

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**

**LA MOLINA**

**FACULTAD DE PESQUERÍA**



“DINÁMICA DEL NITRÓGENO EN BIOREACTORES DE UN SISTEMA DE PRODUCCION DE ALEVINOS MACHOS DE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) CON TECNOLOGIA BIOFLOC”

**Presentado por:**

**CÉSAR MIGUEL MEJÍA SORIA**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO PESQUERO**

Lima - Perú

La Molina, 2014

*A mi abuelo Hernán por desarrollar mi creatividad y enseñarme lo bella que es la vida en el campo y el contacto con la naturaleza.*

*A mi abuelo César por enseñarme la importancia del estudio, la responsabilidad, la ética profesional y desarrollar mi pensamiento crítico.*

*A mi familia, mi motivación.*

## AGRADECIMIENTOS

A mis queridas patrocinadoras y maestras Elsa Vega y María Miglio por brindarme la oportunidad de aprender y trabajar a su lado, poniendo en práctica mis competencias profesionales.

A los miembros del jurado evaluador de tesis, profesores Aníbal, Fernando y Beatriz, por el interés, motivación, apoyo y crítica, necesarios para la realización de este trabajo.

A mi padre y mi madre, Miguel y Gloria, por las constantes palabras de ánimo a lo largo de mi vida. Son y serán siempre el impulso para seguir adelante en todos los proyectos que emprenda.

A mis hermanos Bruno y Gabriella por soportarme y comprenderme cuando necesitaba silencio y tranquilidad. Los quiero mucho.

A mi abuela Gloria y a toda mi familia por su paciencia, comprensión y apoyo.

Al profesor David Roldan y la profesora Fabiola Olivares por brindarme su paciencia, ánimos y apoyo, a fin de que pueda seguir avanzando y desarrollándome profesionalmente.

A los profesores Jessie y Lizardo, a mis amigas Priscilla y Gianela, y a todos aquellos que me brindaron apoyo y colaboraron en la elaboración del presente trabajo.

A CONCITEC por el financiamiento brindado, el cual permitió el desarrollo de la presente tesis.

## INDICE GENERAL

	Pág.
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Aspectos generales sobre la tilapia.</b>	<b>4</b>
2.1.1. Aspectos biológicos de la tilapia	4
2.1.2. Calidad de agua para el cultivo de tilapia.	5
<b>2.2. Problemática en los sistemas de producción intensiva.</b>	<b>8</b>
<b>2.3. Sistemas de producción de tilapia.</b>	<b>9</b>
2.3.1. Sistemas de Producción con remoción de nitrógeno fuera de la unidad de cultivo.	9
2.3.1. Sistemas de Producción con remoción de nitrógeno dentro de la unidad de cultivo.	10
<b>2.4. Sistemas de tecnología biofloc (BFT)</b>	<b>10</b>
<b>2.5. Tipos de sistemas con tecnología biofloc</b>	<b>11</b>
2.4.1. <i>In-Situ</i> Bioflocs.	11
2.4.2. <i>ExSitu</i> Bioflocs.	11
<b>2.6. La calidad de agua en sistemas biofloc</b>	<b>11</b>
2.6.1. Beneficios del biofloc en el uso y manejo de la calidad del agua.	11
2.6.2. Parámetros críticos de calidad de agua en los sistemas BFT	12
2.6.3. Aireación y circulación del agua	13
2.6.4. Dinámica del amonio	13
<b>2.7. Estrategias de manejo para el control del amonio en sistemas BFT</b>	<b>15</b>
2.7.1. Balance de entrada en la relación C:N	15
2.7.2. Adición de carbono orgánico al agua en sistemas BFT	16

2.7.3. Promoción de la Nitrificación en sistemas de crecimiento suspendido.	18
2.8. Manejo del sistema biofloc durante la fase de inicio	18
2.9. Manejo de Sólidos en el sistema BFT	19
2.10. Manejo de la alcalinidad en sistemas BFT	20
2.11. Denitrificación en sistemas biofloc	21
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>22</b>
3.1. Etapa pre-experimental	22
3.1.1. Acondicionamiento del bioreactor de biofloc	22
3.1.2. Preparación del bioreactor	23
3.2. Etapa experimental	24
3.2.1. Siembra de peces	24
3.2.2. Manejo de la población de peces	24
3.2.3. Manejo de la alimentación	24
3.2.4. Monitoreo de la calidad del agua	24
3.2.5. Manejo de la calidad del agua del bioreactor	27
3.2.6. Procesamiento y análisis de datos	29
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES</b>	<b>31</b>
4.1. Procesos de conversión de los principales compuestos nitrogenados (NAT, N-NO <sub>2</sub> y N-NO <sub>3</sub> ) en el bioreactor con BFT	31
4.2. Evaluación de la relación de los principales compuestos nitrogenados con las variables físicas y químicas que influyen en la estabilidad del bioreactor con BFT	39
4.2.1. Análisis de correlación de Pearson entre los principales compuestos nitrogenados y las variables físicas y químicas para las etapas experimentales I y II.	39

4.2.2. Análisis de los parámetros de calidad de agua y su relación con la estabilidad del bioreactor	41
4.3. Establecimiento de un protocolo de puesta en marcha y mantenimiento de un bioreactor con BFT en agua dulce	59
4.3.1. Descripción del Sistema	60
4.3.2. Manejo del bioreactor de biofloc	62
V. CONCLUSIONES	67
VI. RECOMENDACIONES	68
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
VIII. ANEXOS	88

## INDICE DE CUADROS

	<b>Pág.</b>
<b>Cuadro 1:</b> Efectos de la concentración de oxígeno disuelto en el agua para tilapia.	6
<b>Cuadro 2:</b> Diferentes fuentes de carbono aplicadas en sistemas biofloc.	16
<b>Cuadro 3:</b> Caracterización del agua utilizada al inicio del experimento.	23
<b>Cuadro 4:</b> Dosis de Bicarbonato de sodio (g) añadido para corregir la alcalinidad.	28
<b>Cuadro 5:</b> Porcentaje de amoníaco en función al NAT, temperatura y pH.	30
<b>Cuadro 6:</b> Valores máximos y mínimos de los principales compuestos nitrogenados.	31
<b>Cuadro 7:</b> Rangos semanales de temperaturas del agua promedio diaria; temperatura máxima y mínima ambiental.	41
<b>Cuadro 8:</b> Rangos semanales de oxígeno disuelto promedio diario.	43
<b>Cuadro 9:</b> Cambio en las concentraciones de los principales aniones y cationes en el bioreactor del inicio al final de la etapa experimental.	57

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Cambios en las concentraciones ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) de las formas de nitrógeno inorgánico disueltas.	32
<b>Figura 2:</b> Cambio en la coloración del agua en el tanque bioreactor	34
<b>Figura 3:</b> Organismos presentados en las 2 etapas experimentales.	35
<b>Figura 4:</b> Dinámica del nitrógeno inorgánico en el bioreactor de biofloc.	37
<b>Figura 5:</b> Análisis de componentes principales en la etapa I (autotrófica)	39
<b>Figura 6:</b> Análisis de componentes principales de la etapa II (heterotrófica)	40
<b>Figura 7:</b> Variación de la temperatura del agua del bioreactor y las temperaturas máximas y mínimas del aire dentro del invernadero.	42
<b>Figura 8:</b> Variación de la concentración de oxígeno disuelto en el Bioreactor.	44
<b>Figura 9:</b> Variación del pH en el agua del bioreactor.	46
<b>Figura 10:</b> Fluctuación del pH en función a la variación de la alcalinidad; y el efecto de la adición de bicarbonato de sodio en la concentración de la alcalinidad	47
<b>Figura 11:</b> (a) Formación del <i>Bulking</i> y <i>Foaming</i> en el bioreactor y (b) Sedimentación lenta del biofloc en el cono imhoff.	49



<b>Figura 12:</b> Variación de la concentración de sólidos sedimentables en el bioreactor en función a la adición de melaza.	50
<b>Figura 13:</b> Variación de la transparencia y turbidez del agua en el bioreactor.	53
<b>Figura 14:</b> Variación de la concentración de ortofosfatos en el bioreactor.	54
<b>Figura 15:</b> Variación de la intensidad lumínica en Klux en la superficie del agua del bioreactor .	58
<b>Figura 16:</b> Incremento en la concentración de sólidos sedimentables en el Bioreactor.	57
<b>Figura 17:</b> Flujograma para el correcto establecimiento y manejo del bioreactor de biofloc.	60
<b>Figura 18:</b> Bioreactor con tecnología biofloc instalado (Día 1).	61
<b>Figura 19:</b> (a) Bomba de aire y (b) manguerillas y válvulas, empleadas en el sistema de aireación.	61

## INDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1:</b> Matriz de Correlación de Pearson entre los parámetros de calidad de agua en el bioreactor con BFT para la etapa I elaborado con el programa estadístico SPSS v. 22.	88
<b>Anexo 2:</b> Matriz de Correlación de Pearson entre los parámetros de calidad de agua en el bioreactor con BFT para la etapa II elaborado con el programa estadístico SPSS v. 22.	89
<b>Anexo 3:</b> Parámetros de crecimiento de la Tilapia ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) mantenida en el bioreactor de biofloc durante la etapa experimental.	90

## RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar los procesos de conversión de los principales compuestos nitrogenados (Nitrógeno Amoniacal Total,  $\text{NO}_2$  y  $\text{NO}_3$ ), y su relación con las variables físicas y químicas que influyeron en la estabilidad de un bioreactor con tecnología biofloc (BFT) el cual fue acondicionado en un sistema invernadero, con una carga inicial de  $2 \text{ Kg.m}^{-3}$  de tilapia (*Oreochromis niloticus*) con un peso promedio de 17.15 g, durante un periodo de 38 días. Para la evaluación, se dividió la etapa experimental en una autotrófica y otra heterotrófica; esta última fue especialmente controlada mediante la adición de bicarbonato de sodio y melaza como fuentes de alcalinidad y carbono orgánico respectivamente (Relación de C:N de 10:1). Los resultados mostraron que la dinámica del Nitrógeno Amoniacal Total estuvo influenciada por la presencia del biofloc, el fitoplancton y la comunidad bacteriana autotrófica. Adicionalmente, el análisis de componentes principales resultó en la alta correlación de la alcalinidad con respecto a los parámetros de calidad de agua (pH, sólidos suspendidos, compuestos nitrogenados), el cual fue un limitante cuando se encontraba en valores por debajo de los  $75 \text{ mg. CaCO}_3.\text{L}^{-1}$ . La turbidez y la transparencia fueron indicadores del crecimiento de organismos autotróficos (etapa I) y heterotróficos (etapa II) añadiendo a esta última el incremento de la concentración de sólidos sedimentables hasta los  $50 \text{ ml.L}^{-1}$ . La temperatura, oxígeno disuelto y pH no mostraron efectos significativos en la estabilidad del bioreactor debido al uso de termostatos, un buen sistema de aireación y la corrección de la alcalinidad respectivamente. La acumulación de calcio y magnesio permitió un mejor manejo y control de los sólidos sedimentables. En conclusión, debido a la dinámica definida en el bioreactor, se pudo establecer un protocolo de manejo y puesta en marcha para las condiciones específicas de calidad de agua usada en el CINPIS.

Palabras Clave: Tecnología Biofloc, Calidad de Agua, Compuestos Nitrogenados, *Oreochromis niloticus*.

## ABSTRACT

This study had the objective to evaluate the conversion processes of the main nitrogen compounds (Total Ammonia Nitrogen, N-NO<sub>2</sub> and N-NO<sub>3</sub>), and their relationship to physical and chemical variables which affected the stability of a bioreactor with biofloc technology (BFT) placed in a greenhouse system, with an initial charge of 2 kg.m<sup>-3</sup> tilapia (*Oreochromis niloticus*) with an average weight of 17.15 g, for a period of 38 days. For evaluation, the experimental stage was divided into an autotrophic and heterotrophic phase; the last one was especially controlled by addition of sodium bicarbonate and molasses as alkalinity and organic carbon sources, respectively (Ratio C:N of 10:1). Results showed that the dynamic of total ammonia nitrogen is influenced by the presence of biofloc, phytoplankton and autotrophic bacterial community. Moreover, the principal component analysis resulted in a high correlation of the alkalinity in relation to water quality parameters (pH, settleable solids, nitrogen compounds), as part of restrictions when values are under 75 mg CaCO<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup>. Turbidity and transparency were indicators of growing autotrophic organisms (Stage I) and heterotrophic (Stage II) by adding the latter, the increased concentration of total suspended solids to 50 mg.L<sup>-1</sup>. Temperature, dissolved oxygen and pH showed no significant effect on the stability of the bioreactor due to the use of thermostats, a good aeration and correcting alkalinity system, respectively. The accumulation of calcium and magnesium allowed better management and control of settleable solids. In conclusion, the bioreactor dynamics defined a management protocol and implementation for specific water quality conditions used at CINPIS.

Keywords: Biofloc Technology, Water Quality, Nitrogen Compounds, *Oreochromis niloticus*.

## I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de la tilapia en el país viene incrementándose durante los últimos años con 2435.44 toneladas producidas en el 2012 siendo la segunda especie, después de la trucha, de mayor producción en el ámbito continental (PRODUCE 2012). La producción de tilapias requiere: (a) Disponibilidad de semilla de calidad y en cantidad suficiente, que permita al productor obtener como producto los alevinos revertidos de tilapia (Meyer y De Meyer 2003, Barrera y Paz 2006), y (b) Desarrollo de nuevas tecnologías del cultivo que sean más amigables con el medio ambiente (Avnimelech 2012). Así mismo, el aumento de la producción total por área utilizada se vuelve la mayor prioridad en el desarrollo de la acuicultura (en especial de la Tilapia), siendo la intensificación de la misma, la vía más factible para cumplir estos objetivos pero tiene algunas limitaciones tales como el recurso agua, alimento disponible, entre otros. (Brune *et al.* 2003, Avnimelech *et al.* 2008, Avnimelech 2012).

Un sistema intensivo de acuicultura se caracteriza por presentar altas densidades de carga así como altos recambios de agua y el uso de grandes cantidades de alimento artificial de calidad (Piedrahita 2003, Avnimelech *et al.* 2008). Sin embargo esto puede causar el deterioro de la calidad del agua debido a la alta concentración de compuestos orgánicos (Avnimelech, 2006, Avnimelech 2007, Widanarni *et al.* 2012), debido a que solo el 20-30% del alimento es asimilado como biomasa en el pez y el otro 70-80% del alimento va ser acumulado en el cuerpo de agua como alimento no consumido o productos de excreción (Gross *et al.* 2000, Avnimelech y Ritvo 2003).

La proteína del alimento consumido va ser catabolizado como amonio, que es el primer residuo del metabolismo de la proteína en la mayoría de teleósteos y es acumulado en el agua junto a otras formas de nitrógeno inorgánico como los nitritos y nitratos (Masser *et al.* 1999, Stickney 2005).

Por lo tanto, las limitaciones en la producción intensiva de organismos acuáticos son debidas principalmente a la acumulación de metabolitos tóxicos, de los cuales, el amonio y el nitrito son los más importantes. (Avnimelech *et al.* 1992). Por ejemplo, las tilapias comienzan a morir cuando las concentraciones de amoniaco ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ) alcanzan valores de  $2 \text{ mg. L}^{-1}$  y las concentraciones de nitritos ( $\text{N-NO}_2$ ) sobrepasan los  $5 \text{ mg L}^{-1}$  (Rakocy citado por Poleo *et al.* 2011).

Por otra parte, existen 3 diferentes métodos de mantener la calidad de agua: (a) El remplazo de agua del cultivo por agua nueva, (b) Reciclar el agua a través de un biofiltro externo que purifique el agua o (c) Tratamiento del agua dentro del sistema usando algas o comunidades bacterianas. (Avnimelech 2006).

