeneidad en el ensamblado del material genético (Nikolaki & Tsiamis, 2013, Knight *et al.*, 2012). La metagenómica es una moderna y poderosa herramienta que permite el análisis de la composición de un microbioma en muestras ambientales sin subestimar ninguna población microbiana. Esta es la razón por la que se utilizará en el análisis del microbioma de sistemas acuapónicos.

Los sistemas acuapónicos presentan un nivel de complejidad bajo en comparación con sistemas naturales por lo que la metagenómica puede permitirnos analizar la comunidad de dicho sistema de manera exitosa.

Por otro lado, la generación de datos metagenómicos ha tenido un rol muy pequeño en la investigación biotecnológica. Las principales limitaciones para el desarrollo de estos análisis es:

- La complejidad de la diversidad microbiana.
- La insuficiencia de datos generada por la muestra que impida el análisis de la misma.
- La identificación de algunos genes.
- Dificultad en la integración y comparación de resultados obtenidos con las diferentes tecnologías.
- La incompatibilidad de las expectativas de los investigadores quienes buscan comprender los patrones ecológicos generados con aquellos que buscan poner a prueba los límites de las nuevas tecnologías.
- La falta de acuerdo sobre los estándares necesarios para los datos generados Knight *et al.* (2012), Bonilla-Rosso *et al.* (2008).

### **III. Hipótesis**

El metagenoma de un sistema acuapónico tiene como características principales una alta diversidad y riqueza taxonómica de organismos pertenecientes al ciclo del nitrógeno; y como consecuencia de esto, una alta expresión genética de elementos inherentes a este tipo de metabolismo.

### **IV. Objetivos**

#### **General**

Caracterizar la composición taxonómica de la comunidad microbiana de un sistema acuapónico.

#### **Particulares**

1. Caracterizar fisicoquímicamente el sistema acuapónico experimental de larva de rana toro (*Lithobates catesbeianus*) y chile (*Capsicum annum*) y su ambiente.
2. Determinar el perfil del metagenoma de la comunidad microbiana de este sistema acuapónico.
3. Correlacionar la tasa de transformación de la materia en el sistema acuapónico con la expresión metagenética de la comunidad microbiana.

## **V. Materiales y Métodos**

### **3.1. Ubicación del experimento**

Este trabajo se llevó a cabo en el Campus experimental de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Querétaro, ubicado en la comunidad de Amazcala, El Marqués, Qro. Esta región se ubica en la zona central del país, en las coordenadas 20°42'20.6"N, 100°15'37.3"W a 1900 msnl. El régimen climático es semiárido con un promedio de temperatura anual de 18°C y precipitación media anual de 500 mm. El experimento se llevó a cabo bajo condiciones de laboratorio de Julio-Septiembre de 2015. El enfoque del trabajo fueron los microorganismos que se desarrollaron en todos los componentes físicos de los sistemas acuapónicos establecidos durante el periodo experimental.

### **3.2. Material Biológico**

#### **Vegetal**

El material vegetal utilizado en los sistemas acuapónicos fueron plántulas de chile serrano (*Capsicum annum L.*) que fueron trasplantadas después de un mes de germinación.

#### **Animal**

El material animal utilizado fueron renacuajos de rana toro americana (*Lithobates catesbeianus*) de 60 días desde su eclosión. La densidad de cultivo fue de 1 renacuajo por litro de agua.

### **3.3. Análisis ambiental y fisicoquímico de los sistemas acuapónicos**

La temperatura ambiental y la humedad relativa se midieron cada 15 minutos durante todo el ciclo experimental con un data logger automático (Spectrum technologies, Watchdog Model 1000, USA). En cada sistema fue monitoreado la temperatura en agua (cada 15 minutos) con sensores de temperatura conectados al data logger; el pH y el oxígeno disuelto (una vez al día) (HQ40D multi dual input-meter, brand HACH, USA with LD0101-03

probe sensor). Cada 48 horas se tomaron muestras de agua para el análisis de amonio, nitratos, nitritos y fosfatos medidos por espectrofotometría durante todo el periodo experimental, en total se tomaron 75 muestras para los análisis fisicoquímicos (HACH spectrophotometer DR-6000; methods 8038, 8171, 8507 and 8048 Hach Methods). El experimento fue un diseño poli-etápico con tres repeticiones. Los sistemas acuapónicos utilizados para el experimento consistieron de peceras de 40 L (72x35x35 cm) para el cultivo acuícola; una tina de 70x35x15 cm para el sustrato y el cultivo vegetal con un sistema de drenaje en un extremo de la tina, una bomba de agua sumergible de 6W ( $Q_{\text{máx}}=120$  L/hr) y manguera para recircular el agua de la pecera a la tina de cultivo vegetal, la cual drenaba el agua de regreso al estanque por gravedad (Figura 4).



**Figura 6: Unidad experimental: estanque acuícola, biofiltro, sistema de recirculación de agua y sensores de monitoreo.**

### **3.4. Análisis de la comunidad microbiana de los sistemas acuapónicos**

El experimento se dividió por etapas, la primer etapa consistió en la inicialización del sistema y el establecimiento del cultivo acuático (renacuajos), la segunda etapa consistió en el periodo desde el encendido de la recirculación de las peceras a hasta la activación del biofiltro (después de 28 días de iniciada la recirculación y cuando el amonio y los nitritos son cercanos a cero y hay acumulación de nitratos) y finalmente la etapa 3 donde se estableció el cultivo vegetal, es decir, la acuaponia (28 días).

Para analizar la composición taxonómica de la comunidad microbiana del sistema acuapónico se tomaron en total 18 muestras en varios tiempos a lo largo de cada una de las etapas a fin de evaluar el cambio de la composición de los microorganismos a lo largo de un ciclo acuapónico. En total fueron 9 tiempo evaluados y dos tamaños de filtro para cada porción de la comunidad (1.6 y 0.22  $\mu\text{m}$ ) (tabla 2).

**Tabla 2: Tiempos de muestreo por etapa y fecha de análisis de cada uno.**

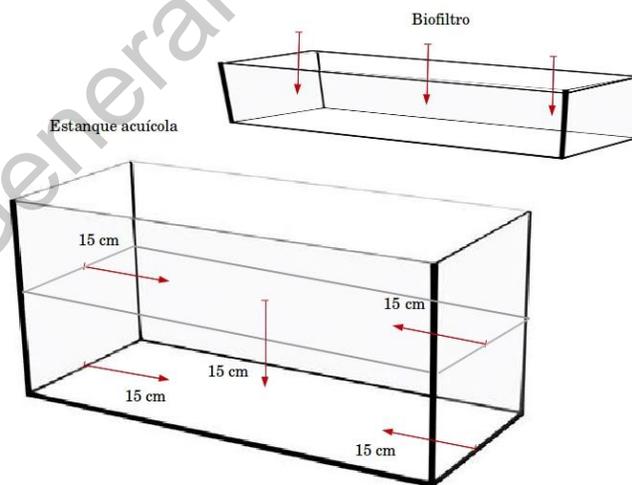
Tiempo	Etapas	Día (D)	Fecha de análisis
0	Inicialización (E1)	D0	29/Junio/2015
1	Activación del biofiltro (E2)	D9	02/Julio/2015
2	Activación del biofiltro (E2)	D16	09/Julio/2019
3	Activación del biofiltro (E2)	D23	16/Julio/2019
4	Activación del biofiltro (E2)	D30	23/Julio/2019
5	Acuaponia (E3)	D37	30/Julio/2019
6	Acuaponia (E3)	D44	06/Agosto/2019
7	Acuaponia (E3)	D51	13/Agosto/2019
8	Acuaponia (E3)	D58	20/Agosto/2019

Las muestras seleccionadas para el análisis de la composición taxonómica se redujeron a 4 tiempos de muestreo para cada porción de la comunidad como lo muestra la Figura 5 tomando como criterio que el tiempo de inicialización nos daría como referencia el estado inicial de la comunidad microbiana. El microbioma de este tiempo se espera que sea más parecido al de un sistema acuícola tradicional. Dado que la etapa 2 (E2) duró 4 semanas se tomaron las muestras de la mitad de esta etapa, momento en el cual es más probable observar un cambio en la comunidad y el final nos indicaría la composición de la comunidad en un biofiltro maduro, esto tomando en cuenta que son aproximadamente 28 días que dura la maduración de un biofiltro de acuerdo a Timmons, 2002. Y finalmente la etapa de acuaponia que duró 4 semanas se tomó como criterio que en la tercera semana la comunidad habría tenido tiempo suficiente para evolucionar y llegar al punto de término del sistema acuapónico.



**Figura 7: Etapas del ciclo productivo de los sistemas acuapónicos experimentales y puntos de muestreo en el tiempo.**

Los puntos de muestreo en el estanque del sistema se hicieron en 5 puntos: se tomó el agua superficial a 15 cm de cada extremo horizontal de la pecera, el agua en la parte de en medio de la pecera a 15 cm por debajo de la columna de agua y el agua y sedimento del fondo a 15 cm de cada extremo horizontal de la pecera. El muestreo del biofiltro se hizo tomando agua y un volumen de 200 ml de sustrato en 3 puntos adyacentes: cerca de la entrada de agua, en medio de la cama del sustrato y cercano a la zona de drenaje del agua (Figura 6).



**Figura 8: Puntos de muestreo en cada unidad experimental.**

Para la toma de cada muestra se utilizaron materiales estériles (espátulas, jeringas de 50 ml y matraces). El agua se homogenizó en vórtex por 10 min y se filtró con papel filtro de poros de 5,1.6 y 0.22 micras a fin de separar por tamaño celular las células procariontas y

eucariontas (Figuras 7 y 8). Una vez recuperadas las células en papel filtro, éste se congeló con nitrógeno líquido y se preservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posteriores análisis. Todo se realizó bajo condiciones de esterilidad.



**Figura 9: Proceso de filtración: Cada muestra se filtró varias veces a fin de separar por tamaño celular a los microorganismos. A la izquierda se muestra la filtración inicial; en medio se presenta la filtración de 1.6 micras y finalmente, la filtración de 0.22 micras.**



**Figura 10: Filtros utilizados para recuperar los microorganismos (5, 1.6 y 0.22 micrómetros de izquierda a derecha).**

#### **3.4.1 Extracción de material genético**

Los filtros en ultra-congelación ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) se descongelaron en hielo, se cortaron con bisturí estéril y se metieron en tubos Falcón de 15 ml para realizar el proceso de extracción de acuerdo al protocolo de Gilbert & Dupont (2011) para extracción de ADN metagenómico con algunas modificaciones.

