

# Efecto de la oxitetraciclina en presencia de una biopelícula y la resistencia a los antibióticos

Alfredo Corbalá<sup>1</sup>, Daniel Martínez<sup>2</sup>, Luis Ayala<sup>2</sup> y Benjamín Ortega<sup>1</sup>

Escuela Superior de Ciencias Agropecuarias<sup>1</sup>, Laboratorio de Microbiología Agropecuaria<sup>2</sup>  
Universidad Autónoma de Campeche<sup>1</sup>, Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Xochimilco<sup>2</sup>  
Campeche, Camp.; Cd. México, D. F.; México  
jacorbal@uacam.mx, dmartin@correo.xoc.uam.mx

**Abstract**— The results obtained in the nutrient flow in two treatments were analyzed in a Tilapia-Basilica aquaponic system, each with three replicates. In the treatment one was provided for 13 weeks to the fish Oxytetracycline at a dose of 400mg / kg of biomass, Mixed in the food and in treatment 2 the food was free of antibiotics. The results show that a functional and complete biofilm was developed in the presence of Oxytetracycline. The use of the HRML technique demonstrates that biofilms act as a protective barrier against antibiotics and can harbor pathogens, thus contributing to the development of resistance to antibiotics in aquaculture.

**Keyword**— *Biofilm, nitrifying bacteria, Aquaponics, Antibiotics, Resistance.*

**Resumen**— Se analizó los resultados obtenidos en el flujo de nutrientes en dos tratamientos, en un sistema acuaponico Tilapia-Albahaca, cada uno con tres réplicas, en el tratamiento uno se proporcionó durante 13 semanas a los peces Oxitetraciclina en una dosis de 400mg/kg de biomasa, mezclados en el alimento y en el tratamiento 2 el alimento fue libre de antibióticos. Los resultados obtenidos, muestran que se desarrolló una biopelícula funcional y completa en presencia de Oxitetraciclina. El empleo de la técnica de HRML demuestra que las biopelículas actúan como una barrera de protección contra antibióticos, y en ella se pueden refugiar patógenos, por lo cual puede contribuir en el desarrollo de la resistencia a los antibióticos en la acuicultura.

**Palabras claves**— *Biopelícula, Bacterias nitrificantes, Acuaponia, Antibioticos, Resistencia*

## I. INTRODUCCIÓN

En sistemas abiertos de producción acuícola se mantienen la calidad del agua a través recambios, lo que genera un severo impacto ambiental en los cuerpos de agua naturales, donde se realizan los intercambios de aguas, [23], [33] [29].

Los sistemas de cero descargas o recirculación (RAS), se les considera bioseguros, dado que no tienen intercambio de agua con el ambiente; altamente productivos, ya que permiten altas densidades y mantienen un control total del ambiente, haciendo más predecible el tamaño de la cosecha; asimismo, se les considera como ambientalmente sustentables, ya que usan entre el 90 y el 99% menos agua en tan solo el 1% de la superficie requerida por otras formas de producción y sus aguas residuales son tratadas a través de un proceso de biofiltración [28], [18].

También existen métodos de producción de tipo integral, que logran el reúso y manejo de las aguas residuales; estos son los sistemas acuícolas multitróficos integrados (IMTAS), que combinan a los RAS con humedales artificiales y la producción de plantas en sistemas hidropónicos. Estos métodos han demostrado que permiten aumentar la calidad del agua [21] [16], [8], [17], [24] y que son económicamente viables [27]. A estos sistemas también se les ha denominado acuaponia [25]. Todos estos métodos se basan en el reúso y biofiltración del agua por medio de la nitrificación [11] [28], [18]. No obstante que se han realizado trabajos innovadores para el mantenimiento de la calidad del agua, como la retención y control del amonio en sistemas cero descargas por medio de la nanofiltración y

osmosis inversa [15], sigue siendo vigente la afirmación de Hovanec, et al [14], de que la nitrificación es la forma más eficiente para remover el amonio en los sistemas cero descargas y es la más usada.

La nitrificación es la parte del ciclo del nitrógeno, en que se efectúa la biotransformación de amonio a nitrito y la subsecuente oxidación de nitrito a nitrato por la acción metabólica de las bacterias nitrificantes. Estas bacterias son Gram negativas y quimiolitótrofas obligadas, las amonio oxidantes (AOB), oxidan el amonio a nitrito y las nitrito oxidantes (NOB) oxidan el nitrito a nitrato, son mixótrofas, así que pueden crecer de manera heterótrofa, todas son aerobias obligadas y presentan un metabolismo central esencialmente igual para obtener la energía y asimilan el carbón a través del ciclo de Calvin Benson [13], [30], [9].

