



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
METROPOLITANA**  
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

INFORME DEL SERVICIO SOCIAL PARA LA LICENCIATURA DE QUÍMICO  
FARMACÉUTICO BIÓLOGO

---

**“ANÁLISIS MOLECULAR DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS CONTENIDAS EN LA RIZOSFERA, LA BIOPELÍCULA Y EL AGUA DE UN SISTEMA DE RECIRCULACIÓN ACUAPÓNICO PARA EL CULTIVO DE LECHUGA (*Lactuca sativa* L.) Y PEZ JAPONÉS (*Carassius auratus*).”**

---

**PERTENECE AL PROYECTO GENÉRICO:** “Obtención de materias primas, principios activos, medicamentos y productos biológicos”

**PRESENTA:** VANESSA ESPINOSA BUSTOS  
NÚMERO DE MATRÍCULA: 209327752

**ASESORES:**

M. EN C. PATRICIA MARTINEZ CRUZ. DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS, CBS, UAM XOCHIMILCO.

DR. JOSÉ FÉLIX AGUIRRE GARRIDO. DEPARTAMENTO DE CIENCIAS AMBIENTALES, CBS, UAM LERMA.

**LUGAR DE REALIZACIÓN:** Laboratorio de Biotecnología, CBS, UAM-X y CIBAC, CDMX.

**FECHA DE INICIO Y TÉRMINO:** 01 de diciembre de 2014 al 01 de marzo de 2015.

## ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
1.1	ACUICULTURA	4
1.2	HIDROPONÍA	5
1.3	ACUAPONÍA	6
1.4	CALIDAD DEL AGUA	9
1.4.1	pH	9
1.4.2	TEMPERATURA	10
1.4.3	SOLIDOS DISUELTOS TOTALES EN AGUA	10
1.5	COMUNIDADES BACTERIANAS	10
1.6	PEZ JAPONÉS ( <i>Carassius auratus</i> )	13
1.7	LECHUGA ( <i>Lactuca sativa</i> )	14
1.8	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR	14
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>16</b>
2.1	Objetivo general:	16
2.2	Objetivos específicos:	16
<b>3</b>	<b>METODOLOGÍA</b>	<b>17</b>
3.1	SISTEMAS DE RECIRCULACIÓN	17
3.2	PECES	18
3.3	LECHUGA	18
3.4	ANÁLISIS	19
3.4.1	Evaluación del agua	19
3.4.2	Parámetros fisicoquímicos del agua	19
3.4.3	Calidad de agua (Compuestos nitrogenados)	19
3.4.4	Evaluación del crecimiento de los peces	19
3.4.5	Evaluación del crecimiento de las lechugas	19
3.4.6	Caracterización microbiológica de la rizosfera	20
3.4.7	Muestreo de biopelícula	20
3.5	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	21
3.5.1	Aislamiento de las bacterias nitrificantes, amonificadoras y desnitrificantes	21
3.5.2	Análisis metagenómico	22
<b>4</b>	<b>ACTIVIDADES REALIZADAS</b>	<b>23</b>
<b>5</b>	<b>METAS ALCANZADAS</b>	<b>23</b>
<b>6</b>	<b>RESULTADOS Y CONCLUSIONES</b>	<b>23</b>
6.1	Resultados	23
6.1.1	Evaluación morfométrica	23

6.1.2	Parámetros fisicoquímicos .....	25
6.1.3	Calidad del agua (Compuestos nitrogenados).....	26
6.1.4	Análisis microbiológico. ....	28
6.2	Conclusiones.....	41
6.2.1	Crecimiento de la lechuga y pez .....	41
6.2.2	Calidad del agua y correlación con bacterias del ciclo del nitrógeno .....	41
6.2.3	Determinación de la estructura de las comunidades bacterianas .....	41
<b>7</b>	<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>42</b>
<b>8</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>43</b>
<b>9</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>46</b>
9.1	ANEXO I: CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS NITROGENADOS.....	46
9.2	ANEXO II: EXTRACCIÓN DE DNA CON EL MÉTODO MODIFICADO DE PROMEGA .....	50
9.3	ANEXO III. EXTRACCIÓN DE DNA POR EL MÉTODO FENOL/CLOROFORMO.....	51
9.4	ANEXO IV: ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 1% y 1.5%.....	52
9.5	ANEXO V: AMPLIFICACIÓN POR PCR.....	53
9.6	ANEXO VI: PREPARACIÓN DE ELECTROFORESIS EN GEL CON GRADIENTE DESNATURALIZANTE. (DGGE) .....	54
9.7	ANEXO VII. EVALUACIÓN MORFOMÉTRICA DE LA LECHUGA .....	57
9.8	ANEXO VIII. PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS DEL AGUA. ....	58
9.9	ANEXO IX. CONCENTRACIÓN DE COMPUESTOS NITROGENADOS EN EL AGUA. ....	59

## 1 INTRODUCCIÓN

La acuicultura, según la FAO (2020), es una técnica para criar e incrementar la producción de organismos acuáticos en zonas costeras como en zonas céntricas. El cultivo de organismos acuáticos a gran escala es un suceso relativamente reciente, aunque, a pequeña escala, esta actividad ha existido desde tiempos antiguos en varios países. Rabanal (1998) señala que al menos existen 4 teorías para explicar los inicios de la acuicultura; desde la teoría del meandro conocida por los ríos y arroyos naturales que por el flujo del agua, debido a la topografía natural y fisiografía del área, se van formando curvas y meandros de diferentes tamaños y a medida que pasaban las estaciones del año la población que vivía cerca de los ríos descubrieron que podían obtener cosecha de peces debido a que con las lluvias se reabastecía el río y en temporada seca se recolectaban los peces, como en Asia; y hasta en Europa, donde los reyes exigían que sus castillos estuviera rodeada de agua como medio de defensa y adicional, se colocaron peces para alimentar a los gobernantes en periodos de invierno, por lo que los peces fueron criados y alimentados, y a su vez hubo una mayor producción de peces por lo que la población empezó a criar Tilapia para consumo humano.

La producción mundial de peces, crustáceos, moluscos y otros animales acuáticos ha alcanzado unos 179 millones de toneladas en el 2018 de los cuales 82 millones de toneladas procedieron de la producción acuícola, alcanzando el 46% de la producción, frente al 25.7% en 2000. La acuicultura representó el 17.9% de la producción pesquera total de África, el 17.0% de Europa, el 15.7% de América y el 12.7% de Oceanía. (FAO, 2020).

Como es señalado por el Instituto Nacional de la Economía Social “la producción acuícola en México se lleva a cabo en 23 de los 32 estados, siendo los principales productores: Morelos, Nayarit, Jalisco, Veracruz y Yucatán; donde Morelos se centra como el más importante al producir alrededor de 30 millones de peces anualmente repartidos en 62 especies diferentes de los cuales el 70% de la producción total es destinada a la exportación”. (SAGARPA, 2018)

La aplicación a gran escala de la acuicultura está limitada por la cantidad de terreno a emplear, la utilización del agua, así como los daños al medio ambiente (Brugère y cols., 2004). “Los cambios en el clima y las condiciones ambientales plantean problemas importantes para la pesca y la acuicultura, especialmente en las regiones donde el calentamiento, la desoxigenación y la acidificación de los medios acuáticos afectan a la distribución y abundancia de recursos. Por tanto, es necesario modificar estos problemas con medidas innovadoras, inclusivas, efectivas y adaptativas” (FAO, 2021). En el sistema acuícola, el 25% de nitrógeno que se suministra en la proteína del alimento, se cosecha a través de la biomasa de los peces, y más del 70% se excreta al agua en forma de amoníaco (Rijn, J., 2012). Para mantener una buena calidad de agua para el crecimiento de los animales, se tienen que hacer cambios con agua limpia en un 5-10% por día. Por otra parte, el efluente alto en nitrógeno que se descarga al ecosistema puede conducir a la eutrofización y otros problemas ambientales (Lam, S. y cols., 2015).

Debido a lo mencionado, se han implementado nuevas formas de producción como el sistema de recirculación acuícola (SRA) que permite ahorrar el suministro de agua y aumenta la capacidad de cultivar organismos en altas densidades, sin embargo, en la operación de un SRA, la remoción de sólidos de la unidad de producción y del sistema es una operación fundamental que debe efectuarse diariamente para evitar el deterioro de la calidad de agua. Se emplean biofiltros nitrificantes que disminuyen el contenido de desechos de los peces para evitar que retornen a los estanques a través de los procesos de oxidación bacteriana, del amoníaco a nitrito, y de nitrito a nitrato, siendo este último un compuesto de menor toxicidad para los animales. Por otro lado, con los SRA, es posible obtener densidades altas de peces (9 g de pez/L agua), incluso en espacios reducidos, teniendo una mayor productividad. Un sistema de recirculación acuícola contribuye a tener un mejor ambiente al no liberar efluentes, eleva la calidad de la cría de peces, tiene un menor impacto de los fenómenos meteorológicos como el calentamiento global y evita la contaminación por metales pesados y dioxinas (Takeuchi, T., 2017).

A pesar de que los sistemas de recirculación acuícola, son tecnología de vanguardia para el desarrollo de la cría de peces en el mundo tanto en espacios pequeños como grandes, no hay un aprovechamiento al máximo de los nutrientes residuales que se producen como el nitrógeno y el fósforo en el sistema. Por lo tanto, se han desarrollado los sistemas de recirculación acuapónicos (SACR) que implican la combinación del cultivo acuícola de recirculación, (cultivo de animales acuáticos) con la hidroponía (cultivo de plantas). Los SACR, son una solución innovadora y sustentable en las granjas acuícolas, ya que reduce el consumo de agua, mejora la retención de nutrientes y la rentabilidad para producir simultáneamente dos cultivos

comerciales (Endut, A., y cols., 2009). Una gran ventaja de la acuaponía es su elevada utilización de nitrógeno eficiente, siendo un elemento vital para el crecimiento de las plantas.

En el sistema de recirculación acuapónico, el ciclo del nitrógeno comienza con la ingesta de proteína por los peces y luego se excreta a la fase acuosa en forma de nitrógeno amoniacal total (TAN, es decir  $\text{NH}_3$  y  $\text{NH}_4^+$ ). El amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) es oxidado a nitrito ( $\text{NO}_2$ ) por bacterias oxidantes de amoníaco (*Nitrosomonas* y *Nitrosococcus*), y luego convertido a nitrato ( $\text{NO}_3$ ) por bacterias oxidantes de nitrito (principalmente *Nitrobacter spp.* y *Nitrospira spp.*). En lugar de ser desechados al ecosistema  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}_3$  y TAN residual, estos son absorbidos como nutrientes por las plantas. De este modo los dos cultivos, plantas y peces, se benefician mediante la utilización de nutrientes en una manera sustentable. Las bacterias nitrificantes, que convierten  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NO}_3$  a través de la nitrificación, desempeñan un papel fundamental en los procesos biológicos que se desencadenan en la acuaponía (Zhen, H. y cols., 2015).

No todas las plantas pueden formar parte de un sistema de recirculación acuapónico; el estilo de la cama de cultivo influye en la elección de la planta, así como en las características de su crecimiento, en su capacidad de asimilar los compuestos nitrogenados y con qué tipo de peces interactuarán en el sistema; las plantas con mayor área superficial de la raíz podrían tener mejor absorción de nutrientes. En general, hay dos categorías de plantas acuapónicas con base en la demanda de nutrientes: plantas con bajo requerimiento de nutrientes incluyendo verduras y hierbas de hoja verde, tales como la lechuga, acelga, rúcula, albahaca, menta, perejil y legumbres como guisantes y frijoles; y plantas con alto requerimiento de nutrientes incluyendo los frutos botánicos como tomates, berenjenas, pepinos, fresas. (Graber, A. y cols., 2008).

## 1.1 ACUICULTURA

La acuicultura es la cría y producción de peces y otras especies acuáticas en cautiverio bajo condiciones controladas, entre las que destacan peces, crustáceos, moluscos y algas. La acuicultura se ha desarrollado en varias regiones del mundo, adaptándola a las condiciones ambientales y climáticas específicas de cada región. Las cuatro categorías principales de la acuicultura incluyen: sistemas abiertos de agua, el cultivo en estanques, canales de conducción de flujo continuo y sistemas de recirculación acuícola.

El incremento en el consumo de pescado, la sobreexplotación de poblaciones de peces, y el aumento de la contaminación de mares, ríos, lagos y estuarios, están erosionando gradualmente los recursos de los cuerpos de agua, por lo que la acuicultura se vislumbra como una alternativa para la producción de pescados y mariscos (Chávez, M. C. y cols., 1993); En el 2018, en la producción de pescado de la acuicultura predominaron los peces de aleta (54.3 millones de toneladas; 47 millones de toneladas de la acuicultura continental y 7.3 millones de toneladas de la acuicultura marina y costera), los moluscos principalmente los bivalvos (17.7 millones de toneladas) y los crustáceos (9.4 millones de toneladas). La contribución de la acuicultura mundial a la producción pesquera mundial alcanzó el 46.0% en 2018, frente al 25.7% en 2000 (FAO, 2020).

La producción en sistemas de recirculación acuícola es una alternativa de cultivo de organismos acuáticos, donde por medio de la reutilización del agua previamente tratada de manera física, química y biológica, se utiliza menos del 10% de la requerida en una producción convencional por estanque (Timmons, M.B, y cols, 2006). Para que un sistema de recirculación sea eficiente y provea un ambiente adecuado debe contar con los siguientes elementos (Losordo, T., y cols., 1992), como se puede observar en la figura 1

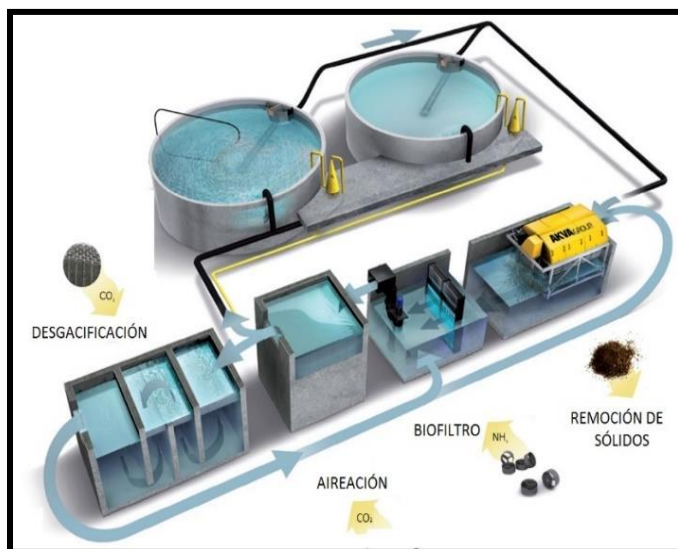


Figura 1. Elementos de un sistema de recirculación acuícola: sistema de remoción de sólidos (Fuente AKVA Group)

- Remoción de sólidos: consiste en un sistema de filtración primaria que permite remover los desechos producidos en el sistema tales como las heces y el alimento no consumido. Se dividen en sólidos sedimentables, sólidos suspendidos y sólidos finos.
- Biofiltro: Sistema de filtración sustentado en el desarrollo de una biopelícula que controla la concentración de los compuestos nitrogenados.
- Aireador: Elemento que oxigena el agua de estanques.
- Desgasificación: elimina el dióxido de carbono acumulado en el sistema.

Se ha potencializado el uso de los sistemas de recirculación acuícola, debido al incremento que se obtiene de la productividad del cultivo a lo largo del año con un control de condiciones climáticas y del control de la calidad del agua, así como a la reducción del volumen de agua residual a tratar (Davidson, J. y cols., 2016).

De acuerdo con el Servicio de Información Agroalimentaria y pesquera en México en la década de los ochentas se comenzó la producción acuícola para fines comerciales, y se ha logrado que la acuicultura en América Latina mantenga el crecimiento más elevado a escala global, superando constantemente el 9% anual promedio en las últimas décadas dividiéndose en dos grandes vertientes, la producción de peces para consumo humano y la producción de peces de ornato. Comer pescado forma parte de la tradición cultural mexicana y es excelente fuente de proteína, ácidos grasos, minerales y nutrientes en la dieta del hombre, adicional la comercialización de los peces de forma decorativa de manera ornamental (INAES, 2017). El 63% del total de los productos acuícolas que más se cultivan en México está formado por la mojarra tilapia, el camarón y el ostión (SADER, 2015).

## 1.2 HIDROPONÍA

La Hidroponía, es un conjunto de técnicas que permiten el cultivo de plantas en un medio libre de suelo agrícola proporcionando a la planta los nutrientes necesarios para que lleve a cabo su ciclo de vida a través de lo que se conoce como una solución nutritiva, que contiene oxígeno y todos los nutrientes disueltos. Los nutrientes pueden ser aportados por sales o fertilizantes comerciales. Los iones en solución guardan una relación que está marcada por los factores de tipo químico y fisiológico, en función a las necesidades nutritivas de un determinado cultivo (Beltrano, J. y cols., 2015).

En la bibliografía se encuentran los siguientes tipos de sistemas hidropónicos:

- Cultivos sin sustrato, técnica de la solución nutritiva recirculante, donde los nutrientes están disueltos en agua los cuales están en contacto con las raíces directamente. En este sistema el agua es aireada o se permite que las raíces y la solución estén en contacto con el aire. Provee soporte a la planta mediante enganches o cables metálicos.
- Cultivo agregado, donde los nutrientes están disueltos en agua y son transportados hasta las raíces. En este sistema las raíces están creciendo en un medio sólido inerte capaz de retener suficiente humedad, drenando el exceso y que permita una aireación adecuada. Algunos medios sólidos utilizados en este tipo de sistemas son: arena, arcilla expandida, gravilla, musgo, etc. (Resh, H., 2001).

Para los sistemas de cultivo hidropónicos, es importante que la solución nutritiva contenga todos los elementos necesarios y en la composición correcta. La absorción de nutrientes es un factor importante en el cultivo de plantas. Las raíces deben absorber lo que la planta necesita para crecer sana y de un tamaño conveniente. Cuando se cultiva en suelo, las raíces crecen continuamente, para buscar nutrientes, agua y aire en el suelo. En el cultivo hidropónico, las raíces están continuamente en contacto con las cantidades apropiadas de nutrientes, ya que se colocan en contacto con un medio acuoso de crecimiento (Canovas, F. y cols., 1999).

La producción de cultivos hidropónicos aumenta constantemente debido al trabajo realizado en espacios reducidos (techos, patios, viveros, etc.) obteniendo un buen crecimiento y un periodo menor para el desarrollo, así como la conservación de las plantas. En cultivos con alta rentabilidad como aquellos para producción de tomate, lechuga, espinaca y flores, el sistema permite cosechar las plantas cada 21 días usando lámparas de alta intensidad de descarga que simulan la luz solar directa. La hidroponía permite producir plantas principalmente de tipo herbáceo aprovechando sitios o áreas como azoteas, suelos infértiles e invernaderos climatizados, a través de técnicas que se apoyan de sustratos (medios que sostienen la planta), o en sistemas con aportes de soluciones de nutrientes estáticos o circulantes, sin perder de vista las necesidades de la planta como la temperatura, humedad, agua y nutrientes (Mateus, J., 2009).

### 1.3 ACUAPONÍA

La acuaponía es la integración de la acuicultura y la hidroponía en un solo sistema de producción. El agua es recirculada de los tanques con peces a las camas hidropónicas a través de filtros que eliminan los residuos sólidos y por un biofiltro que está formado por un conjunto de bacterias que llevan a cabo el proceso de nitrificación, en el que transforman el amoníaco, que es tóxico para los peces, en nitrato que es utilizado por las plantas para su crecimiento.

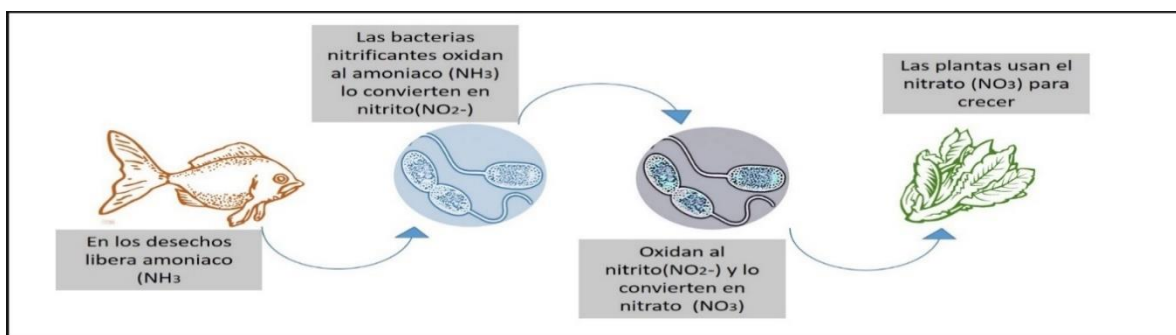


Figura 2. Proceso de nitrificación en sistemas acuapónicos (Somerville, C., y cols., 2014).

En el sistema de recirculación acuapónico, el ciclo del nitrógeno comienza con la ingesta de proteína por los peces y luego se excreta a la fase acuosa en forma de nitrógeno amoniacal total (TAN, es decir  $\text{NH}_3$  y  $\text{NH}_4^+$ ). El amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) es oxidado a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) por bacterias oxidantes de amoníaco (*Nitrosomonas* y *Nitrosococcus*), y luego convertido a nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) por bacterias oxidantes de nitrito (principalmente *Nitrobacter spp.* y *Nitrospira spp.*). En lugar de ser desechados al ecosistema  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  y TAN residual, estos son absorbidos como nutrientes por las plantas. De este modo los dos cultivos, plantas y peces, se benefician mediante la utilización de nutrientes en una manera sustentable. Las bacterias nitrificantes, que convierten  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NO}_3^-$  a través de la nitrificación, desempeñan un papel fundamental en los procesos biológicos que se desencadenan en la acuaponía (Zhen, H. y cols., 2015).

El primer intento de relacionar la práctica de la acuicultura y la hidroponía, comenzó en la década de los setenta con investigaciones que buscaban desarrollar sistemas de cultivo de peces a pequeña escala (Rakocy, J., y cols., 1993). Hacia 1986, McMurtry, M. y cols., crearon el primer sistema acuapónico (sistema acua-vegetativo) para el cultivo de tilapia y tomates..