1. Se añadió en cada tubo con muestras 1.6 ml de CTAB y 180  $\mu$ l de lizosima.
2. Se incubó a 37°C por 30 min en agitación constante.
3. Se añadió 200  $\mu$ l de SDS (10% peso/volumen) y 55  $\mu$ l de proteinasa K (20 mg/ml), dejando incubar por 2 horas en agitación constante.
4. El lisado se retiró del tubo Falcón y se repartió en varios tubos eppendorf de 2 ml a los cuales se les añadió 1 ml de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) a un pH de 8 mezclando suavemente. Se centrifugaron los tubos eppendorf a 1500xg por 5 minutos.
5. Se añadió otro volumen de 1 ml de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1), se mezcló suavemente y se centrifugó a 1500xg por 5 minutos.
6. Se añadió 1 ml de cloroformo isoamílico (24:1), se mezcló suavemente y se centrifugó por 5 minutos a 1500xg.
7. Se decantó la fase acuosa a un tubo estéril y se le añadió 0.5 vol. de 7.5 M de acetato de amonio, se mezcló y se añadió 2.5 vol. de etanol puro. Se mezcló y se dejó precipitar toda la noche a -20°C.
8. Se centrifugó a 10 000xg por 30 minutos a 4°C y se decantó el etanol.
9. Se añadió 2 ml de etanol 80 %, se mezcló y se centrifugó a 10 000xg por 20 minutos a 4°C, se decantó el etanol.
10. Repetir el paso anterior.
11. Decantar el etanol y dejar los tubos invertidos por 15 minutos para evaporar los restos de etanol.
12. Re-suspender en 200  $\mu$ l de agua estéril. Conservar a -80°C.

Posteriormente se confirmó la presencia de ADN genómico mediante un gel de electroforesis y se cuantificó por espectrofotometría. Se midió la absorbancia a 260 y 280 nm y se calculó la concentración de ADN con la fórmula:

$$[ADN] \mu g/ml = Abs_{260} \cdot Factor \ de \ dilución \cdot Coeficiente \ de \ extinción(50 \ para \ ADN) \ (1)$$

La calidad de pureza del ADN se calculó con la relación  $Abs_{260}/Abs_{280}$ , un valor entre 1.65 y 1.9 indica una alta pureza de ADN.

Las variaciones de las secuencias del gen 16s ARN ribosomal y 18s ARN ribosomal (rARN) son ampliamente usados para caracterizar la diversidad taxonómica presente en

comunidades microbianas procariontes y eucariontes, respectivamente. La secuencia del 16s rARN está compuesta de nueve regiones hipervariables intercaladas con regiones altamente conservadas entre especies. La secuencia de este gen y sus regiones hipervariables se ha determinado en una gran cantidad de microorganismos y es posible tener acceso a esas bases de datos en múltiples plataformas como Greengenes, Silva y el Proyecto de bases de datos ribosomales. Usando tecnologías de Secuenciación de Última Generación o NGS (Next Generation Sequencing en inglés) y métodos bioinformáticos puede caracterizarse la estructura de una comunidad, abundancia de especies y la evolución de un ambiente microbiano en un ambiente en particular.

Las librerías genéticas del 16s rRNA (procariontes) y 18s rRNA (eucariontes) en este trabajo se construyeron a partir de 4 muestras de material genético proveniente de los sistemas acuapónicos. Mediante reacción de PCR se amplificaron los genes codificantes para 16s rRNA en las regiones V1-V3. Los productos de PCR se cuantificaron y purificaron para la construcción de la librería. Los amplicones se secuenciaron en una plataforma Illumina HiSeq 2500 para generar secuencias de 250 pb.

#### **3.4.2. Procesamiento de secuencias crudas**

A los extremos terminales de las secuencias crudas de cada muestra se les asignó un código único, este código y el cebador de la secuencia fueron truncados. Los extremos terminales fueron ensamblados utilizando el software FLASH (V1.2.7) (Magôc et al. 2011), una herramienta de análisis muy rápido y precisa para fusionar pares de secuencias cuando los fragmentos de ADN originales son más cortos que el doble de la longitud de las secuencias. Las secuencias de corte y empalme obtenidas se denominan **etiquetas primas**. Una vez obtenidas las etiquetas primas, se realizó un filtro de calidad en las secuencias bajo condiciones específicas para el proceso de control de calidad con el software QIIME (V1.9.0) (Caporaso et al. 2010; Bokulich et al. 2013). Después de este filtrado, se obtuvieron secuencias de alta calidad que fueron comparadas con bases de datos de

referencia (Gold database), usando el algoritmo UCHIME (UCHIME Algorithm) para detectar secuencias quiméricas, las cuales fueron removidas (Edgar et al. 2011).

### **3.4.3. OTUs y análisis de la comunidad**

Las secuencias efectivas de todas las muestras que resultaron del proceso anterior fueron agrupadas por clusters utilizando el software Uparse (v7.0.1001) para obtener las Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs, por sus siglas en inglés) con un 97% de identidad (Edgar et al. 2013). La taxonomía de los OTUs se llevo a cabo usando el script QIIME **assign\_taxonomy.py** (RDP método clasificador, nivel de confianza de 0.8) utilizando las secuencias OTUs representativas. Se eligieron las siguientes bases de datos para el análisis taxonómico: Green Gene (16S, secuencias de mitocondria y cloroplastos), RDP (16S), Silva (18S) y Unite (ITS) para el análisis de la comunidad procarionte y eucarionte, respectivamente. Posteriormente se borrarón los OTUs contaminantes que fueron los OTUs que tuvieron anotación como mitocondrias, cloroplastos y desconocidos, los cuales se removieron. Finalmente, se visualizaron todas las relaciones filogenéticas de una sola muestra usando el software KRONA; el árbol filogenético de las especies de interés se construyó por secuencias OTUs representativas usando el software QIIME con el script **make\_phylogeny.py**. El árbol filogenético que incluye las abundancias relativas de los OTUs y el nivel de confianza taxonómico se visualizó utilizando Perl y el software SVG. Las relaciones filogenéticas de especies de interés dentro y a través de las muestras fueron visualizadas utilizando Perl o MEGAN. Finalmente, el heat-map de la abundancia relativa de las especies para cada nivel taxonómico se construyó utilizando el software R.

### **3.4.4. Índices de diversidad**

**Índice de diversidad alfa.** Se calculó el índice de Chao, Shannon y de especies observadas utilizando el software QIIME basado en la abundancia relativa de los OTUs (script **alpha\_diversity.py**) (Chao 1987; Colwell 2004).

Todas las secuencias encontradas en este trabajo se depositaron en BioProject database (número de acceso: PRJNA353631).

## VI. Resultados y Discusión

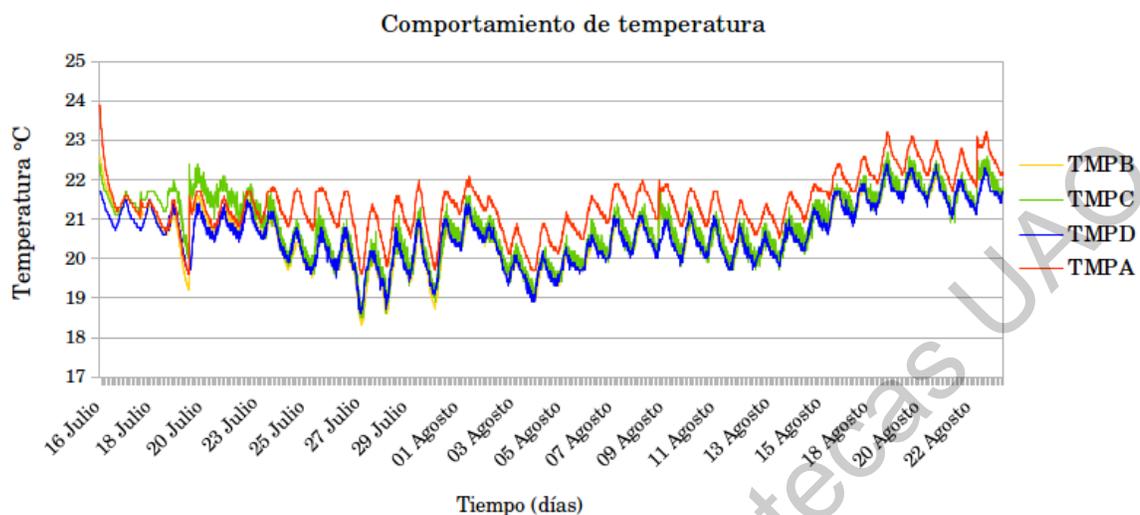
### 4.1. Caracterización ambiental y fisicoquímica de los sistemas acuapónicos

El promedio de los resultados de los parámetros medio ambientales y fisicoquímicos medidos en los sistemas acuapónicos se muestran en la tabla siguiente:

**Tabla 3: Resultados promedio de mediciones fisicoquímicas del agua de los sistemas acuapónicos y ambientales**

Parámetro	Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3
Temperatura Ambiental (°C)	22.010 ± 0.710	21.120 ± 0.830	22.580 ± 0.650
Humedad Relativa (%)	66.970 ± 5.390	65.650 ± 3.520	70.400 ± 1.670
pH	7.866 ± 0.057	8.722 ± 0.420	8.583 ± 0.248
Oxígeno disuelto (mg/L)	0.450 ± 0.098	5.781 ± 0.895	5.685 ± 0.413
Promedio de temperatura en agua de cultivo (°C)	21.190 ± 0.040	20.610 ± 0.590	22.060 ± 0.990
Amonio (mg NH <sub>3</sub> -N L <sup>-1</sup> )	0.115 ± 0.008	0.285 ± 0.118	0.420 ± 0.090
Nitrito (NO <sub>2</sub> -N L <sup>-1</sup> )	0.047 ± 0.000	0.475 ± 0.600	0.178 ± 0.401
Nitrato (NO <sub>3</sub> -N L <sup>-1</sup> )	1.800 ± 0.020	6.268 ± 1.843	23.747 ± 7.657
Fosfatos (mg PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> L <sup>-1</sup> )	0.640 ± 0.009	1.483 ± 0.768	18.556 ± 9.029

El promedio de la temperatura ambiental durante el periodo experimental fue de 21.52°C ± 0.99 (P 0.05), mientras que el promedio de la temperatura en el agua de los sistemas acuapónicos fue 21.286°C (P 0.05). El comportamiento de las temperaturas durante este periodo se muestra en la Figura 9. El promedio del pH en el agua de los sistemas acuapónicos fue de 8.372 ± 0.241. El valor más bajo de pH se presentó en la etapa 1 (E1) del desarrollo de los sistemas acuapónicos (7.866, P 0.05) y la etapa 2 (E2) presentó el valor más alto (8.722, P 0.05). EL valor máximo de pH durante todo el periodo experimental fue 9.1 y el mínimo fue 7.8.