Los recambios de agua tienen un alto costo por su consumo así como por la energía necesaria para bombearla al sistema (Avnimelech 1999) cuando no se puede usar la gravedad. Por otro lado, el reciclaje del agua a través de biofiltros externos mediante el uso de bacterias autotróficas, consume la alcalinidad del agua y libera como producto final el nitrato ( $\text{N-NO}_3$ ) que puede ser tóxico en niveles altos (Ebeling *et al.* 2006). Es por ello que los estudios recientes, están enfocados al uso de microorganismos acuáticos heterotróficos como mejoradores de la calidad del agua. (Avnimelech 2012, Crab *et al.* 2012, Luo *et al.* 2012, Widanarni *et al.* 2012, Hargreaves 2013)

Los sistemas de tecnología Biofloc (BFT) en acuicultura, se centran en el uso más eficiente de los nutrientes de entrada con la condición de cero recambio de agua (Widanarni *et al.* 2012). El principal objetivo del BFT es reciclar los nutrientes con el mantenimiento de una alta tasa de Carbono/Nitrógeno (C/N) en el agua (Avnimelech 2011b) estimulando el crecimiento de las bacterias heterotróficas que convierten el amonio tóxico en biomasa microbiana (Avnimelech 1999, De Schryver *et al.* 2008, Taw, 2010), la cual estará disponible como alimento para los animales en el cultivo (Azim y Little 2008) y en el caso específico de la tilapia, debido a sus hábitos alimenticios, se ha demostrado su aprovechamiento (Dempster *et al.* 1995, Azim *et al.* 2003b).

Por lo tanto, el BFT podría ser considerado como un sistema prometedor versus un sistema con recambio de agua para desarrollar el cultivo de Tilapia (*Oreochromis niloticus*), en el cual, la calidad de agua debe ser monitoreada y evaluada en el transcurso de la actividad debido a que la tasa de C/N en el agua definirá el proceso que minimizará la acumulación del nitrógeno amoniacal total (NAT), NO<sub>2</sub> y NO<sub>3</sub>, sus fluctuaciones en el día y sus interacciones con los demás parámetros de calidad del agua (Goldman *et al.* 1987, Crab *et al.* 2007, Sesuk *et al.* 2009, Rakocy *et al.* 2011, Avnimelech, 2012). Un medio para poder realizar un monitoreo y una adecuada descripción de la dinámica del agua en un sistema con BFT, es mediante el establecimiento de un bioreactor de biofloc.

Sin embargo, los sistemas con tecnología biofloc necesitan una fase inicial de estabilización previa al desarrollo de los cultivos, de la cual, no hay mucha información disponible. Algunos autores (Avnimelech 2012, Luo *et al.* 2012, Widanarni *et al.* 2012, Hargreaves, 2013) sugieren un periodo de estabilización o inicio (“*Start-up*”) desarrollando bioreactores externos que son controlados de diferentes maneras dependiendo de las características de agua de la zona, especie a cultivar, composición del floc, fuente de carbono externa, etc. Por lo tanto, si se logra caracterizar la dinámica de los parámetros de calidad del agua (especialmente de los compuestos nitrogenados) en un bioreactor de biofloc, esto podría permitir el conocimiento necesario para el manejo del agua de cultivo destinado para la producción de tilapia (*Oreochromis niloticus*) en sus diferentes etapas.

El objetivo general del presente estudio es analizar y describir la dinámica del nitrógeno en un bioreactor de un sistema para la producción de alevines machos de tilapia (*Oreochromis niloticus*) con tecnología biofloc (BFT). De este derivan los siguientes objetivos específicos:

Evaluar los procesos de conversión de los principales compuestos nitrogenados (NAT, N-NO<sub>2</sub> y N-NO<sub>3</sub>) en un bioreactor con BFT.

Evaluar la relación existente entre los compuestos nitrogenados con las variables físicas y químicas que influyen en la estabilidad del bioreactor con BFT (pH, alcalinidad, turbidez, luz, PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>, sólidos suspendidos y oxígeno disuelto)

Establecer un protocolo de puesta en marcha y mantenimiento del bioreactor con BFT.

## **II. REVISION DE LITERATURA**

### **2.1. ASPECTOS GENERALES SOBRE LA TILAPIA**

#### **2.1.1. ANTECEDENTES**

Tilapia es un término genérico utilizado para designar un grupo de especies de peces de valor comercial pertenecientes a la familia Cichlidae; la expresión se deriva de la palabra nativa de Bechuana (Africa) "*thlape*" que significa Pez. Los Cíclidos se clasifican en el Orden Perciformes y habitan las aguas dulces y salobres de África, el Medio Oriente, las zonas costeras de la India, América Central, del Sur y el Caribe. La tilapia se encuentra representada por más de 100 especies, muchas de ellas distribuidas en diversos países del mundo (El-Sayed 2006).

La tilapia del Nilo es un pez originario del continente africano que en las últimas décadas ha sido introducido en prácticamente todas las regiones del planeta susceptibles de cultivarlo. Su resistencia a enfermedades, su fácil reproducción y su alta adaptabilidad a diferentes ambientes, alimentos y calidades de agua lo ha hecho una de las especies más populares en la acuicultura de varios países en el mundo (Vega-Villasante *et al.* 2010).

#### **2.1.2. ASPECTOS BIOLÓGICOS DE LA TILAPIA**

Presentan un cuerpo comprimido lateralmente y en algunas variedades la cabeza de los machos es más grande que de las hembras. Tiene boca protráctil, con dientes cónicos. Tiene un solo orificio nasal a cada lado de la cabeza, característica que las diferencia de las mojarra. (ALICORP 2002).



Es un pez de rápido crecimiento, se puede cultivar en estanques y en jaulas, soporta altas densidades, resiste condiciones ambientales adversas, tolera bajas concentraciones de oxígeno y es capaz de utilizar la productividad primaria de los estanques, es decir, se alimenta tanto de fitoplancton como de zooplancton. Crece bien y puede obtenerse una alta producción de su cultivo en estanques, debido a que es considerada una especie omnívora. (ASTILAPIA 2009).

Una característica de la mayoría de las tilapias es que aceptan fácilmente los alimentos suministrados artificialmente. Para el cultivo se han empleado diversos alimentos, tales como plantas, desperdicios de frutas, verduras y vegetales, semillas oleaginosas y cereales, todos ellos empleados en forma suplementaria. La base de la alimentación de la tilapia la constituyen los alimentos naturales que se desarrollan en el agua y cuyo contenido proteico es de un 55% (peso seco) aproximadamente. (Toledo-Pérez y García-Capote 2000, El-Sayed 2006, Saavedra 2006). La tilapia tiene hábitos omnívoros – herbívoros, por lo que han desarrollado adaptaciones estructurales, como los dientes faríngeos, un intestino largo (7 veces el largo del cuerpo), y un estómago pequeño y poco desarrollado. (ALICORP 2002).

### **2.1.3. CALIDAD DE AGUA PARA EL CULTIVO DE TILAPIAS**

#### **a. Temperatura**

El género tilapia se desarrolla en un amplio rango de temperatura del agua y este se encuentra comprendido entre 17°C y 30°C (Lund y Figueira, citados por Borrovich 2010), señalando que entre 17.2°C y 19.6°C se encuentra el límite inferior para posibilitar el crecimiento de la tilapia; siendo las temperaturas entre 18°C y 28°C en las que mejor se adapta esta especie. A temperaturas menores de 15°C no crecen y cuando desciende menos de 12°C no sobreviven mucho tiempo. Durante los meses fríos dejan de crecer y el consumo de alimento disminuye cuando se presentan cambios repentinos de 5°C/día. Los límites superiores de tolerancia varían entre 37°C y 42°C. (Saavedra 2006).

Para Meyer (2004), la tilapia se adapta con facilidad a las condiciones variables de su entorno debido a que es un pez tropical y la temperatura óptima para su cultivo debe encontrarse por encima de 24°C y por debajo de 32°C, ya que a temperaturas muy elevadas las larvas pueden pasar mucho más rápido el periodo lábil de la inversión.

## b. Oxígeno Disuelto

Según Sastre *et al.* (2004) el oxígeno disuelto es probablemente la variable de calidad de agua más crítica en el cultivo de organismos acuáticos; por lo tanto debe tenerse en cuenta, no solo la disponibilidad de oxígeno disuelto, sino también los requerimientos de este por la especie o especies a cultivar.

Boyd, citado por Borrovich (2010) mencionaba que la solubilidad del oxígeno disminuye a medida que la temperatura del agua aumenta y que, además, es el principal factor que afecta el metabolismo respiratorio y la excreción de amonio en organismos acuáticos.

La tilapia es una especie reconocida por su gran tolerancia a las fluctuaciones de oxígeno pudiendo tolerar concentraciones tan bajas como  $0.01 \text{ mg.L}^{-1}$  de oxígeno disuelto en el agua por cortos periodos de tiempo; sin embargo, esta tolerancia es mayor en ejemplares mayores a los 20 g. (Balarin, citado por Borrovich 2010). Del mismo modo, Valbuena y Cruz (2006) observaron que existe una relación directa entre el consumo de oxígeno y la temperatura del agua, encontrando que peces de 25 g. a  $18^{\circ}\text{C}$  consumieron menor cantidad de oxígeno que los peces de 25 g. que se encontraban a  $30^{\circ}\text{C}$ . Los mismos autores afirman que a un mayor peso corporal de tilapias, el consumo de oxígeno es menor; encontrando una relación inversa.