Los SAc utilizan principalmente tres tipos de unidades acuapónicas para el crecimiento para las plantas (Harmon, 2003) y (Somerville y col., 2014):

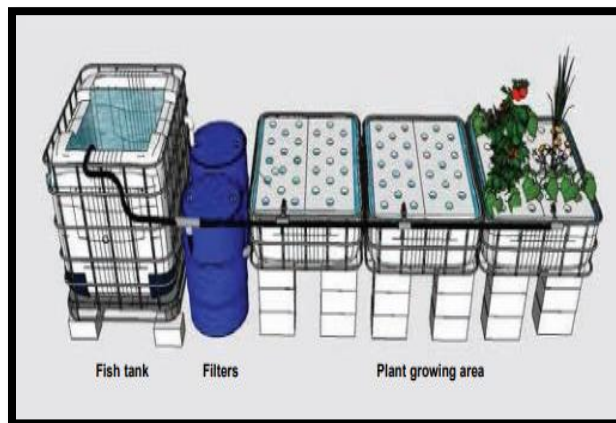


Figura 3. Técnica de cultivo en aguas profundas (Somerville y col., 2014)

- Técnica de cultivo en aguas profundas (Deep Water Culture DWC). Las plantas se suspenden en una placa de poliestireno flotantes. Por lo general, el agua no sufre incrementos elevados de temperatura. Las bacterias nitrificantes se establecen aproximadamente en un mes. Se utiliza preferentemente la tilapia y en plantas se han realizado ensayos con lechuga, orégano, albahaca, menta y tomate (Ramos, 2006).

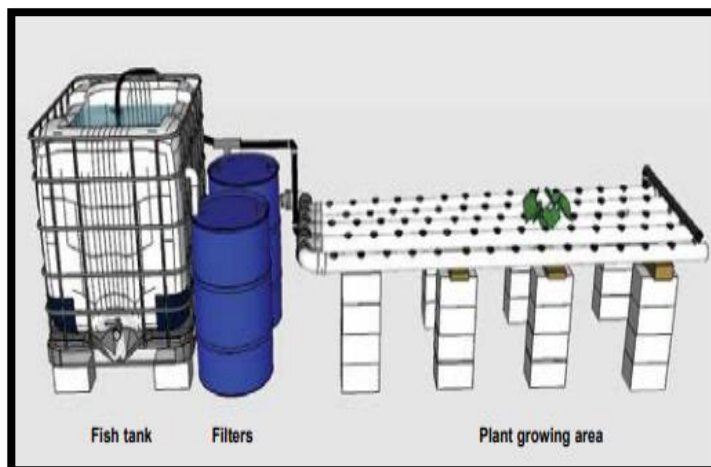


Figura 4. Técnica de cultivo en capas de nutrientes (Somerville y col., 2014)

- Técnica de cultivos en capas de nutrientes (Nutrient Film Technique NFT): En este sistema, las plantas se colocan en los agujeros perforados en la parte superior de una tubería, de tal modo que las raíces de las plantas se mantienen en contacto con una película delgada de agua que contiene los nutrientes. Lleva un sistema de clarificación más estricto para impedir que los canales se tapen (Harmon, 2003).



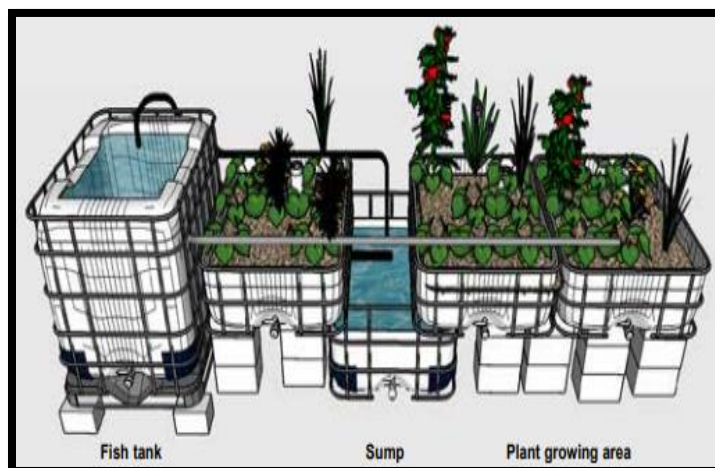


Figura 5. Técnica de cultivo en cama de sustratos (Somerville y col., 2014)

- Técnica de cultivo en cama de sustrato (MBT): Consta de un sustrato en las camas de cultivo de material poroso que se utiliza para sostener las raíces de las plantas y a su vez funciona como filtro mecánico y biológico (Someville y cols., 2014).

Un sistema acuapónico mantiene la calidad del agua, produce una vegetación rentable y peces de alta densidad y se aprovecha el remanente orgánico disuelto en el agua (Jason, J. y cols. 2013). A su vez las camas hidropónicas funcionan como un biofiltro, mejorando la calidad del agua, que será recirculada nuevamente a los tanques de los peces (Mateus, 2009).

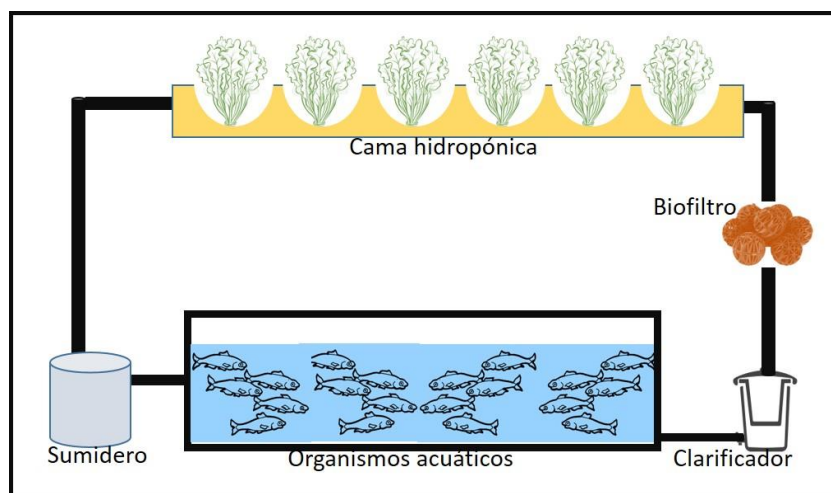


Figura 6. Componentes en un sistema de recirculación acuapónica (Mateus, 2009).

Un Sistema acuapónico de recirculación (SAcR) está conformado por los siguientes elementos (Gorder, S, 2003):

- 1.) Un tanque para los peces.
- 2.) Un clarificador.
- 3.) Un biofiltro con bacterias nitrificantes.
- 4.) Un componente hidropónico, donde las plantas flotan en el agua de cultivo.

- 5.) Un sumidero, donde el agua pueda ser recolectada para que sea direccionada de nuevo hacia el tanque de cultivo de peces.

La acuaponía constituye una práctica amigable con el ambiente ya que permite el reciclaje de desechos generados por los peces, y utilizados para el crecimiento de las plantas. Permite un ahorro importante de agua

La acuaponía constituye una práctica amigable con el medio ambiente (Rahman, 2005) permite el crecimiento de las plantas a través de la materia orgánica y fecal de los peces favoreciendo la producción continua de especies acuáticas y vegetales (Muñoz, M., 2012).

#### 1.4 CALIDAD DEL AGUA

El agua es el medio a través del cual todos los macro y micronutrientes esenciales son transportados a las plantas, y los peces reciben oxígeno. De acuerdo a Endut, A. y cols., 2009, para maximizar la calidad de los peces y las plantas las condiciones de los niveles de oxígeno en el agua y la temperatura deben ser las óptimas para tener un adecuado crecimiento bacteriano y así poder obtener los nutrientes necesarios para el crecimiento de peces y plantas.

En la tabla 1 se presentan los parámetros de calidad del agua tolerables para el óptimo crecimiento de los peces, plantas y bacterias que contribuyen en el sistema de recirculación acuapónico.

Los compuestos nitrogenados influyen en la calidad del agua; el amoniaco indica una degradación completa de materia orgánica, así como, los niveles altos de nitritos indican contaminación reciente por materias fecales.

Tabla 1. Rangos de tolerancia en agua para peces, plantas hidropónicas y bacterias nitrificantes (Somerville, C., y cols., 2014).

Tipo de organismo	Temperatura °C	pH	Amoniaco (ppm)	Nitrito (ppm)	Nitrato (ppm)	Oxígeno disuelto (ppm)
Peces tropicales	22°C a 32°C	6-8.5	Menor a 3 ppm	Menor a 1 ppm	Menor a 400 ppm	Entre 4 y 6 ppm
Peces de agua fría	10°C a 18°C	6-8.5	Menor a 1 ppm	Menor a 0.1 ppm	Menor a 400 ppm	Entre 6 y 8 ppm
Plantas	16°C a 30°C	5.5-7.5	Menor a 30 ppm	Menor a 1 ppm	-	Mayor a 3 ppm
Bacterias	14°C a 34°C	6-8.5	Menor a 3ppm	Menor a 1 ppm	-	Entre 4 y 8 ppm

##### 1.4.1 pH

De acuerdo con la FEUM 13ª edición, la escala de pH es una serie de valores que representan convencionalmente la concentración de iones hidrógeno en una solución acuosa. La composición química de las soluciones nutritivas en el sistema acuapónico contiene iones disueltos y la interacción entre los iones en la solución pueden influir en la absorción de nutrientes por las raíces de las plantas. El pH en un sistema acuapónico puede impactar en la producción bacteriana y en la salud de los peces y plantas.

La nitrificación bacteriana de amoníaco a nitrito y de nitrito a nitrato en situaciones ideales ocurre en un pH de 8.5 sin embargo, la absorción de nutrientes para muchas especies de cultivo se obtiene en un pH cerca de 6.0 (Worthman, S., 2015). Es recomendando que el pH del sistema acuapónico se mantenga en un rango de 6 a 7, como lo indica en la tabla siguiente:

Tabla 2. Intervalo de valores ideales de los parámetros de calidad de agua para un sistema acuapónico (Somerville, C., y cols., 2014).

Sistema	Temperatura (°C)	pH	Amoníaco (mg/L)	Nitrito (mg/L)	Nitrato (mg/L)	Oxígeno disuelto (mg/L)
Acuapónico	18°C a 30°C	Entre 6 a 7	Menor a 1 ppm	Menor a 1 ppm	5 ppm a 150 ppm	Mayor a 5 ppm

Las bacterias nitrificantes pueden oxidar los compuestos orgánicos adecuadamente en un pH entre 6 a 8.5. El grupo de Nitrosomonas trabajan en un pH ideal de 7.2 a 7.8 y el grupo Nitrobacter en un pH de 7.2 a 8.2. (Somerville, C., y cols., 2014).

#### 1.4.2 TEMPERATURA

La temperatura fundamental en un sistema acuapónico debe ser de entre 18°C a 30°C e influye sobre el oxígeno disuelto y la toxicidad del amoníaco; a mayor temperatura mayor amoníaco en el ambiente. Las altas temperaturas restringen la absorción de calcio en las plantas; Algunos peces pueden habitar en aguas de temperatura de entre 22 a 29°C como la tilapia, carpa y bagre. Y entre las plantas, se encuentra la albahaca y las coles de Asia. Por el contrario, algunos vegetales como la lechuga, acelgas y pepinos y peces como las truchas crecen mejor en temperaturas de entre 18 a 26°C (Somerville, C. y cols., 2014).

#### 1.4.3 SÓLIDOS DISUELTOS TOTALES EN AGUA

Los Sólidos Disueltos Totales (TDS) son sales inorgánicas, como calcio, magnesio, potasio, sodio, bicarbonatos, cloruros y sulfatos, y pequeñas cantidades de materia orgánica que se disuelven en el agua y que no son retenidas en el material filtrante. El límite permisible en el agua potable definido en la Norma Oficial Mexicana (NOM-127-SSA1-1994) es de 1000 ppm. Al ser iones solubles en agua se puede determinar a través de la conductividad la presencia de sólidos disueltos, sin embargo, a altas concentraciones puede impedir el crecimiento de las plantas ya que para el óptimo cultivo se requiere entre 0 a 2000 ppm presentes en el agua (Campos, R.P y cols, 2013).

#### 1.5 COMUNIDADES BACTERIANAS

Las bacterias en un sistema de recirculación acuapónico oxidan los residuos tóxicos para el pez y los transforman en nutrientes para las plantas. Numerosas especies bacterianas son quimiolitótrofas, las cuales son capaces de un crecimiento autótrofo donde utilizan compuestos nitrogenados inorgánicos como fuentes de carbono, como es el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ).

Se clasifican en diversos géneros de acuerdo a la morfología, filogenia y a las reacciones de oxidación específicas que realizan. Taxonómicamente, las comunidades de bacterias nitrificantes se distribuyen en cuatro clases de proteobacterias: alfa, beta, gama y delta: el género *Nitrospira* forma su propio filum de bacterias y está relacionado con las demás bacterias

nitrificantes debido a su metabolismo. Las *Nitrosomonas* es un género representativo que oxida el amoníaco a nitrito, y la *Nitrospira* es un género representativo que oxida el nitrito a nitrato, ver tabla 3 y 4 (Shiung, S., y cols., 2015).

Tabla 3. Características de las bacterias nitrificantes, grupo nitroso (Madigan, M. y cols, 2009).

GRUPO NITROSO (OXIDAN AMONIO)			
Género	Grupo filogenético	Morfología	Hábitat
<i>Nitrosomonas</i>	Betaproteobacterias	Bacilos	Suelo, aguas residuales, agua dulce y salada
<i>Nitrococcus</i>	Gammaproteobacterias	Cocos	Agua dulce y salada
<i>Nitrospira</i>	Betaproteobacterias	Espirales	Suelo, agua dulce
<i>Nitrosolobus</i>	Betaproteobacterias	Peomórficos	Suelo

Los géneros de *Nitrospira* beta tiene la característica de oxidar amonio mientras que la *Nitrospira* delta oxida nitrito. Ambos grupos filogenéticos se pueden encontrar en el agua, los géneros *Nitrosomonas*, *Nitrococcus* y *Nitrosolobus* tienen la función de oxidar amonio y se pueden encontrar en suelo, aguas residuales o marinas y los mismos géneros, pero diferente grupo filogenético tienen la función de oxidar nitrito y también se encuentran en agua marina, agua dulce y suelo.

Tabla 4. Características de las bacterias nitrificantes, grupo nitro (Madigan, M. y cols, 2009).

GRUPO NITRO (OXIDAN NITRITO)			
Género	Grupo filogenético	Morfología	Hábitat
<i>Nitrobacter</i>	Alfaproteobacterias	Bacilos cortos	Suelo, agua dulce y agua salada
<i>Nitrospina</i>	Deltaproteobacterias	Bacilos largos y finos	Aguas saladas
<i>Nitrococcus</i>	Gammaproteobacterias	Cocos grandes	Aguas saladas
<i>Nitrospira</i>	Deltaproteobacterias	Células helicoidales a vibrioides	Aguas saladas

Diversas enzimas participan en la oxidación de compuestos nitrogenados reducidos. En bacterias oxidadoras de amoníaco, el  $\text{NH}_3$  se oxida mediante la amoníaco-monooxigenasa que produce  $\text{NH}_2\text{OH}$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . Una segunda enzima es la hidroxilamina-oxidoreductasa, que oxida  $\text{NH}_2\text{OH}$  a  $\text{NO}_2^-$  eliminando cuatro electrones en el proceso. La amoníaco-monooxigenasa es una proteína transmembrana, mientras que la hidroxilamina-oxidoreductasa es periplasmática. Las bacterias oxidadoras de nitrito emplean la enzima nitrito-oxidoreductasa para oxidar el nitrito a nitrato (Hatayama, R., y cols., 2000).

Otro grupo importante de bacterias que participan en la acuaponía, son las bacterias heterótrofas que utilizan el carbono orgánico como fuente de alimento y están involucradas en los residuos sólidos de los peces y de las plantas. La mayoría de los peces sólo conservan de 30 al 40% del alimento que comen, el resto se libera en forma de residuos siendo una mezcla orgánica que contiene proteínas, carbohidratos, grasas, vitaminas y minerales. Las bacterias heterótrofas metabolizan estos residuos sólidos en un proceso llamado mineralización, esencial para las plantas ya que no pueden absorber los nutrientes en forma sólida (Diduch, M. y cols., 2016).

Uno de los aceptores de electrones alternativos más habitual es el nitrato,  $\text{NO}_3^-$ , que se puede reducir a óxido nitroso,  $\text{N}_2\text{O}$ , óxido nítrico,  $\text{NO}$ , y nitrógeno molecular,  $\text{N}_2$ , ver figura 7. Como todos estos productos de reducción del nitrato son

gaseosos, se pueden perder con facilidad en el ambiente en un proceso que se denomina desnitrificación (Madigan, M., y cols, 2009). La mayor parte de las procariotas desnitrificantes son miembros filogenéticamente de las proteobacterias, y fisiológicamente son anaerobios facultativos. Muchas bacterias desnitrificantes reducen también otros aceptores de electrones de forma anaerobia, como el hierro férrico y algunos aceptores de electrones orgánicos (Shete, A., y cols., 2016).

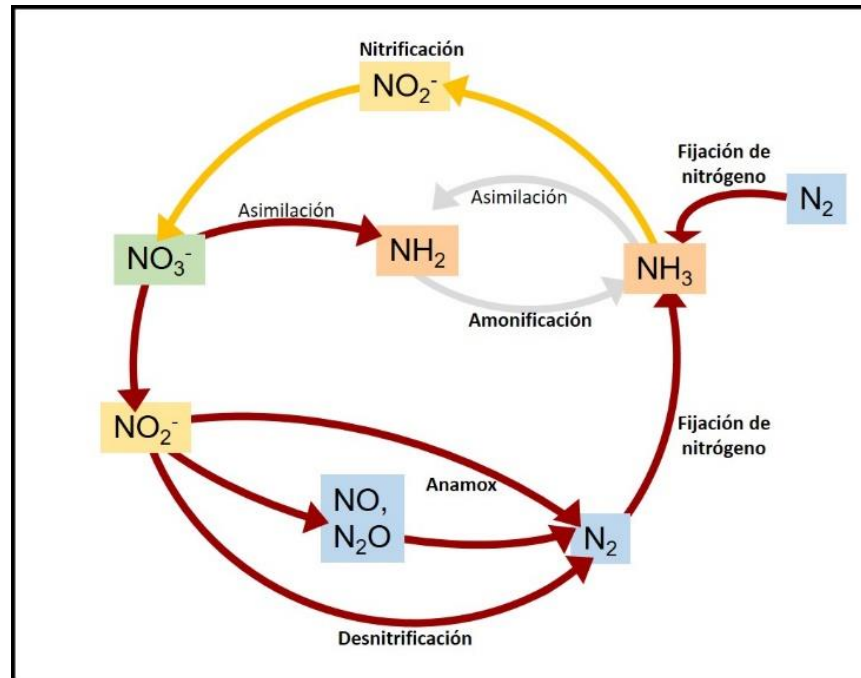


Figura 7. Ciclo redox del nitrógeno, las reacciones de oxidación se muestran con flechas amarillas y las de reducción con flechas rojas. Las reacciones sin cambio redox aparecen en gris (Madigan, M. y cols, 2009).

Tabla 5. Procesos que conforman el ciclo del nitrógeno (Rakocy, J. y cols., 2004).

Procesos	Organismos
<b>Nitrificación</b> ( $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_3$ )	
$\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2$	<i>Nitrosomona estuario</i> , <i>Nitrosomona communis</i> , <i>Nitrosomona euripaea</i> , <i>Nitrosomona eutropha</i> , <i>Nitrosomona halophila</i> , <i>Nitrosomona marina</i> , <i>Nitrosomona nitrosa</i> , <i>Nitrosomona ureae</i>
$\text{NO}_2 \rightarrow \text{NO}_3$	<i>Nitrobacter alkalicus</i> , <i>Nitrobacter hamburgensis</i> , <i>Nitrobacter vulgarias</i> , <i>Nitrobacter winogradskyi</i>
<b>Desnitrificación</b> ( $\text{NO}_3 \rightarrow \text{N}_2$ )	<i>Bacillus</i> , <i>Paracoccus</i> , <i>Pseudomonas</i>
<b>Fijación de <math>\text{N}_2</math></b> ( $\text{N}_2 + 8\text{H} \rightarrow \text{NH}_3 + \text{H}_2$ )	
De vida libre	
Aerobios	<i>Azotobacter</i> , <i>Cianobacterias</i>
Anaerobios	<i>Clostridium</i> , bacterias verdes y púrpuras
Simbióticos	<i>Rhizobium</i> , <i>Bradyrhizobium</i> , <i>Frankia</i>
<b>Amonificación</b> ( $\text{N orgánico} \rightarrow \text{NH}_4^+$ )	Pueden hacerla muchos organismos
<b>Anamox</b> ( $\text{NO}_2 + \text{NH}_3 \rightarrow 2\text{N}_2$ )	<i>Brocadia</i>

## 1.6 PEZ JAPONÉS (*Carassius auratus*)

Una gran cantidad de especies de peces, tanto de agua fría como templada, están adaptadas a los sistemas de recirculación acuapónico entre estas se incluyen (Selock, D., 2003):

- Tilapia (*Oreochromis niloticus*);
- Híbridos de tilapia (*Oreochromis urolepis hornorum*, *Oreochromis mosambicus*)
- Carpa (*Cyprinus carpio*)
- Híbridos de carpa (*Ctenopharyngodon idealla X Aristichthys nobilis*)
- Pez dorado (*Carassius sp.*)

La biomasa de peces debe ser mantenida cerca de la capacidad máxima para aprovechar el espacio disponible y maximizar la producción garantizando un suministro de alimentos constante, ya que será un precursor de los nutrientes destinados a los vegetales.

El pez japonés es un teleósteo de agua dulce perteneciente a la clase *Osteichthyes*, subclase *Actinopterygii*, Infraclase *Neopterygii*, superorden *Otophysi*, orden *Cypriniformes*, familia *Cyprinidae*, subfamilia *Cyprininae*. Los ciprínidos son una familia ampliamente distribuida en el planeta. Se conocen más de dos mil especies pertenecientes a esta familia, con gran variedad de formas, hábitats y modos de vida. Domesticado en China hace más de mil años e introducido en Japón en el siglo XVI y exportado a Europa en el año 1611 (Kottelat, M. y cols., 2007). Morfológicamente (Velarde, E. y cols., 2010) presenta una aleta dorsal de base amplia, un cuerpo macizo de color pardo amarillento o verdoso, con reflejos blanco plateados en los costados y vientre. Los adultos pueden llegar a medir hasta 45 cm, sin embargo, suelen estar entre los 10 cm y 20 cm. Su crecimiento viene determinado por la cantidad de alimento que puedan obtener. Se adaptan con facilidad a condiciones extremas, sin embargo, su hábitat idóneo es en aguas poco profundas de ríos de corriente lenta y lagunas, ricos en vegetación con temperaturas entre 10 y 21°C (Bent, J. y cols., 1981).