**Figura 11: Comportamiento de la temperatura ambiental y la temperatura del agua en los sistemas acuapónicos.**

En cuanto al oxígeno disuelto el valor promedio durante la primera etapa (E1) fue de  $0.450 \pm 0.098$  y este valor se incrementó en la segunda etapa y tercera etapa debido al inicio de la recirculación de agua. El pH promedio que permite el proceso de nitrificación para biofiltros sumergidos es de 5.5 a 9.0, sin embargo, el pH del agua en este trabajo fue 8.372, que fue más alto que el pH recomendado de 7 para optimizar la producción de peces y plantas (Tyson et. al. 2004, Somerville et al. 2014). El pH en los estanques acuapónicos en este trabajo aumentó de 7.1 a 8.4 durante la activación del biofiltro (E2), como se esperaba para un biofiltro típico durante la oxidación de amoníaco.

En términos de nutrientes disueltos, el comportamiento de la concentración de amonio ( $\text{NH}_3$ , que es la forma más tóxica) en el estanque acuapónico se mantuvo por debajo de la concentración máxima de amonio recomendada para la acuicultura ( $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  a un pH de 8.0).

Con respecto a la concentración de nitritos, los niveles más altos se presentaron en E2, después de una acumulación de amoníaco y antes de la oxidación de nitratos. Esta acumulación de nitrito corresponde a la esperada para un biofiltro. Por otro lado, los valores de nitrato para E1, E2 y E3 fueron  $1.800 \pm 0.020$ ,  $6.268 \pm 1.843$  y  $23.747 \pm 7.657$ ,

respectivamente. La concentración de nitrato no es tóxica para las especies acuáticas, excepto en niveles muy altos (>1000 mg/L de  $\text{NO}_3\text{-N}$ ) y es la fuente principal de nitrógeno para las plantas en sistemas hidropónicos, por lo que el nivel de nitrato se mantuvo en una tasa de concentración óptima (Tyson *et al.*, 2011).

En el caso de los fosfatos, se observa un incremento a lo largo del experimento. Otros trabajos informaron una concentración de fosfatos entre  $117 \text{ mg L}^{-1} \text{ PO}^{+4}$ , sin embargo, las concentraciones recomendadas están entre  $40\text{-}60 \text{ mg/L PO}^{+4}$  (Goddek *et al.*, 2015). Este último sugiere una posible deficiencia de fósforo en el sistema acuapónico evaluado en este trabajo, que se compensa con la acumulación en el sistema; sin embargo, será necesario analizar el rendimiento de los fosfatos en un ciclo acuapónico más largo.

Por otro lado, el comportamiento del amonio, el nitrato y los fosfatos presentan una acumulación en su concentración a lo largo del tiempo. El comportamiento del nitrito muestra un incremento de la concentración en la segunda etapa (E2) y una menor concentración en la primer y última etapa (Figura 10).

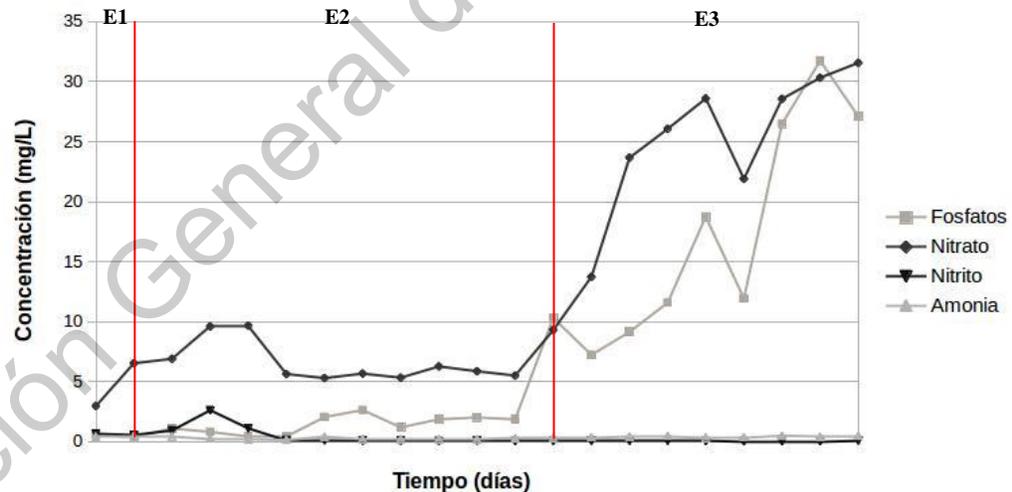


Figura 12: Comportamiento de fosfatos, nitratos, nitritos y amonio en el agua de los sistemas acuapónicos.

#### 4.2. Comunidad microbiana en los sistemas acuapónicos

Una vez extraído en material genético se cuantificó y se calculó la pureza del ADN, lo que se muestra en el siguiente cuadro (Tabla 4). Las muestras subrayadas corresponden a aquellas que se seleccionaron para el trabajo. El criterio fue con base en la mayor cantidad y calidad del material genético.

**Tabla 4: Concentración y pureza de las muestras de ADN.**

Muestra	[ADN]mg/mL	Abs260/Abs280
<u>E1-D0</u>	<u>2060</u>	<u>1.002</u>
E2-D9	2065	1.122
<u>E2-D16</u>	<u>1740</u>	<u>1.125</u>
E2-D23	10	-
<u>E2-D30</u>	<u>2500</u>	<u>1.035</u>
E3-D44	1710	1.125
<u>E3-D51</u>	<u>2505</u>	<u>1.091</u>
E3-D58	2235	1.098

Podemos observar que en cuanto a la cantidad de ADN en las muestras del sistema acuapónico, éste comienza con una concentración que se mantiene al inicio de la siguiente etapa pero cae drásticamente en las siguientes semanas de muestreo. Recuperándose la concentración de ADN en el último periodo de muestreo. Se observa un comportamiento semejante en la etapa E3 en donde se inicia el cultivo acuapónico (E3). Como podemos observar, cada que se inicia una etapa en el sistema, la concentración de ADN disminuyó y al cabo de un tiempo aumenta. Esto pudiera indicarnos que los cambios en el sistema están afectando a la comunidad de microorganismos que en un inicio disminuyen y conforme pasa el tiempo la concentración de la comunidad se recupera y se estabiliza.

El metagenoma de los sistemas acuapónicos incluye la porción procarionta y eucarionta de la comunidad microbiana por lo que en este trabajo se reportan los resultados de cada porción por separado. Las siguientes tablas (5 y 6) muestran los resultados del procesamiento de las secuencias obtenidas del procedimiento de secuenciación, filtraciones y anotaciones para cada porción de la comunidad.

**Tabla 5: Resultados de secuenciación de la porción procarionte de la comunidad microbiana en sistemas acuapónicos.**

Muestra	Total Sec	Sec. Efectivas (%)	Sec. Taxon.	Tamaño Amplicón (pb)	Sec. Únicas	Sec. Sin Clasificar
E1-D0	39422	38987 (98.90)	38309	255.97	611	67
E2-D14	46484	44149 (94.98)	43036	255.98	1100	13
E2-D30	34509	33672 (97.57)	33072	255.97	580	20
E3-D51	44440	42589 (95.83)	42589	256.02	2332	149

**Tabla 6: Resultados de secuenciación de la porción eucarionte de la comunidad microbiana en sistemas acuapónicos.**

Muestra	Total Sec.	Sec. Efectivas (%)	Sec. Taxon.	Tamaño Amplicón (pb)	Sec. Únicas	Sec. Sin Clasificar
E1-D0	46926	44602 (94.78)	44253	245.01	349	0
E2-D14	52092	42947 (94.85)	42128	243.57	574	0
E2-D30	44309	42445 (95.62)	42160	242.05	80	0
E3-D51	41423	39715 (95.07)	37554	258.15	116	0

Del total de secuencias producidas en cada muestra, entre el 94.78% y el 95.62% pudieron ser asignadas a algún nivel taxonómico en las bases de datos seleccionadas de acuerdo a la porción de la comunidad (GreenGene, RDP, Silva y Unite) para el análisis de la comunidad procarionte y eucarionte.

En cuanto a la diversidad de la comunidad microbiana, para la porción procarionte encontramos que de acuerdo con los índices de Shannon y Chao, esta aumentó con el tiempo y los valores más altos estuvieron presentes en la última etapa cuando todos los componentes biológicos estaban presentes en el sistema acuapónico (E3-D51), más del doble en comparación con la primera etapa del desarrollo del sistema (Tabla 7). En la mayoría de los estudios ecológicos, el valor del índice de Shannon rara vez es mayor que 4 y corresponde a muestras con una alta biodiversidad. El valor de Shannon en la última etapa (7.675) de este trabajo sugiere una gran diversidad de poblaciones procariontes que se espera para un cultivo intensivo. Asimismo, la diversidad dentro de la porción eucarionta

de la comunidad microbiana de acuerdo con ambos índices indicó una alta diversidad en la primera etapa del ciclo acuapónico (E1-D0) y disminuyendo en las siguientes dos etapas (E2-D14 y E2-D30) correspondientes a la activación del biofiltro y aumentando nuevamente en la última etapa (Tabla 8).

**Tabla 7: Diversidad microbiana de la porción procarionta de la comunidad del sistema acuapónico**

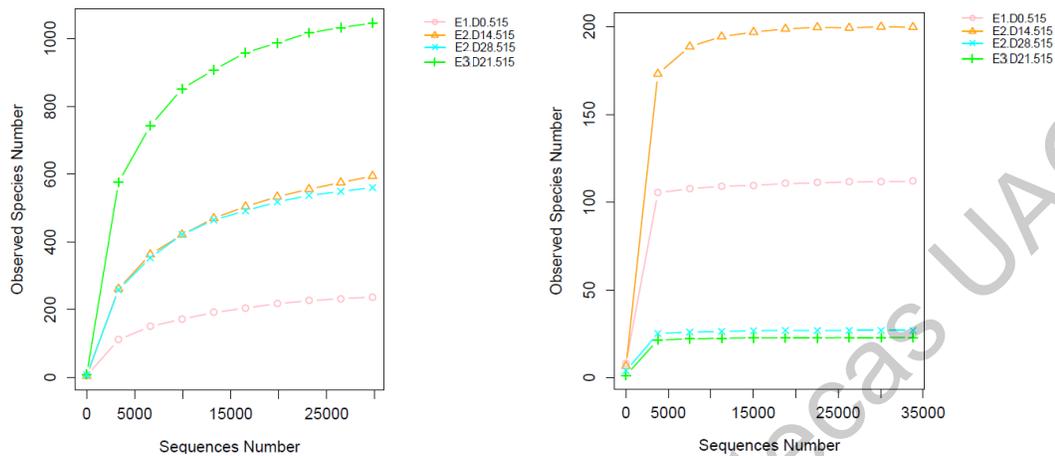
<b>Etapa</b>	<b>Shannon</b>	<b>Chao</b>	<b>Especies</b>
E1-D0	3.494	260.13	242
E2-D14	3.663	698.00	608
E2-D30	4.873	591.23	570
E3-D51	7.675	1098.60	1057

**Tabla 8: Diversidad microbiana de la porción eucarionta de la comunidad del sistema acuapónico**

<b>Etapa</b>	<b>Shannon</b>	<b>Chao</b>	<b>Especies</b>
E1-D0	5.3398	112.5	112
E2-D14	4.8015	200.0	200
E2-D30	2.4871	27.0	27
E3-D51	0.5346	23.0	23

La tendencia en el aumento de la diversidad durante el desarrollo del sistema acuapónico en la porción procarionta se muestra de la misma manera que el índice de Shannon en la gráfica de la rarefacción (Figura 13). Esta tendencia se ve claramente en la figura 12 en donde en la primer etapa podemos ver una menor cantidad de diferentes phylum aunque cada uno con mayor abundancia y en la última etapa se observa una mayor cantidad de phylum con menos abundancia relativa cada uno excepto para las Proteobacterias que son quienes dominan la comunidad microbiana del sistema acuapónico.