**Cuadro 1: Efectos de la concentración de oxígeno disuelto en el agua para tilapia.**

<b>OXÍGENO DISUELTO (<math>\text{mg.L}^{-1}</math>)</b>	<b>EFEECTO EN ALEVINES</b>
0.3 – 1.0	Letal en exposiciones prolongadas
2.0 – 4.0	Hay sobrevivencia, pero mayor porcentaje de mortalidad en exposiciones prolongadas
5.0 – más	Rango deseable

FUENTE: Swingle, citado por Larriviere *et al.* 2002

Saavedra (2006) indica que la especie prefiere niveles de oxígeno disueltos mayores a 3 mg.L<sup>-1</sup> pero de preferencia mantenerlos por encima de los 5 mg.L<sup>-1</sup> debido a que el valor adicional, disminuye por reacciones químicas de descomposición de la materia orgánica, alimento no consumido, heces, aumento de la tasa metabólica por incremento de la temperatura y remoción de oxígeno en el agua del efluente. Los efectos de diferentes concentraciones de oxígeno en alevines, se observan en el Cuadro 1.

#### **c. pH**

Es la concentración de iones de hidrógeno en el agua. (Roldan 1992). Se considera que el pH óptimo para el cultivo de tilapia está entre 6.5 y 9.0 (Saavedra 2006, Cantor 2007). En aguas cálidas la fotosíntesis normalmente eleva el pH de 9 a 10, disminuyendo hacia la noche al incrementarse el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Valores por encima o por debajo de los óptimos retrasan la reproducción y disminuyen el crecimiento. Cuando estos están cercanos a 5 se pueden presentar fallos respiratorios (Gonzales, 2004).

#### **d. Alcalinidad**

La alcalinidad es referida a la cantidad de carbonatos (CO<sub>3</sub><sup>-2</sup>) presentes en la columna de agua, estos son muy importantes porque tienen un efecto buffer al acidificarse en la columna de agua ya que pueden retener los protones (H<sup>+</sup>) generados por la degradación de la materia orgánica en sistemas acuícolas. (Orduz y Constanza 2007).

Una alcalinidad mayor a 40 mg CaCO<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup> se considera adecuada y propicia para no limitar la productividad primaria de los estanques (Egna y Boyd 1997).

#### **e. Nitrógeno Amoniacal Total (NAT)**

Está conformado por la concentración de amonio y amoniaco. Los valores de amoniaco deben fluctuar entre 0.01 – 0.1 mg.L<sup>-1</sup> (valores cercanos a 2 mg.L<sup>-1</sup> ya son críticos). El amoniaco es tóxico y depende del pH y de la temperatura del agua. Los niveles de tolerancia propiamente dichos para la tilapia se encuentran en un rango de 0.6 – 2.0 mg.L<sup>-1</sup> (Baltazar y Palomino 2004, Liñan 2007).

Para la tilapia del Nilo se ha calculado la  $LC_{50}$  (Concentración Letal Media) de amoníaco en 48 horas para larvas de 1.007 - 1.010  $mg.L^{-1}$  y 7.39 - 7.41  $mg.L^{-1}$  con alevines de aproximadamente 1g de peso promedio (Benli y Koksak 2005). Por otra parte las tilapias muestran sensibilidad a concentraciones elevadas de nitritos. EL  $LC_{50}$  de 96 horas para *O. aureus* fue de 16.2  $mg.L^{-1}$  a un pH de 7.2 y 22  $mg.L^{-1}$  de cloruros (Palachek y Tomasso 1984). Lossordo (1997) recomienda mantener los niveles de nitrito por debajo de los 5  $mg.L^{-1}$ .

## **2.2. PROBLEMÁTICA EN LOS SISTEMAS DE PRODUCCIÓN INTENSIVA**

La limitación de los recursos naturales, especialmente de tierra y agua, son un desafío para los expertos en acuicultura para hacer sistemas de acuicultura cada vez más productivos y eficientes (Ekasari *et al.* 2010). Por lo tanto, la intensificación de la acuicultura se vuelve una de las formas más razonables de completar este objetivo (Avnimelech 2007, Avnimelech, *et al.* 2008, Widanarni *et al.* 2012). Por otro lado, los programas de intensificación de la acuicultura tienen además necesidades específicas como un estricto manejo de la calidad de agua para mantenerla apropiadamente (Ekasari *et al.* 2010), evitar la generación de cantidades significativas de efluentes contaminantes que contengan heces, alimento no consumido (Read y Fernandes 2003) y productos del metabolismo de la proteína liberados por los peces (Stickney 2005). El amonio es uno de ellos y se encuentra en el agua en un estado de equilibrio con el amoniaco dependiendo del pH y temperatura del agua (Avnimelech *et al.* 1986, Avnimelech *et al.* 1992, Timmons *et al.* 2002, Avnimelech, 2006).

El amoniaco en los sistemas de acuicultura, puede ser mantenido en bajas concentraciones por dilución, con tasas de 2 % a más de 100 % del volumen de agua, dependiendo de la densidad de los cultivos (Manju *et al.* 2009). El recambio de agua es una de las técnicas más comunes usadas para mantener la calidad del agua (Boyd 2003). Estos recambios de agua sin ningún tratamiento adicional conllevan a la acumulación de productos residuales dentro del agua que los recibe. Consecuentemente, los efluentes de acuicultura son considerados como una fuente importante de contaminación (Crab *et al.* 2007, Ekasari *et al.* 2010).

Varios métodos han sido desarrollados para superar la acumulación de amonio en la acuicultura, como los sistemas de recirculación en acuicultura (RAS), acuicultura basada en perifiton y la tecnología biofloc (BFT).

## **2.3. SISTEMAS DE PRODUCCION DE TILAPIA**

Los sistemas de producción conocidos son aquellos de tipo comercial que se desarrollan en forma semi-intensiva, intensiva y súper-intensiva. El sistema de producción adoptado dependerá de varios factores, entre ellos, de la disponibilidad de recursos financieros e insumos, del mercado consumidor al que esté dirigido el producto, del acceso a regiones con temperaturas aptas para el cultivo, de la disponibilidad de agua y abastecimiento de la misma desde el sitio seleccionado, del terreno apto para las construcciones necesarias, y del conocimiento del productor acerca del manejo a efectuar en el sistema a elegir (Luchini 2006).

Un concepto importante a determinar es la denominada “Capacidad de Carga” que es capaz de ser sustentada en la unidad de producción seleccionada ya que el crecimiento de los peces bajo cultivo se detendrá cuando dicha capacidad alcance su máximo y cualquier tentativa de superar este límite, podrá posibilitar la pérdida del cultivo a menos que se incremente la tecnología a utilizar (Luchini 2006).

### **2.3.1. SISTEMAS DE PRODUCCIÓN CON REMOCIÓN DE NITRÓGENO FUERA DE LA UNIDAD DE CULTIVO**

Los métodos de tratamiento que son aplicados, están clasificados en: físicos, químicos y biológicos. Este último es el más importante con respecto a los tratamientos de aguas residuales y el mantenimiento de calidad de agua del cultivo siendo el mayor proceso biológico la nitrificación (Crab *et al.* 2007), la cual se realiza frecuentemente en los biofiltros (Avnimelech 2006). Esta es realizada por bacterias autotróficas que obtienen su energía de compuestos inorgánicos. La bacteria oxidadora del amonio (AOB) obtiene su energía catabolizando el amonio no ionizado hacia nitritos. La bacteria oxidadora del nitrito (NOB) oxida el nitrito en nitrato, consumiendo dióxido de carbono como fuente de carbono primario, requiriendo oxígeno para crecer. El producto final de la reacción es nitrógeno-nitrato (N-NO<sub>3</sub>), que no es normalmente tóxico en niveles moderados en sistemas de producción acuícola (Ebeling *et al.* 2006).