### 1.7 LECHUGA (*Lactuca sativa*)

La lechuga pertenece a la familia *Asteraceae* y su nombre botánico es *Lactuca sativa L.*, es una planta herbácea de pequeño porte, ya que alcanza de 40 a 60 cm de altura anual y autógama. La raíz no llega a sobrepasar los 25 cm de profundidad, y presenta numerosas ramificaciones: Debido a sus bajos requerimientos se puede desarrollar en los sistemas acuapónicos (Lee, R., y cols., 2000).

Para un óptimo crecimiento la temperatura ambiental debe ser de entre 17°C a 28°C durante el día y por la noche de 3°C a 12°C, un pH ideal entre 5.8 a 6.2 (Somerville, C. y cols., 2014) así como mantener los niveles de luz, potasio y hierro.

### 1.8 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

La principal técnica para la amplificación exponencial de un fragmento de DNA es la Reacción en Cadena de Polimerasa que a través de la extracción y purificación de ácidos nucleicos siguen una secuencia de lisis, aislamiento, lavado y elución para pasar de una muestra biológica compleja a un ácido nucleico purificado que se pueda usar en una reacción de PCR. La reacción por PCR es el mecanismo de replicación del DNA in vivo donde se desnaturaliza el DNA y se duplica obteniendo un proceso ciclado, lo que resulta un crecimiento exponencial de millones de copias de segmentos fraccionados. La PCR ha permitido clasificar a las bacterias en sus patrones de huellas genómicas (M.J. McPherson & cols, 2000).

La técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) permite estudiar la diversidad de las comunidades bacterianas el cual separa fragmentos de DNA que difieren en una o más bases simples obteniendo amplicones desnaturizados, que presentaran diferentes patrones de migración. Estudios han demostrado que la DGGE ofrece la predicción de genotipos, con alto potencial en la evaluación de la diversidad genética a través de un análisis cualitativo de muestras obtenida (Hsu T.K y cols, 2018)

El ARN ribosómico 16S así como, un segmento corto de DNA, gen DNA, son macromoléculas utilizadas en estudios de filogenia y taxonomía bacteriana, la amplificación de genes que codifican el rRNA 16S se han utilizado para establecer las relaciones filogenéticas en el mundo procariota, avanzando en la clasificación e identificación bacteriana. El método molecular de identificación bacteriana mediante la secuenciación del ADNr 16S incluye la etapa de amplificación de gen (a través de PCR), determinación de la secuencia de nucleótidos (análisis de los productos por electroforesis) y análisis de la secuencia (bases de datos como el GenBank) (Rodicio, M.R y cols, 2003).

En la presente investigación se empleó como modelo de estudio a la lechuga popularmente conocida en México como lechuga romana (*Lactuca sativa L.*) ya que es una hortaliza consumida en todo el mundo y presenta un ciclo corto de crecimiento, con un periodo de 45 a 50 días en invernadero, a una temperatura entre 14°C y 24°C y nutricionalmente aporta: vitamina A, calcio, hierro, magnesio, fósforo y potasio al ser humano (Garza. M.D. y cols., 2016).

Actualmente, los sistemas de recirculación acuapónicos se emplean para la producción de peces de consumo y ornamentales. Dentro de los últimos, el pez japonés (*Carassius auratus*) es una de las especies ornamentales más populares, tanto en términos de producción y en el comercio ya que es considerado un pez exótico y codiciado por el



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

## UNIDAD XOCHIMILCO

REPORTE DE SERVICIO SOCIAL PARA LA LICENCIATURA DE QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

mundo (Tizkar, B., y cols., 2015). Se reproducen con facilidad y se ha demostrado que, manipulando los parámetros ambientales, empleando tratamientos hormonales y dieta de alta calidad, es posible mejorar la eficiencia reproductiva y la productividad (Edinson, W., y cols., 2014).

El propósito de la presente investigación es evaluar molecularmente a las comunidades bacterianas contenidas en la rizofera de la lechuga, en la biopelícula y en el agua de un sistema de recirculación acuapónico para la producción del pez japonés (*Carassius auratus*) y de la lechuga (*Lactuca sativa L.*). Y a su vez evaluar los compuestos nitrogenados ( $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NH}_3$ ), pH y conductividad del agua durante el cultivo.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general:

- Evaluar la estructura y diversidad de las comunidades bacterianas contenidas en un cultivo de pez japonés (*Carissius auratus*) y en la rizosfera de la lechuga (*Lactuca sativa L.*) producidos en un sistema acuapónico de 90 días.

### 2.2 Objetivos específicos:

- Evaluar los parámetros fisicoquímicos y la calidad del agua durante el cultivo en tres sistemas de recirculación: acuícola (peces), hidropónico (lechugas) y acuapónico (peces y lechugas).
- Evaluar el crecimiento de la lechuga en los sistemas acuapónicos e hidropónicos.
- Aislar en medios selectivos a las bacterias nitrificantes, amonificadoras y desnitrificantes contenidas en el agua, rizosfera y biopelícula formada en los sistemas experimentales.
- Determinar la estructura de las comunidades bacterianas del agua y de la rizosfera mediante la huella genética obtenida por Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE).

### 3 METODOLOGÍA

#### 3.1 SISTEMAS DE RECIRCULACIÓN

##### *Estanques de cultivo*

Se montaron tres sistemas experimentales (Ver Figura 8):

- Recirculación acuícola
- Recirculación acuapónico
- Recirculación hidropónica

Los cuales contenían 3 estanques con dimensiones de 60 cm de largo, 40 cm de ancho y 40 cm de altura con una capacidad de 70 L de agua. Los sistemas acuícola y acuapónico, contenían peces en los estanques, mientras que el hidropónico sólo contenía agua en ellos. El acuícola carecía del elemento hidropónico, es decir, no se realizó cultivo de lechugas en este, mientras que en los sistemas acuapónico e hidropónico, se empleó la técnica de cultivo en capa de nutrientes, NFT, para el desarrollo de las lechugas.

- *Fuente de agua.* Se empleó agua potable para todos los estanques. Se completó por día el nivel de agua limitado de los estanques debido a la pérdida de la misma.
- *Sistema de tratamiento primario del agua.* Se utilizó un filtro de fieltro (30 cm de largo por 25 cm de ancho), que se colocó en la tubería del efluente de los estanques (Ver Figura 8), para la remoción de sólidos suspendidos tales como alimento no consumido y heces. Fue sustituido dos veces al día para evitar su saturación. Una vez removido el filtro, se lavaba con agua a presión, se desinfectaba con cloro y se secaba al sol durante 48 horas.
- *Biofiltración.* La biofiltración mecánica se llevó a cabo en el sistema acuícola, colocando 600 bioesferas de la marca Aquatic ecosystem® con forma de prisma de 3 cm de diámetro, en una malla introducida en el contenedor (Ver figura 8) con el objetivo de generar una biopelícula nitrificante. En los sistemas acuapónico e hidropónico, se colocó una tubería de PVC perforada en la parte superior, en cuyos orificios se colocaron 15 lechugas en total por sistema NFT, de tal modo que la raíz de los vegetales se empleó como sistema de biofiltración para el desarrollo de bacterias nitrificantes.
- *Flujo de agua en el sistema.* En los tres sistemas experimentales, se colocaron tubos de PVC con orificios de 0.5 cm de diámetro en el interior de los estanques), que se conectaron a los contenedores de tratamiento primario y el agua se recirculó al sistema de biofiltración, y posterior a este, el efluente tratado se bombeó hacia los estanques, empleando tuberías de PVC.
- *Solución nutritiva.* Se elaboró una mezcla de sales para el sistema hidropónico con la siguiente composición: Sulfato de potasio ( $K_2SO_4$ ) 0.524 g/L, sulfato de magnesio ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) 0.404 g/L, fosfato monobásico de potasio ( $KH_2PO_4$ ) 0.136 g/L, carbonato de calcio ( $CaCO_3$ ) 0.74 g/L y nitrato de potasio ( $KNO_3$ ) 0.606 g/L.

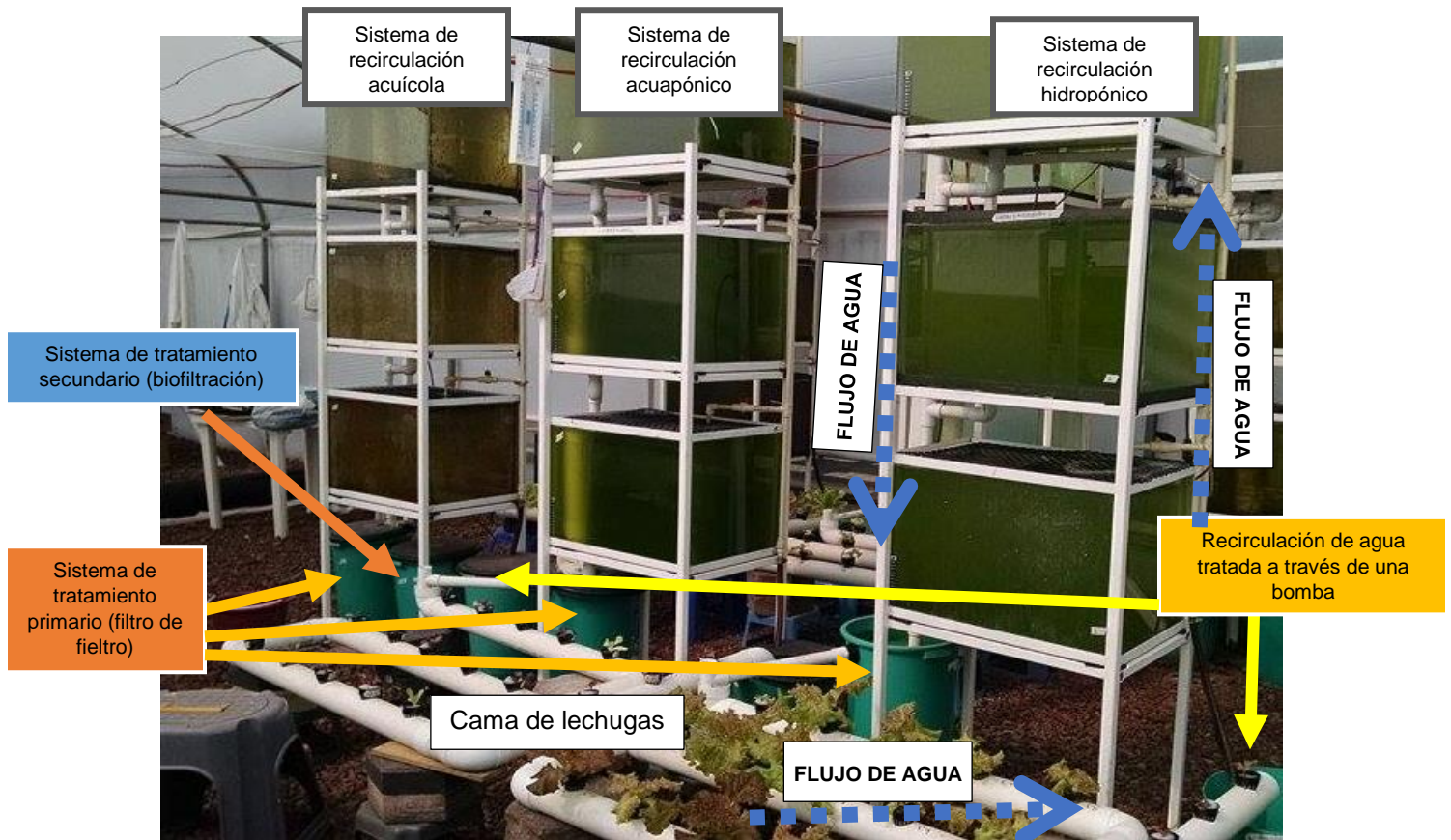


Figura 8. Sistemas experimentales: acuícola, acuapónico e hidropónico.

### 3.2 PECES

Se emplearon 263.52 g de biomasa de pez japonés (*Carassius auratus*), por sistema. Se mantuvieron en cuarentena durante 2 semanas y posteriormente se introdujeron al estanque de control acuícola y al sistema acuapónico. Se les administró el 3% de alimento Silver Cup-El pedregal® (Con 38% de proteína, 17% de lípidos y 10% de carbohidratos) de acuerdo a su peso, dividiendo su alimento en 2 partes (1.5% en la mañana, 1.5% en la tarde) por 60 días.

### 3.3 LECHUGA

Se emplearon lechugas popularmente conocidas como lechuga romana (*Lactuca sativa L.*):

*Siembra de semillas.* La siembra se realizó en charolas de plástico con 200 cavidades, utilizando como sustrato abono de lombricomposta. En cada cavidad se sembraron 2 semillas y se regaron todos los días con agua de la llave.

*Trasplante de lechuga a los sistemas de recirculación.* Después de 3 semanas de germinación, las lechugas se retiraron de las cavidades. Se rodearon las raíces con una tela absorbente, dejando un residuo de tela de 1x3 cm. Se colocó esponja alrededor de la rizosfera que estaba rodeada de la tela absorbente y se montaron en canastillas de polietileno de 4 cm x 7 cm con paneles para que la raíz pudiera crecer. Se introdujo una canastilla en cada orificio del sistema NFT a los sistemas de recirculación acuapónico e hidropónico. Antes de introducir cada canastilla, se extendió una porción de 2 cm de tela

absorbente para que, durante el tratamiento, el agua pudiera ascender fácilmente a las raíces en crecimiento mediante dicha tela. En los sistemas acuapónico e hidropónico, se colocaron 15 lechugas.

### 3.4 ANÁLISIS

#### 3.4.1 Evaluación del agua

Se colectaron 2 litros de agua en total de cada sistema en frascos de vidrio estériles de 500 mL al inicio del cultivo, a los 30 días y a los 60 días, y se transportaron al laboratorio de biotecnología ubicado en la UAM Xochimilco para su análisis. En el sistema hidropónico y acuapónico, se recolectaron 500 mL de agua de la tubería NFT, 500 mL de agua del contenedor de la bomba de recirculación; 500 mL de agua generada del tratamiento primario y 500 mL de agua de los estanques, a una profundidad de 20 cm en una esquina de los estanques. En el caso del sistema acuícola, se recolectaron 500 mL de agua del contenedor de la bomba de recirculación, 500 mL de agua generada del tratamiento primario y 1 mL de los estanques, y se mezclaron para su procesamiento. El agua colectada, se filtró por un papel filtro marca Whatman No.4 para eliminar residuos sólidos insolubles. Posteriormente, el eluyente se filtró a través de una membrana marca Millipore con un tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ , se colectó el pellet de las membranas resuspendiéndolas en solución salina estéril, y se concentró el pellet, centrifugando la suspensión a 3 000 rpm durante 5 minutos.

#### 3.4.2 Parámetros fisicoquímicos del agua

Con el equipo Tester<sup>®</sup>, modelo HI 98129 Hanna Instruments<sup>®</sup>, en el agua de los estanques de los tres sistemas, así como el agua de los contenedores del tratamiento primario de la bomba se determinaron los parámetros de pH, conductividad ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) y sólidos totales disueltos (ppm) al inicio del experimento, a los 15 días, a los 30 días y a los 60 días.

#### 3.4.3 Calidad de agua (Compuestos nitrogenados)

Con el instrumento fotómetro multiparamétrico HANNA Instruments<sup>®</sup> HI 83099, se cuantificó la concentración de amonio, nitratos y nitritos en el agua de los estanques de cada sistema de recirculación, en el agua del tratamiento primario y el agua del contenedor de la bomba de recirculación al inicio del experimento, a los 30 días y a los 60 días (Ver anexo I).

#### 3.4.4 Evaluación del crecimiento de los peces

Se emplearon 30 peces de los cuales se evaluó el crecimiento de cada uno en el sistema acuapónico y acuícola al inicio del experimento, a los 15 días, a los 30 días, a los 45 días y a los 60 días. Se cuantificó el peso total (W) en gramos, empleando una balanza granataria marca Ohaus<sup>®</sup>, modelo 750- SO, con una capacidad máxima 2610 g.

#### 3.4.5 Evaluación del crecimiento de las lechugas

Se emplearon 15 lechugas y se realizaron con un venier la dimensiones morfométricas , en cm.:

- Altura Total (AT)
- Longitud de las hojas chicas (HC)
- Longitud de las hojas medianas (HM)
- Longitud de las hojas grandes (HG)

También se cuantificó el número total de hojas de cada lechuga al inicio del experimento, a los 15 días, a los 30 días, a los 45 días y a los 60 días.

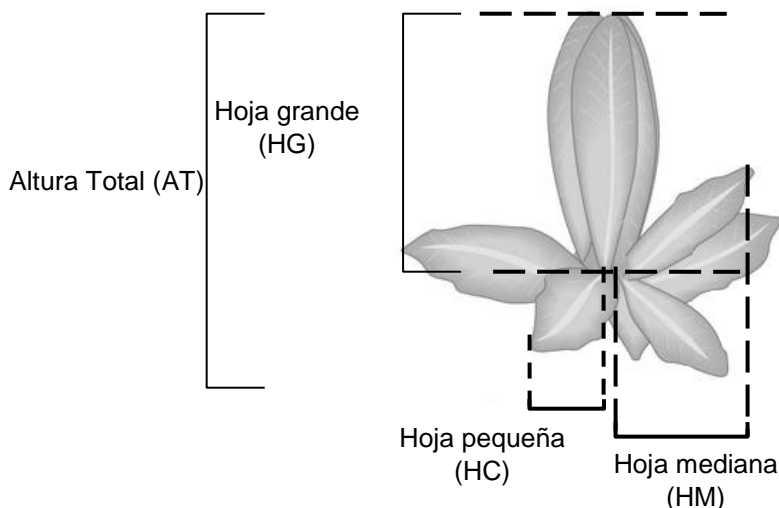


Figura 9. Evaluación de crecimiento de lechugas

### 3.4.6 Caracterización microbiológica de la rizosfera

A los 30 y 60 días de cultivo se tomaron aleatoriamente 3 lechugas de cada sistema y se separaron las raíces de las plantas en el laboratorio de biotecnología en la UAM Xochimilco con tijeras previamente sanitizadas. Se trocearon las raíces y se agitaron vigorosamente en un vaso de precipitado con solución salina estéril, para promover la resuspensión de los microorganismos rizosféricos.

Posteriormente se separaron las raíces por filtración al vacío, empleando un equipo marca Millipore con filtro de celulosa No.4. Se desecharon las raíces, y lo obtenido se filtró al vacío utilizando un filtro marca Millipore con un tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ . Se colocó el pellet obtenido de los diferentes filtros, en tubos eppendorf de 1.5 mL con solución salina estéril, y se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos hasta obtener un pellet visible. Se mantuvo a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el análisis microbiológico.

### 3.4.7 Muestreo de biopelícula

Se tomaron las muestras de la biopelícula desarrollada en el contenedor del tratamiento primario de agua, la biopelícula de la cama hidropónica y la biopelícula de las peceras de cada sistema de recirculación con hisopos estériles y estos se colocaron en tubos falcón de 15 mL. Posteriormente se adicionó agua estéril y se agitaron los hisopos para promover que la biopelícula se resuspendiera en el agua. La suspensión de biopelícula, se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos para la generación de un pellet visible. Se mantuvo a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el análisis microbiológico.

### 3.5 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

#### 3.5.1 Aislamiento de las bacterias nitrificantes, amonificadoras y desnitrificantes.

Se prepararon 24 matraces con 50 mL de cultivo líquido.

a) Se prepararon los siguientes medios de cultivo selectivos:

Medio de cultivo desnitrificante (g/L):

Solución I

- $\text{KNO}_3$ ..... 2.0
- Asparagina..... 2.0

Solución II

- Citrato de sodio..... 17.0
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ..... 2.0
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ..... 2.0
- $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ..... 2.0
- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ..... 0.1

Las soluciones I y II se prepararon y se esterizaron por separado, se suspendieron y disolvieron todos los ingredientes en el agua destilada, se esterilizó a  $121^\circ\text{C}$  por 15 minutos. Antes del vaciado se hizo una mezcla de las soluciones en una relación 1:1

Medio Stuart (para microorganismos amonificadores) (g/L):

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ..... 1.0
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ..... 1.0
- Extracción de levadura..... 0.1
- Urea (máxima pureza 20%)..... 20.0

No se calentó el medio para disolver ya que la urea se degrada con el calor. Se esterilizó en autoclave a 10 Lb de presión por 10 minutos.

Medios de cultivo nitrificantes (g/L):

Fase I:

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ..... 0.5
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ..... 0.03
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ..... 1.0
- $\text{NaCl}$ ..... 0.3
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ..... 0.03
- $\text{NaHCO}_3$  ..... 7.5
- Agar..... 2.0

Fase II:

- $\text{NaNO}_2$ ..... 0.2
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ..... 1.0
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ..... 0.1
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ..... 0.03
- $\text{NaHCO}_3$ ..... 1.0
- $\text{NaCl}$ ..... 0.3
- Agar..... 2.0

Todos los medios líquidos se incubaron a 28°C por tres semanas. Los medios en agar se incubaron a 28°C hasta la visualización de colonias bacterianas, mismas que fueron aisladas (Ver Tabla 7).

b) Se llevaron a cabo tinciones de gram de las colonias aisladas, para estudiar y caracterizar la morfología colonial en cada medio de cultivo.

### **3.5.2 Análisis metagenómico**

#### **3.5.2.1 Extracción de DNA**

Se llevó a cabo la estandarización de la técnica de extracción de DNA metagenómico, de acuerdo a las muestras a tratar:

- A las colonias nitrificantes, desnitrificantes y amonificadoras aisladas, se les extrajo el DNA con el kit Promega Wizard® Genomic DNA purification (Ver Anexo II), con las siguientes modificaciones: se utilizó un mini Bead-Beater con perlas zirconio/sílica de 0.1 mm de diámetro, homogeneizando durante 3 ciclos de 30 segundos a 1400 rpm, con intervalos de hielo de medio minuto para llevar a cabo la lisis celular.
- Para los pellets bacterianos obtenidos de las muestras de agua, de la biopelícula y de la rizosfera de los sistemas experimentales se empleó el método de fenol-cloroformo para la extracción del DNA (Ver Anexo III).

Los productos de la extracción de DNA obtenidos se visualizaron en agarosa al 1% p/v, utilizando como revelador gelRed® (Ver Anexo IV).

#### **3.5.2.2 Amplificación del DNA por PCR**

Se utilizó el termociclador Biometra®, amplificando por medio de un gradiente de temperaturas la secuencia V6-V8 del gen 16S de rRNA (ver Anexo V). Los productos amplificados obtenidos se visualizaron en agarosa al 1.5% p/v.

#### **3.5.2.3 Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)**

El equipo utilizado fue el Universal Mutation Detection System de BIO-RAD®, con un gradiente de 30:60, urea:formamida (Ver Anexo VI).