Por el contrario, en la porción eucarionte de la comunidad microbiana la diversidad durante el desarrollo del sistema disminuye de acuerdo a la gráfica de rarefacción y coincide con el índice de Shannon. En la figura 13 podemos observar que en la primer etapa hay una mayor cantidad de filos que durante el desarrollo del sistema se pierden hasta quedar dominados por el phylum Ascomycota.



**Figura 13: Rarefacción presente en las diferentes etapas del desarrollo de los sistemas acuapónicos para la porción procarionte (izquierda) y eucarionte (derecha).**

La composición taxonómica de la porción procarionta estaba compuesta de Bacterias y Archaea y la porción eucarionta estuvo compuesta de Hongos y Protista (Tabla 9).

**Tabla 9: Composición taxonómica de la comunidad microbiana de los sistemas acuapónicos.**

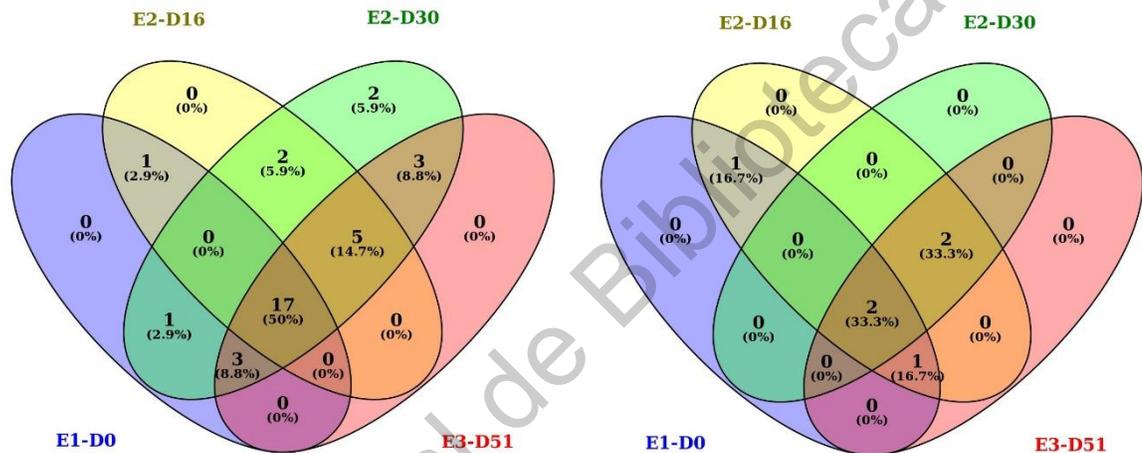
Archaea	Bacteria	Fungi	Protista
0.18%	81.78%	17.53%	0.49%

La comunidad microbiana del sistema acuapónico cambió su composición a través del tiempo. De las cuatro etapas evaluadas (E1-D0, E2-D16, E2-D), la etapa inicial y la final tuvieron presentas mayores diferencias, mientras que las dos etapas medias presentan mayor similitud entre ellas, ambas corresponden a la activación del biofiltro por lo que es de esperarse que las diferencias sean mínimas.

La composición de la comunidad microbiana en la primera etapa (E1-D0) fue un 59,05% de procariontas y un 40,95% de eucariontas. En la siguiente etapa, en medio de la activación del biofiltro (E2-D16) fue de 81.30% y 18.07% para procariontas y eucariontas, respectivamente. Al final de la activación del biofiltro (E2-D30), la composición era 93.38% procariótica y 6.62% eucarionta y, finalmente, en la última etapa con todos los

componentes biológicos (E3-D51) era 97.02% procarionta y 2.98% eucariótica. Estos resultados sugieren que la comunidad microbiana en este sistema acuapónico evolucionó de procariontas y eucariontas en una proporción cerrada a una comunidad microbiana procariótica casi por completo.

Los filos encontrados en común en dos o más etapas del ciclo acuapónico para la porción procarionta y eucarionta se muestran en los siguientes diagramas mediante superposición entre los grupos (Figura 14).



**Figura 14: Etapas del ciclo acuapónico y los *phyla* encontrados en una sola etapa o en común en dos o más etapas en la porción procarionta (izquierda) y en la porción eucarionta (derecha).**

Por otro lado, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* y *Fusobacteria* fueron los filos más representativos de procariontas durante el desarrollo del sistema acuapónico, similares a otros trabajos donde la diversidad microbiana en el biofiltro, raíces de plantas, perifitón y heces de pescado de un sistema acuapónico se mostró como *phyla* más representativa *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, y *Proteobacteria* (Schmautz et al. 2017).

En la porción procarionte, los filos encontrados en el sistema acuapónico en cada etapa se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 10: Filos presentes en el sistema acuapónico, etapa en la que están presentes y en cuál tuvieron mayor representatividad en la comunidad microbiana del sistema acuapónico (rojo).**

Filo	E1-D0	E2-D16	E2-D30	E3-D51
<i>Proteobacterias</i>	X	X	X	X
<i>Bacteroidetes</i>	X	X	X	X
<i>Actinobacterias</i>	X	X	X	X
TM7	X	X	X	X
<i>Acidobacterias</i>	X	X	X	X
<i>Firmicutes</i>	X	X	X	X
OD1	X	X	X	X
<i>Planctomycetes</i>	X	X	X	X
<i>Fusobacterias</i>	X	X	X	X
<i>Verrucomicrobia</i>	X	X	X	X
TM6	X	X	X	X
<i>Chloroflexi</i>	X	X	X	X
GN02	X	X	X	X
SR1	X	X	X	X
<i>Armatimonadetes</i>	X	X	X	X

<i>Tenericutes</i>	X	X	X	X
<i>Elusimicrobia</i>	X	X	X	X
<i>Spirochaetes</i>	X		X	X
<i>Thermi</i>	X		X	X
<i>Cyanobacteria</i>	X		X	X
<i>Chlamydiae</i>		X	X	X
<i>Fibrobacteres</i>		X	X	X
<i>Gemmatimonadetes</i>		X	X	X
<i>Nitrospirae</i>		X	X	X
NKB9		X	X	X
WPS-2			X	
<i>Synergistetes</i>			X	
<i>Crenarchaeota</i>			X	X
<i>Parvarchaeota</i>			X	X
BHI80-139			X	X
<i>Lentisphaerae</i>		X	X	
OP3		X	X	
ZB3	X	X		
<i>Chlorobi</i>	X		X	

Del total de secuencias taxonómicas anotadas fueron 23 filos procariontes en total que están presentes en la etapa inicial del sistema y los más representativos en esta etapa fueron *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* y *Otros*. En la etapa E2-D16 y E2-D30 fueron anotadas 25 y 26 phylum respectivamente dominando *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, OD1 y *Verrucomicrobia* y en la etapa E3-D51 que es la de acuaponia los filos dominantes fueron *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, TM7, *Acidobacteria*, *Firmicutes*, OD1, *Planctomycetes*, *Fusobacteria*, *Verrucomicrobia*, TM6 y *Otros*; además de *Chlamydiae* y *Gemmatimonadetes* que se encuentran en 3 de las etapas del sistema. Las

*Proteobacterias* fueron el phylum más abundante en casi todas las etapas acuapónicas con el 69%, 88% y 90% en las etapas E2-D16, E2-D30 y E3-D51, excepto en la primera etapa (E1-D0) en la que sólo cuenta con 38% de representatividad y el phylum más abundante fue *Bacteroidetes* con 41%. El segundo phylum más abundante en etapas acuapónicas fue *Bacteroidetes*, sin embargo, en las últimas tres etapas su abundancia relativa fue más baja que en la primera etapa. La proporción de *Proteobacteria* y *Bacteroidetes* fue inversamente proporcional. En todos los estadios acuapónicos se encontraron filos sin clasificar (Figura 15).

Las proteobacterias son un grupo de bacterias gran-negativas muy extenso y complejo con diversidad de metabolismos (autótrofo, heterótrofo y quimiolitótrofos), muchas especies importantes para la industria, medicina e investigación biológica. Una gran variedad de patógenos se encuentran dentro de este filo. Estas estuvieron presentes en el agua inicial en donde se encontraban los renacuajos pero que a lo largo del desarrollo del sistema acuapónico incrementó su abundancia. Estos resultados concuerdan con el trabajo de Schmutz y col. (2017) en donde en el biofiltro, las raíces de las plantas y el periphyton fueron el grupo de bacterias más abundante. Es interesante resaltar que el porcentaje de *Proteobacterias* que hay inicialmente en el agua de los renacuajos es mucho menor al que hay en el agua de peces del sistema acuapónico de Schmutz y col. (2017) (38% y 46.68%, respectivamente). Esto pudiera deberse tanto al organismo acuático utilizado como al hecho de que el trabajo de Schmutz se analizó un biofiltro ya maduro y cómo podemos ver, en este trabajo conforme madura el sistema acuapónico las *Proteobacterias* aumentan su abundancia.