### **2.3.2. SISTEMAS DE PRODUCCIÓN CON REMOCIÓN DE NITRÓGENO DENTRO DE LA UNIDAD DE CULTIVO**

Se conocen 2 vías para la remoción del nitrógeno amoniacal. La primera vía se obtiene desarrollando y controlando una densa población de microorganismos en la columna de agua unidos al perifiton, los cuales aceleran la remoción biológica de los residuos orgánicos e inorgánicos en los estanques (Azim *et al.* 2003, Hargreaves 2006, Azim y Little 2008, Milstein *et al.* 2009). La otra vía conocida es mediante el uso de la tecnología biofloc (Crab *et al.* 2007) los cuales son usados para el tratamiento del agua, producción de alimento natural, recicladores de nutrientes, etc. (Serfling 2006). En este medio se desarrollará una mayor biomasa bacteriana heterotrófica, en comparación a la bacteriana autotrófica, y además, será necesario un manejo de los sólidos suspendidos totales (TSS) para remover el exceso que no es requerido. (Ebeling *et al.* 2006).

### **2.4. SISTEMAS DE TECNOLOGÍA BIOFLOC (BFT)**

La Tecnología Biofloc (BFT) es una nueva técnica utilizada en los sistemas de acuicultura (Avnimelech y Kovcha 2009). Puede ser definida como una técnica de manejo de calidad de agua, que está basada en el desarrollo y control de bacterias heterotróficas dentro del sistema de cultivo con cero recambio de agua (Avnimelech *et al.* 1989). Los Biofloc son formados conteniendo una mixtura heterogénea de microorganismos, partículas, coloides, polímeros orgánicos, heces, alimento no consumido, etc. (De Schryver *et al.* 2008, Taw 2010, Kunh 2012). La población bacteriana puede ser manejada con la adición de carbohidratos en el agua permitiendo a su vez la toma de nitrógeno del agua y la síntesis de proteína microbiana (Megahed 2010, Ray *et al.* 2011;). Además de ello, desarrollando densos floc de organismos heterotróficos en los tanques, pueden acelerar la “limpieza” biológica de los residuos orgánicos e inorgánicos en el tanque (Azim *et al.* 2003a, Avnimelech 2005).

La regeneración o inmovilización de nutrientes dependen del carbono total tomado por la bacteria, la eficiencia de la conversión bruta y sobre la relación de carbono/nitrógeno (C/N) de la bacteria y el sustrato. (Schneider *et al.* 2005, Olvera-Olvera *et al.* 2009).

La formación de nitrógeno inorgánico en los sistemas biofloc puede ser controlado por la manipulación de la relación de C/N orgánico como una forma de promover el crecimiento de las bacterias heterotróficas (Avnimelech 1999).

## **2.5. TIPOS DE SISTEMAS CON TECNOLOGÍA BIOFLOC**

### **2.5.1. IN-SITU BIOFLOCS**

Son formados dentro de los estanques de cultivo por la manipulación de la relación carbono/nitrógeno (C/N) en valores mayores a 8:1 (Kunh 2012), teniendo valores óptimos entre 10:1 hasta 20:1 (Avnimelech 1999, Crab *et al.* 2009). De esta forma, proveyendo una apropiada relación de C/N, se promueve el crecimiento de las bacterias heterotróficas mientras transforman el amonio directamente de la columna del agua en biomasa bacteriana (Avnimelech *et al.* 1995, Kunh 2012).

### **2.5.2. EX-SITU BIOFLOCS**

Son formados en reactores biológicos de Crecimiento-Suspendido. Los reactores biológicos pueden ser empleados para remover los sólidos y nitratos acumulados en los efluentes de la producción acuícola. La adición de carbono también puede ser usada para promover la actividad biológica. La ventaja de este reactor a comparación del anterior, radica en que la demanda de oxígeno es mucho menor por que el biofloc y los animales de cultivo no se encuentran en la misma agua (Kunh 2012).

## **2.6. LA CALIDAD DE AGUA EN SISTEMAS BIOFLOC**

### **2.6.1. BENEFICIOS DEL BIOFLOC EN EL USO Y MANEJO DE LA CALIDAD DEL AGUA**

La tecnología Biofloc hace posible minimizar el recambio de agua y el uso del agua en sistemas de acuicultura a través del mantenimiento adecuado de la calidad del agua dentro de la unidad de cultivo, mientras produce a bajo costo bioflocs ricos en proteína, que por otro lado puede servir como alimento para los organismos acuáticos (Crab *et al.* 2007, Crab *et al.* 2009, Crab 2010b, Crab *et al.* 2012).

## **2.6.2. PARÁMETROS CRÍTICOS DE CALIDAD DE AGUA EN LOS SISTEMAS BFT**

Con una tecnología In-Situ, los bioflocs pueden asimilar el amonio directamente en proteína microbiana, y de este modo prevenir la acumulación de nitritos y nitratos que provienen de la nitrificación. Además de ello, tiene una alta demanda de oxígeno debido a que el cultivo de animales y biofloc se da en la misma agua. Los peces requieren más de 5 mg.L<sup>-1</sup> de oxígeno disuelto. (Avnimelech 2011a)

Aunque se ha demostrado que el sistema con BTF en estanques de tilapia es relativamente fácil de operar (Avnimelech 2007, Azim y Little 2008, Widanarni *et al.* 2012), el sistema demanda un cuidadoso control de la calidad del agua y una rápida respuesta a las anomalías que se presenten, cuando sean detectadas. Debido a que el estanque presenta una muy alta biomasa y que cualquier falla no respondida, puede volverse crítica, se debe tener especial cuidado en los siguientes parámetros:

### **a. Oxígeno Disuelto**

Si el oxígeno es alto, se puede reducir el número de aireadores aplicados para ahorrar electricidad. Sin embargo, si el oxígeno disuelto es menor a 4 mg.L<sup>-1</sup>, se deberá añadir más aireadores. (Avnimelech *et al.* 2008, Avnimelech 2011a)

### **b. Nitrógeno Amoniacal Total (NAT)**

Un nivel de NAT bajo (<0.5 mg.L<sup>-1</sup>) significa que el sistema trabaja bien. Se puede considerar una baja adición de carbono en ese tipo de casos. Si el NAT se incrementa, una solución rápida puede ser el incremento en la adición de carbono.

### **c. Nitritos (NO<sub>2</sub>)**

Los nitritos pueden afectar negativamente a la tilapia, aunque los efectos son limitados en agua salada. Sin embargo, un incremento del NO<sub>2</sub> puede ser un indicador del crecimiento de zonas anaeróbicas o de nitrificación (Ebeling *et al.* 2006).



En el caso de un incremento de nitritos, se debe ser cuidadoso en observar la posible presencia de montículos de lodos en los estanques, y cambiar el despliegue de los aireadores. (Avnimelech 2011a)

### **2.6.3. AIREACIÓN Y CIRCULACIÓN DEL AGUA**

Una intensiva y turbulenta circulación es un requerimiento esencial en los sistemas biofloc. Los sólidos deben estar suspendidos en la columna de agua todo el tiempo o el sistema no funcionará. Sin una circulación apropiada, los bioflocs van a sedimentar y pueden formar montículos que consumirán rápidamente el oxígeno disuelto (Ray *et al.* 2010a, Emerenciano 2013, Hargreaves 2013). Estas zonas anaeróbicas pueden llevar a la liberación de sulfuros de hidrógeno, metano, y amonio que son tóxicos para los peces y crustáceos (Hargreaves 2013).

Comparada con el agua de los tanques en los sistemas de recirculación (RAS), el agua en los sistemas biofloc tienen una elevada tasa de respiración debida a la alta concentración de sólidos suspendidos. La respiración del agua en tanques con agua marrón en sistemas biofloc tiene normalmente un consumo de  $6 \text{ mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$  por hora. Es absolutamente esencial proveer suficiente aireación para mantener esta alta demanda de oxígeno y mantenerlo dentro de los rangos seguros (Hargreaves 2013).

### **2.6.4. DINÁMICA DEL AMONIO**

El objetivo más importante en el manejo de la calidad del agua en cualquier sistema de producción de animales acuáticos es mantener la concentración de amonio por debajo de sus niveles tóxicos (Michaud *et al.* 2006). En los sistemas biofloc hay 3 procesos para controlar amonio: asimilación por algas, asimilación bacteriana y la nitrificación. La transformación y dinámica del amonio en sistemas biofloc son complejas, envolviendo una interacción entre las algas y las bacterias por su competencia por el amonio.