Como en todas las formas de producción animal, las infecciones por bacterias, parásitos, hongos y virus son una frecuente causa de morbilidad y mortalidad en la acuicultura y de la misma forma se requieren una serie de químicos, como los desinfectantes, antiparasitarios y antibióticos entre otros, para su tratamiento y control. En el frágil ambiente de un sistema cero descargas, que efecto tiene el uso terapéutico y profiláctico de desinfectantes, antiparasitarios y antibióticos ¿Lo alteran de alguna manera disminuyendo la producción de manera cuantitativa o cualitativa en el sistema? ¿Cuáles son los efectos en la flora bacteriana? ¿Qué efectos a largo plazo genera? ¿Y cómo se pueden evaluar y relacionar estos efectos?

En el biofiltro de un sistema cero descargas, de manera natural, empieza unas cuantas horas después de estar sumergido, una acumulación de moléculas orgánicas que forman un ensamble de células bacterianas irreversiblemente asociadas a la superficie, encerradas en una matriz de polisacáridos, formando una biopelícula que completan en alrededor de 25 días [22], [32]. Su funcionalidad y evolución se puede seguir mediante la verificación de los productos de la nitrificación y de acuerdo con Haug y Mc Carty [12] de 20mg/de Nitrógeno amoniacal genera alrededor de 3mg/l de Nitrosomonas y alrededor de 0.5mg/l de Nitrobacter, con un consumo de 85 mg/l O<sub>2</sub> disuelto. Un biofilm funcional debería de desarrollarse y madurar en el tiempo esperado y la biotransformación oxidativa del amonio a nitratos, se daría de manera continua por las bacterias nitrificantes. Pero también es posible identificar mediante técnicas moleculares como se encuentra estructurada una comunidad bacteriana. El análisis de fusión de alta resolución (HRM), al basarse en la comparación de los valores de fusión de una región específica del gen 16sR, en el que cada variación corresponde a un pico de fluorescencia y este teóricamente a una especie, permite comparar las variaciones entre comunidades, el análisis HRM puede discriminar secuencias basado en su composición tamaño el contenido de GC o sus complementarios, identifica variaciones genéticas en la secuencia de ácidos nucleicos[19], por lo tanto si refleja la estructura de la comunidad bacteriana, ante un estresor como un antibiótico sería posible establecer una comparación de cómo se modifica la estructura de la comunidad y relacionarla con sus productos metabólicos.

## II. MATERIAL Y MÉTODOS

El experimento tuvo una duración de 13 semanas, del 27 octubre de 2014 al 26 de enero de 2015. Consistió en dos tratamientos cada uno con tres réplicas en el tratamiento 1 se proporcionó a los peces antibiótico en el alimento y en el tratamiento 2 se les dio alimento libre de antibióticos.

Se diseñó y construyó de acuerdo a Nelson [20] seis unidades acuaponicas experimentales que se ubicaron en la Escuela Superior de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Campeche Campus IV, (Figura 1), Integradas de la siguiente manera:

- Subsistema de producción de organismos acuáticos. Tanques cilíndricos de plástico de 100 l. de capacidad.
- Subsistema de filtrado, (clarificador o filtro de sólidos, de 15 l. de volumen, con grava para la retención mecánica de sólidos, biofiltro, con una capacidad de 20 l de volumen, con 120 biobolas de 144 biopines cada una, desgasificador, con una capacidad de 15 l).
- Subsistema de hidroponía (canales de crecimiento para plantas integrado por una espiral de tubos de PVC de 2.5 pulgadas de diámetro), con una bomba de 14 W de potencia para el retorno del agua.
- Aireador genérico de 1/8 de Hp con líneas de conducción.

A. Organismos cultivados

De un lote de aproximadamente 300 crías de peces *Tilapia nilotica* (*Orochromis niloticus*) provenientes de una misma cohorte se eligieron a 42 individuos con un peso promedio de 2.9 gr pesados con una báscula electrónica (marca Belaquim 0.1gr de exactitud) y una longitud total de 5.61 cm medidos con un Ictiómetro graduado en cm, los cuales fueron colocados en los 6 tanques de cría a una densidad de 7peces/100 l.

El material vegetativo que se cultivó es albahaca (*Ocimum basilicum*) a una proporción de 1.9 Plantas/pez .

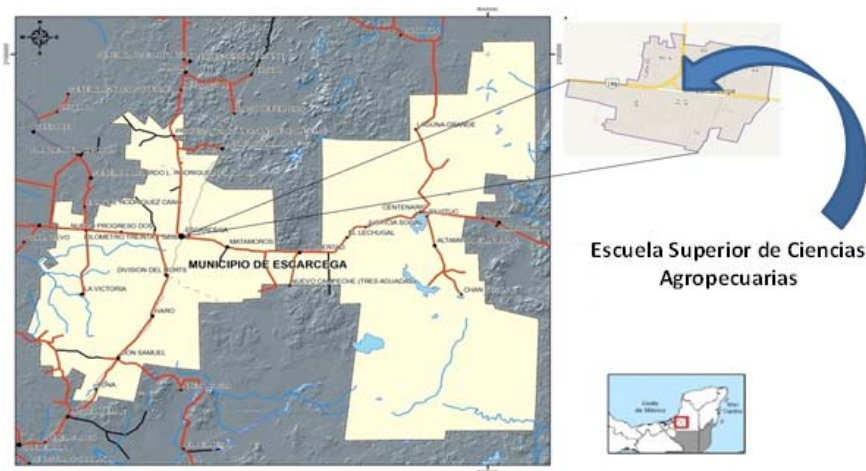


Fig. 1. Ubicación de la escuela superior de ciencias agropecuarias.