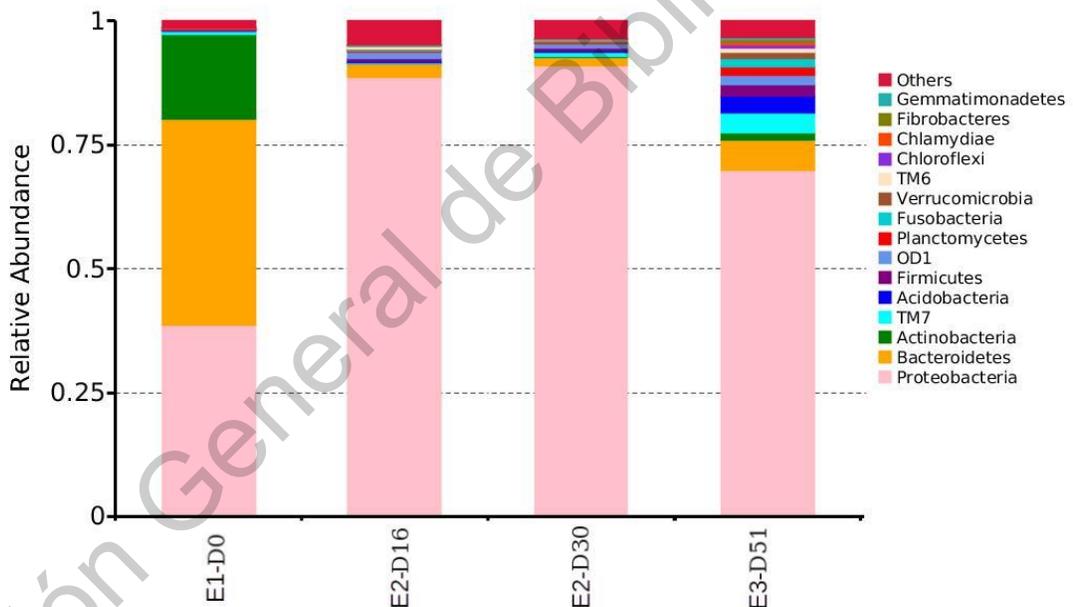
EL filo *Bacteroidetes* son bacterias gram-negativas que fermentan polisacáridos y otros carbohidratos no digeribles y producen ácidos grasos de cadena corta que tienen efectos benéficos en el tracto intestinal. Son en su mayoría bacterias no patógenas, con la excepción del género *Bacteroides*, constituido por patógenos oportunistas, y de algunas *Flavobacteriaceae*, patógenas para los seres humanos, otros mamíferos, peces de agua dulce o peces marinos. La proporción de este grupo bacteriano disminuyó drásticamente a partir de la segunda etapa evaluada (E2-D16) en donde el sistema ya tenía recirculación, lo cual cambia totalmente las condiciones ambientales en cuanto a oxigenación,

disponibilidad de nutrientes, etc. Es posible que este género haya estado en mayor cantidad al principio cuando en el medio acuático había una acumulación de carbohidratos, polisacáridos y ácidos grasos provenientes de los residuos del alimento de los animales y en cuanto se comenzó con la recirculación del agua, el contenido de estos disminuyó haciendo que las bacterias no tuvieran más sustrato para alimentarse. En la última etapa podemos ver una ligera recuperación de este grupo bacteriano. Dado que algunas *Bacteroidetes* son patógenas oportunistas de animales acuáticos, podemos decir que si se encontraban presentes en el sistema, estos patógenos disminuyeron su población.

*Actinobacteria* son bacterias gram-positivas que están presentes en todos lados, con alto contenido de guanina y citocina en su ADN, tienen característica morfológica filamentosa (Dhakal et al., 2017). Este filo tiene importantes funciones incluyendo la descomposición todo tipo de sustancias orgánicas. Estas bacterias filamentosas han evolucionado con una riqueza de los grupos de genes biosintéticos y, por lo tanto, mostraron su capacidad sin igual para la producción de varios metabolitos secundarios bioactivos. Muchas de las especies de este filo viven en simbiosis en el tracto digestivo de algunos animales. Como se puede observar en la figura 15, este filo tiene mayor abundancia en la etapa inicial, cuando en el medio se encontraba mayor concentración de elementos provenientes de los organismos acuáticos (heces, restos de alimento, etc.) y cuando se inicia la recirculación del sistema disminuyen drásticamente, posiblemente debido al aumento del volumen del medio acuático que disminuyó su representatividad así como el cambio de condiciones medio ambientales, ya que en la última etapa vemos un ligero aumento de estas, lo que puede significar una acumulación de este filo en el sistema tras los cambios iniciales.

*Firmicutes* o Endobacteria son un filo de bacterias, la mayoría de las cuales tienen una estructura celular Gram-positiva con formas de bacilo o de coco. Algunas de ellas carecen de paredes celulares por lo que no se colorean con la tinción de Gram y además carecen de la segunda membrana encontrada en la mayoría de las bacterias Gram negativas. Contrario a *Actinobacteria*, su contenido GC en el ADN es bajo. Tanto el filo *Actinobacteria* como *Firmicutes* son bacterias que se encuentran comúnmente en el tracto intestinal de los animales y al parecer de gran importancia en la salud de estos ya que alteraciones en las abundancias de estos microorganismos pueden desencadenar problemas de salud como la

obesidad en humanos. Contrario a *Actinobacteria*, *Firmicutes* está en menor abundancia en la etapa inicial pero aumenta su abundancia conforme se desarrolla el sistema acuapónico. En el trabajo de Eck (2017), quien caracteriza la diversidad de varios sistemas acuapónicos, los phylum bacterianos que encontraron en mayor abundancia en casi todos los sistemas analizados son las *Proteobacterias*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Planctomycetes*, *Thermi* y *Nitrospirae*. Muchos de los filos coinciden con los encontrados en este trabajo. Cabe resaltar que uno de los filos que se encontró en más del 2% de abundancia relativa en la mayoría de los sistemas analizados por Mathilde Eck es *Nitrospirae*, sin embargo, es el filo con menor representatividad que los anteriormente mencionados.

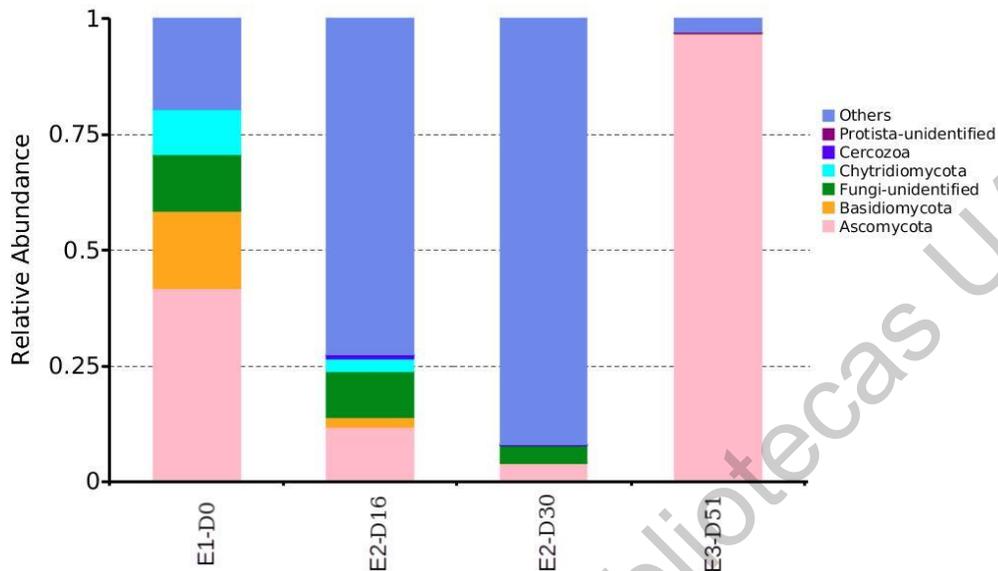


**Figura 15: Abundancias relativas de los filos procariontes encontrados en las cuatro etapas del desarrollo del sistema acuapónico.**

Por otro lado, en la porción eucarionte se presentaron los filos *Ascomycota* y *Basidiomycota* en todas las etapas del ciclo acuapónico. Se presentó un único phylum de hongos no identificados en todas las etapas excepto en E2-D30. *Cercozoa* y un Protista no identificado se presentaron en las tres últimas etapas del ciclo acuapónico (E2-D16, E2-D30 y E3-D51)

y el filo *Chytridiomycota* se presentó en la primera y segunda etapa (E1-D0 y E2-D16) (Figura 16).

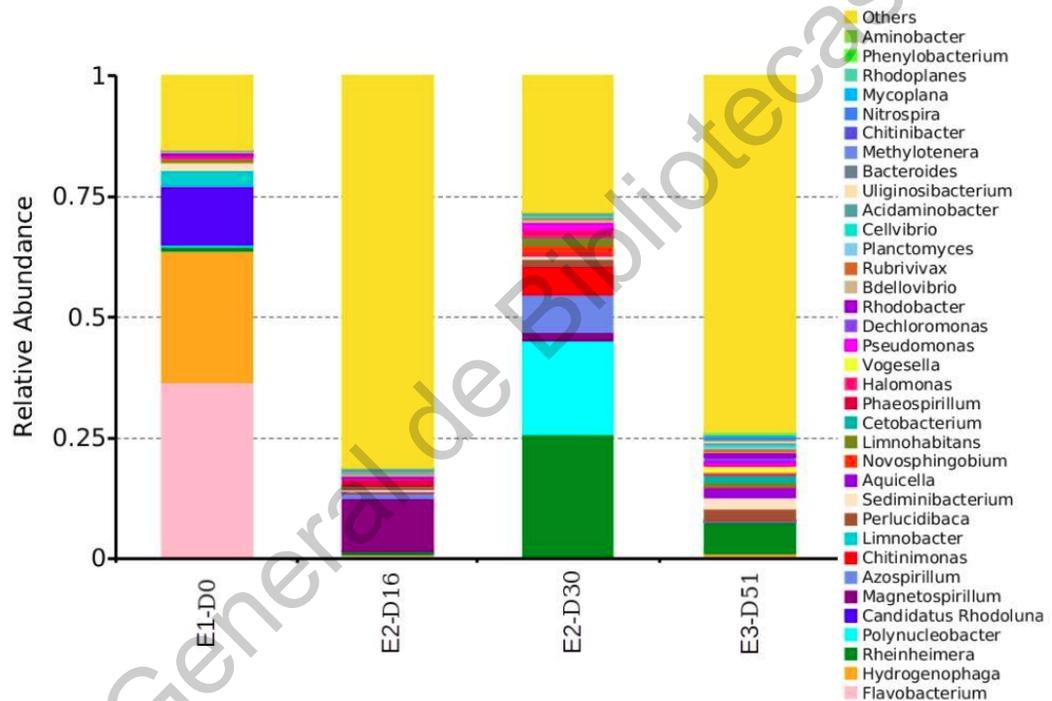
En cuanto al total de secuencias taxonómicas anotadas fueron 5 filos eucariontes en total que están presentes en la etapa inicial del sistema y es el phylum *Ascomycota* el más abundante con 41% de la población. En esta porción de la comunidad microbiana se observa un comportamiento semejante a la porción procarionta en cuanto a que en las etapas E2-D16 y E2-D30 las poblaciones microbianas son muy parecidas entre ellas; en estas fueron anotadas 6 y 7 phylum respectivamente dominando *Otros* con 72% y 92% respectivamente seguidas de *Ascomycota* y un phylum *no identificado*. En el caso de E2-D16 el phylum *Chytridiomycota* se presenta con un 2.6% de abundancia. Finalmente en la etapa E3-D51 que es la de acuaponía los filos dominantes cambiaron drásticamente y el dominante fue *Ascomycota* con 96.69% de abundancia y *Otros* con 2.79%. Los filos *Ascomycota* y *Basidiomycota* se encontraron en todas las etapas del desarrollo del ciclo acuapónico y en un gran porcentaje de abundancia; además de *Cercozoa*, hongos no identificados y *Chytridiomycota* que se encontraron en tres y dos etapas, respectivamente. Como se observa en la porción procarionte con *Proteobacterias* y *Bacteroidetes*, en la porción eucarionte el phylum *Ascomycota* y el no identificado mostraron una relación en donde al aumentar *Ascomycota*, el no identificado disminuyó o viceversa (Figura 16).