La relativa importancia de cada uno de esos procesos depende de varios factores, entre ellos la tasa de alimentación, la concentración de sólidos suspendidos (Avnimelech 1993, Ray *et al.* 2010b), la concentración de amonio (Crab *et al.* 2009), la intensidad de la luz (Baloi *et al.* 2013) y la entrada de una tasa de Carbono-Nitrógeno (Avnimelech 1999, Asaduzzaman *et al.* 2010).

### **a. Asimilación por algas**

En cualquier sistema biofloc expuesto a la luz, una densa masa algal puede desarrollarse en respuesta a la carga de nutrientes que vienen del alimento.

Los nutrientes liberados provenientes de la descomposición de la materia orgánica (incluyendo algas muertas, sólidos fecales y alimento no consumido) son rápidamente captados y almacenados en sus células algales. (Milstein *et al.* 2009, Hargreaves 2013)

La tasa de consumo por algas en los sistemas biofloc está regulada por influencia de la intensidad de luz que llega bajo el agua. En las primeras etapas del sistema biofloc donde la captación del NAT depende de las algas, extensos periodos con clima nublado pueden generar altas concentraciones de este compuesto en el agua. (Hargreaves 2004)

La fluctuación en el día del oxígeno disuelto y pH, considerando una alta aireación, es otra característica de los sistemas biofloc donde la actividad algal es predominante. (Vinatea *et al.* 2010, Hargreaves 2013).

### **b. Asimilación Bacteriana**

Varios de los nombres más usados para designar un sistema biofloc incluyen la palabra heterotróficos, que describe un grupo de bacterias que, por definición, obtienen el carbón de fuentes orgánicas. A pesar de los grandes ingresos de alimento en los sistemas intensivos, el crecimiento de las bacterias heterotróficas en sistemas biofloc está limitado por el carbono orgánico disuelto. Para estimular la producción de bacterias heterotróficas, la relación C/N es incrementada por la adición de una fuente suplementaria de carbohidratos o reduciendo el nivel de proteína de la dieta (Chamberlain *et al.* 2001, Michaud *et al.* 2006, Haslun *et al.* 2012, Pérez-Fuentes *et al.* 2013)

Gracias a esta manipulación, las bacterias heterotróficas crean una demanda de nitrógeno (como amonio) debido a que el carbono orgánico y el nitrógeno inorgánico son generalmente tomados en una tasa corregida que refleja la composición y requerimiento de las células bacterianas. Así, el amonio puede ser controlado mediante la adición de carbono orgánico para promover el crecimiento de las bacterias heterotróficas (Asaduzzaman *et al.* 2010 y Avnimelech 2012)

Similar al caso de las algas, el amonio es inmovilizado mientras es almacenado en las células de las bacterias heterotróficas como proteína. Debido a que la tasa de crecimiento de las bacterias heterotróficas es 40 veces más rápida que de las nitrificantes (Cedano-Castro *et al.* 2013), el control e inmovilización del amonio ocurre mucho más rápido, usualmente entre horas o días si hay una suficiente cantidad de carbono orgánico.

El almacenamiento del nitrógeno en las células bacterianas es temporal debido a que esto se retorna rápidamente liberando nitrógeno como amonio cuando ellas se descomponen (Crab *et al.* 2007). Además de ello, las células son consumidas por los peces o removidas como excesos de sólidos. (De Schryver *et al.* 2008)

### **c. Nitrificación**

Las dos etapas de oxidación del amonio a nitrato conforman la nitrificación (Sesuk *et al.* 2009). Según Ebeling *et al.* (2006), los procesos bacterianos transforman la forma tóxica del nitrógeno (amoníaco) a una que solo es tóxica en altas concentraciones (nitrato). En el tiempo, el nitrato se acumula en sistemas biofloc debido a que no se realiza ningún recambio de agua. Solo se cubren las pérdidas por evaporación (Carbó y Celades 2012).

## **2.7. ESTRATEGIAS DE MANEJO PARA EL CONTROL DEL AMONIO EN SISTEMAS BIOFLOC**

### **2.7.1. BALANCE DE ENTRADA EN LA RELACIÓN C:N**

En los sistemas biofloc, el principal parámetro que controla la concentración de amonio es la relación C:N en el alimento que entra al agua. Un alimento con 30 a 35% de proteína tiene una baja relación de C:N, alrededor de 9:1 a 10:1. Incrementando el ratio C:N a niveles de 12:1 o 15:1 favorece el control del amonio por vía heterotrófica.

Los bajos ratios de C:N pueden ser aumentados mediante la adición de insumos o productos que presenten altas relaciones de C:N. Otra forma puede ser incrementando el C:N reduciendo el nivel de proteína del alimento. La asimilación del amonio por las bacterias heterotróficas ocurre rápidamente tras la adición de carbohidratos. El control del amonio a través de la vía heterotrófica es más estable y confiable que la asimilación algal o la nitrificación (Hargreaves 2013).

## 2.7.2. ADICIÓN DE CARBONO ORGÁNICO AL AGUA EN SISTEMAS BFT

Muchos materiales naturales o procesados han sido utilizados como fuentes de carbono en sistemas biofloc, incluyendo granos, pellets, melaza, azúcar de caña, entre otros (Cuadro 2).

Los materiales utilizados como carbohidratos deben ser de bajo costo y convenientes. El material orgánico que se descompone fácilmente y rápido, es el mejor (Emerenciano *et al.* 2013).

**Cuadro 2: Diferentes fuentes de carbono aplicadas en sistemas biofloc.**

<b>Fuente de Carbón</b>	<b>Especie Cultivada</b>	<b>Referencia</b>
<b>Acetato de Sodio</b>	<i>M. rosenbergii</i>	Crab 2010
<b>Harina de Casava</b>	<i>P. monodon</i>	Avnimelech y Mokady 1988
<b>Celulosa</b>	<i>Tilapia</i>	Avnimelech <i>et al.</i> 1989
<b>Harina de Maíz</b>	<i>Basa y Tilapia Híbrida</i>	Milstein <i>et al.</i> 2001 Asaduzzaman <i>et al.</i> 2010
<b>Dextrosa</b>	<i>L. vannamei</i>	Suita 2009
<b>Glicerol</b>	<i>M. rosenbergii</i>	Crab <i>et al.</i> 2010
<b>Glucosa</b>	<i>M. rosenbergii</i>	Crab <i>et al.</i> 2010
<b>Melaza</b>	<i>L. vannamei</i> y <i>P. monodon</i>	Burford <i>et al.</i> 2004, Panjaitan 2004, Samocha <i>et al.</i> 2007
<b>Tapioca</b>	<i>L. vannamei</i> y <i>M. rosenbergii</i>	Hari <i>et al.</i> 2004, Asaduzzaman <i>et al.</i> 2008
<b>Harina de Trigo</b>	<i>O. niloticus</i>	Azim y Little 2008
<b>Afrecho + Melaza</b>	<i>F. brasiliensis</i> , <i>F. paulensis</i> y <i>F. duorarum</i>	Emerenciano <i>et al.</i> 2012a, Emerenciano <i>et al.</i> 2011, Emerenciano <i>et al.</i> 2012b
<b>Almidón</b>	<i>O. niloticus x O. aureus</i> y <i>Tilapia (Mozambique)</i>	Crab <i>et al.</i> 2009, Avnimelech 2007

FUENTE: Adaptado de Emerenciano 2013.

Las bacterias heterotróficas pueden actuar rápidamente, entre minutos y horas. Carbohidratos simples como los azúcares (Sacarosa o dextrosa) o almidones pueden tener un efecto rápido.

Hari *et al.* (2004) facilitó el desarrollo de bacterias heterotróficas y la relacionó con la proteína sintetizada *in situ* mediante el incremento de la tasa de C/N del alimento y la adición de carbohidratos en los tanques.

Los niveles de las especies de nitrógeno inorgánico en la columna de agua fueron reducidos debido a su consumo por las bacterias heterotróficas. Los niveles de NAT fueron de 0.01 mg.L<sup>-1</sup>, que es bajo comparado a los niveles (0.5-3.0 mg.L<sup>-1</sup>), reportados por Hopkins *et al.*, citados por Hari *et al.* (2004). El consumo del floc microbiano incrementó la retención de nitrógeno del alimento suministrado en un 13%.

Óptimas tasas de C/N para la producción de bacterias heterotróficas están sobre los 12-15:1 (Avnimelech 1999, Henze *et al.* 1996) y otros indican entre 15-20:1 (Avnimelech 2012, Hargreaves 2013, Pérez-Fuentes *et al.* 2013). Con respecto a ello, los peces que reciben dietas con altos valores de proteína, están produciendo deficiencias de carbono debido a los altos nivel de nitrógeno excretado. A consecuencia de ello, el nitrato se acumula en el agua del sistema y la tasa cae hasta un 3:1 (Schneider *et al.* 2006a).