B. Esquema de alimentación

Se proporcionó un alimento de marca comercial con 35% de proteína dividido en dos raciones, de acuerdo al plan de alimentación que se encuentra en el tabla I.

Tabla I. Tabla de alimentación..

Mes	% de Proteína	% de Biomasa	Frecuencia de alimentación al día
1	35	13	2
2	35	10	2
3	35	8	2

C. *Aplicación del Fármaco*

El fármaco aplicado fue Oxitetraciclina en polvo soluble al cual por medio de números aleatorios se determinó que unidades experimentales se les aplicaría el fármaco el cual se proporcionó en una dosis de 400mg/1kg de biomasa. Las unidades experimentales en las que se aplicó el fármaco fueron las unidades marcadas con el número 1 y las unidades marcadas con el número 2 funcionan como testigo libre del fármaco (Figura. 2).

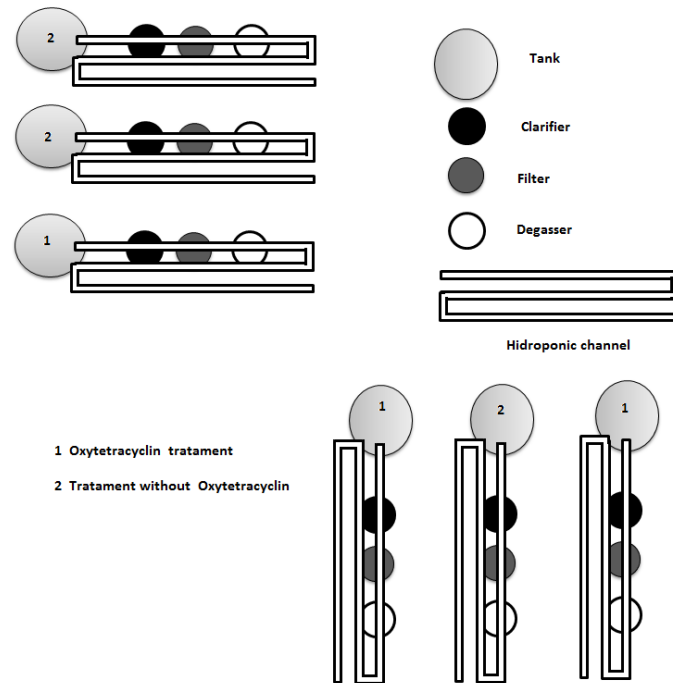


Fig. 2. Disposición de las unidades experimentales.

D. *Parámetros Fisicoquímicos del agua*

En las unidades experimentales montadas, se mantuvo un seguimiento permanente del estado de los factores fisicoquímicos. Diariamente se midió en los estanques de cría el oxígeno disuelto y la temperatura mediante un oxímetro marca Hanna modelo HI 9146. El pH se midió con un potenciómetro Marca Hanna Modelo HI98130.

E. *Flujo de nutrientes*

Se tomó muestras de agua en la entrada y en la salida del subsistema de filtración de cada unidad experimental para medir una vez por semana los iones  $NH_4$ ,  $NH_3$ ,  $NO_2$ ,  $NO_3$ , mediante un espectrofotómetro marca Hanna modelo HI 83099.

F. *Análisis molecular*

Se tomó muestras de cada biofiltro y se extrajo el ADN, una vez verificada su presencia mediante electroforesis y cuantificado mediante análisis espectrofotométrico y se efectuó el HRM con un termociclador Marca Giagen Modelo Rotor Gene Q5, el reporte de resultados se obtuvo mediante Rotor-Gene Q Series Software 1.7 (Build94).

G. Análisis estadísticos

Para determinar si existen diferencias en el flujo de nutrientes entre los dos tratamientos se utilizó una t de Student para muestras independientes, los supuestos de homocedasticidad se verificaron mediante la prueba de Bartlett y Cochran para y la normalidad mediante la prueba de Kolmogorov y Smirnov. Se comparó los parámetros a la entrada y su salida del subsistema de filtración.

Para analizar los datos obtenidos en el HRM, se hizo mediante una prueba de hipótesis, se intentó mediante una prueba de t para variables independientes, sin embargo debido a que no tenemos normalidad en la distribución se optó por un análisis no paramétrico, debido a que estas pruebas son menos robustas que los análisis paramétricos se usó dos pruebas, la prueba de Mann-Whitney, pues es considerada como una alternativa válida a la prueba de t bajo la hipótesis de que no existe diferencias entre las medias de ambos tratamientos y la prueba de Kolmogorov-Smirnov, una prueba de bondad de ajuste bajo la hipótesis estadística de que sus curvas de distribución no difieren entre sí.