**Figura 16: Abundancias relativas de los filos eucariontas encontrados en las cuatro etapas del desarrollo del sistema acuapónico.**

La composición taxonómica de la comunidad microbiana a nivel de género en su porción procariótica y eucarionta se muestra en la Figura 14 y 15. Se muestran los géneros más representativos por abundancia relativa en todas las etapas del ciclo acuapónico, y la representación de géneros de menor abundancia relativa se muestra como *Otros*. La porción procariótica mostró un patrón heterogéneo en los géneros *Otros* a través de las etapas acuapónicas (Figura 17). En la segunda (E2-D16) y la última etapa acuapónica (E3-D51), los *Otros* tuvieron una representatividad  $>73.78\%$ , mientras que en la primera (E1-D0) y la tercera etapa (E2-D30) su abundancia fue  $<28.11\%$ . Los géneros identificados *Flavobacterium*, *Hydrogenophaga*, *Rheinheimera*, *Polinucleobacter*, *Candidatus Rhodoluna*, *Sediminibacterium*, *Limnobacter*, *Halomonas*, *Rhodobacter* y *Chitinibacter* fueron los más abundantes en la primera etapa acuapónica (E1-D0) en el orden mencionado. En la segunda etapa acuapónica (E2-D16) algunos géneros como *Flavobacterium*, *Hydrogenophaga*, *Rheinheimera*, *Sediminibacterium* y *Halomonas* disminuyeron su abundancia pero se mantuvieron entre los más abundantes, mientras que *Magnetospirillum*, *Azospirillum*, *Phaeospirillum*, *Limnohabitans* y *Bdellovibrio*

aparecieron como un abundante género. En la tercera etapa (E2-D30), las abundancias volvieron a cambiar y *Rheinheimera*, *Polynucleobacter*, *Azospirillum*, *Magnetospirillum*, *Limnohabitans* y *Halomonas* se mantuvieron abundantes y aparecieron *Chitinimonas*, *Perlucidibaca*, *Novosphingobium* y *Pseudomonas*. Finalmente, en la última etapa (E3-D51), los géneros *Rheinheimera*, *Perlucidibaca* y *Sediminibacterium* se mantuvieron abundantes y *Aquicella*, *Cetobacterium*, *Vogesella*, *Dechloromonas* y *Rhodobacter* aparecieron como abundantes.



**Figura 17: Abundancias relativas de los géneros procarionta encontrados en las cuatro etapas del desarrollo del sistema acuapónico.**

Mientras tanto, en la porción eucarionta (Figura 18), se encontró que los géneros agrupados en *Otros* tienen abundancias relativas importantes en todas las etapas, desde el 39,94% en la primera etapa (E1-D0) y aumentaron en las siguientes etapas hasta el 97,07% en la última etapa (E3-D51). Después de los *Otros*, los géneros más abundantes en la primera etapa acuapónica (E1-D0) fueron *Epicoccum*, no identificado-no identificado, *Sporobolomyces*, *Cochliolobus*, *Alternaria*, *Phoma*, *Rhodospiridium*, *Monographela*, *Catenaria* y *Rhodotorula*, seis géneros no identificados, *Penioporaceae*-Unidentified,



encontrar la presencia de géneros de estas bacterias en sistemas acuáticos tanto naturales como en los hechos por el hombre aunque en abundancias muy bajas debido a su sensibilidad ante la presencia del oxígeno. Debido a la necesidad de una buena oxigenación en los biofiltros, estas bacterias no tienen una abundancia mayor, sin embargo siempre habrá nichos ambientales bajos en oxígeno que permitan su desarrollo. En el caso de *Planctomyces* sp. Es una bacteria comúnmente encontrada en el tracto intestinal de los peces y otros organismos acuáticos.

Pero algunas especies detectadas en este trabajo presentan procesos metabólicos que pueden ser relevantes para el desarrollo de sistemas acuapónicos, por ejemplo, con fijación de nitrógeno (*Agrobacterium* sp., *Pleomorphonas* y *Rhodobacter* sp.) (Luque-Almagro *et al.*, 2011, Spang *et al.*, 2012); desnitrificación (*Azospirillum* sp., *Hyphomicrobium* sp., *Paracoccus* sp., *Rhodobacter* sp., *Hydrogenophaga* sp., *Methylotenera* sp., *Rhodanobacter* sp.) (Luque-Almagro *et al.*, 2011, Holmet *et al.*, 1996, Willems *et al.*, 1989, Kalyuzhnaya *et al.*, 2006, Kalyuzhnaya *et al.*, 2012, Kostka *et al.*, 2012); nitrificación y metabolismo del azufre (*Desulfovibrio putealis*, *Thiocapsa* sp., *Thiobacatruerperi*, *Thiobaca trueperi*, *Fusibacter* sp., *Pirellula* sp.) (Suzuki *et al.*, 2010, Gitelson *et al.*, 1999, Mori *et al.*, 2010, Hania *et al.*, 2012, Glöckner *et al.*, 2003).

La diversidad microbiana relacionada con la nitrificación, uno de los procesos más importantes en los sistemas acuapónicos encontrados en este trabajo fue *Candidatus Nitrososphaera*, *Nitrospira* sp. y *Nitrosomonas ureae*, una arquea oxidante de amoníaco, bacterias oxidantes de nitritos y bacterias oxidantes de amoníaco, respectivamente (Spang *et al.*, 2012, Burton *et al.*, 2001, Schreier *et al.*, 2010). El género *Candidatus Nitrososphaera* apareció en E2-D30, *Nitrospira* sp. apareció en E2-D16 y E3-D51 y *Nitrosomonas urea* en la etapa E2-D16. Estos géneros aparecieron en la activación del biofiltro (E2) y en las etapas acuapónicas (E3), pero en una abundancia relativa menor del 0,0074 %, 0,134% y 0,014 %, respectivamente. Es posible que *Nitrosomonas ureae* esté relacionada con renacuajos de rana toro, ya que durante la metamorfosis los renacuajos cambian su metabolismo de amoniotélicos a ureotélicos, lo que aumenta la concentración de urea en el agua. Otras bacterias fueron *Gemmata* y *Planctomyces* con un metabolismo de oxidación anaeróbico de amonio (ANNAMOX) (Brümmer *et al.*, 2004, Strous *et al.*, 2006)

que aparecieron en una abundancia relativa baja pero en todos los estadios acuapónicos (0.023% en E1-D0, 0.009% en E2-D16, 0.082% en E2-D30 y 0.003% en E3-D51 para *Gemmata* y 0.021% en E1-D0, 0.060% en E2-D16, 0.493% en E2-D30 y 0.051% en E3-D51 para *Planctomyces*), excepto *Planctomyces* que apareció en mayor abundancia relativa en E2-D30.

Otras especies, importantes debido a la patogenicidad para los seres humanos, las plantas y las especies acuáticas también se identificaron en el sistema acuapónico en este trabajo; sin embargo, no se mostró evidencia de patogenicidad ni en los animales ni en las plantas acuáticas. Algunas de estas especies presentan características metabólicas específicas, es decir, magnetotaxis (*Magnetospirillum* sp.) (Bazylnski *et al.*, 2000); oxidación de manganeso (*Pedomicrobium* sp.) (Ridge *et al.*, 2007), actividad de ADNasa y lipasa (*Silanimonas mangrovi*) (Srinivas *et al.*, 2013); metabolitos anticancerígenos (*Salinispora* sp.); actividad quitinolítica (*Chitinibacter tainanensis*, *Chitinilyticum litopenaei*, *Chitinimonas taiwanensis*, *Chitinophaga* sp., *Serratia marcescens*) (Chern y otros, 2004, Chang y otros, 2009, Shu-Chen y otros, 2004, Sangkhobol y Skerman 1981, Hejjil *et al.*, 1997, Watanabe *et al.*, 1990); actividad celulolítica como *Enhydrobacter* sp., *Cellvibrio* sp., *Cellulomonas* sp. (Elberson *et al.*, 2000, Premalatha *et al.*, 2015) y la actividad de degradación de contaminantes en *Pseudomonas alcaligenes*, *Oleibacter* sp., *Rhodanobacter* sp., *Shewanella* sp., *Phenylobacterium* sp., *Sphingomonas wittichii*, *Leadbetterella byssophila*, *Dechloromonas* sp., *Rubrivivax* sp. y *Exiguobacterium* sp. (Focht y Shelton 1987, Gerritse *et al.*, 1998, Teramoto *et al.*, 2011, Kostka *et al.*, 2012, Gram y Dalgaard 2002, Heildelberg *et al.*, 2002, Eberspächer and Lingens 2006, Miller *et al.*, 2010, Abt *et al.*, 2015, Coates *et al.* 2001, McIlroy *et al.*, 2016, Scheuring *et al.*, 2001, Vishnivetskaya *et al.*, 2009).

Es muy común encontrarnos con el hecho de que el agua en los sistemas acuapónicos suele tomar una coloración ámbar cristalina, el agua de los sistemas acuapónicos en este trabajo no fue la excepción y tomó una coloración ámbar característica, después de algunas semanas de iniciar el sistema. Se reconocieron algunos géneros en este trabajo que pudieron contribuir con este fenómeno debido a su producción de compuestos con coloraciones como amarillo, rojo, rosa, naranja, marfil, marrón y rojo debido a sus pigmentos naturales

como el licopeno, carotenoides, entre otros. Los géneros identificados en este trabajo que expresan compuestos de pigmentación fueron: *Cloacibacterium*, *Deefgea*, *Deinococcus*, *Dietzia*, *Euzebya*, *Fimbrimonas*, *Flavihumibacter*, *Flavobacterium*, *Flectobacillus*, *Rigociva*, y otras bacterias. Estos resultados sugieren que la coloración particular en el agua del sistema acuapónico podría deberse a los pigmentos producidos por estas especies.