El acetato de sodio es fácilmente degradable como una fuente de carbono y a pesar de ser ampliamente utilizado como sustrato para la producción bacteriana (Luo *et al.* 2014) puede ser económicamente malo en grandes cantidades destinadas para la producción de biofloc. Una alternativa puede ser la melaza como fuente de carbono, ya que su costo es menor. La composición de ésta es favorable porque contiene poco nitrógeno (3-7%), y menos del 1% de ceniza o fibra (Curtin 1993, Samocha *et al.* 2007).

Las melazas, mieles finales o melazas “*Blackstrap*”, suelen ser definidas, por muchos autores como los residuos de la cristalización final del azúcar de los cuales no se puede obtener más azúcar por métodos físicos. Con una apariencia similar a un jarabe o líquido denso y viscoso.

La composición de la melaza es muy heterogénea y puede variar considerablemente dependiendo de la variedad de caña de azúcar, suelo, etc. Por otro lado la melaza de caña se caracteriza por tener grados Brix o sólidos disueltos de 68 – 75 % y un pH de 5.0 – 6.1.

Según el nivel de azúcar total y el contenido de humedad se clasifica como: (a) Melaza Superior *BlackStrap*: Melaza de caña que contiene 23.4% de agua o menos y 53.5% o más de azúcares totales, (b) Melaza *BlackStrap*: Melaza compuesta por 23.5% a 26.4% de agua y 48.5% a 53.5% de azúcares totales (Fajardo y Sarmiento 2007).

### **2.7.3. PROMOCIÓN DE LA NITRIFICACIÓN EN SISTEMAS DE CRECIMIENTO-SUSPENDIDO**

Este sistema no requiere un suplemento de carbohidratos o consideraciones sobre la tasa de C/N. Este método enfatiza a la nitrificación sobre las otras vías de control de amonio, usando bacterias nitrificantes que están ligadas a los sólidos suspendidos (en las superficies de las unidades de cultivo). Una buena circulación en un sistema biofloc sin adición de carbohidratos tiende a desarrollar este mecanismo de control del amonio naturalmente.

Una de las principales desventajas de este método es el consumo de la alcalinidad por la nitrificación (Hargreaves 2013).

### **2.8. MANEJO DEL SISTEMA BIOFLOC DURANTE LA FASE DE INICIO**

Durante la fase de inicio (“*Start-up*”), los cambios en la calidad del agua en los sistemas biofloc son muy similares a los sistemas de recirculación convencionales (Avnimelech 2006). El inicio del sistema se caracteriza por retrasos en las concentraciones máximas de amoníaco y nitritos conforme las diferentes poblaciones de bacterias se desarrollan. Si la tasa de alimentación se incrementa rápidamente, las concentraciones de amoníaco y (especialmente) nitrito pueden incrementarse hasta el punto de volverse tóxicos y afectar el crecimiento de los peces, conversión alimenticia, resistencia a enfermedades o (en algunos casos), la supervivencia (Avnimelech 2012, Hargreaves 2013).

La duración de la fase de “*Start-up*” depende de un amplio rango de factores, incluyendo la temperatura, programación de la tasa de alimentación y la pre-siembra del sistema con las especies exactas y cantidad de microorganismos. Los protocolos de aclimatación de los sistemas BFT no han sido estandarizados, y varios sistemas operativos han desarrollado sus propias técnicas a través de su larga y adquirida experiencia. (Hargreaves 2013)

Los altos valores de amoníaco y nitritos pueden ser evitados o minimizados durante la “*Start-up*” mediante la adición de carbohidratos (Avnimelech 1999).

Para neutralizar 1 mg.L<sup>-1</sup> de amoníaco (como nitrógeno), se puede añadir 15 a 20 mg.L<sup>-1</sup> de carbono orgánico. El carbohidrato añadido durante la “*Start-up*” puede mantener baja la concentración de amonio y extender el tiempo requerido para la aclimatación del sistema. (Hargreaves 2013)

Luo *et al.* (2012) indica que existen 3 fases diferenciadas:

(1) Fase inicial (“*Start-up*”): Consiste en construir el bioreactor hasta alcanzar el punto en el que los componentes del agua se estabilicen. Para ello utilizó dos tratamientos (Con 3 repeticiones cada uno): (a) Con adición de glucosa C:N= 10:1 y (b) Sin la adición de glucosa. Los parámetros del agua se midieron diariamente en la mañana.

(2) Segunda fase experimental: Esta comienza después de haber pasado 33 días desde que comenzó la fase inicial y cuando se tengan los valores de NAT, N-NO<sub>2</sub> y N-NO<sub>3</sub> estables. El objetivo de esta fase es enfocarse en la capacidad del reactor de asimilar el NAT. Para ello se agregó 15 g de Glucosa y 0.5 g de KNO<sub>3</sub>. Los parámetros del agua se midieron a cada hora por 2 días.

(3) Tercera fase experimental: Dos días después, la capacidad del bioreactor para remover los nitratos fue probada. Se volvió a añadir 10 g de glucosa y 0.5 g de KNO<sub>3</sub>. Los parámetros del agua se midieron cada hora por 2 días.

## **2.9. MANEJO DE SOLIDOS EN EL SISTEMA BFT**

En el tiempo, y con suficiente mezcla de aguas, los sólidos pueden acumularse en indeseables niveles (2000 – 3000 mg.L<sup>-1</sup>). Los sistemas biofloc operan típicamente en concentraciones de sólidos suspendidos (SS) menores a los 1000 mg.L<sup>-1</sup> y en la mayoría de ellos por debajo de los 500 mg.L<sup>-1</sup>. Una concentración de SS de 200 hasta 500 mg.L<sup>-1</sup> es suficientemente bueno para el funcionamiento del sistema y permite controlar el amoníaco sin una excesiva respiración de los organismos en el agua. (Hargreaves 2013).

Los conos de sedimentación o Imhoff son una vía rápida para determinar la concentración de SS. Los conos tienen graduaciones marcadas externamente y pueden ser usadas para medir el volumen de sólidos sedimentados en 1 litro del agua del sistema. El tiempo estandarizado es de 10 a 20 minutos. Según APHA (1988), el tiempo es de 45 min.

Manteniendo la concentración de sólidos sedimentables desde 25 hasta 50  $\text{ml.L}^{-1}$  puede proporcionar un buen funcionamiento en los sistemas de biofloc para el cultivo de tilapia. (Hargreaves 2013).

Una vez terminado el proceso de cultivo, se debe remover biofloc desde el bioreactor para estabilizar la población de microorganismos. Por ejemplo, eliminando un 10% de los sólidos por día, permitiría mantener al biofloc con un promedio de 10 días de edad. La edad del biofloc influye en el tipo de organismos que lo formarán. Un biofloc joven permitirá una predominancia de organismos heterotróficos y un biofloc viejo podría ser dominado por la presencia de hongos. (Avnimelech 2012)

## **2.10. MANEJO DE LA ALCALINIDAD EN SISTEMAS BFT**

La alcalinidad es la capacidad buffer del agua para resistir cambios en el pH en respuesta a las adiciones de ácidos o bases (Cavalcante y Do Carmo 2010).

El agua en los sistemas biofloc, debe mantenerse con amplias reservas de alcalinidad debida a los constantes agotamientos por reacciones con ácidos añadidos al agua. La actividad de las bacterias nitrificantes es responsable de la mayor pérdida de alcalinidad en sistemas intensivos de biofloc. En el tiempo, los ácidos producidos por la nitrificación gastan las reservas alcalinas del agua. Una vez que la alcalinidad es agotada, el pH puede caer abruptamente, inhibiendo la función bacteriana, incluyendo las importantes bacterias nitrificantes. En este caso, la acumulación de amonio llegará al punto en el cual el pez reduce su apetito y alimentación (Hargreaves 2013).

La alcalinidad debe ser mantenida entre 100 y 150  $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{CaCO}_3$  mediante adiciones regulares de bicarbonato de sodio (Ebeling *et al.* 2006, Azim y Little 2008, Hargreaves 2013).