Para establecer si existen asociaciones que permitan definir grupos diferenciados, se efectuó un análisis de conglomerados (clúster), en el que se usó como variable los valores de los picos de fusión obtenidos mediante el análisis HRM. El método utilizado es de tipo jerárquico asociativo mediante la distancias euclidianas [3] De la Fuente 2011 y se analizó la asociación mediante la distancia euclidianas obtenida en cada una de las repeticiones de cada tratamiento.

Comparación de las curvas de fusión para determinar si presentaban diferencias en cuanto a su estructura de comunidad.

III. RESULTADOS

Los parámetros fisicoquímicos presentaron un comportamiento uniforme (Figura 3), sin que entre los tratamientos se presentaran variaciones importantes. El pH en ambos tratamientos mantuvo valores medios cercanos al 8.9, máximos de 9.6 y mínimos de 7.6.

En cuanto a la temperatura ambos tratamientos presentaron valores medios son 23.6 °C, valores máximos de 27.1 °C y mínimos de 20 °C.

El O<sub>2</sub> disuelto presentó en el tratamientos uno valores medios de 7.2 ppm, máximos de 8.5ppm y mínimos de 5.4 ppm y en el tratamiento dos valores medios de 7.1 ppm, máximos de 8.8ppm y mínimos de 5.0 ppm.

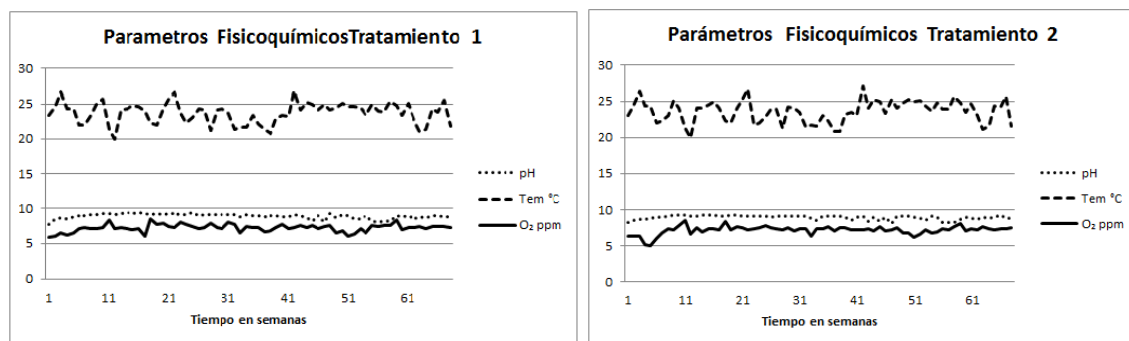


Fig. 3. Comportamiento medio de los parámetros fisicoquímicos en ambos tratamientos del experimento.

Durante las 13 semanas que fueron medidos los iones NH<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>, NO<sub>2</sub> y NO<sub>3</sub>, en ambos tratamientos. Con las mediciones hechas se conformó una base de datos cuyos valores medios máximos

y mínimos se encuentran en la se encuentran en los tablas 2 y 3 para los resultados de entrada y 4y 5 para los resultados de salida.

En la figura 4, se presentan las gráficas del comportamiento de estos iones a través de las 13 semanas de experimentación en las mediciones de entrada al sistema de biofiltración.

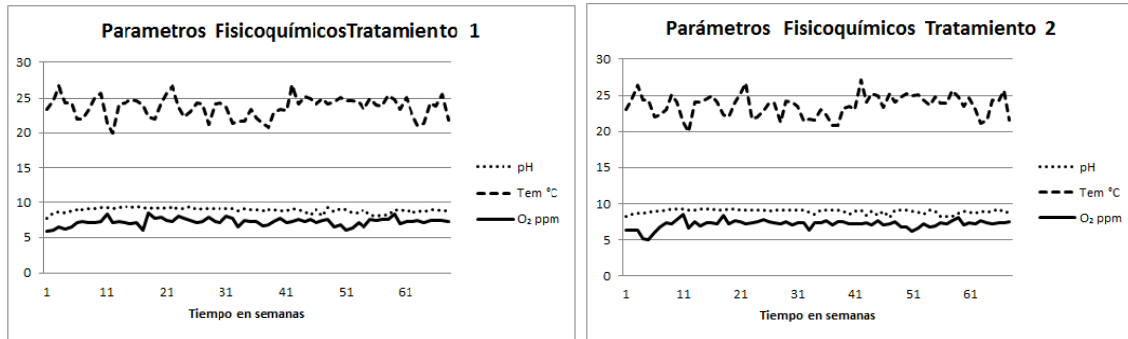


Fig. 4. Gráficas del comportamiento a la entrada al sistema de biofiltración de los iones NH<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>, NO<sub>2</sub> y NO<sub>3</sub>.

En cuanto a la comparación de los iones analizados NH<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>, NO<sub>2</sub> y NO<sub>3</sub>, a la entrada del sistema de biofiltración, mediante de la prueba de t de Student para grupos independientes, con un  $\alpha=0.05$  se obtuvo valores de  $p > 0.05$  con lo cual se asume que en ambos tratamientos el flujo de nutrientes es igual en ambos tratamientos en la entrada del sistema de biofiltración.