## 4 ACTIVIDADES REALIZADAS

Los conocimientos teórico-prácticos adquiridos durante el servicio social, han permitido desarrollarme laboralmente en la industria farmacéutica como químico analista en Sistemas Críticos como: agua purificada nivel 1, agua purificada nivel 2, agua para fabricación de inyectables y agua potable en la fabricación de productos farmacéuticos, betalactámicos e inyectables en la empresa Sanfer desde diciembre de 2016 hasta la fecha, con una experiencia de 6 años. Para ello, se emplean los métodos generales normativos de las farmacopeas como la Farmacopea de Estados Unidos, 43ª edición, 2022 y la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 13ª edición, 2021 y la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994 “Salud ambiental, agua para uso y consumo humano- límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.” para realizar la cuantificación de los valores de pH, conductividad y carbono orgánico total y determinar cualitativamente nitratos y metales pesados de las diferentes muestras de agua.

## 5 METAS ALCANZADAS

La realización de este estudio, me permitió desarrollar herramientas para discernir y establecer objetivos SMART, es decir, objetivos específicos, medibles y alcanzables convirtiéndome en una profesionalista analítica y observadora.

Experimentalmente, me capacité en el montaje de sistemas acuapónicos, así como en el aislamiento e identificación molecular bacteriana en la rizosfera de las lechugas.

Por lo tanto, con el conocimiento adquirido he podido contribuir éticamente a la sociedad, cubriendo los criterios y lineamientos normativos en la industria farmacéutica para asegurar la calidad del paciente.

## 6 RESULTADOS Y CONCLUSIONES

### 6.1 Resultados

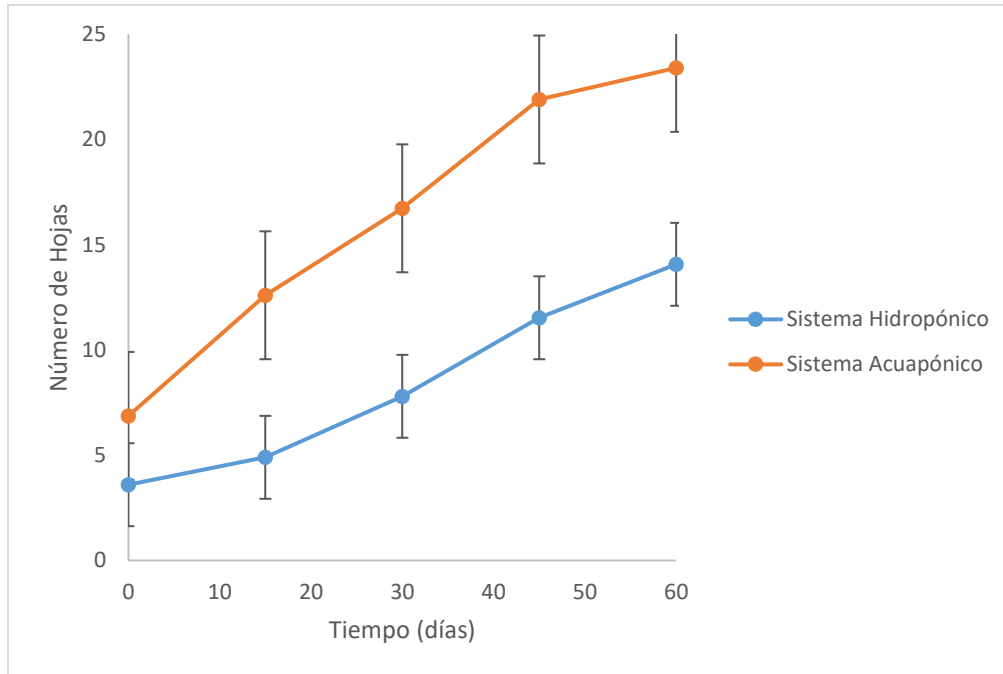
#### 6.1.1 Evaluación morfométrica

##### 6.1.1.1 Lechugas:

Se presenta, en la gráfica 1, la cantidad de hojas de lechuga que se desarrollaron a lo largo del cultivo en el sistema acuapónico e hidropónico donde en ambos casos hubo un crecimiento exponencial en el número de hojas en la población experimental de 15 lechugas.

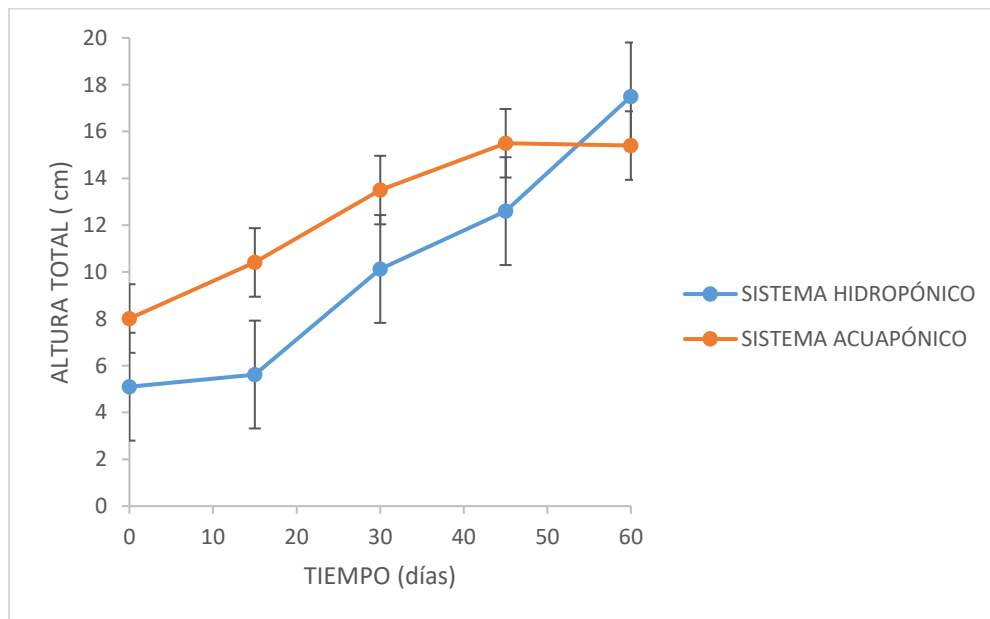
En el sistema acuapónico hubo un crecimiento exponencial de 0.28 hojas por día y durante el periodo de 60 días de cultivo la media aritmética fue de 16.3 hojas con una desviación estándar de 2.4. Mientras que, en el sistema hidropónico se obtuvo un crecimiento exponencial de 0.13 hojas por día y una media aritmética de 8.38 hojas con una desviación estándar de 2.1 (Ver Anexo VII).





Gráfica 1. Número de hojas en las lechugas crecidas en los sistemas de recirculación acuapónico e hidropónico durante 60 días de cultivo.

La gráfica 2 representa la altura total promedio de las lechugas obtenida en un periodo de 60 días, en el sistema hidropónico se obtuvo una media aritmética de 10.2 cm de altura con una desviación estándar de  $\pm 2.0$  mientras que, en el sistema acuapónico se obtuvo una media aritmética de 12.6 cm de altura con una desviación estándar de  $\pm 2$ . A los 45 días el sistema acuapónico presenta una altura total mayor, 15.5 cm, que el sistema hidropónico, 12.6 cm. (Ver Anexo VII)



Gráfica 2. Altura total de las lechugas en los sistemas de recirculación acuapónico e hidropónico durante 60 días de cultivo.

### 6.1.1.2 Peces:

Los peces japoneses utilizados durante el experimento en el sistema de recirculación acuícola tuvieron un crecimiento exponencial de 0.14 g por día mientras que, en el sistema de recirculación acuapónico tuvieron un crecimiento exponencial de 0.15 g por día (Ver Tabla 6).

En el sistema de recirculación acuícola el peso del pez japonés tuvo una media aritmética de 8.5 g con una desviación estándar de  $\pm 1.2$  en un periodo de 60 días mientras que, en el sistema de recirculación acuapónico se obtuvo una media aritmética de 8.9 g con una desviación estándar de  $\pm 1.1$ , en una población experimental de 30 peces.

Tabla 6. Peso en gramos del pez japonés en los sistemas de recirculación acuapónico (SRAq) y acuícola (SRac) durante 60 días de cultivo (n=30).

Tiempo (días)	Peso (g) de los peces en SRac	Peso (g) de los peces en SRAq
0	7.31 $\pm$ 0.9	7.32 $\pm$ 0.8
15	7.92 $\pm$ 0.9	8.23 $\pm$ 0.9
30	8.15 $\pm$ 1.0	8.52 $\pm$ 1.0
45	8.60 $\pm$ 0.7	9.15 $\pm$ 0.8
60	10.51 $\pm$ 2.6	11.40 $\pm$ 2.1

### 6.1.2 Parámetros fisicoquímicos

El agua del sistema de recirculación acuícola al inicio del experimento presentó una conductividad de 365.0  $\mu$ S/cm mientras que el agua del sistema de recirculación acuapónico presentó una conductividad de 373.8  $\mu$ S/cm, sin embargo, durante los 15, 30 y 60 días sólo hubo una mínima diferencia en promedio de 8.5  $\mu$ S/cm (Ver Anexo VIII).

En el sistema de recirculación hidropónica no se pudo interpretar la conductividad generada por los iones presentados en el agua ya que para un crecimiento óptimo de las lechugas se incluyó una solución nutritiva alta en sales provocando que el sistema presentara en promedio una conductividad de 1299.3  $\mu$ S/cm durante los 60 días de experimentación.

El agua del sistema de recirculación acuícola presentó en promedio un pH de 8.3 durante los 60 días, mientras que el sistema de recirculación acuapónico en promedio tuvo un pH de 8.4, ambos sistemas presentaron un agua alcalina, favorable para el crecimiento de las bacterias *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*.

El agua del sistema de recirculación hidropónico presentó variabilidad ya que al inicio del experimento presentó un pH alcalino de 8.5, sin embargo, a los 15 días presentó un pH ácido por las sales disueltas en la solución nutritiva. A los 30 y 60 días presentó en promedio un pH de 7.3, equilibrándose en un pH neutro.

La temperatura del agua en los tres sistemas experimentales, mostró la misma tendencia (Ver Anexo VIII) donde se mantuvo en un rango entre 13.8 °C y 19.5°C durante los 60 días de experimentación. De acuerdo con Somerville, C. y Cols, 2014, la temperatura óptima en un sistema acuapónico se presenta en un rango entre 18°C y 30°C.

En el periodo del proyecto la temperatura dependió de las condiciones ambientales del Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuernavaca.

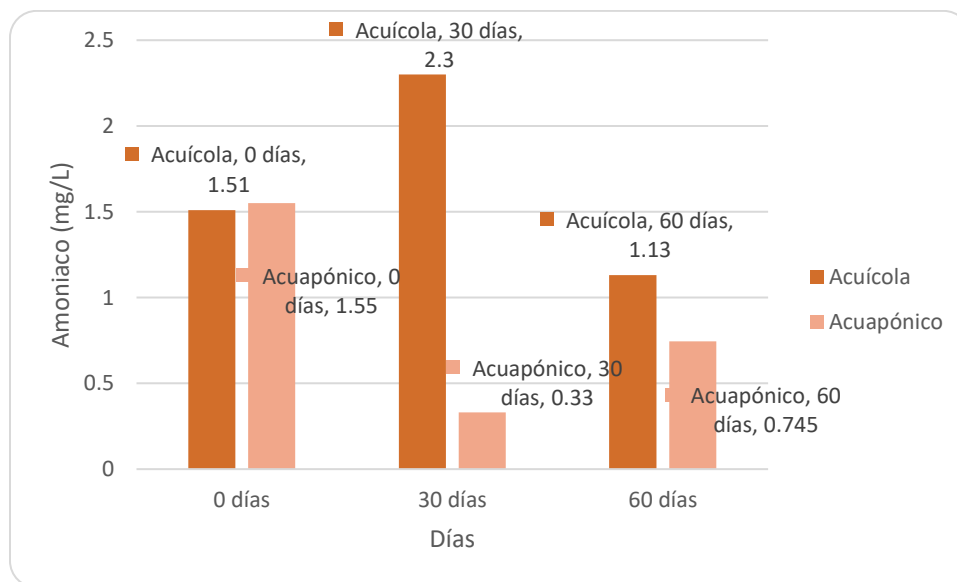
Los sólidos disueltos totales en el sistema de recirculación acuícola al inicio del experimento fueron de 187.3 ppm mientras que en el sistema de recirculación acuapónico fueron de 185.8 ppm, en ambos sistemas no hubo diferencia representativa ya que durante los 15, 30 y 60 días sólo hubo una mínima diferencia de 9.0 ppm y una media aritmética de 207.8 ppm. Sin embargo, en el sistema de recirculación hidropónico los sólidos disueltos totales al inicio del experimento fueron de 182.7 ppm, pero al agregar la solución nutritiva en el periodo de los 15, 30 y 60 días se mantuvieron los sólidos disueltos totales en un promedio de 822.5 ppm.

### 6.1.3 Calidad del agua (Compuestos nitrogenados)

En los sistemas de recirculación acuícola y acuapónico a través de los desechos de los peces el ciclo del nitrógeno inicia con el amoníaco por lo que las bacterias involucradas en el ciclo del nitrógeno requieren convertir el amoníaco tóxico a través de la oxidación a nitritos y posteriormente a nitrato para que éste pueda ser utilizado por las plantas.

Al inicio de los experimentos, el amoníaco presente en el agua de los estanques del sistema acuícola fue de 1.51 mg/L, mientras que en el acuapónico fue de 1.55 mg/L, con un coeficiente de variación de  $\pm 1.8$  lo que indica una baja variabilidad entre ambos sistemas (gráfica 3).

Sin embargo, a los 30 días el sistema de recirculación acuícola presentó 2.3 mg/L de amoníaco mientras que, el sistema de recirculación acuapónico presentó 0.33 mg/L, donde a través de la diferencia entre ambas lecturas indica una mayor variabilidad. Produciendo más amoníaco en el sistema acuícola donde solo hay presencia de peces.



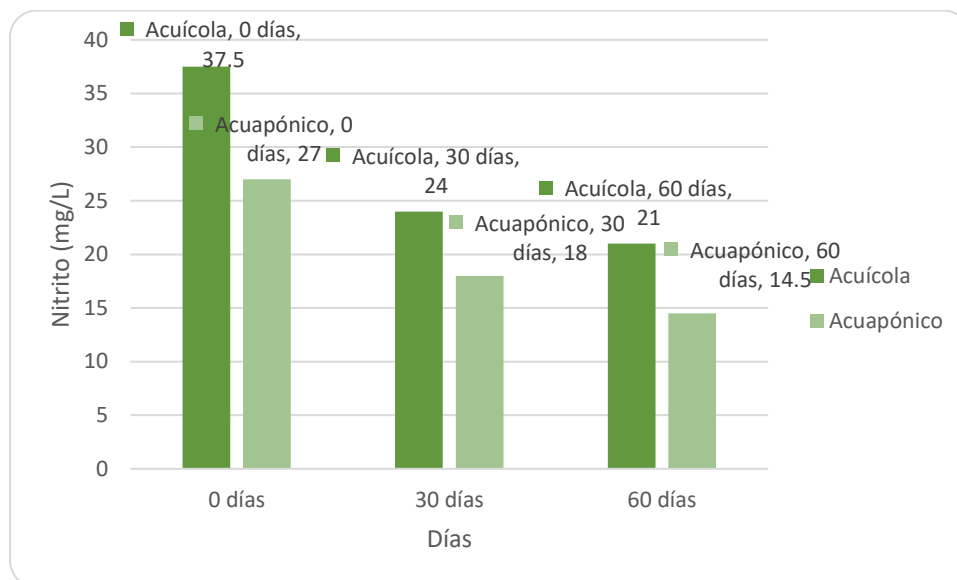
Gráfica 3. Concentración de amoníaco (mg/L) en los sistemas de recirculación acuapónico y acuícola a lo largo de un cultivo de 60 días.

A los 60 días de cultivo, la concentración de amoníaco en ambos sistemas disminuyó considerablemente, 1.13 mg/L en el sistema acuícola y 0.745 mg/L en el sistema acuapónico, con una variabilidad aún mayor en el sistema acuícola que en el acuapónico. De acuerdo con Somerville y cols, 2014 quienes determinaron que las concentraciones de amoníaco óptimas para un adecuado funcionamiento biológico de los sistemas acuapónicos deben ser menores a 1 mg/L.

Continuando con el ciclo del nitrógeno, el amoníaco es oxidado a nitrito por las bacterias oxidantes de amoníaco (*Nitrosomonas* y *Nitrosococcus*), donde durante en el experimento el nitrito en el sistema de recirculación acuícola presentó

una concentración inicial de 37.5 mg/L mientras que el sistema acuapónico presentó una concentración de 27.0 mg/L, con un coeficiente de variación de 23, dando a entender que hay una diferencia significativa en las concentraciones obtenidas inicialmente.

A los 30 días el sistema acuícola disminuyó un 36% mientras que el acuapónico disminuyó un 33.3%. A los 60 días el sistema acuícola estuvo en 21 mg/L transformando el 44% de nitrito a nitrato, en el sistema acuapónico se quedó en 14.5 mg/L transformando 46.3%, 2.3% más eficiente que el primer sistema debido a la presencia de plantas capaces de adaptarse a concentraciones altas del compuesto nitrogenado y poder transformarlo a nitratos, sin embargo, Somerville y cols, 2014 indicó que la cantidad de nitritos para que haya una óptima simbiosis entre agua, peces y lechuga debe encontrarse menor a 1 mg/L.



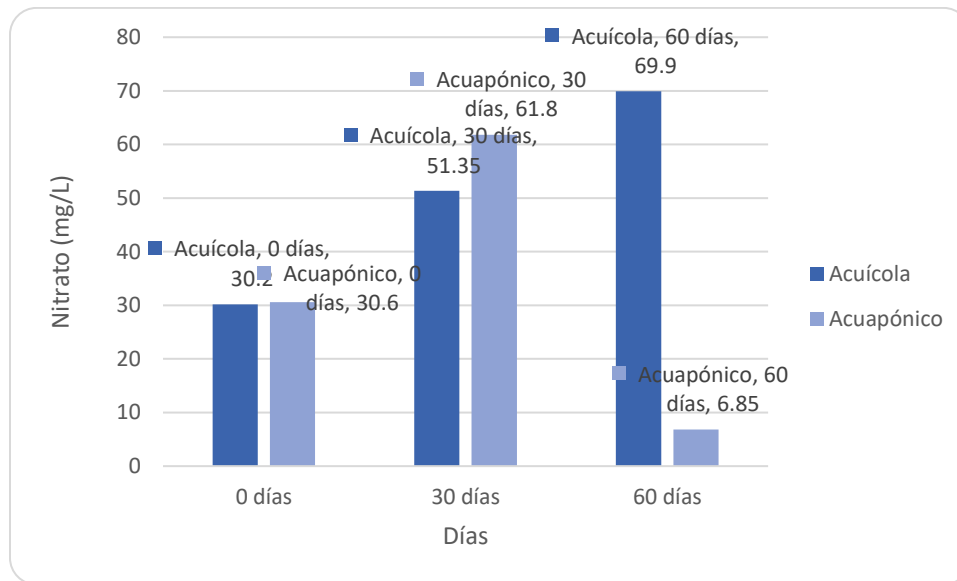
Gráfica 4. Nitrito (mg/L) en los sistemas de recirculación acuapónico y acuícola en un periodo de 60 días

El límite máximo permitido de nitrato para el consumo humano es de 50 a 150 mg/día obteniendo un 14% al consumir vegetales. La ingesta aceptable de nitratos para el consumo humano según la FAO/OMS es de 0-3.7 mg/kg de peso corporal mientras que el consumo de nitritos para la ingesta diaria aceptable es de 0-0.06 mg/kg de peso corporal (FAO, 2020), los peces pueden tolerar no más de 400 mg/L de nitrato.

Al inicio del experimento el sistema de recirculación acuícola presentó una concentración de 30.2 mg/L y el sistema de recirculación acuapónico presentó una concentración de 30.6 mg/L, con un coeficiente de variación de 0.9, es decir que la comparación entre sistemas es baja, presentando una variación menor a 1.

A los 30 días en el sistema de recirculación acuícola aumentó 21.15 mg/L en nitratos y en el sistema acuapónico 31.20 mg/L siendo aceptable para el crecimiento de los peces y las plantas. Según Somerville y cols., 2014 el rango de nitratos que debe contar un sistema acuapónico es de 5-150 mg/L.

A los 60 días en el sistema acuícola la oxidación de nitrito a nitrato fue eficiente ya que se incrementó la concentración de este compuesto a 70 mg/L, aceptable según Somerville. En el sistema acuapónico las plantas emplearon dicho compuesto nitrogenado para crecer y por ello su concentración disminuyó por debajo de 10 mg/L. En el sistema acuícola no disminuyó porque no hay presencia de lechugas, sin embargo, se mantuvo a concentraciones no tóxicas para los peces por lo que la recirculación del agua no presenta consecuencias negativas en dicho compuesto (Ver Anexo IX)



Gráfica 5. Nitrato (mg/L) en los sistemas de recirculación acuapónico y acuícola en un periodo de 60 días de cultivo.

En el sistema de recirculación hidropónico los valores de compuestos nitrogenados no pudieron ser evaluados debido a la solución de nutrientes que se utilizó en dicho sistema por lo que produjo falsos positivos evitando el conteo original de los compuestos nitrogenados presentes en el agua ajenos a las sales utilizadas.

#### 6.1.4 Análisis microbiológico.

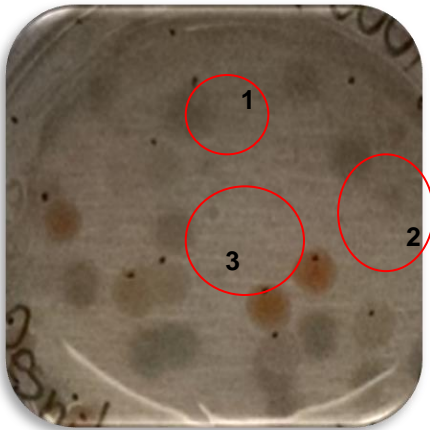
El nitrógeno amoniacal es oxidado por microorganismos quimiolitótrofos a su forma nítrica en dos pasos, el primero se denomina nitrificación, el cual consiste en la oxidación del amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) a nitrito ( $\text{NO}_2^+$ ) por bacterias oxidadoras de amonio como las *Nitrosomonas*, bacterias Gram-negativas, las cuales forman bacilos cortos o largos móviles o inmóviles con sistemas membranosos periféricos; *Nitrococcus*, bacterias Gram-negativas, son cocos grandes móviles con membranas vesiculares o periféricas; y *Nitrospira*, bacterias gram-negativa, son espirales, móviles con sistema de membranas no aparente (Kouiki, S y cols, 2011). El segundo paso es la nitratación, que es la conversión del nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) a nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) este proceso es realizado por bacterias oxidadoras de nitrito como el género *Nitrobacter*, bacterias gram-negativas, quienes forman bacilos cortos, ocasionalmente móviles (Madigan, M. y cols, 2009). La nitrificación disminuye la toxicidad de los metabolitos nitrogenados, porque el nitrato es menos tóxico y puede ser asimilado por las plantas y convertidos en proteínas (Castellanos, J, 2014).