**Tabla 11: Procesos biológicos asociados a los géneros o especies bacterianas presentes en el sistema acuapónico y las etapas en las que se encuentran presentes (P) y no presentes (NP).**

Proceso Biológico	Filo, género/especie	E1	E2	E3	E4
Fijación de N <sub>2</sub> N <sub>2</sub> → NH <sub>4</sub>	<i>α-proteobacteria</i> , <i>Agrobacterium</i> sp.	P	P	P	P
	<i>α-proteobacteria</i> , <i>Pleomorphonas</i> sp.	NP	P	NP	P
	<i>α-proteobacteria</i> , <i>Rhodanobacter</i> sp.	P	P	P	P
Oxidación de Amonio NH <sub>4</sub> → NO <sub>2</sub>	<i>Crenarchaeota</i> , <i>Candidatus Nitrososphaera</i> (AOA)	NP	P	NP	NP
	<i>β-proteobacteria</i> , <i>Nitrosomonas ureae</i> (AOB)	NP	P	NP	NP
	<i>Planctomycetes</i> , <i>Gemmata</i> sp. (ANNAMOX)	P	P	P	P
	<i>Planctomycetes</i> , <i>Planctomyces</i> sp. (ANNAMOX)	P	P	P	P
	<i>α-proteobacteria</i> , <i>Paracoccus</i> sp. (nitrificación heterotrófica)	P	P	P	P
Oxidación del Nitrito NO <sub>2</sub> → NO <sub>3</sub>	<i>Nitrospirae</i> , <i>Nitrospira</i> sp. (NOB)	NP	P	P	P
Denitrificación (Reducción del Nitrato) NO <sub>3</sub> → N <sub>2</sub>	<i>α-proteobacteria</i> , <i>Azospirillum</i> sp.	P	P	P	P
	<i>α-proteobacteria</i> , <i>Hyphomicrobium</i> sp.	P	P	P	P
	<i>β-proteobacteria</i> , <i>Paracoccus</i> sp.	P	P	P	P
	<i>α-proteobacteria</i> , <i>Rhodobacter</i> sp.	P	P	P	P
	<i>β-proteobacteria</i> , <i>Hydrogenophaga</i> sp.	P	P	P	P
	<i>β-proteobacteria</i> , <i>Methylotenera</i> sp.	NP	P	P	P
<i>γ-proteobacteria</i> , <i>Rhodanobacter</i> sp.	NP	P	P	P	
Reducción del Nitrato NO <sub>3</sub> → NO <sub>2</sub>	<i>Actinobacteria</i> , <i>Dietzia</i> sp.	NP	NP	P	P
	<i>Actinobacteria</i> , <i>Nesterenkonia</i> sp. <i>α-proteobacteria</i> , <i>Aquaspirillum serpens</i>	P NP	NP P	P NP	P NP

	<i>Verrucomicrobia, Opitutus sp.</i>	NP	P	P	P
Actividad Quitinolítica	$\beta$ -proteobacteria, <i>Chitinibacter tainanensis</i>	P	NP	NP	NP
	$\beta$ -proteobacteria, <i>Chitinilyticum litopenai</i>	P	NP	P	P
	$\beta$ -proteobacteria, <i>Chitinimonas taiwanensis</i>	NP	P	P	P
	$\beta$ -proteobacteria, <i>Chitinophaga sp.</i>	NP	NP	NP	P
	$\gamma$ -proteobacteria, <i>Serratia marcescens</i>	NP	NP	P	P
Actividad Celulolítica	$\gamma$ -proteobacteria, <i>Enhydrobacter sp.</i>	P	NP	P	P
	$\gamma$ -proteobacteria, <i>Cellvibrio sp.</i>	P	P	P	P
	Actinobacteria <i>Cellulomonas sp.</i>	NP	NP	NP	P
Azufre	$\delta$ -proteobacteria, <i>Desulfovibrio putealis</i> (Sulfure Reduction Bacteria, SRB)	NP	P	P	P
	$\gamma$ -proteobacteria, <i>Thiocapsa sp.</i> (SRB)	P	NP	NP	P
	$\gamma$ -proteobacteria, <i>Thiobaca trupuen</i> (SRB)	P	NP	NP	P
	Firmicutes, <i>Fusibacter sp.</i>	NP	P	NP	P
	Planctomycetes, <i>Pirellula sp.</i>	NP	P	P	P
Metilótrofo CH <sub>3</sub> -R	$\alpha$ -proteobacteria, <i>Hyphomicrobium sp.</i>	P	P	P	P
	$\beta$ -proteobacteria, <i>Methylotenera sp.</i>	NP	P	P	P
Formación de Hidrógeno	Firmicutes, <i>Acidaminobacter sp.</i>	NP	P	P	P
Oxidación del Hidrógeno	<i>Verrucomicrobia, Opitutus sp.</i>	NP	P	P	P
	$\beta$ -proteobacteria, <i>Hydrogenophaga sp.</i>	P	P	P	P
Patógenos oportunistas	<i>Bacteroidetes, Flavobacterium columnare</i> (oportunista en animales acuáticos)	P	P	P	P
	<i>Bacteroidetes, Flovobacterium succinicans</i> (oportunista en animales acuáticos)	P	P	P	P
	Actinobacteria, <i>Gordonia sp.</i> (oportunista en humanos)	NP	NP	NP	P
	$\beta$ -proteobacteria, <i>Ralstonia sp.</i> (oportunista en plantas)	P	P	P	P
	$\gamma$ -proteobacteria, <i>Pseudomonas spp.</i> (oportunista en animales, plantas y humanos)	P	P	P	P
	$\gamma$ -proteobacteria, <i>Serratia marcescens</i> (oportunista en humanos)	NP	NP	P	P
Control Biológico	$\delta$ -proteobacteria, <i>Bdellovibrio bacteriuovorus</i>	P	P	P	P
	$\delta$ -proteobacteria, <i>Plecyocystis</i>	NP	NP	NP	P
Degradación de	Actinobacteria <i>Gordinia sp.</i>	NP	P	P	P

contaminantes				
<i>α-proteobacteria, Aminobacter</i> sp.	P	P	P	P
<i>α-proteobacteria, Phenyllobacterium</i> sp.	NP	P	P	P
<i>α-proteobacteria, Novosphingobium</i> sp.	P	P	P	P
<i>α-proteobacteria, Sphingomonas wittichii</i>	P	P	P	P
<i>Bacteroidetes, Leadbetterella byssophila</i>	P	NP	NP	NP
<i>β-proteobacteria, Dechloromonas</i> sp.	P	P	P	P
<i>β-proteobacteria, Rubrivivax</i> sp.	P	P	P	P
<i>γ-proteobacteria, Pseudomonas alcaligenes</i>	P	P	P	P
<i>γ-proteobacteria, Oleibacter</i> sp.	NP	P	P	P
<i>γ-proteobacteria, Rhodanobacter</i> sp.	NP	NP	NP	P
<i>γ-proteobacteria, Shewanella</i> sp.	NP	P	P	P

## VII. Conclusiones

Dado que solamente tres géneros (*Candidatus Nitrososphaera*, *Nitrospira* sp. y *Nitrosomona ureae*) de un conjunto de 64 elementos fueron encontrados como microorganismos nitrificantes con baja abundancia relativa, consideramos que la hipótesis es falsa. Por lo tanto, el sistema en el cual crecieron los renacuajos y las plantas no es acuapónico, ya que lo que define este tipo de sistemas es la nitrificación.

La comunidad microbiana de los sistemas evaluados estuvo dominada por procariontas. La proporción de procariontas/eucariontas aumentó con el tiempo. Los procariontas más abundantes en el sistema acuapónico se reportan con un metabolismo heterotrófico. Otras bacterias presentan metabolismo del azufre, quitinolítico, celulolítico y otras características metabólicas particulares, muchas de ellas con importancia biotecnológica.

## VIII. Bibliografía

- Alatorre, J. O. 2014. *Diseño de un sistema acuapónico autónomo*. Tesis doctoral. Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de Querétaro.
- Bai, Yu, Zhang, Jie, Li, Yi-fan, Gao, Yu-nan, & Li, Yong. 2005. Biomass and microbial activity in a biofilter during backwashing. *Journal of zhejiang university. Science. b*, **6** (5), 427.
- Beddington, Sir John. 2011. The future of food and farming. *International journal of agricultural management*, **1**(2), 2–6.
- Bonilla-Rosso, G. 2012. *Análisis de patrones de diversidad taxonómica y funcional en bases de datos metagenómicos*. Tesis Doctoral. UNAM.
- Bonilla-Rosso, G., Eguiarte, L. E., & Souza, V. 2008. Metagenómica, genómica y ecología molecular: La nueva ecología en el bicentenario de Darwin. *Tip revista especializada en ciencias químico-biológicas*, **11**(1), 41–51.
- Bonilla-Rosso, G., Eguiarte, L. E., Romero, D. R., Travisano, M., & Souza, V. 2012. Understanding microbial community diversity: use of simulated datasets to evaluate the performance of diversity metrics derived from metagenomes. *Fems Microbiology Ecology*, **82**(1), 37–49.
- Buzby, Karen M, & Lin, Lian-Shin. 2014. Scaling aquaponic systems: Balancing plant uptake with fish output. *Aquacultural engineering*, **63**, 39–44.
- Diver, S. 2006. *Aquaponics, integration of hydroponics with aquaculture*. National Sustainable Agriculture Information Service. pp. 1.
- Eck, Matilde. 2017. Taxonomic characterisation of bacteria communities from water of diversified aquaponic systems. Tesis de Maestría en Ciencias Agronómicas. Liège Université.
- Fox, Bradley K, Tamaru, Clyde S, Hollyer, James, Castro, Luisa F, Fonseca, Jorge M, Jay-Russell, Michele, & Low, Todd. 2012. A preliminary study of microbial water quality related to food safety in recirculating aquaponic fish and vegetable production systems. *College of tropical agriculture and human resources, university of hawaii at manoa. Food safety and technology*.