En la figura 4, se presentan las gráficas del comportamiento de estos iones analizados a través de las 13 semanas de experimentación en las mediciones de salida del sistema de biofiltración.

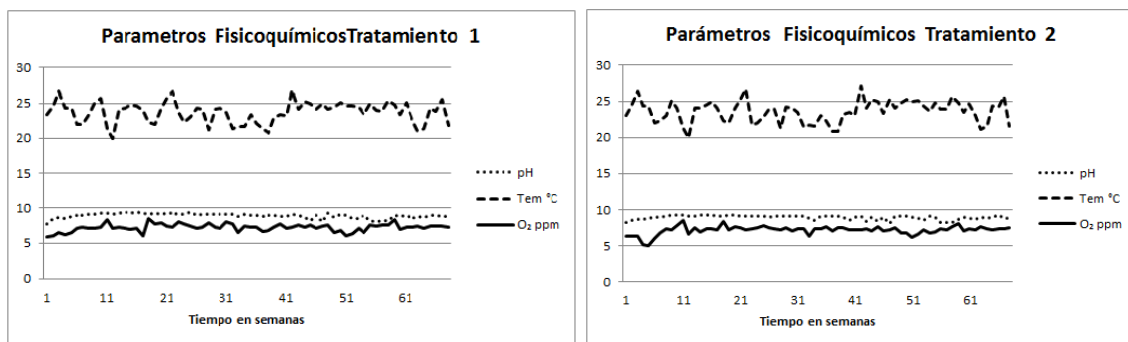


Fig. 5. Gráficas del comportamiento a la salida del sistema de biofiltración de los iones NH<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>, NO<sub>2</sub> y NO<sub>3</sub>.

En la comparación mediante de la prueba de t de Student para grupos independientes a la salida del sistema de biofiltración de los iones analizados NH<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>, NO<sub>2</sub> y NO<sub>3</sub>, con un  $\alpha=0.05$  se obtuvo valores de  $p > 0.05$  con lo cual se asume que el flujo de nutrientes no presenta diferencias entre ambos tratamientos en la entrada del sistema de biofiltración.

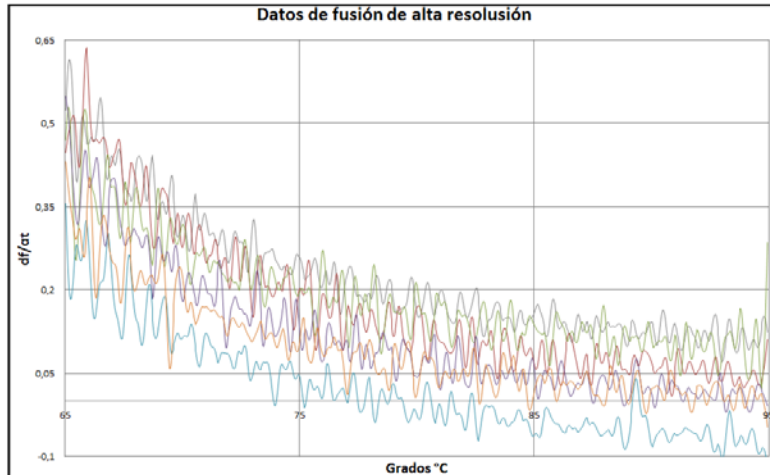


Fig. 6. Gráfico de los datos obtenidos en el análisis de fusión de alta resolución con un iniciador 16SR universal

Para comparar los tratamientos se utilizó la prueba de Mann-Whitney, bajo la hipótesis estadística de que no existe diferencias entre las medias de los valores de los picos de fusión en ambos tratamientos (Tabla 2).

Con un valor de  $p=0.00$  se rechaza la hipótesis nula, se acepta que las medias de los tratamientos son diferentes.

Tabla II. Prueba de U de Mann-Whitney para la variable tratamiento

$\alpha= 0.05$									
Variable	Rang Sum Trat 1	Rang Sum Trat 2	U	Z	Valor de p	Z ajustada	Valor de p	Núm Vali t1	Núm Vali t2
Picos	1061466	552240.0	148589.0	23.16968	0.00	23.16968	898	898	898

De manera complementaria se utilizó una prueba de bondad de ajuste que permitiera comparar la distribución de la curva de los de valores de los picos de fusión del HRM, se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov bajo la hipótesis nula de que las curvas de distribución de los valores de los picos de fusión no difieren entre ambos tratamientos no difieren.

Tabla III. Prueba de Kolmogorov-Smirnov para la variable tratamiento

$\alpha= 0.05$									
Variable	Max Dif Nega	Max Dif Pos	Valor de p	Med trat 1	Med trat 2	S trat 1	S trat 2	Núm Vali t1	Núm Vali t2
Picos	0.00	0.603563	p 0.001	0.193338	0.077211	0.11004	0.096383	898	898

Con un valor de  $p 0.001$  se rechaza la hipótesis nula, con lo cual se acepta que las curvas de distribución de los picos de fusión son significativamente diferentes entre los tratamientos.