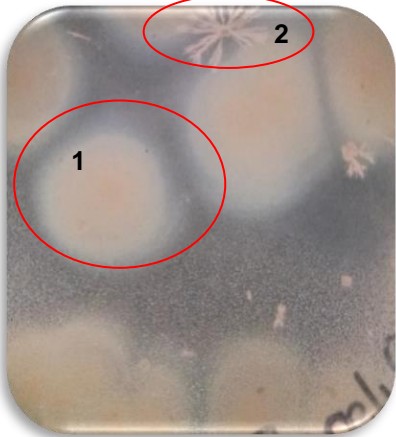
Se emplearon los medios de cultivo selectivo amonificador, nitrificante y desnitrificante para tener condiciones específicas para el crecimiento de las bacterias de interés y así poder identificar a través de su morfología la variabilidad de bacterias presentes en cada proceso de la oxidación del amonio hasta nitratos.

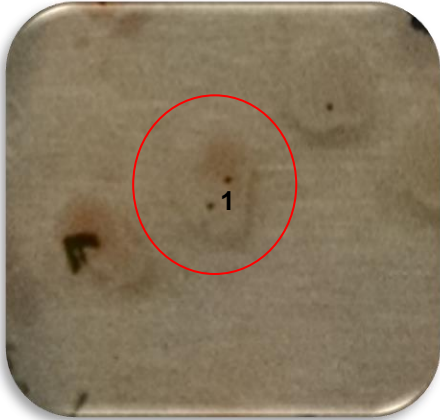
Después del crecimiento bacteriano se aisló una colonia del medio desnitrificante, bacterias capaces de oxidar el nitrato a compuestos simples (3), una colonia del medio amonificador (1) bacterias que presentan la característica de oxidar el amonio a nitritos, y una colonia aislada del medio nitrificante (1) bacterias capaces de oxidar el nitrito a nitrato (Ver Tabla 7).

El medio nitrificante y el medio desnitrificante presentan morfología colonial parecida, según Daims, H. y cols, 2015, el genoma del género *Nitrospira* puede codificar las vías para la oxidación de amoniaco como de nitrito, que se activa concomitantemente durante el crecimiento por lo que este género tiene la capacidad de realizar diversos procesos de oxidación.

Tabla 7. Descripción generalizada de las colonias en los medios de cultivo nitrificante, desnitrificante y amonificador de los diferentes sistemas de recirculación

<b>MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA</b>				
	Medio amonificador	Medio nitrificante	Medio desnitrificante	
Sistema de recirculación acuícola	Diámetro de 0.05 cm, cremosa, plana circular,	Diámetro de 0.01 cm, blanca, circular, plana, cremosa.  Diámetro 0.2 cm, transparente, circular, convexa.	Diámetro 0.01 cm, uniforme, circular, plana y cremosa. <b>(1)</b>  Diámetro 0.1 cm, transparente, irregular y plana <b>(2)</b>  Diámetro 0.07 cm, blanco, cremosa, plana e irregular <b>(3)</b>	<p><b>Colonias de medio desnitrificante</b></p> 

<p>Sistema de recirculación acuapónico</p>	<p>Diámetro 0.5 cm, circular, plana, cremosa. <b>(1)</b></p> <p>Diámetro 0.1 cm. Tipo rizoide, plano, duro <b>(2)</b></p>	<p>Diámetro 0.03 cm, circular, plana, blanca.</p> <p>Diámetro 0.2 cm, colonia blanca, convexa y dura.</p> <p>Diámetro 0.01 cm, colonia blanca, cremosa y plana.</p>	<p>Diámetro 0.15 cm, uniforme, circular, blanca, convexa, dura.</p> <p>Diámetro 0.2 cm, blanca cremosa, circular plana.</p> <p>Diámetro 0.02 cm, cremosa, blanca, plana y circular.</p> <p>Diámetro 0.3 cm, cremosa, irregular, blanca, plana.</p>	<p align="center"><b>Colonias de medio amonificador</b></p> 
--	---	---	--	---

<p>Sistema de recirculación hidropónico</p>	<p>No presentó colonias</p>	<p>Diámetro 1.2 cm, no uniforme, transparente, y plana. <b>(1)</b></p>	<p>Diámetro 0.3 cm, irregular, blanca, plana. Diámetro 0.2 cm, transparente, uniforme, convexa.</p>	<p align="center"><b>Colonias de medio nitrificante</b></p> 
---	-----------------------------	--	---	---



**6.1.4.1 Extracción de DNA de agua, la rizosfera y la biopelícula de los sistemas de recirculación**

Las extracciones de DNA metagenómico, se realizaron al inicio del experimento, así como a los 60 días de este.

En la figura 10 se presentan los productos de extracción de sistema acuapónico al inicio del experimento, que se obtuvieron en una electroforesis de agarosa al 1% (Ver Anexo IV). En todos los casos, se observaron bandas de alto peso molecular de 23.1 kb. Se comparó contra el marcador molecular Fago/HindIII que se obtiene a partir de DNA del fago λ digerido con HindIII con bandas entre 0.125 kbp y 23 kbp. se utilizó para apreciar cualitativamente las bandas de la extracción.

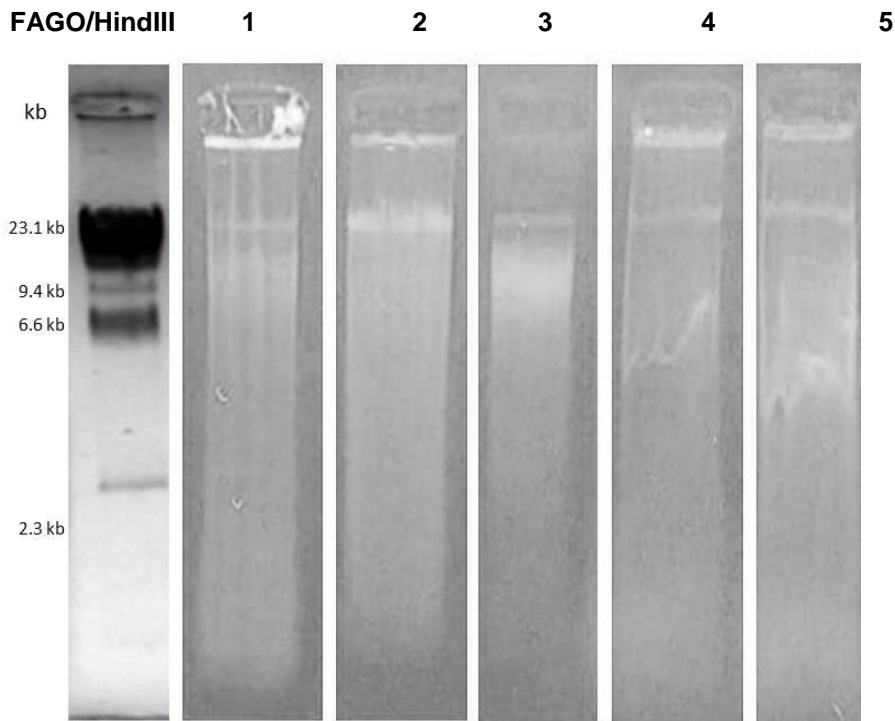


Figura 10. Productos de extracciones de DNA 1) Biopelícula acuapónica.T0 2) Rizosfera acuapónica Tf  
3)Rizosfera acuapónica T0 4) Agua Acuapónica T0 5) Agua Acuícola T0

La figura 11, representa los productos de extracción de la biopelícula, rizosfera y agua de los sistemas acuícola, hidropónico y acuapónico. Se observa que la banda es de alto peso molecular, aproximadamente 23.1 kb.

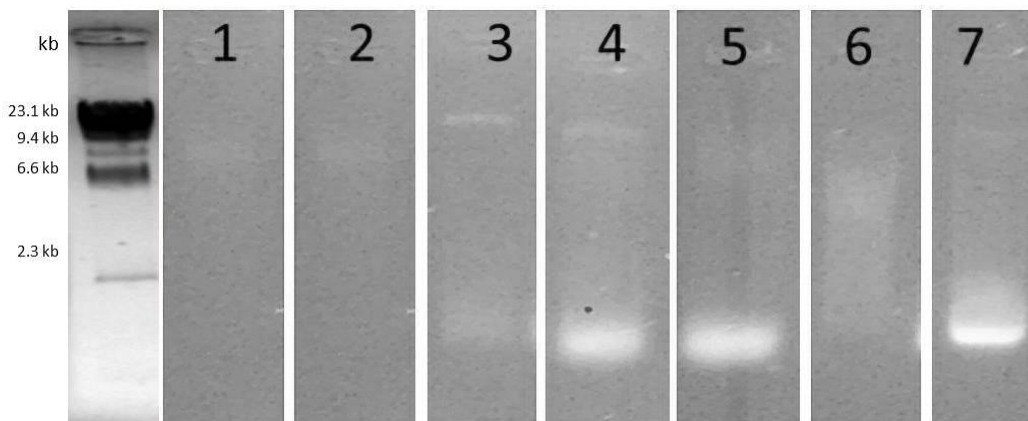


Figura 11. Productos de extracción de DNA tiempo final. Marcador molecular  $\lambda$ /HindIII 1) Biopelícula acuícola 2) Biopelícula hidropónica 3) Agua acuapónica 4) Agua hidropónica 5) Agua acuícola 6) Biopelícula acuapónica 7) Rizosfera hidropónica

#### 6.1.4.2 Extracción metagenómica del medio de cultivo desnitrificante

Se extrajo DNA metagenómico de los medios selectivos, haciendo diversas electroforesis y obteniendo únicamente del medio desnitrificante en los diferentes sistemas de recirculación. Únicamente fue posible extraer DNA metagenómico a partir del medio selectivo desnitrificante del sistema acuícola y del acuapónico.

#### 6.1.4.3 Amplificación por PCR

A todos los productos de extracción de DNA, se les realizó la amplificación de la región V6-V8 del gen ribosomal 16S con un clamp de GC, utilizando primers 968GCf y 1401r. Se usó el marcador de DNA 100 bp ladder el cual cuenta con fragmentos de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 bp. Se utilizó un termociclador Biometra<sup>®</sup> con los tiempos de reacción, temperatura y número de ciclos especificados en el Anexo V.

Se hizo una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de las muestras que se amplificaron:

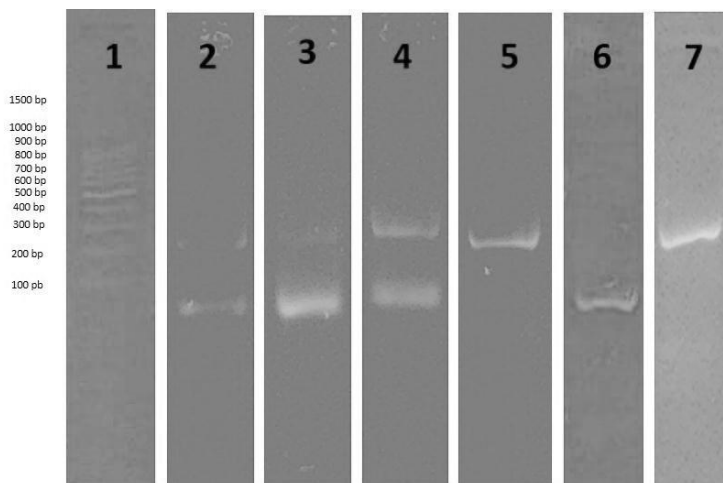


Figura 12. Productos amplificados de la secuencia V6-V8 del gen 16S de rRNA de las cepas de los medios selectivos y las colonias aisladas. 1) Marcador molecular 2) Medio selectivo desnitrificante hidropónico 3) colonia desnitrificante aislada del medio acuícola 4) colonia aislada desnitrificante medio acuapónico 5) Medio selectivo desnitrificante biopelícula acuapónico 6) Medio selectivo desnitrificante medio acuapónico 7) Medio selectivo desnitrificante medio acuícola.

Las electroforesis de la amplificación por PCR de las muestras iniciales y finales del DNA metagenómico (Figuras 13 y 14 respectivamente).

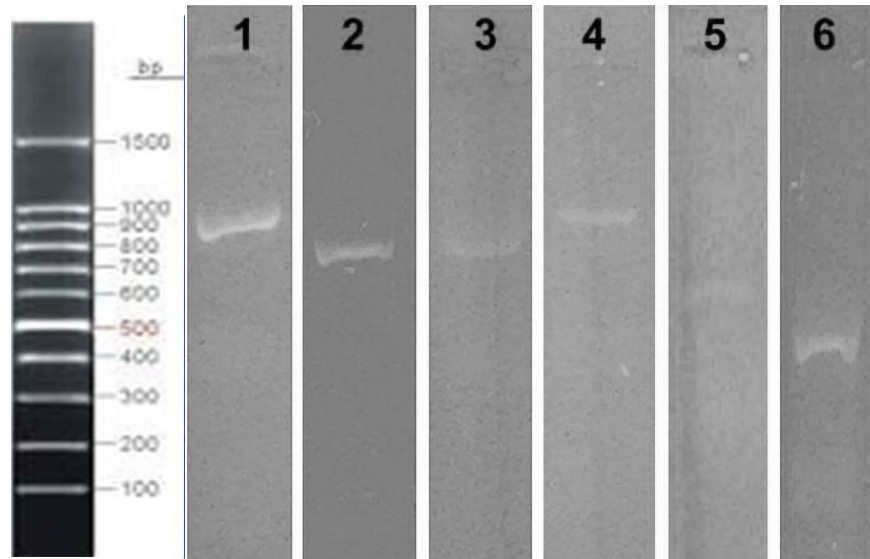


Figura 13. Productos amplificados de la secuencia de V6-V8 del gen 16S de rRNA del tiempo cero de los sistemas de recirculación 1) Agua del sistema de recirculación acuícola 2) agua del sistema de recirculación hidropónico 3) agua del sistema de recirculación acuapónico 4) biopelícula del sistema de recirculación hidropónico 5) Biopelícula del sistema de recirculación acuicola 6) Rizosfera del sistema de recirculación acuapónico.

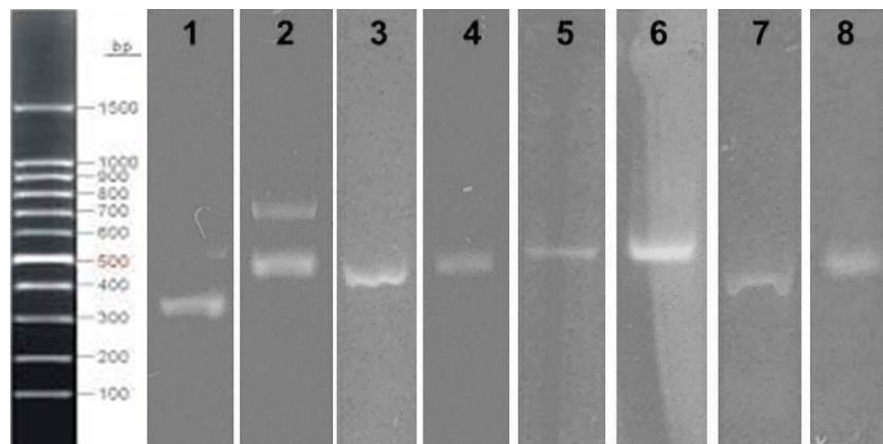


Figura 14. Productos amplificados de la secuencia de V6-V8 del gen 16S de rRNA del tiempo final de los sistemas de recirculación. 1) Agua del sistema de recirculación acuapónico 2) Agua del sistema de recirculación acuicola 3) Agua del sistema de recirculación hidropónico 4) Biopelícula del sistema de recirculación acuapónico 5) Biopelícula del sistema de recirculación acuicola 6) Biopelícula del sistema de recirculación hidropónica 7) Rizosfera del sistema de recirculación hidropónico 8) Rizosfera del sistema de recirculación acuapónico.

#### 6.1.4.4 Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante DGGE

El DGGE se elaboró en un gradiente 30-60% de gel poliacrilamida, se corrieron las muestras con la siguiente nomenclatura:

T0 (tiempo inicial del cultivo),  
Tf (tiempo final del cultivo=60 días),  
Agua del sistema acuícola T0 (Ac T0),  
Agua del sistema acuícola Tf (Ac Tf),  
Agua del sistema acuapónico T0 (Aq T0),  
Agua del sistema acuapónico Tf (Aq Tf),  
Agua del sistema hidropónico T0 (H T0),  
Agua del sistema hidropónico Tf (H Tf),  
Biopelícula del sistema acuícola y acuapónico T0 (Biopelíc ac/aq T0),  
Biopelícula del sistema acuícola Tf (Biopelíc Ac Tf),  
Biopelícula del sistema acuapónico Tf (Biopelíc Aq Tf),  
Biopelícula del sistema hidropónico T0 (Biopelíc H T0),  
Biopelícula del sistema hidropónico Tf (Biopelíc H Tf),  
Rizosfera del sistema hidropónico/acuapónico T0 ( Rizosf H/Aq T0),  
Rizósfera del sistema hidropónico Tf (Rizosf H Tf),  
Rizosfera del sistema acuapónico Tf (Rizosf Aq Tf)

Y de los medios selectivos de cada sistema de recirculación:

Desnitrificante acuapónico (DAq),  
Desnitrificante acuícola (DAc),  
Desnitrificante Hidropónico (DH).

El DGGE se corrió a un voltaje de 85V durante 16 horas, y posteriormente se tiñó con nitrato de plata para observar la migración de las huellas moleculares.

Para la comparación de las comunidades bacterianas en el agua, la rizosfera y la biopelícula en los diferentes sistemas de recirculación se utilizó el análisis de los perfiles de bandeado en los geles de DGGE, aportando información bacteriana en general.

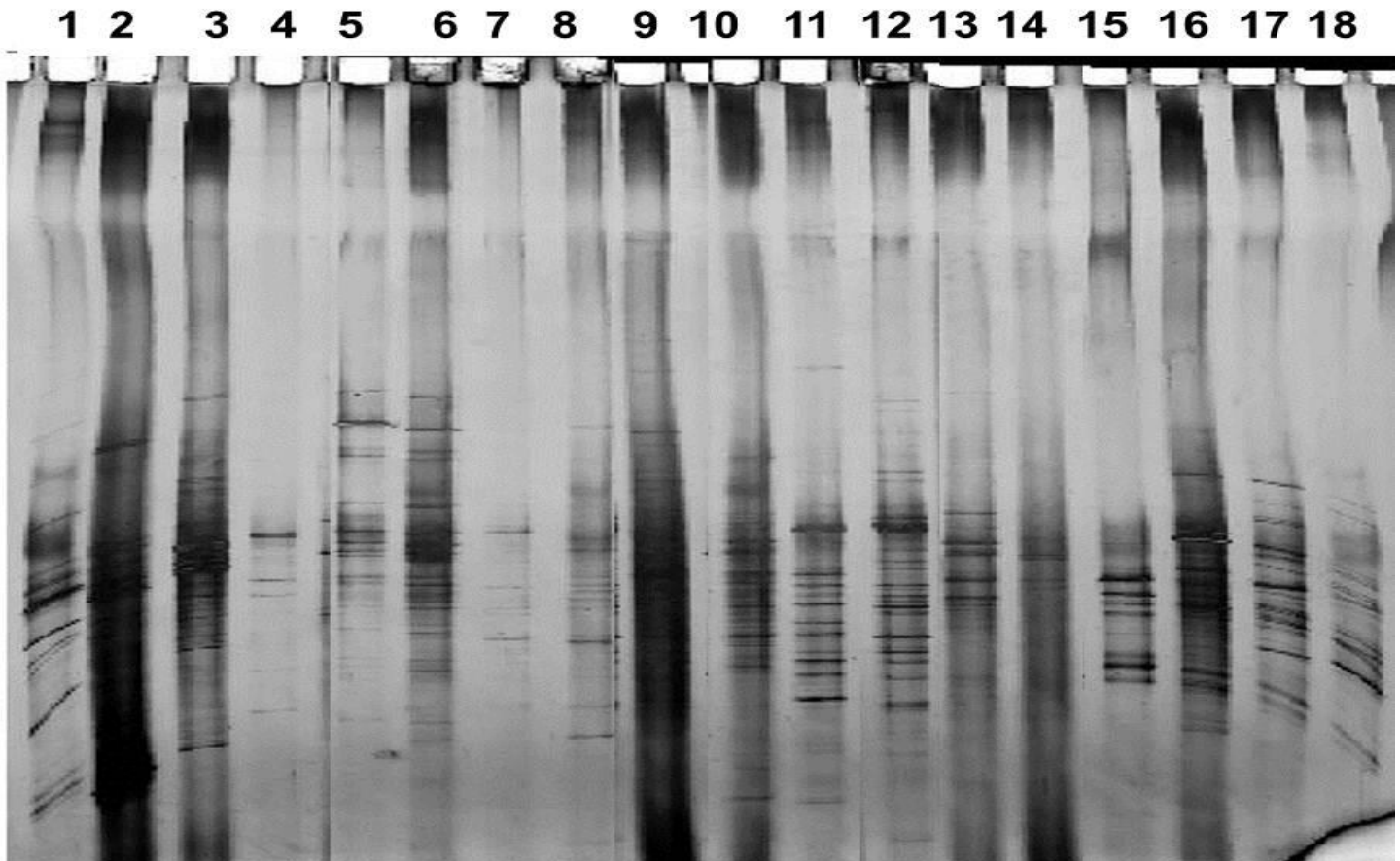


Figura 15. Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante 30:60% con productos amplificados por PCR región V6-V8 del gen 16S rRNA. Carril 1) Ac T0 2)Ac Tf 3)Aq T0 4) Aq Tf 5) H T0 6)H Tf7) Biopelíc Ac/Aq T0 8)Biopelíc Ac Tf 9)Biopelíc Aq Tf 10)Rizosf H Tf 11)Rizosf Aq Tf 12)Rizosf H/Aq To 13) Biopelíc H T0 14) Biopelíc H Tf 15)DAq 16)DH 17)DBAq 18)DAc

Se utilizó el programa PyElph, que crea una matriz de similitud a partir de la imagen generada del DGGE, dependiendo de la ausencia o presencia de bandas respectivamente a una distancia de migración determinada por cada carril (Figura 16). La matriz de distancias genéticas se analizó por el método UPGMA, el cuál forma clusters jerárquicos de forma aglomerada, comparando los patrones de banda y construye un dendrograma enraizado comenzando por los dos perfiles más similares y va adicionando ramas al cluster dependiendo de la distancia (diferencia), que existe entre los patrones restantes.