- Gilbert, J. A., Steele, J. A., & *et al.*, J. G. Caporaso. 2012. Defining seasonal marine microbial community dynamics. *Isme journal*, **6**(2), 1433–1453.
- Gilbert, Jack, & Dupont, Christopher L. 2011. Microbial metagenomics: Beyond the genome. *Annual review of marine science*, **3**, 347–371.
- Greenfeld, A., Becker, N., McIlwain, J., Fotedar, R., & Bornman, J. F. (2019). Economically viable aquaponics? Identifying the gap between potential and current uncertainties. *Reviews in Aquaculture*, **11**(3), 848-862.
- Handelsman J. 2004. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol. molec. biol. rev.*, **68**(4), 669–685.
- Hu, Zhen, Lee, Jae Woo, Chandran, Kartik, Kim, Sungpyo, Brotto, Ariane Coelho, & Khanal, Samir Kumar. 2015. Effect of plant species on nitrogen recovery in aquaponics. *Bioresource technology*, **188**, 92–98.
- Itoi, S., Niki, A., & Sugita, H. 2006. Changes in microbial communities associated with the conditioning of filter material in recirculating aquaculture systems of the puffer fish *Takifugurubripes*. *Aquaculture*, **256**, 287–295.
- Itoi, S., Ebihara, N., Washio, S., & Sugita, H. 2007. Nitrite-oxidizing bacteria, *Nitrospira*, distribution in the outer layer of the biofilm from filter materials of a recirculating water systems for the goldfish *Carassius auratus*. *Aquaculture*, **264**, 297–308.
- Jones, Scott. 2002. Evolution of aquaponics. *International journal of agricultural management*, **VI** (1), 14–17.
- Joo, H. S., Hirai, M., & Shoda, M. 2005. Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **100**(4), 184–191.
- Jun, Y., & Wenfeng, X. 2009. Ammonia biofiltration and community analysis of ammonia-oxidizing bacteria in biofilters. *Bioresource technology*, **100**(17), 3869–3876.
- Kemp, Paul F, & Aller, Josephine Y. 2004. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16s rDNA libraries can tell us. *Fems microbiology ecology*, **47**(2), 161–177.

- Klemencic, A Krivograd, & Bulc, T Griessler. 2015. The use of vertical constructed wetland and ultrasound in aquaponic systems. *Environmental science and pollution research*, **22**(2), 1420–1430.
- Knight, Rob, Jansson, Janet, Field, Dawn, Fierer, Noah, Desai, Narayan, Fuhrman, Jed A, Hugenholtz, Phil, Van Der Lelie, Daniel, Meyer, Folker, Stevens, Rick, *et al.* . 2012. Unlocking the potential of metagenomics through replicated experimental design. *Nature biotechnology*, **30**(6), 513–520.
- Konopka, Allan. 2009. What is microbial community ecology? *The isme journal*, **3**(11), 1223–1230.
- Kumar, P. S., Brooker, M. R., Dowd, S. E., & Camerlengo, T. 2011. Traget region selection is a critical determinant of community fingerprints generated by 16s pyrosequencing. *Plos one.*, **6** (6).
- Leonard, N, Blancheton, JP, & Guiraud, JP. 2000. Populations of heterotrophic bacteria in an experimental recirculating aquaculture system. *Aquacultural engineering*, **22**(1), 109–120.
- Lewis, William M, Yopp, John H, Schramm Jr, Harold L, & Brandenburg, Alan M. 1978. Use of hydroponics to maintain quality of recirculated water in a fish culture system. *Transactions of the American fisheries society*, **107**(1), 92–99.
- López, T, Dominguez, L, & García, J. 2007. *Arreglo estructural de un consorcio microbiano de interés alimentario en la producción del vinagre*. Trabajo presentado en el octavo Congreso Nacional de Microscopía, Octubre, México.
- Love, David C., Fry, Jillian P., Li, Ximin, Hill, Elizabeth S., Genello, Laura, Semmens, Ken, & Thompson, Richard E. 2015. Commercial aquaponics production and profitability: Findings from an international survey. *Aquaculture*, **435**, 67 – 74.
- Martins, CIM, Eding, EH, Verdegem, MCJ, Heinsbroek, LTN, Schneider, O, Blancheton, Jean-Paul, d’Orbcastel, E Roque, & Verreth, JAJ. 2010. New developments in recirculating aquaculture systems in europe: A perspective on environmental sustainability. *Aquacultural engineering*, **43**(3), 83–93.
- Martins, P., Cleary, D. F., Pires, A. C., Rodrigues, A. M., Quintino, V., Calado, R., & Gomes, N. C. 2013. Molecular analysis of bacterial communities and detection of

- potential pathogens in a recirculating aquaculture system for *scophthalmus maximus* and *solea senegalensis*. *Plos one*, **8**.
- Michaud, Luigi, Blancheton, Jean-Paul, Bruni, V, & Piedrahita, Raul. 2006. Effect of particulate organic carbon on heterotrophic bacterial populations and nitrification efficiency in biological filters. *Aquacultural engineering*, **34** (3), 224–233.
- Munguia-Fragozo Perla, Alatorre-Jacome Oscar, Rico-Garcia Enrique, Torres-Pacheco Irineo, Cruz-Hernandez Andres, Ocampo-Velazquez Rosalia V, Garcia-Trejo Juan F & Guevara-Gonzalez Ramon G. 2015. Perspective for aquaponic systems: “omic” technologies for microbial community analysis. *Biomed research international*, **2015**.
- Muyzer, Gerard. 1999. Dgge/tgge a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current opinion in microbiology*, **2**(3), 317–322.
- Naegel, L. C. A. 1977. Combined production of fish and plants in a recirculating system. *Aquaculture.*, **10**(1), 17–24.
- Nikolaki, Sofia, & Tsiamis, George. 2013. Microbial diversity in the era of omic technologies. *Biomed research international*, **2013**.
- Padhi, S. K., Tritathy, S., Sen, R., Mahapatra, A. S., Mohanty, S., & Maiti, N. K. 2013. Characterization of heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying *Klebsiella pneumoniae* cf-s9 strain for bioremediation of wastewater. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **78**, 67–73.
- Parthasarathy, Hemai, Hill, Emma, & MacCallum, Catriona. 2007. Global ocean sampling collection. *Plos biology*, **5**(3), e83.
- Rakocy, J. E., Masser, M. P., & Losordo, T. M. 2006. Recirculating aquaculture tank production systems: Aquaponics, integrating fish and plant culture. *Srac publication*, **454**, 1–16.
- Revsbech, N. P., Risgaard-Petersen, N., A, Schramm, & Nielsen, L. P. 2006. Nitrogen transformation in stratified aquatic microbial ecosystems. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **90**, 361–375.
- Rodríguez-Valera, Francisco. 2004. Environmental genomics, the big picture? *Fems microbiology letters*, **231**(2), 153–158.

- Rurangwa, Eugene, & Verdegem, Marc CJ. 2015. Microorganisms in recirculating aquaculture systems and their management. *Reviews in aquaculture*, **7**(2), 117–130.
- Schloss, Patrick D, & Handelsman, Jo. 2003. Biotechnological prospects from metagenomics. *Current opinion in biotechnology*, **14**(3), 303 – 310.
- Schmautz, Z., Graber, A., Jaenicke, S., Goesmann, A., Junge, R., & Smits, T. H. (2017). Microbial diversity in different compartments of an aquaponics system. *Archives of microbiology*, **199** (4), 613-620.
- Schneider, Oliver, Chabrilion-Popelka, Mariana, Smidt, Hauke, Haenen, Olga, Sereti, Vasiliki, Eding, Ep H, & Verreth, Johan AJ. 2007. Hrt and nutrients affect bacterial communities grown on recirculation aquaculture system effluents. *Fems microbiology ecology*, **60**(2), 207–219.
- Schreier, H. J., Mirzoyan, N., & Saito, K. 2010. Microbial diversity of biological filters in recirculating aquaculture systems. *Current Opinion in Biotechnology*, **21**, 318–325.
- Shete, AP, Verma, AK, Tandel, RS, Prakash, Chandra, Tiwari, VK, & Hussain, Tanveer. 2013. Optimization of water circulation period for the culture of goldfish with spinach in aquaponic system. *Journal of agricultural science*, **5**(4), 26.
- Sirsat, Sujata A, & Neal, Jack A. 2013. Microbial profile of soil-free versus in-soil grown lettuce and intervention methodologies to combat pathogen surrogates and spoilage microorganisms on lettuce. *Foods*, **2**(4), 488–498.
- Somerville, C, Cohen, M, Pantanella, E, Stankus, A, & Lovatelli, A. 2014. *Small-scale aquaponic food production. integrated fish and plant farming*. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 589. Rome, FAO. 262 pp.
- Sugita, H., Nakamura, H., & Shimada, P. 2005. Microbial communities associated with filter materials in recirculating aquaculture systems of freshwater fish. *Aquaculture*, **243**, 403–409.
- Tal, Yossi, Watts, Joy EM, & Schreier, Harold J. 2006. Anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria and associated activity in fixed-film biofilters of a marine recirculating aquaculture system. *Applied and environmental microbiology*, **72**(4), 2896–2904.

- Timmons, M. B., Ebeling, J. M., Wheaton, F. W., Summerfelt, S. T., & Vinci, J. B. 2002. *Recirculating aquaculture systems*. 2 edn. NRAC Publication.
- Tokuyama, Tatsuaki, Mine, Atsusi, Kamiyama, Kaoru, Yabe, Ryuichi, Satoh, Kazuo, Matsumoto, Hirotohi, Takahashi, Reiji, & Itonaga, Koji. 2004. *Nitrosomonas communis* strain ynsra, an ammonia-oxidizing bacterium, isolated from the reed rhizoplane in an aquaponics plant. *Journal of bioscience and bioengineering*, **98** (4), 309–312.
- Tyson, Richard V, Treadwell, Danielle D, & Simonne, Eric H. 2011. Opportunities and challenges to sustainability in aquaponic systems. *Horttechnology*, **21**(1), 6–13.
- Van Rijn, Jaap, Tal, Yossi, & Schreier, Harold J. 2006. Denitrification in recirculating systems: theory and applications. *Aquacultural engineering*, **34**(3), 364–376.
- Venter, J Craig, Remington, Karin, Heidelberg, John F, Halpern, Aaron L, Rusch, Doug, Eisen, Jonathan A, Wu, Dongying, Paulsen, Ian, Nelson, Karen E, Nelson, William, *et al.* . 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the sargasso sea. *science*, **304**(5667), 66–74.
- Wagner, Michael, Horn, Matthias, & Daims, Holger. 2003. Fluorescence in situ hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes. *Current opinion in microbiology*, **6** (3), 302–309.
- Whitman, William B., Coleman, David C., & Wiebe, William J. 1998. Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the national academy of sciences*, **95**(12), 6578–6583.
- Xiang, Hong, Lu, Xiwu, Yin, Lihong, Yang, Fei, Zhu, Guangcan, & Liu, Wuping. 2013. Microbial community characterization, activity analysis and purifying efficiency in a biofilter process. *Journal of environmental sciences*, **25**(4), 677–687.
- Yong-Xiang, R., Yang, L., & Liang, X. 2014. The characteristics of a novel heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium, *Acinetobacter junii* yb. *Journal of Bioresource Technology*, **171**, 1–9.
- Yusoff, Fatimah Md, Banerjee, Sanjoy, Khatoon, Helena, & Shariff, Mohamed. 2011. Biological approaches in management of nitrogenous compounds in aquaculture systems. *Dyn biochemprocess biotech mol biol*, **5**, 21–31.