En dendograma se puede observar cómo se generan tres grupos claramente el del tratamiento 1 integrado por las filtros 1, 4 y 3 que se encuentran estrechamente asociados por similitud en cuanto a

su distancia euclidiana 1 y 4 son prácticamente iguales y ligeramente distinto el filtro 3, en cuanto al tratamiento 2 los filtros y 6 se ve una clara asociación y el filtro 5 es totalmente distinto a todos.

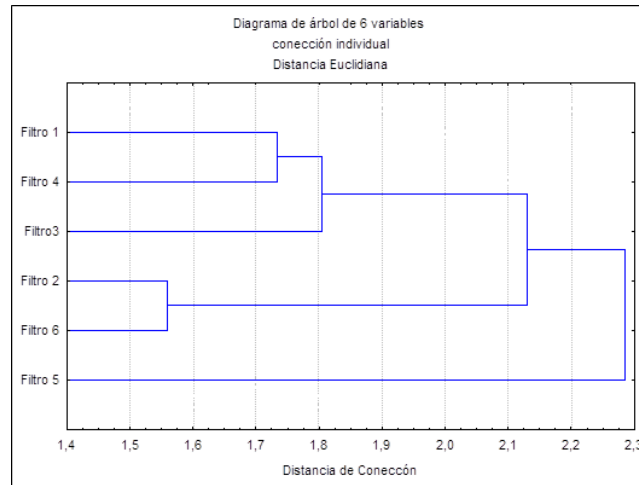


Fig. 7. Dendrograma de la asociación los datos obtenidos en el análisis de fusión de alta resolución

#### IV. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

##### A. Factores fisicoquímicos

En las unidades experimentales valores medios máximos y mínimos de pH que se mantuvieron en las 13 semanas de la experimentación, permanecieron en ambos tratamientos dentro de los rangos que distintos autores mencionan como óptimos para sostener el proceso de nitrificación, Haug y Mc Carty [12], afirman que en un biofiltro se desarrollan en un rango de pH 7 a 9, las bacterias nitrificantes. EPA [5], menciona como óptimos para el desarrollo de las para AOB entre 7.0 y 8 de pH y para las NOB entre 7.5 y 8, asimismo de acuerdo con González *et. al.* [8] la tasa máxima de nitrificación se produce entre 7.2 y 9.0 y que en un rango inferior a 6.5 la velocidad de la nitrificación se reduce de manera considerable.

La temperatura también es un factor determinante para la nitrificación, en condiciones aeróbicas por debajo de los 20° C decae la actividad enzimática de la oxidación del amonio [30], los valores de temperatura que en el experimento mantuvieron las unidades experimentales se mantuvo por encima de los 23°C

La nitrificación es parte del ciclo del N, para que se lleve a cabo de acuerdo con Fenchel *et. al* [6], son indispensables la disponibilidad de amonio y de oxígeno, el O<sub>2</sub> disuelto se mantuvo por encima de los valores mínimos necesarios que se determinaron de acuerdo a la altura temperatura así como de flujo de agua. Asimismo los valores medios de O<sub>2</sub> disuelto se mantuvieron por encima de los valores recomendables para la nitrificación [12], por lo cual de conformidad con los valores reportados el oxígeno fue suficiente para sostener el proceso de nitrificación y mantener a los peces sin problemas por anoxia.

##### B. Flujo de nutrientes

De acuerdo a los resultados obtenidos el proceso de biotransformación del amonio a nitrato no fue alterado por el suministro de Oxitetraciclina. Las pruebas de hipótesis efectuadas presentan evidencia que los valores medios de los iones analizados a lo largo del experimento no presentaron diferencias,



en esencia la biotransformación y flujo de elementos nitrogenados es igual entre los tratamientos y no se presentaron en concentraciones que fueran un factor de toxicidad para los organismos cultivados [1], [16], [4].

### C. *Análisis de las comunidades microbianas*

Del análisis de conglomerados que se efectuó se puede asumir que las similitudes presentadas permiten describir un grupo homogéneo integrado por las comunidades bacteriológicas de los biofiltros del tratamiento uno (unidades 1, 3 y 4) y dos conglomerados más, uno muy homogéneo integrado por dos de los biofiltros del tratamiento dos, las unidades 2 y 6, así como otro más integrado por el biofiltro 5 y el resultado de las pruebas de hipótesis usadas aportan evidencia de que las comunidades comparadas a través del análisis de fusión de alta resolución son diferentes.

Sin embargo el proceso de nitrificación no presentó diferencias entre los tratamientos, lo que hace evidente la formación de una biopelícula estructural y funcional en presencia de oxitetraciclina. Este efecto es posible explicarlo en función de lo que mencionó Johnson [14], que el desarrollo bacteriano en biopelículas funciona como una estrategia de protección; incrementa la resistencia a antibióticos, estrés térmico y depredación y lo respaldan los datos obtenidos Fatima [6], al presentar evidencia de la resistencia a antibióticos de diversas bacterias aisladas de biopelículas.