En el carril 1 y 2 del agua del sistema acuícola sólo mantuvo una banda presente en ambos tiempos. En el carril 3 y 4 del agua del sistema acuapónico se mantienen 4 bandas similares al agua del sistema acuícola en el tiempo inicial, presentó dos bandas diferentes al tiempo inicial que el sistema acuícola. Al tiempo final sólo presentó dos bandas estimando que son bacterias que ayudan al crecimiento de las lechugas y los peces, en el carril 1 y 15 una banda se encuentra a la misma altura que el medio desnitrificante acuapónico, atribuyendo que es una comunidad bacteriana desnitrificante presente al tiempo final en el agua del sistema acuapónico.

En el carril 5 el agua en el sistema hidropónico presenta una banda que sólo se encuentra en los sistemas de recirculación que presentan lechugas, a tiempo inicial. Mientras en el carril 6 del tiempo final cuatro comunidades bacterianas se encuentran presentes al tiempo final de todos los sistemas de recirculación tanto en la rizosfera, agua como en la biopelícula. La sexta banda presente en la biopelícula del tiempo final (carril 14) del sistema acuapónico es semejante una comunidad bacteriana desnitrificante. Las bacterias desnitrificantes se presentan al tiempo final de los sistemas de recirculación (Ver Figura 16).

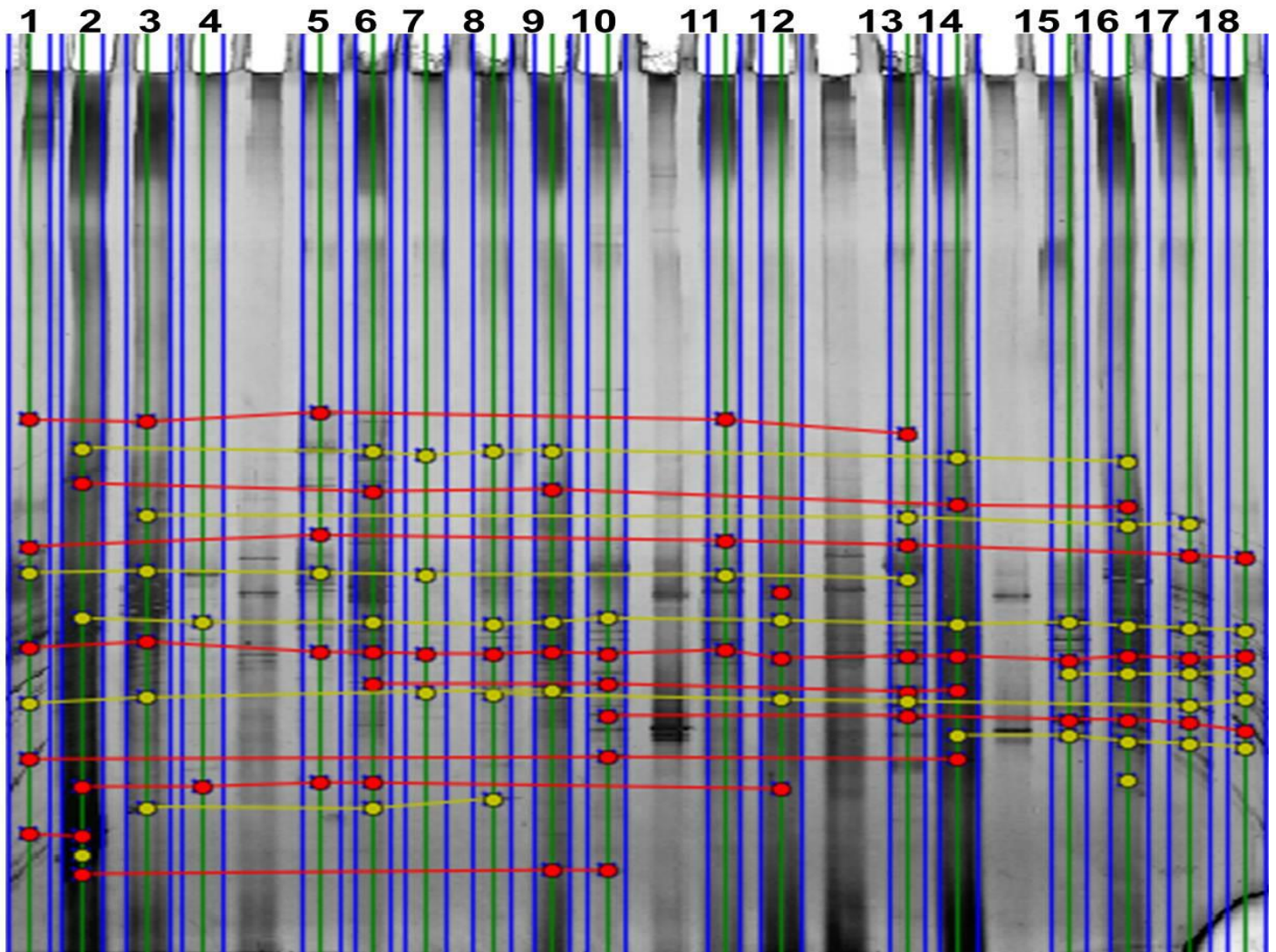


Figura 16. Bandas seleccionadas en Pyelph de la electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante. Carril 1) Ac T0 2) Ac Tf 3) Aq T0 4) Aq Tf 5)H T0 6) H Tf 7) B Ac T0 8) B Ac Tf 9) R H Tf 10) R Aq Tf 11) B H T0 12) B H Tf 13) R Aq T0 14) B Aq Tf 15) D Aq 16) D H 17) D BAq 18) D Ac.

En el dendrograma de los perfiles de bandeo (Ver Figura 17), se compararon las huellas moleculares de las comunidades bacterianas presentes en las muestras de agua, la rizosfera y la biopelícula en los diferentes sistemas de recirculación, al inicio y al tiempo final del experimento. La biopelícula hidropónica y el agua en el sistema hidropónico iniciales, presentaron una similitud del 91%, es decir que inicialmente tuvieron la misma comunidad bacteriana, sin embargo, al final del ensayo, la biopelícula hidropónica tuvo más relación con la comunidad bacteriana del agua en el sistema acuapónico al tiempo final. La rizosfera en el sistema acuapónico del tiempo final presenta una mayor similitud a los medios de desnitrificación, debido a que en este sistema hay un mayor crecimiento de bacterias desnitrificantes como de nitrificantes ya que el nitrato es absorbido por las plantas regresando en forma de nitratos a los peces. Al parecer, hubo crecimiento de comunidades bacterianas en los sistemas de recirculación al final del experimento, en comparación al inicio, con un porcentaje de similitud del 75%.

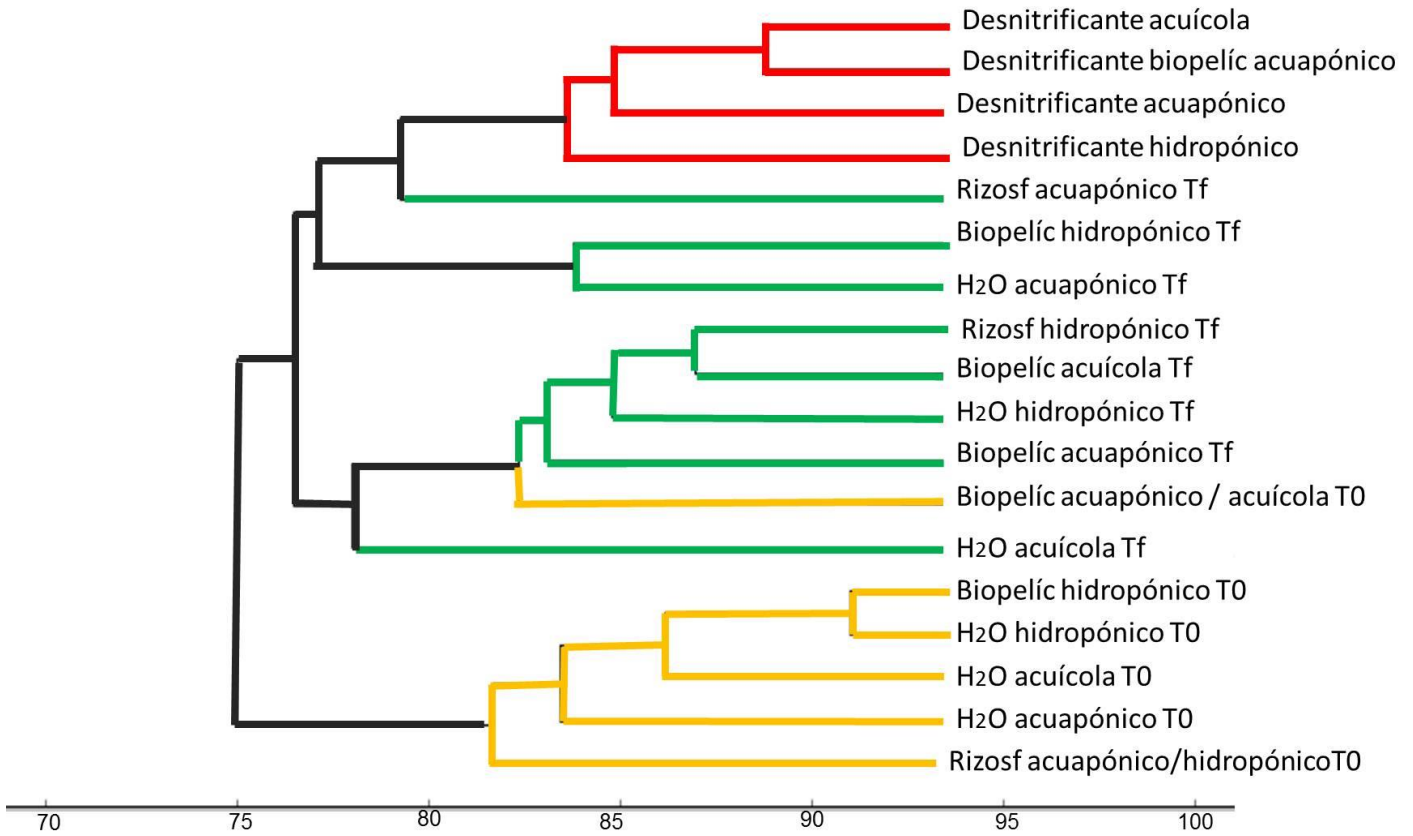


Figura 17. Dendrograma UPGMA de la rizosfera, la biopelícula y el agua de los sistemas de recirculación hidropónico, acuícola y acuapónico. Color amarillo tiempo inicial, color verde tiempo final, color rojo medio selectivo desnitrificante.

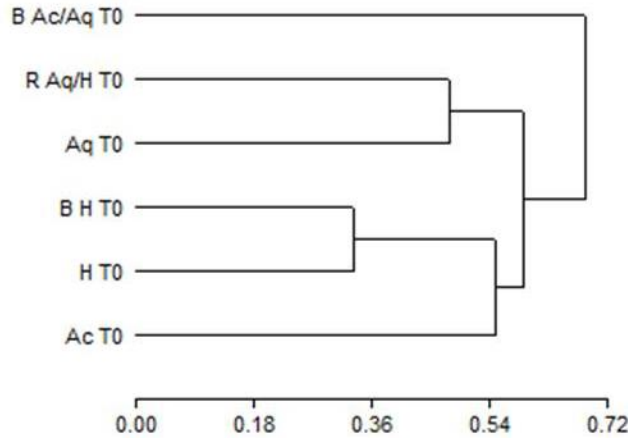


Figura 18. Dendrograma de distancia Dice comparando el tiempo inicial de los sistemas de recirculación.

Se utilizó el software Info-Gen para comparar la distancia genética mediante el índice de similitud de Dice, a la que se asignan valores de 0 y 1 a cada carril dependiendo de la ausencia o presencia de bandas respectivamente a una distancia de migración determinada por carril.

*Dice (sqrt(1-S))*

	Ac T0	Aq T0	H T0	B Ac/Aq T0	B H T0	R Aq/H T0
Ac T0	0.00					
Aq T0	0.75	0.00				
H T0	0.89	0.94	0.00			
B Ac/Aq T0	0.94	0.94	0.43	0.00		
B H T0	0.88	0.94	0.19	0.39	0.00	
R Aq/H T0	0.63	0.58	0.89	0.94	0.88	0.00

Figura 19. Matriz de triángulo inferior de similitudes y distancias para variables cuantitativas

El análisis en los sistemas de recirculación al inicio del experimento, con una matriz de distancia triangular inferior (Ver Figura 19), permite observar que la biopelícula en el sistema hidropónico y el agua en el sistema hidropónico son los perfiles con mayor similitud, por tener la menor distancia entre ellos. Por otro lado, la biopelícula del sistema acuapónico y acuícola presenta mayor distancia del agua del sistema acuícola y del sistema acuapónico, haciendo evidente la diferenciación de las comunidades bacterianas en ambos sistemas cuando se inicia el experimento.



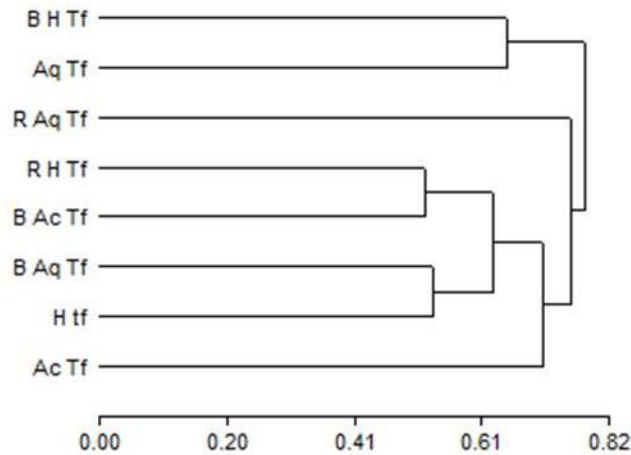


Figura 20. Dendrograma de distancia Dice comparando el tiempo inicial de los sistemas de recirculación.

Para visualizar las variables entre los sistemas (Ver Figura 20), permitió la generación de una matriz triangular inferior para comparar las similitudes y distancias entre los sistemas experimentales, observando que la biopelícula del sistema hidropónico y el agua en el sistema acuícola presentan un perfil similar por tener la menor distancia entre ellos.

*Dice (sqrt(1-S))*

	Ac Tf	Aq Tf	H tf	B Ac Tf	R H Tf	R Aq Tf	B H Tf	B Aq Tf
Ac Tf	0.00							
Aq Tf	0.80	0.00						
H tf	0.71	0.94	0.00					
B Ac Tf	0.93	0.69	0.77	0.00				
R H Tf	0.67	1.00	0.67	0.76	0.00			
R Aq Tf	0.93	0.69	0.93	0.58	0.85	0.00		
B H Tf	0.94	0.52	0.87	0.51	0.86	0.61	0.00	
B Aq Tf	0.82	0.94	0.58	0.86	0.67	0.86	0.94	0.00

Figura 21. Matriz de triángulo inferior de similitudes y distancias para variables cuantitativas

Se aprecia también, que la distancia entre el agua del sistema acuapónico y la rizosfera del sistema hidropónico es la más grande de todas las condiciones experimentales, lo que sugiere un perfil bacteriano completamente diferente, es decir que podría no tener relación alguna con las comunidades bacterianas presentes en cada banda.

## 6.2 Conclusiones

### 6.2.1 Crecimiento de la lechuga y pez

De acuerdo a la evaluación morfométrica de *Lactuca sativa L.*, el sistema acuapónico favoreció el crecimiento exponencial en 45 días, esto implica que aumentaría la sustentabilidad evitando la erosión ya que no utiliza suelo para el crecimiento de las hortalizas.

El sistema hidropónico presentó un crecimiento lento de las lechugas a pesar que las condiciones nutritivas estuvieron controladas.

Los peces japoneses, *Carassius auratus*, presentaron mayor biomasa en el sistema acuapónico, en relación al acuícola.

Se considera óptimo manejar un sistema de recirculación acuapónico para producción sincrónica de *Lactuca sativa L.* y de *Carassius auratus*, ya que sería posible obtener lechugas en menor tiempo de producción y tamaño adecuado, sino peces con mayor biomasa a menor tiempo. Así se evitaría la acumulación de amoníaco en los estanques de peces y la erosión de la tierra por la producción continua de hortalizas.

### 6.2.2 Calidad del agua y correlación con bacterias del ciclo del nitrógeno

El sistema de recirculación acuapónico mantuvo la temperatura óptima (de 14 a 19°C) y el pH de 8, esencial para la producción de bacterias involucradas en el proceso de nitrificación.

El sistema de recirculación acuapónico para la producción de lechuga (*Lactuca sativa L.*) y de pez japonés (*Carassius auratus*), cuenta con la capacidad para producir peces con alta biomasa, mantener la calidad del agua y producir una vegetación rentable utilizando los desechos de los peces disueltos en el agua modificados por las bacterias nitrificantes, desnitrificantes y amonificadoras. convirtiéndose en una simbiosis en armonía para la vegetación, peces y bacterias.

### 6.2.3 Determinación de la estructura de las comunidades bacterianas

Las comunidades bacterianas presentes en el tiempo inicial en todos los sistemas de recirculación, exhiben mayor similitud en el agua, compartiendo 3 bandas que desaparecen en el tiempo final a excepción del sistema hidropónico. Dicha banda se presenta al inicio y a los 60 días.

La biopelícula del sistema acuapónico presenta mayor diferencia en las comunidades bacterianas a los 60 días del cultivo en relación con el inicio del mismo, presentando una banda identificada en el medio desnitrificante. Posiblemente se trate de una comunidad bacteriana desnitrificante.

Al inicio de los ensayos, se observa un perfil muy parecido entre la biopelícula y el agua del sistema hidropónico, sin embargo, para el caso de los sistemas acuícolas y acuapónico, hay diferencias entre la biopelícula y el agua de ambas condiciones, por lo que las diferencias de las comunidades bacterianas iniciales podrían atribuirse a la presencia de peces (cultivo acuícola y acuapónico)

Al final de los experimentos, la biopelícula del sistema hidropónico y el agua en el sistema acuícola, se comportaron de manera similar a cuando se iniciaron los mismos, ya que sus perfiles fueron parecidos por tener la menor distancia entre ellos. Por otra parte, el agua del sistema acuapónico y la rizosfera del sistema hidropónico, por tener la distancia mayor, presentaron un perfil completamente diferente, compartiendo solamente una banda a los 60 días de cultivo.

## **7 RECOMENDACIONES**

Para una mayor evaluación de la composición en las comunidades bacterianas se recomienda realizar pruebas bioquímicas a las bacterias aisladas de los medios nitrificantes, desnitrificantes y amonificadores.

Hacer cultivos aislados de las bacterias relacionadas con el ciclo del nitrógeno, para obtener DNA genómico y así poder secuenciar las bandas presentes e identificar las bacterias involucradas en cada proceso.

Estandarizar el método de extracción de DNA metagenómico para los medios de cultivo nitrificante y amonificador.

Estandarizar el porcentaje de gradiente para mejorar el arrastre y visualización de las bandas en el DGGE

Aplicar los sistemas acuapónicos en ensayos con peces comestibles para comparar el crecimiento y la producción de biomasa de los animales, con el de las hortalizas.

Utilizar plataformas de secuenciación masiva de alto rendimiento para muestras metagenómicas.

## 8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Beltrano, J., Gimenez, D., 2015. "Cultivo en hidroponía". Editorial de la Universidad Nacional de La Plata. 1era. Edición: 9-15.
- Bent, J., Dahlstrom, P., 1981. "Los peces de agua dulce de España y Europa". Editorial Omega. 1ª edición: 132-135
- Brugère, C., Ridler, N., 2004. "Global aquaculture Outlook in the next decades: an analysis of national aquaculture production forecasts to 2030". FAO Fisheries Circular no. 1001.
- Campos P. Rosa, Alonso, L. Alejandro, Avalos C. Dora A., Asiasin, H. Alberto, Reta M. Juan L., 2013. "Caracterización fisiológica de un efluente salobre de tilapia en acuaponía." Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas No.6: 939-950.
- Canovas, F., Magna, J., 1999. "Cultivos sin suelo: Hidroponía". En técnica de producción de frutas y hortalizas en los cultivos protegidos del sureste español. Editorial Instituto de la Caja Rural de Almería. 1era. Edición: 199-215
- Castellanos, J., 2014. "Caracterización de bacterias oxidadoras de amonio aisladas del humedal de la planta de tratamiento de aguas residuales de la Universidad de Boyacá". Investigación Innovación Ingeniería. Facultad de Ciencias e Ingeniería; 82-94
- Chávez, M. C., 1993. "El estado actual el agua en el de la acuicultura en México y perfiles de nutrición y alimentación". FAO 8.
- Daims, H., Lebedeva, E, Pjevac P., 2015. "Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria". Nature 528, 504-509.
- Davidson, J., May, T., Good, C., Waldrop, T., Kenney, B., Fyhn, B., Summerfelt, S., 2016. "Production of market-size North American strain Atlantic salmon *Salmo salar* in a land-based recirculation aquaculture system using freshwater". Aquacultural Engineering 74: 1-16
- Diduch, M., Polkowska, Z. Namiesnik, J., 2016. "The role of heterotrophic plate count bacteria in bottled water quality assessment". Food Control 61: 188-195
- Edinson, W., Moreno, S., Zafra, A., 2014. "Sistema acuapónico del crecimiento de lechuga, *Lactuca sativa*, con efluentes de cultivo de tilapia". REBIOL 34 (2): 60-72
- Endut, A., Jusoh, A., Ali, N., Wan, W.B., Hassan, A., 2009. "A study on the optimal hydraulic loading rate and plant ratios in recirculation aquaponic system". Bioresource Technology 101: 1511-1517.
- FAO 2022. Año Internacional de la Pesca y la Acuicultura artesanales 2022, Plan de Acción Mundial [en línea] Citado domingo 13 de febrero de 20220 <https://www.fao.org/3/cb4875es/cb4875es.pdf>
- FAO. 2020. "El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020". La sostenibilidad en acción. Roma.
- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) 13 ed. México; 2021 "Sistemas Críticos": 661-676
- Garza, M.D., Vázquez, M.J., Varela, M., 2016. "Marine aquaculture and environment quality as perceived by Spanish consumers. The case of shellfish demand". Marine Policy 24: 1-5
- Gorder, S., 2003. "Small-Scale Aquaculture and Aquaponics". Aquaponic Journal VII (3): 14-17
- Graber, A., Junge, R., 2008. "Aquaponic Systems: Nutrient recycling from fish wastewater by vegetable production". Desalination 246: 147-156
- Harmon, T. 2003. "NFT aquaponic systems: a closer look". Aquaponics Journal. 31:8-11

Hatayama, R., Takahashi, R., Ohshima, M., Shibasaki R., Tokuyama, T., 2000. "Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase from an Ammonia Oxidizing Bacterium, *Nitrosomonas* sp. K1: Purification and Properties". Journal of bioscience and bioengineering 90(4):426-430

Hsu T.K, Chen J.S, Hsu B. M., Chen Y.P, Leu T.H, Huang T.Y, 2018. "Application of modified JDP-DGGE-based molecular genotyping method to predict *Acanthamoeba* genotype and to analyse community diversity in aquatic environments" Parasitology Research 117: 437-446

Instituto Nacional de la Economía Social, 2018. Acuicultura, historia y actualidad en México [en línea] Citado martes 15 de febrero de 2022 <https://www.gob.mx/inaes/es/articulos/acuicultura-historia-y-actualidad-en-mexico?idiom=es>

Jason J. Danaher, R., Shultz, C. Rakocy, J., Bailey, D., 2013. "Alternative Solids Removal for Warm Water Recirculating Raft Aquaponic Systems". World Aquaculture Society 44(3): 374-383

Kottelat, M., Freyhof, J., 2007. "Handbook of European freshwater fishes". Editorial Kottelat: 646-700

Kouki, S., Saidi N, Hanssen, A., 2011. "Isolation and characterization of facultative mixotrophic ammonia-oxidizing bacteria from constructed wetlands." Journal of Environmental Science, 23(10), 1699-1708

Mateus, J., 2009. "Acuaponía: hidroponía y acuicultura, sistema integrado de producción de alimentos". Red Hidroponía 44: 7-10

McMurtry, M., Sanders, D., Patterson, R., Nash, A., 1993. "Yield of tomato irrigated with recirculation aquaculture water". Journal of Productive Agriculture 6: 429-432.

M.J. McPherson, S.G. Moller, 2000. "PCR" Oxford, Ingraterra. Bios Scientific Publishers Limited

Monaldi, E., 1995. "Principios de Fisiología Vegetal". Ediciones Sur: 298-300

Muñoz, M., 2012. "Sistemas de recirculación acuapónicos". Informador Técnico 76:123-129

Rabanal, HR., 1998. " Fisheries development project" División de Políticas y Economía de la pesca y la Acuicultura: 6-7

Rahman, M., 2005. "As i see it. Futuristic environment-friendly technologies for growing plants". Aquaponics Journal. 39: 44-45

Rakocy, J., Hargreaves, J., 1993. "Integration of vegetable hydroponics with fish culture: a review". Tehniques of modern aquaculture 1: 112-136

Rakocy, J., Shultz, R., Bailey, D., Thoman, E., 2004. "Aquaponic production of tilapia and basil: comparing batch and staggered cropping system". Acta Horticulturae 648: 63-69

Ramos, C., 2006. "Acuaponics Guadalajara". Aquaponics Journal. 40: 12-13

Resh, H., 2001. "Cultivos hidropónicos. Nuevas técnicas de producción". Ediciones Mundi-Prensa, 5ta. Edición

Rijjn, J., 2014. "Waste treatment in recirculating aquaculture systems". Aquacultural Engineering 53: 49-56

Rodicio, M.R, Mendoza, M.C, 2004. "Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica" Enfermedades Infecciones Microbiología Clínica 22: 238-245

Rueda, G. Miguel F, 2011. "Breve Historia de una gran desconocida: La acuicultura". Eubacteria: especial biología marina. 26: 1-2

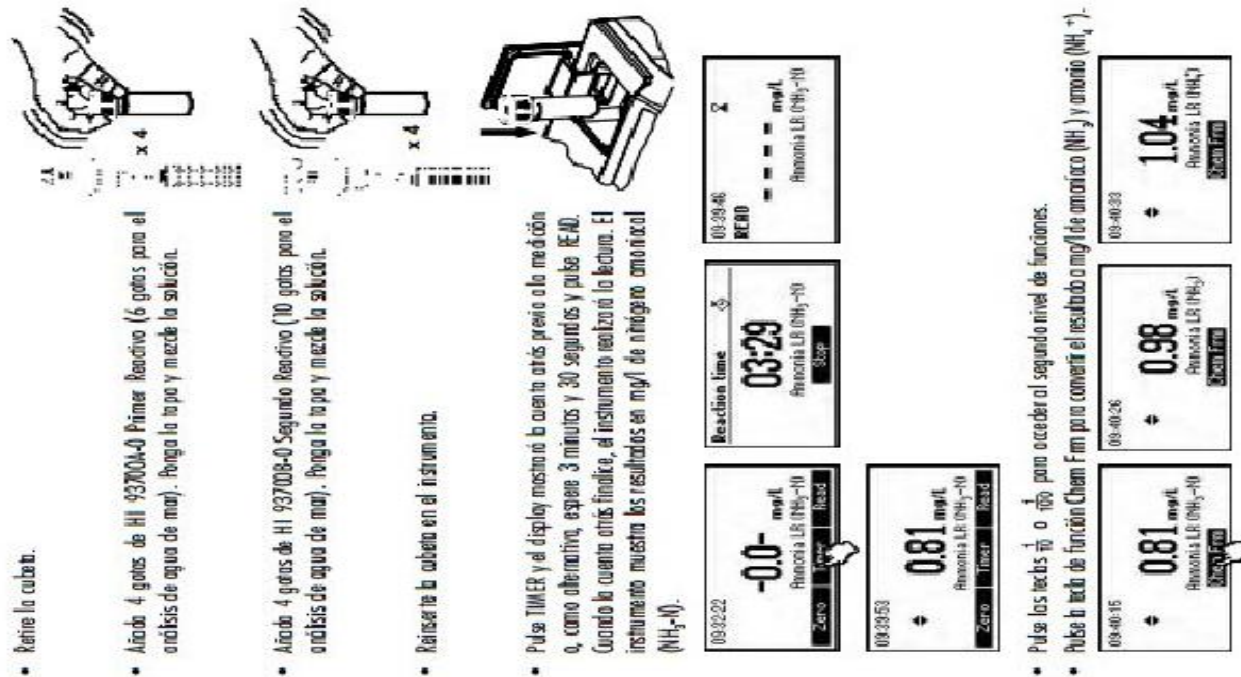
SADER,2015. "Acuicultura, el cultivo de pescados y mariscos" Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural [En línea] Citado el 15 de febrero 2022 <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/acuicultura-el-cultivo-de-pescados-y-mariscos>

- Seawright, D., Stickney, R., Walker, R., 1998. "Nutrient dynamics in integrated aquaculture-hydroponics systems". *Aquaculture* 160: 215-237
- Selock, D., 2003. "An introduction to aquaponics: the symbiotic culture of fish and plants". Rural Enterprise and Alternative Agricultural Development Initiative Report. 20.
- Shete, A., Verma, A., Chandha, N., Prakash, C., Ahmad., 2016. "Optimization of hydraulic loading rate in aquaponic system with Common carp (*Cyprinus carpio*) and Mint (*Mentha arvensis*)". *Aquaculture Engineering* 73: 53-57
- Shiung, S., Ling, N., Jusoh, A., Mohd, A., 2015. "Biological nutrient removal by recirculating aquaponic systems: Optimization of the dimension ratio between the hydroponic and rearing tank components". *International Biodeterioration & Biodegradation* 102: 107-115
- Silva, B., Fitzsimmons K., 2016. "The effect of pH on phosphorus availability and speciation in an aquaponics nutrient solution". *Bioresource Technology* 219: 778-781
- Somerville, C., Cohen, M., Pantanella, E., Stankus, A., Lovatelli, A., 2014. Small-scale aquaponic food production: integrated fish and plant farming. In: FAO, U. (Ed.), FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper. , Rome, Italy. 1–262.
- Lam, S., Ma, N., Jusoh, A., Ambak, M., 2014. "Biological nutrient removal by recirculating aquaponic system: Optimization of the dimension ratio between the hydroponic & rearing tank components". *International Biodeterioration & Biodegradation* XXX: 1-9.
- Lee, R., Escobar, H., 2000. "Manual de producción de lechuga lisa bajo invernadero". Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca.
- Lonnard, W., Leonard, B. 2004. "A comparison of reciprocating flow versus constant flow in an integrated, gravel bed, aquaponic test system". *Aquaculture International* 12: 539-553
- Losordo, T., Masser, M., Rakocy, J., 1992. "Recirculating Aquaculture Tank Production Systems: an overview of critical considerations principales of biofiltration". Fact Sheet 451
- Takeuchi, T., 2017. "Application of Recirculating Aquaculture Systems in Japan". Fisheries Science Series book 1:9-10
- Takeuchi T, Endo M (2004) Recent advances in closed recirculating aquaculture systems. *Eco-Engineering* 16(1):15–20
- Tizkar, B., Kazemi, R., Alipour, A., Seidavi, A., Naseralavi, G., Poce, J.T., 2015. "Effects of dietary supplementation with astaxanthin and  $\beta$ -carotene on the semen quality of goldfish (*Carassius auratus*)". *Theriogenology* 84 (7): 1111-1117
- Velarde, E., Delgado, M. J., Gómez A., 2010. "Relojes periféricos en el tracto digestivo del carpín (*Carassius auratus*): síntesis circadiana de melatonina y su función en la motilidad intestinal". Editorial Universidad Complutense de Madrid. 1era. Edición.: 4-8.
- Yina, Z., Zhen, H., Guimbaud, C., Wang, Q., 2016. "Effect of seasonal Variation on nitrogen transformations in aquaponics of northern China". *Ecological Engineering* 94: 30-36
- Zhen, H., Woo, J., Chandran, K. Sungpyo, K., Coelho, A., Kumar, S., 2015. "Effect of plant species on nitrogen recovery in aquaponics". *Bioresource Technology* 188: 92-

## 9 ANEXOS

### 9.1 ANEXO I: CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS NITROGENADOS.

- Retire la cubierta.
- Añada 4 gotas de HI 93700A-0 Primer Reactivo (6 gotas para el análisis de agua de mar). Ponga la tapa y mezcle la solución.
- Añada 4 gotas de HI 93700B-0 Segundo Reactivo (10 gotas para el análisis de agua de mar). Ponga la tapa y mezcle la solución.
- Retire la cubierta en el instrumento.
- Pulse TIMER y el display mostrará la cuenta atrás previo a la medición o, como alternativa, espere 3 minutos y pulse READ. Cuando la cuenta atrás finalice, el instrumento realizará la lectura. El instrumento muestra los resultados en  $\text{mg/L}$  de nitrógeno amoniacal ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ).



- Pulse los teclas  $\frac{0}{0}$  o  $\frac{1}{10}$  para acceder al segundo nivel de funciones.
- Pulse la tecla de función Chem Firm para convertir el resultado a  $\text{mg/L}$  de amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ).
- Pulse los teclas  $\frac{0}{0}$  o  $\frac{1}{10}$  para volver a la pantalla de medición.

#### INTERFERENCIAS

Las interferencias pueden estar en estas escalas por: acetona, alcohol, aldehídos, glicina, cloruro superior o  $1 \text{ g/L}$  hierro, decaminas orgánico, sulfuro, cianuros, aminas alifáticas y aromáticas.

## AMONIACO RANGO BAJO

#### ESPECIFICACIONES

Rango	0,00 a 3,00 $\text{mg/L}$
Resolución	0,01 $\text{mg/L}$
Precisión	$\pm 0,04 \text{ mg/L} \pm 4\%$ de lectura
Desviación	$\pm 0,01 \text{ mg/L}$
EMC Típica	
Fuente de Luz	Lámpara de tungsteno con filtro de interferencias de banda estrecha @ 420 nm
Método	Adaptación del método Nessler, DT 426-92, de <i>ASIM Manual of Water and Environmental Technology</i> . La reacción entre el amoníaco y los reactivos causa una coloración amarilla en la muestra.

#### REACTIVOS NECESARIOS

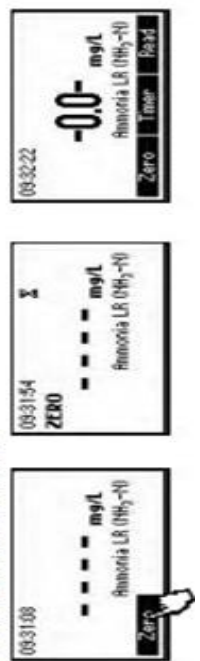
Código	Descripción	Cantidad
HI 93700A-0	Primer Reactivo	4 gotas (6 gotas para agua de mar)
HI 93700B-0	Segundo Reactivo	4 gotas (10 gotas para agua de mar)

#### LOTES DE REACTIVO

HI 93700-01 Reactivos para 100 tests  
HI 93700-03 Reactivos para 300 tests  
Para otros accesorios, ver página 128.

#### PROCEDIMIENTO DE MEDICIÓN

- Seleccione el método *Amoníaco LR (R. Bsp)* usando el procedimiento descrito en la sección *Selección del Método* (ver página 12).
- Llene la cubeta con 10 ml de muestra sin tratar (hasta la marca) y ponga la tapa.
- Introduzca la cubierta en el cable de medición y cierre la tapa.
- Pulse la tecla ZERO. El display mostrará "0.0" cuando el instrumento esté a cero y listo para medición.



**NITRATO**

**ESPECIFICACIONES**

Rango	0,0 a 30,0 mg/l
Resolución	0,1 mg/l
Precisión	±0,5 mg/l ± 10% de lectura
Desviación	±0,1 mg/l
EMC Típica	

Fuente de Luz Lámpara de tungsteno con filtro de interferencias de banda estrecha @ 825 nm  
Método Adaptación del método de reducción por caldmo. La reacción entre el nitrato y el reactivo causa una coloración ámbar en la muestra.

**REACTIVOS NECESARIOS**

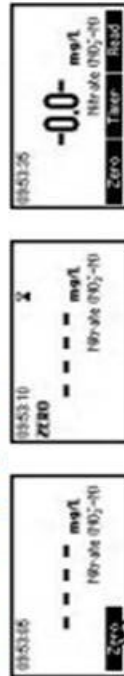
Código	Descripción	Cantidad
HI 93728-0	Reactivo en polvo	1 paquete

**LOTES DE REACTIVO**

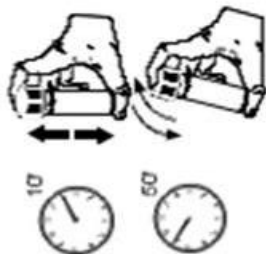
HI 93728-01 Reactivos para 100 tests  
HI 93728-03 Reactivos para 300 tests  
Para otras acciones, ver página 128.

**PROCEDIMIENTO DE MEDICION**

- Seleccione el método *Nitrato* usando el procedimiento descrito en la sección *Selección del Método* (ver página 12).
- Mediante la pipeta, llene la cubeta con 6 ml de muestra, hasta la mitad de su altura, y ponga la tapa.
- Inserte la cubeta en la celda de medición y cierre la tapa.
- Pulse la tecla ZERO. El display mostrará "-0,0-" cuando el instrumento esté a cero y listo para medición.



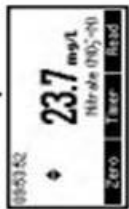
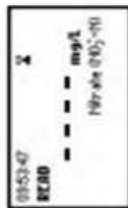
- Revire la cubeta y añada el contenido de un paquete de reactivo HI 93728-0.



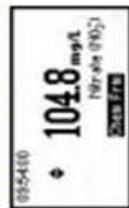
- Ponga la tapa y agite inmediatamente de forma vigorosa, arriba y abajo, durante exactamente 10 segundos. Continúe mezclando, invirtiendo la cubeta suavemente durante 50 segundos, teniendo cuidado de no provocar burbujas de aire. El polvo no se disueltó completamente. El tiempo y la forma de agitado podrían afectar considerablemente a la medición.
- Retire la cubeta en el instrumento, teniendo cuidado de no agitarla.



- Pulse **TIMER** y el display mostrará la cuenta atrás previa a la medición o, como alternativa, espere 4 minutos y 30 segundos y pulse **READ**. Cuando la cuenta atrás finalice, el instrumento indicará la lectura. El instrumento muestra los resultados en mg/l de nitrato nitrogénico.



- Pulse las teclas **0** o **00** para acceder al segundo nivel de función.
- Pulse la tecla de función **Chem Firm** para convertir el resultado a mg/l de nitrato (NO<sub>3</sub>-).



- Pulse las teclas **0** o **00** para volver a la pantalla de medición.

**INTERFERENCIAS**

Las interferencias pueden estar ausentes por:  
Ammonio y amonios, como urea y aminas alifáticas primarias  
Cloro superior a 100 ppm  
Cloro superior a 2 ppm  
Cobre  
Hielo (III)  
Substratos fuertemente oxidantes y reductores  
Modales con nitrato sulfuro.



**NITRITO RANGO BAJO**

**ESPECIFICACIONES**

- Rango 0,00 a 0,35 mg/l
- Resolución 0,01 mg/l
- Precisión  $\pm 0,02$  mg/l  $\pm 4\%$  de la lectura
- Desviación  $\pm 0,01$  mg/l
- BMC Típica
- Fuente de Luz Lámpara de tungsteno con filtro de interferencias de banda estrecha @ 525 nm
- Método Adaptación del método *3820.02-01\_354.7 de EPA*. La reacción entre el nitrato y el reactivo causa una coloración rosa en la muestra.

**REACTIVOS NECESARIOS**

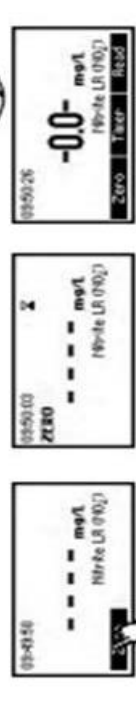
Código	Descripción	Cantidad
HI 93707-0	Reactivo en polvo	1 paquete

**LOTES DE REACTIVO**

- HI 93707-01 Reactivos para 100 tests
- HI 93707-03 Reactivos para 300 tests
- Para otros accesorios, ver página 128.

**PROCEDIMIENTO DE MEDICIÓN**

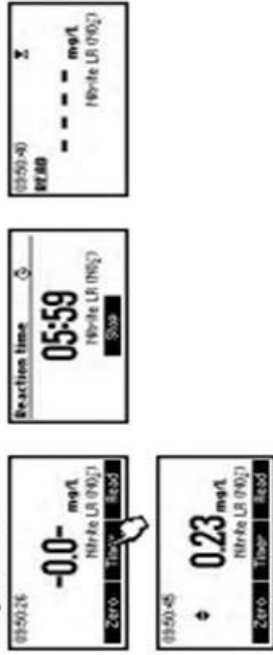
- Seleccione el método *Nitrato LR (R. Bajo)* usando el procedimiento descrito en la sección *Selección del Método* (ver página 12).
- Llene la cubeta hasta la marca con 10 ml de muestra sin tratar y ponga la tapa.
- Insértela la cubeta en la celda de medición y cierre la tapa.
- Pulse la tecla ZERO. El display mostrará "-0,0-" cuando el instrumento esté a cero y listo para medición.



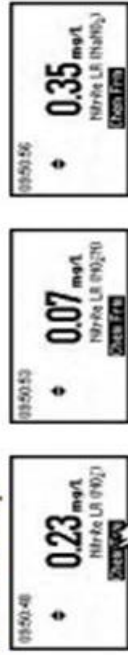
- Refine la cubeta.
- Añada el contenido de un paquete de reactivo HI 93707-0. Ponga la tapa y agite suavemente durante aproximadamente 15 segundos.



- Encienda la cubeta en el instrumento.
- Pulse TIMER y el instrumento mostrará la cuenta atrás para la medición o, como alternativa, espere 6 minutos y pulse READ. Cuando la cuenta atrás finalice, el instrumento activará la lectura. El instrumento mostrará la concentración en mg/l de nitrato.



- Pulse las teclas  $\uparrow$  o  $\downarrow$  para acceder al segundo nivel de funciones.
- Pulse la tecla de función Chem Frm para convertir el resultado a mg/l de nitrato-nitrato (NO<sub>3</sub>-N) y nitrato soluble (NoNO<sub>3</sub>).



- Pulse las teclas  $\uparrow$  o  $\downarrow$  para volver a la pantalla de medición.

**INTERFERENCIAS**

Los interferencias pueden estar causados por los siguientes iones:  
 hierro, selenio, cianuro, mercurio, plata, amoníaco, bismuto, níquel, plomo, metacromo y dodecilsulfato.  
 Reactivos fuertemente oxidantes y reductores.  
 Altos niveles de nitrato (superior a 100 mg/l) podrían producir lecturas falsamente altas debido a una mínima cantidad de nitrato a nitrato que podría ocurrir a estos niveles.

**NITRITO RANGO ALTO**

**ESPECIFICACIONES**

- Rango 0 a 150 mg/l
- Resolución 1 mg/l
- Precisión  $\pm 4$  mg/l  $\pm 4\%$  de lectura
- Desviación  $\pm 1$  mg/l
- EMC Típica
- Fuente de Luz Lámpara de tungsteno con filtro de interferencias de banda estrecha @ 575 nm
- Método Adaptación del método de Sulfato Ferroso. La reacción entre el nitró y el reactivo causa una coloración marrón-verdosa en la muestra.

**REACTIVOS NECESARIOS**

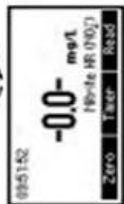
Código	Descripción	Cantidad
HI 93708-0	Reactivo en polvo	1 paquete

**LOTES DE REACTIVO**

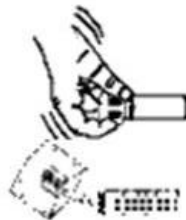
- HI 93708-01 Reactivos para 100 tests
  - HI 93708-03 Reactivos para 300 tests
- Para otros casos, ver página 178.

**PROCEDIMIENTO DE MEDICIÓN**

- Selección el método *Nitrato FR (R. Alto)* usando el procedimiento descrito en la sección *Selección del Método* (ver página 12).
- Llene la cubeta hasta la marca con 10 ml de muestra sin taponar y ponga la tapa.
- Inserte la cubeta en la celda de medición y cierre la tapa.
- Pulse la tecla ZERO. El display mostrará "-0.0-" cuando el instrumento esté a cero y listo para medición.