Wang et al [22], analizó el tiempo que tarda en completarse la sucesión de la comunidad bacteriana de AOB y las NOB, durante la formación de una biopelícula, los resultados presentados en el bioensayo coinciden con los autores mencionados, pero la funcionalidad de la biopelícula, se demuestra por medio el análisis de los iones que en presencia y ausencia de la oxitetraciclina, fue estadísticamente igual entre los tratamientos y las diferencias en la estructura de las comunidades, la explica la acción de la oxitetraciclina cuyo efecto antibiótico de amplio espectro al parecer solo atacó a las bacterias exógenas a la película.

De acuerdo con Fatima [6], las biopelículas microbianas se han asociado con una variedad de infecciones persistentes que responden mal al tratamiento convencional con antibióticos. Las biopelículas en presencia de antibióticos pueden ser un factor en la propagación de los rasgos de resistencia a antibióticos en patógenos, mediante el aumento las tasas de mutación por intercambio de genes que son responsables de la resistencia a los antibióticos. En el medio natural el fenómeno de la resistencia se ha estudiado y se ha documentado la resistencia a diferentes antibióticos en bacterias asociadas a los sedimentos en sitios cercanos a granjas acuícolas [2], [26]. Sin embargo hoy en día la información sobre las implicaciones clínicas del uso de químicos y antibióticos y biopelículas aún es escasa pero se deben generar protocolos para el uso responsable de antibióticos.

## REFERENCIAS

- [1] Arillo, A. C., Margiocco, M., F. Mensi P., And G. Schenone.1981. Ammonia Toxicity Mechanism in Fish: Studies on rainbow Trout (*Salmo gairdneri* Rich.) *Ecotoxicology And Environmental Safety* (5) 3: 16-328.
- [2] Chelossi, E., Vezzulli L., Milano A., Branzoni, M., c, Fabiano, M., Riccardi, G., Banat, I. M. 2003. Antibiotic resistance of benthic bacteria in fish-farm and control sediments of the Western Mediterranean. *Aquaculture* 62306: 1-15.
- [3] De la Fuente, Fernandez. Santiago. 2011. Análisis de conglomerados. Universidsd Autonoma de Madrid. Madrid, España. 55 p.
- [4] El-Shafai, S. A., El-Gohary, F. A., Nasr, F.A., van der Steen, N. P., Gijzen, H. J. 2004. Chronic ammonia toxicity to duckweed-fed tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 232: 117-127

- [5] EPA. 2002. Nitrification. U.S. Environmental Protection Agency Office of Ground Water and Drinking Water Standards and Risk Management Division 1200 Pennsylvania Ave., NW Washington DC 20004.17 p.
- [6] Fatima, S., Prasanthi, K., and Nagamani, K. 2015. Comparative evaluation of biofilm production in Multidrug resistant and sensitive Gram negative clinical isolates. *International journal of current microbiology and applied sciences* 4(6): 918-926.
- [7] Fenchel, T., King, Gm. and Blackburn T.H. 2000. *Bacterial biogeochemistry The ecophysiology of mineral cycling*. second edition .Academy Press. San Diego California. Chapter 5: 117-141.
- [6] González, P., Quintans, P., Vizcaíno, M., Miguel, R., Gonzalez, J., Pérez, J y García, R. (2010). Estudio de la inhibición del proceso de nitrificación como consecuencia de la acumulación de metales en el fango biológico de la EDAR de León y su alfo. *Tecnología del agua*. 322: 28-38.
- [8] Graber, A. and Junge R. 2009. Aquaponic Systems: Nutrient recycling from fish wastewater by vegetable production. *Desalination* 246: 147–156
- [9] Gross. A., Nemirovsky. A., Zilberg. D., Khaimov, A., Brenner A., Snir, E., Ronen, Z., N, Ali.2003. Soil nitrifying enrichments as biofilter starters in intensive recirculating saline water aquaculture. *Aquaculture* 223: 51–62.
- [10] Gujer, W. (2010). Nitrification and me- A subjective reviw. *Water Reserch*. 44:1-19.
- [11] Gutierrez-Wing, M.T., and Malone, F.M., 2006. Biological filters in aquaculture: Trends and research directions for freshwater and marine applications. *Aquacultural Engineering* 34: 163–171.
- [12] Haug, R.T. and McCarty. 1972. Nitrification with submerged filters. *Journal of Water Pollution Control Federation*. 44 (11): 2086-2102.
- [13] Head, I. M., Hiornst, W.D., Embleya,T. M., Mc Carty A. J. And Saunders J. R. 1993. The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16s ribosomal RNA gene sequences. *Journal of General Microbiology*. 139: 1147-1153.
- [14] Hovanec, T. and Delong, E. 1996. Comparative analysis of nitrifigyn bacteria associated with fresh water and marine aquaria. *Applied and environmental microbiology*. (62) 8: 2888-2896.
- [15] Hurtado, C.F. and Cancino-Madariaga. 2014. Ammonia retention capacity of nanofiltration and reverse osmosismembranes in a non-steady state system, to be use in recirculation aquaculture systems (RAS). *Aquacultural Engineering* 58: 29– 34
- [16] Ip, Y. K., Chew, S. E. And D. J. Randall. 2001. Ammonia Toxicity, Tolerance, and Excretion. *Fish Physiology*. 20: 109-148.
- [14] Johnson, L. R. 2008 Microcolony and biofilm formation as a survival strategy for bacteria. *Journal of theoretical biology*. 251: 24-34.
- [16] Li, X. N., Song, H. L., Lu, X. W., Xie, F.X., Inamori, Y. 2009. Characteristics and mechanisms of the hydroponic bio-filter method for purification of eutrophic surface water. *Ecological engineering*. 35: 1574-1583.
- [17] Lin, Ying-Feng;Jing, Shuh-Ren;Lee, Der-Yuan;Chang, Yih-Feng;Sui, Hsuan-Yu. 2010. Constructed Wetlands for Water Pollution Management of Aquaculture Farms Conducting Earthen Pond. *Water Environment Research*; 82, 8:759-768.
- [18] López-Luna, J., Ibáñez y Villarroel. 2013. Using multivariate analysis of water quality in RAS Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to model the evolution of macronutrients. *Aquacultural Engineering*, 54: 22-28.
- [19] Mathis Hjort Hjelmsø, Hestbjerg Hansen, L., Bælum. J., Feld, L., Holben, W. E., Carsten. Suhr. J, 2014. High-Resolution Melt Analysis for Rapid Comparison of Bacterial Community Compositions. *Applied and Environmental Microbiology*. (80) 12: 3568 –3575
- [20] Nelson, R. L. 2007. 10 aquaponics systems around the world. *Aquaponics Journal*. 46:8-12
- [21] Pan, J., Sun, H., Nduwimana, A., Wang, Y., Zhou. G., Ying, Y. and Zhang, R. 2007. Hydroponic plate /fabric/grass system ford treatment of aquaculture wastewater. *Aquacultural Engineering*, 37: 266-273.