- Retire la cubeta
- Añada el contenido de un paquete de reactivo HI 93708-0. Ponga la tapa y agite suavemente hasta su completa disolución.



- Reinserte la cubeta en el instrumento.
- Pulse **TIMER** y el display mostrará la cuenta atrás previa a la medición, o como alternativa, espere 10 minutos y pulse **READ**. Cuando la cuenta atrás finalice, el instrumento mostrará la lectura. El instrumento muestra la concentración en mg/l de nitrato.



- Pulse las teclas **0** o **000** para acceder al segundo nivel de funciones.
- Pulse la tecla de función **Chem Firm** para convertir el resultado a mg/l de nitrógeno-nitrato ( $\text{NO}_3^--\text{N}$ ) y nitrato sódico ( $\text{NaNO}_3$ ).



- Pulse las teclas **0** o **000** para volver a la pantalla de medición.

## 9.2 ANEXO II: EXTRACCIÓN DE DNA CON EL MÉTODO MODIFICADO DE PROMEGA

La extracción de DNA de las bacterias se lleva a cabo utilizando el KIT Promega Wizard Genomic DNA purification y el equipo Mini Bead-Beater:

PASOS	INDICACIÓN
1	Suspender el material recolectado en 480 $\mu$ L de solución EDTA a 50 mM pH 8
2	Dar una lisis mecánica con el Mini Bead- Beater, adicionar 0.1 g de perlas de vidrio de sílica de 0.1 mm de grosor. Homogeneizar a 5000 rpm por 3 ciclos de 30 segundos, pasar los tubos en hielo inmediatamente después de la lisis celular.
3	Centrifugar a 14 000 por 45 segundos. Retirar el sobrenadante y pasar a un eppendorf nuevo.
4	Adicionar 600 $\mu$ L de solución de lisis nuclear, homogeneizar el pellet.
5	Poner las muestras en baño maría a una temperatura de 80°C por 5 minutos enfriar a temperatura ambiente.
6	Agregar 200 $\mu$ L de solución de precipitación de proteínas. Incubar en hielo durante 5 minutos.
7	Centrifugar a 14 000 por 4 minutos.
8	Transferir el sobrenadante que contiene el DNA a un tubo eppendorf que contenga 600 $\mu$ l de isopropanol frío.
9	Mezclar hasta que aparezca una hebra visible de DNA.
10	Centrifugar a 14 000 rpm por 4 minutos.
11	Decantar el sobrenadante y adicionar 600 $\mu$ l de etanol al 70% frío y mezclar por inversión.
12	Centrifugar a 14 000 rpm durante 4 minutos y retirar el etanol. Secar el exceso con papel absorbente.
13	Dejar secar el DNA con una corriente de aire durante 15 minutos.
14	Adicionar 50 $\mu$ L de solución de rehidratación de DNA.
15	Prehidratar toda la noche o incubar el DNA a 65°C durante 1 hora.
16	Visualizar el DNA por electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

### 9.3 ANEXO III. EXTRACCIÓN DE DNA POR EL MÉTODO FENOL/CLOROFORMO

PASOS	INDICACIÓN
1	Usar 300 mg de muestra y adicionar 600 $\mu$ L de amortiguador fosfato de sodio 120 mM pH 8 en un tubo de polipropileno del Bead-Beater
2	Homogeneizar en el Beab-Beater durante 10 segundos
3	Adicionar 40 $\mu$ L de la solución de 10 mg/mL de lisozima a la suspensión
4	Homogeneizar e incubar durante 15 minutos a 37°C y transferir la muestra a hielo.
5	Adicionar 600 mg de perlas de zirconia/silica de 0.1 mm de diámetro y mezclar 3 veces durante 30 segundos en el mini Bead-Beater a 400 rpm con intervalos de 15 a 30 segundo en cada tiempo
6	Adicionar 600 $\mu$ L de solución SDS al 20% y mezclar en el Bead-Beater por 5 segundos a 4000 rpm,
7	Transferir las muestras a hielo por una hora y 15 minutos a temperatura ambiente
8	Colocar 400 $\mu$ L de la solución de fenol pH 8 al lisado.
9	Mezclar en el vortex y centrifugar a 14 000 rpm durante 5 minutos.
10	Recuperar la fase acuosa en un eppendorf limpio.
11	Regresar a la mezcla con fenol y adicionar 1 mL de amortiguador de fosfato de sodio 120 mM pH 8
12	Centrifugar nuevamente a 14000 durante 5 minutos y recuperar nuevamente la fase acuosa
13	Colocar la fase recuperada al mismo eppendorf.
14	Realizar la extracción de la fase acuosa con 600 $\mu$ L de solución fenol-cloroformo-alcohol isoamílico saturado 10 mM a pH 8 (25:24:1) y recuperar la fase acuosa
15	Si entre ambas fases se observa una nata blanca realizar la extracción de la fase acuosa con un volumen igual de solución de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1
16	Para precipitar el DNA adicionar 0.1 volumen de solución de cloruro de sodio 5 M y dos volúmenes de etanol al 100%
17	Conservar a -80°C durante 20 minutos o a -20°C toda la noche
18	Centrifugar a 14000 rpm durante 10 minutos a 4°C
19	Descartar el sobrenadante y lavar el precipitado con etanol al 70% frío
20	Dejar secar el botón en aire
21	Resuspender con 50 $\mu$ L de agua ultrapura y visualizar los productos de extracción en gel de agarosa al 1%

#### **9.4 ANEXO IV: ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 1% y 1.5%**

- **ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 1%:**

1. Pesar 0.25 g de agarosa y adicionar 25 mL de TAE 1X, calentar en microondas hasta diluir la agarosa, adicionar 1  $\mu$ L de gelRed y verter la solución colocando el peine en el gel y esperar hasta que gelifique y retirar el peine.
2. Pasar el gel a la cámara de electroforesis y llenar con amortiguador 1X hasta que el mismo quede completamente cubierto.
3. Para cargar las muestras obtenidas de la extracción de DNA mezclar 1  $\mu$ L de buffer de carga y 3  $\mu$ L de la muestra, insertar dentro de los carriles de gel.
4. Conectar la fuente de poder ajustado a 100V por 15 minutos. Visualizar el gel con un transiluminador UV y digitalizar la imagen.

- **ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 1.5%**

1. Pesar 0.375 g de agarosa y adicionar 25 mL de TAE 1X, calentar en microondas hasta diluir la agarosa, adicionar 1  $\mu$ L de gelRed y verter la solución colocando el peine en el gel y esperar hasta que gelifique y retirar el peine.
2. Pesar el gel a la cámara de electroforesis y llenar con amortiguador 1X hasta que el gel quede completamente cubierto.
3. Para cargar las muestras obtenidas de la extracción de DNA mezclar 1  $\mu$ L de buffer de carga y 3  $\mu$ L de la muestra, insertar dentro de los carriles de gel.
4. Conectar la fuente de poder ajustado a 100V por 15 minutos. Visualizar el gel con un transiluminador UV y digitalizar la imagen.

## 9.5 ANEXO V: AMPLIFICACIÓN POR PCR

1. Utilizar el Termociclador Biometra®
2. Realizar la mezcla (Pull) de los reactivos para la amplificación en un tubo eppendorf en el siguiente orden con un volumen final de 25  $\mu$ L. El Master Mix-Promega es una premezcla lista para usar que contiene *Taq DNA polimerasa*, dNTPs y  $MgCl_2$ :

Reactivo	Cantidad por reacción
Agua MQ	8.5 $\mu$ L
Master Mix Promega®	12.5 $\mu$ L
Primer GC968 Forward	1 $\mu$ L
Primer UNI1401 Reverse	1 $\mu$ L
Muestra DNA	2 $\mu$ L

3. La cantidad de reacción es considerada para una sola amplificación por lo que se necesita multiplicar por la cantidad de muestras a amplificar considerando un blanco positivo, un blanco negativo y un extra.
4. Adicionar la muestra de DNA en otro eppendorf donde se agregarán 23  $\mu$ L del pull y 2  $\mu$ L de la muestra de DNA.
5. Programar el termociclador de la siguiente manera, para amplificar la región V6- V8:

Etapa	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94°C	5 minutos
Desnaturalización	94°C	30 segundos
Alineamiento	52°C	20 segundos
Alargamiento	70°C	35 ciclos repitiendo los pasos del 2 al 4
Alargamiento final	70°C	7 minutos

6. Para ver el producto de la amplificación por PCR hacer una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, con un marcador molecular 100 bp. Y observar por medio de un transiluminador.
7. Almacenar los amplicones en un rango de 0 a 4 °C

**9.6 ANEXO VI: PREPARACIÓN DE ELECTROFORESIS EN GEL CON GRADIENTE DESNATURALIZANTE. (DGGE)**

Soluciones reactivo requeridas para la preparación de DGGE:

<b>Solución reactivo</b>	<b>Preparación</b>
Buffer TAE 50 X	Pesar 242 g de TRIS Base, y agregar 500 mL de agua destilada, 51.7 mL de ácido acético glacial, 100 mL de EDTA 0.5 mM a pH 8.0 y aforara un litro con agua destilada.
Solución desnaturalizante 0%.	Mezclar 50 mL de solución acrilamida-bisacrilamida (37.5:1) al 40% agregar 2.5 mL de amortiguador TAE 50X, adicionar 5 mL de glicerol y aforar a 250 mL con agua destilada.
Solución desnaturalizante 100%.	Pesar 105.4 gr de urea, agregar 50 mL de solución acrilamida-bisacrilamida (37.5:1), adicionar 100 mL de formamida y mezclar hasta que se disuelva la urea, agregar 5 mL de amortiguador TAE 50X, adicionar 5 mL de glicerol y aforar con agua destilada hasta un volumen de 250 mL.
Solución de Carlos 8x (para fijar).	Mezclar 200 mL de etanol al 96% con 10 mL de ácido acético glacial y 40 mL de agua destilada.
Solución de Carlos de preservación.	Mezclar 50 mL de etanol al 96% con 20 mL de glicerol y 130 mL de agua destilada.
Solución para fijar.	Tomar 50 mL de solución de Carlos 8X y agregar 350 mL de agua destilada.
Solución para la tinción de plata.	Pesar 0.4 gr de nitrato de plata y disolver con 200 mL de solución para fijar.
Solución de revelado	Pesar 10 mg de borohidruro de sodio y adicionar 200 mL de hidróxido de sodio al 1.5% hasta disolver y agregar 750µL de formaldehído.
Buffer TAE 1X.	Tomar 20 mL de la solución TAE 50X y diluir hasta un litro con agua destilada.

Porcentajes para el gradiente de desnaturalización:

% Desnaturalizante	Volumen final (mL)	Solución desnaturalizante 0% (mL)	Solución desnaturalizante 100%(mL)	TEMED (μL)	APS (μL)
0	6	6	-----	6	25
25	12	9	3.0	50	50
30	12	8.4	3.6	50	50
35	12	7.8	4.2	50	50
40	12	7.2	4.8	50	50
45	12	6.6	5.4	50	50
50	12	6.0	6.0	50	50
55	12	5.4	6.6	50	50
60	12	4.8	7.2	50	50
65	12	4.2	7.8	50	50
70	12	3.6	8.4	50	50

Preparación del gel DGGE:

- Calentar la solución 100% desnaturalizante a no más de 50°C hasta que se disuelvan los cristales de urea.
- Limpiar con agua destilada y desengrasar con alcohol etílico las partes de los costados del gel.
- Sobre un vidrio de 16 x 16 cm colocar una hoja de Gelbond, con la cara hidrofóbica hacia el vidrio y la hidrofílica libre para adherirse al gel.
- Ajustar la separación de los vidrios con la tarjeta separadora y ajustar las abrazaderas.
- Poner una capa de vaselina en la almohadilla del soporte de polimerización y ajustar los costados del gel, de forma que no se produzcan fugas durante el vertido del gel.
- Montar el formador de gradiente acoplado a la bomba peristáltica a 10 cm del soporte de polimerización.
- Preparar la solución alta, baja y cero de acuerdo a la tabla del porcentaje para el gradiente desnaturalizante sin adicionar el APS.
- Realizar el gradiente relación 30-60. El gradiente bajo es de 30% y el alto es de 60%.
- Asegurar de que las válvulas del formador de gradiente se encuentren cerradas. Adicionar el APS a la solución baja y alta, mezclar bien y colocarlas en el formador de gradiente. De lado derecho se coloca la solución alta y de lado izquierdo la baja.
- Colocar la manguera proveniente de la bomba peristáltica en el centro del gel con el bisel de la aguja apuntando hacia el exterior.
- Accionar la bomba peristáltica a una velocidad de 30 rpm, y abrir la válvula de la solución alta. Después de 10 segundos abrir la válvula de la solución baja. Permitir que el contenido del formador de gradiente se vierta en el gel.
- Agregar el APS a la solución cero, colocarlo en el formador de gradiente y abrir la válvula para permitir el paso de la solución.
- Una vez vertida toda la solución, colocar el peine en el gel de forma tal que no se modifique el gradiente formado.
- Cubrir el gel del sol con paños limpios y permitir que polimerice (aproximadamente una hora).
- Llenar el tanque con 7 litro de TAE 1X, o hasta la marca de llenado y precalentar el buffer a 65°C.
- Una vez que el gel ha polimerizado, retirar el soporte de polimerización y colocar el gel en el núcleo con el vidrio de 16x14 cm hacia adentro del mismo.
- Colocar como contrapeso en el lado libre del núcleo un par de vidrios sin separadores.
- Colocar el núcleo dentro del tranque de electroforesis.
- Preparar las muestras con buffer de carga a razón de 1 μL de buffer de carga por cada 5 μL de muestra.
- Centrifugar a 1000 rpm por 10 segundos para permitir que el contenido de los tubos se junte en el fondo.
- Cargar el gel con las puntas capilares para cargado de geles de 200 μL.



- Colocar el controlador de temperatura y ajustar la temperatura a 65°C.
- Conectar el controlador de temperatura a la fuente de poder y correr a 110 V por cinco minutos.
- Correr el gel a 85v por 960 minutos.
- Sacar del tanque el gel por las orillas del Gelbond evitando tocar la matriz del gel.
- Tinción del gel. Enjuagar la charola marcada como fijado con 30 mL de la solución de fijado y desechar la solución.
- Colocar la charola en el agitador rocker a 26 rpm.
- Sumergir el gel en la solución de fijado por 3 minutos, almacenar la solución en un matraz.
- Poner en la charola la solución de teñido y sumergir el gel por 10 minutos.
- Desechar la solución de tinción en un matraz con 20 g de cloruro de sodio.
- Lavar el gel 3 veces con 120 mL de agua ultrapura por 2 minutos.
- Enjuagar la charola marcada como “revelado” con 30 mL de la solución de revelado y desecharla.
- Poner en la charola la solución de revelado y sumergir el gel por no más de 45 minutos.
- Desechar la solución de revelado.
- Lavar el gel 2 veces con 120 mL de agua ultra pura por dos minutos.
- Sumergir el gel en la solución de fijado por 5 minutos.
- Lavar el gel con 120 mL de agua ultrapura por 2 minutos
- Colocar papel celofán sobre el gel y digitalizar la imagen del mismo con un escáner de doble haz.

## 9.7 ANEXO VII. EVALUACIÓN MORFOMÉTRICA DE LA LECHUGA

Tabla 9. Evaluación morfométrica de la lechuga en el sistema hidropónico por 60 días.

Tiempo (días)	Número de hojas	Longitud de hojas chicas	Longitud de hojas medianas	Longitud de hojas grandes	Altura total	Número de muestra
0	3.6 ± 1.9	0.7 cm	2.1 cm	3.9 cm	5.1 ± 1.5 cm	15
15	4.9 ± 2.2	1.2 cm	3.4 cm	4.1 cm	5.6 ± 2.2 cm	15
30	7.8 ± 2.1	1.1 cm	7.8 cm	8.8 cm	10.1 ± 2.1 cm	15
45	11.5 ± 2.0	1.3 cm	7.2 cm	11.0 cm	12.6 ± 2.3 cm	15
60	14.1 ± 2.4	1.5 cm	9.0 cm	13.4 cm	17.5 ± 1.9 cm	15

Tabla 10. Evaluación morfométrica de la lechuga del sistema acuapónico por 60 días.

Tiempo (días)	Número de hojas	Longitud de hojas chicas	Longitud de hojas medianas	Longitud de hojas grandes	Altura total	Número de muestra
0	6.9 ± 2.5	1.1 cm	7.0 cm	8.1 cm	8.0 ± 1.9 cm	15
15	12.6 ± 3.6	1.2 cm	7.5 cm	9.6 cm	10.4 ± 2.3 cm	15
30	16.7 ± 1.7	2.0 cm	9.4 cm	12.1 cm	13.5 ± 2.1 cm	15
45	21.9 ± 2.0	1.2 cm	9.9 cm	11.8 cm	15.5 ± 1.8 cm	15
60	23.4 ± 2.1	1.4 cm	10.2 cm	12.5 cm	15.4 ± 2.0 cm	15

## 9.8 ANEXO VIII. PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS DEL AGUA.

Tabla 11. Parámetros físicos del agua al inicio del experimento, en los diferentes sistemas de recirculación

SISTEMA	CONDUCTIVIDAD	pH	SOL. DISUELTOS	TEMPERATURA
ACUÍCOLA	365.0	8.4	187.3	13.83°C
ACUAPÓNICO	373.8	8.4	185.8	14.25°C
HIDROPÓNICO	364.5	8.5	182.7	15.07°C

Tabla 12. Parámetros físicos del agua a los quince días de experimentación, en los diferentes sistemas de recirculación

SISTEMA	CONDUCTIVIDAD	pH	SOL. DISUELTOS	TEMPERATURA
ACUÍCOLA	416.1 $\mu\text{S/cm}$	8.3	206.5 ppm	18.9°C
ACUAPÓNICO	411.2 $\mu\text{S/cm}$	8.7	206.0 ppm	18.9°C
HIDROPÓNICO	2361.5 $\mu\text{S/cm}$	5.9	1181.9 ppm	18.6°C

Tabla 13. Parámetros físicos del agua a los treinta días de experimentación, en los diferentes sistemas de recirculación

SISTEMA	CONDUCTIVIDAD	pH	SOL. DISUELTOS	TEMPERATURA
ACUÍCOLA	428.4 $\mu\text{S/cm}$	8.2	214.5 ppm	17.3°C
ACUAPÓNICO	419.0 $\mu\text{S/cm}$	8.2	208.2 ppm	17.2°C
HIDROPÓNICO	1512.3 $\mu\text{S/cm}$	7.2	755.5 ppm	17.9°C

Tabla 14. Parámetros físicos del agua a los 60 días de experimentación, en los diferentes sistemas de recirculación

SISTEMA	CONDUCTIVIDAD	pH	SOL. DISUELTOS	TEMPERATURA
ACUÍCOLA	432.3 $\mu\text{S/cm}$	8.2	213.4 ppm	19.5°C
ACUAPÓNICO	420.3 $\mu\text{S/cm}$	8.1	240.9 ppm	19.3°C
HIDROPÓNICO	958.8 $\mu\text{S/cm}$	7.4	530.0 ppm	18.9°C

### 9.9 ANEXO IX. CONCENTRACIÓN DE COMPUESTOS NITROGENADOS EN EL AGUA.

Tabla 15. Concentración de los compuestos nitrogenado al inicio del ensayo, en los sistemas de recirculación acuícola y acuapónico NH<sub>3</sub>-N (Nitrógeno amoniacal), NH<sub>3</sub> (Amoniaco), NH<sub>4</sub> (Amonio). NO<sub>3</sub>-N (Nitrato-nitrógeno) NO<sub>3</sub> (Nitrato), NO<sub>2</sub> (Nitrito), NO<sub>2</sub>-N (nitrito nitrógeno), Na<sub>2</sub>NO<sub>2</sub> (Nitrito de sodio).

Fórmula química		Sistema acuícola. (mg/L)	Sistema acuapónico (mg/L)
<b>Amonio</b>	NH <sub>3</sub> -N	0.88	1.30
	NH <sub>3</sub>	1.51	1.55
	NH <sub>4</sub>	1.13	1.65
<b>Nitrato</b>	NO <sub>3</sub> -N	6.80	6.90
	NO <sub>3</sub>	30.20	30.60
<b>Nitrito</b>	NO <sub>2</sub>	37.50	27.00
	NO <sub>2</sub> -N	11.50	8.50
	Na <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>	44.00	41.00

Tabla 16. Compuestos nitrogenados a los 30 días en los diferentes sistemas de recirculación acuícola y acuapónico. NH<sub>3</sub>-N (Nitrógeno amoniacal), NH<sub>3</sub> (Amoniaco), NH<sub>4</sub> (Amonio). NO<sub>3</sub>-N (Nitrato-nitrógeno) NO<sub>3</sub> (Nitrato), NO<sub>2</sub> (Nitrito), NO<sub>2</sub>-N (nitrito nitrógeno), Na<sub>2</sub>NO<sub>2</sub> (Nitrito de sodio)

Fórmula química		Sistema acuícola (mg/L)	Sistema acuapónico (mg/L)
<b>Amonio</b>	NH <sub>3</sub> -N	1.89	0.27
	NH <sub>3</sub>	2.30	0.33
	NH <sub>4</sub>	2.44	0.35
<b>Nitrato</b>	NO <sub>3</sub> -N	11.60	13.95
	NO <sub>3</sub>	51.35	61.80
<b>Nitrito</b>	NO <sub>2</sub>	24.00	18.00
	NO <sub>2</sub> -N	7.50	5.50
	Na <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>	36.00	26.50

Tabla 17. Compuestos nitrogenados a los 60 días (amonio, nitrato y nitrito) de la Semana 2 en los diferentes sistemas de recirculación acuícola y acuapónico. NH<sub>3</sub>-N (Nitrógeno amoniacal), NH<sub>3</sub> (Amoniaco), NH<sub>4</sub> (Amonio). NO<sub>3</sub>-N (Nitrato-nitrógeno) NO<sub>3</sub> (Nitrato), NO<sub>2</sub> (Nitrito), NO<sub>2</sub>-N (nitrito nitrógeno), Na<sub>2</sub>NO<sub>2</sub> (Nitrito de sodio)

Fórmula química		Sistema acuícola (mg/L)	Sistema acuapónico (mg/L)
<b>Amonio</b>	NH <sub>3</sub> -N	0.935	0.62
	NH <sub>3</sub>	1.13	0.75
	NH <sub>4</sub>	1.20	0.79
<b>Nitrato</b>	NO <sub>3</sub> -N	15.80	1.55
	NO <sub>3</sub>	69.90	6.85
<b>Nitrito</b>	NO <sub>2</sub>	21.00	14.50
	NO <sub>2</sub> -N	6.50	6.50
	Na <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>	32.00	22.00