- [22] Pandey P. K., Bharti, V. and Kumar, K. 2014. Biofilm in Aquaculture production. *African Journal of Microbiology Research*. (8) 13: 1434-1443.
- [23] Pardo. S., Suárez. H. y Soriano E. 2006. Tratamiento de efluentes : una vía para la acuicultura responsable. *Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia*. Córdoba 1:20-29.
- [24] Qiuzhuo Zhang, Varenym Achal, Varenym Achal, Yotong Xu, Wei, Ning Xiang. 2014. Aquaculture wastewater quality improvement by water spinach (*Ipomoea aquatica* Forsskal) floating bed and ecological benefit assessment in ecological agriculture district. *Aquacultural Engineering*, 60: 48-55.
- [25] Rakocy. J.E., Masser. M. P. and Losordo T.M. 2006. Recirculating Aquaculture Production System: Aquaponics-Integrating Fish and Plant Culture. SRAC Publication No. 454.
- [26] Rigos, G., Nengas, I., Alexis, M., Troisi, G. M. 2004. Potential drug (oxytetracycline and oxolinic acid) pollution from Mediterranean sparid fish farms. *Aquatic Toxicology* 69: 281–288.
- [27] Shi, H., Zheng, W., Zhang, X., Zhu M Ding, D. .2013. Ecological–economic assessment of monoculture and integrated multi-trophic aquaculture in Sanggou Bay of China. *Aquaculture* (410)–411: 172–178.
- [28] Timons, M.B. and Eveling, J. M. 2007. Recirculating Aquaculture. Coyuga Aqua Ventures. Ithaca Newyork. 975pp.
- [29] Urakawa H., Sh. Murata, T. Fujiwara, D. Kuroiwa, H. Maki, S. Kawabata, T. Hiwatari, H. Ando, T. Kawai, M. Watanabe and K. Kohata. 2006. Characterization and quantification of ammonia oxidizing bacteria in eutrophic coastal marine sediments using polyphasic molecular approaches and immunofluorescence staining. *Environmental Microbiology*. 8 (5), 787–803.
- [30] Van Rij, J. (1996). The potential for integrated biological treatment in recirculating fish culture - A review. 139:181-201.
- [31] Voytek M. A. and B. B. Ward. 1995. Detection of Ammonium-Oxidizing Bacteria of the Beta-Subclass of the Class Proteobacteria in Aquatic Samples with the PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 1444–145
- [32] Wang. J., Zhang C. & Rong H. 2014. Analysis and succession of nitrifying bacteria community structure in sequencing biofilm batch reactor. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:4581–4587.
- [33] Wiber, Melanie. G., Young, S. and Wilson, L. 2012. Impact of Aquaculture on Commercial Fisheries: Fishermen’s Local Ecological Knowledge. *Human Ecology* 40:29–40