En sistemas intensivos, donde los sistemas biofloc están dominados por las bacterias nitrificantes, cada kilogramo de alimento añadido en el sistema debería ser suplementado con 0.25 Kg de bicarbonato de sodio. Incluso con adiciones regulares, es más fácil operar el sistema teniendo un programa de monitoreo regular para evaluar la alcalinidad.

## **2.11. DENITRIFICACIÓN EN SISTEMAS BIOFLOC**

La alcalinidad puede ser recuperada en unidades de denitrificación. El nitrato se acumula en la mayoría de sistemas intensivos de biofloc debido al proceso de nitrificación. Si no es observado, la concentración de nitrato refleja la carga de alimento acumulado en el sistema. La acumulación de nitrato puede ser disminuida por una dilución a través de los recambios de agua, pero esto anula el propósito del uso intensivo del agua y reduce la bioseguridad (Hargreaves 2013).

Las unidades de denitrificación son usadas como parte de la conservación y de las estrategias de bioseguridad donde resulta costoso conservar esas sales. Estas unidades son operadas generalmente en condiciones inactivas y anóxicas.

Bajo condiciones anóxicas, el suministro constante de nitrato es usado como un oxidante para continuar oxidando la materia orgánica, aunque el carbono orgánico puede ser necesitado como refuerzo en el proceso. El bicarbonato es liberado por las bacterias como un producto de este proceso. Por lo tanto, la alcalinidad que se perdió en la nitrificación puede ser recuperada por la denitrificación (Hargreaves 2013).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

El experimento con una duración de 38 días de monitoreo y evaluación, se realizó en las instalaciones del CINPIS (Centro de Producción Piscícola) de la Facultad de Pesquería perteneciente a la Universidad Nacional Agraria La Molina dentro de un sistema invernadero, y comprendió de dos etapas.

#### **3.1. ETAPA PRE - EXPERIMENTAL**

##### **3.1.1. ACONDICIONAMIENTO DEL BIOREACTOR DE BIOFLOC**

Para ello se instaló y acondicionó un tanque circular de fibra de vidrio de color blanco de 2 m<sup>3</sup> de capacidad máxima, con desagüe central mediante un tubo de PVC de 9 cm de diámetro y con una altura de 54 cm, para obtener un volumen de llenado de 1.5 m<sup>3</sup>.

Para la oxigenación y circulación constante del agua, se realizó la instalación de un sistema de aireación constituido por una bomba de aire (*Blower*) marca *Sweetwater* de 1/3 HP y un sistema de tuberías de distribución y conducción de aire, manguerillas de silicona de 1cm de diámetro externo, ajustadas con abrazaderas y 3 piedras difusoras de cerámica (15 cm de largo y 3.5 cm de ancho, cada una), las cuales fueron ubicadas en el fondo del tanque de forma equidistante.

Se instalaron 3 calentadores con termostato marca SOBO de 300 W para mantener la temperatura en un rango de 25 – 29°C (Widanarni *et al.* 2012).

### 3.1.2. PREPARACIÓN DEL BIOREACTOR

El bioreactor fue llenado con 1500 litros de agua de pozo con las características indicadas en el Cuadro 3 a la cual se le adicionó 5 litros de agua proveniente de un bioreactor maduro como inóculo.

**Cuadro 3: Caracterización del agua utilizada al inicio del experimento.**

Parámetros de calidad de agua	Unidades	Valores
Temperatura	°C	23.50
Oxígeno Disuelto	% Saturación	105.00
	mg.L <sup>-1</sup>	8.75
pH		7.78
NAT	mg.L <sup>-1</sup>	0.98
NO <sub>2</sub>	mg.L <sup>-1</sup>	0.005
NO <sub>3</sub>	mg.L <sup>-1</sup>	15.00
PO <sub>4</sub>	mg.L <sup>-1</sup>	0.45
N-NH <sub>3</sub>	mg.L <sup>-1</sup>	0.093
Alcalinidad	mgCaCO <sub>3</sub> .L <sup>-1</sup>	84.00
Transparencia	cm	54.00 (Total)
Solidos Sedimentables	mg.L <sup>-1</sup>	0.00
Turbidez	NTU	1.30
Calcio	mg.L <sup>-1</sup>	206.00
Magnesio	mg.L <sup>-1</sup>	62.95
Potasio	mg.L <sup>-1</sup>	13.71
Sodio	mg.L <sup>-1</sup>	471.04
Sulfatos	mg.L <sup>-1</sup>	670.08

FUENTE: Elaboración Propia.

El bioreactor fue mantenido a nivel de 52 cm. mediante la adición de agua de pozo para compensar las pérdidas por evaporación.

El Bioreactor de biofloc en el presente estudio fue del tipo *In – Situ* (Kuhn 2012), para lo cual se sembraron peces juveniles de tilapia gris (*O. niloticus*), como fuente de producción directa de materia orgánica con el propósito de incrementar la formación de flocs bacterianos.

## **3.2. ETAPA EXPERIMENTAL**

### **3.2.1. SIEMBRA DE PECES**

Se sembró en el bioreactor un total de 176 juveniles machos de tilapia con un peso promedio de 17.15 gramos y a una densidad inicial de  $2 \text{ Kg.m}^{-3}$ .

### **3.2.2. MANEJO DE LA POBLACIÓN DE PECES**

Se realizaron biometrías semanales a lo largo del experimento en las cuales se pesaron los peces por grupos de 3 a 4 individuos de tallas similares para la obtención de la biomasa. Debido a la coloración y turbidez propia de los sistemas con tecnología biofloc, no se pudo realizar el pesado de todos los individuos siendo muestreado solamente un rango entre el 85% y 95% de la población total.

Para la estimación de la biomasa final por semana, se multiplicó el peso promedio de los peces muestreados por el número de individuos que no fueron muestreados. Este valor fue sumado al valor de los peces muestreados obteniendo la biomasa final.

### **3.2.3. MANEJO DE LA ALIMENTACIÓN**

Los juveniles de tilapia (*O. niloticus*) fueron alimentados con piensos extruidos de la marca AQUATECH con 40% de proteína (Avnimelech, 2006; Avnimelech, 2012) a una frecuencia de dos veces al día en horarios de 8:00 a.m. y 3:00 p.m. y una tasa de alimentación ajustada según el peso promedio de los peces sembrados de 4.5%. (Popma y Green, 1990).

### **3.2.4. MONITOREO DE LA CALIDAD DEL AGUA**

Durante el experimento se evaluó los siguientes parámetros físicos y químicos del agua del bioreactor de biofloc:

**a. Temperatura y Oxígeno Disuelto**

La temperatura y el oxígeno disuelto del agua (expresados en °C, en mg.L<sup>-1</sup> y porcentaje de saturación, respectivamente) fueron medidos diariamente mediante el uso de un oxímetro marca YSI 550 A, registrándose en tres horarios: 8:00 a.m., 10:00 a.m. y 3:00 p.m.

Adicionalmente, se registraron diariamente las temperaturas máximas y mínimas ambientales empleando un termómetro de máximos y mínimos marca HAVI-TOPOBEN a las 8:00 a.m.

La temperatura ambiental fue regulada mediante la circulación de aire abriendo las ventanas del invernadero en los días muy calurosos.

**b. Potencial de Hidrogeno (pH)**

El pH fue medido utilizando un potenciómetro de mano marca OAKTON *Waterproof pHTestr20*, registrándose diariamente en 3 horarios: 8:00 a.m., 10:00 a.m. y 3:00 p.m.

**c. Sólidos Sedimentables**

Los sólidos sedimentables fueron determinados diariamente a las 8:00 a.m. mediante el uso de un cono Imhoff, marca *scienceware*, por un tiempo de 45 minutos, según la metodología dispuesta por la APHA (1998).

**d. Alcalinidad Total**

Para su determinación, se utilizó una muestra de agua del bioreactor la cual fue filtrada mediante 4 capas de malla fina de 50 micras aproximadamente, seguida de una segunda filtración mediante el uso de papel filtro fino marca *Whatman qualitative* de 90 mm de diámetro.

Un total de 25 ml de muestra filtrada (APHA, 1998) fue titulada con ácido sulfhídrico previamente valorizado (0.02 N). El indicador empleado para determinar el punto final de la titulación fue el indicador mixto preparado a base de rojo de metilo y azul de bromocresol.

Se registró diariamente en  $\text{mg CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$  y una vez por día a las 3:00 p.m

**e. Luz**

La luz fue medida diariamente en Klux mediante un luxómetro marca *Extech instruments*, 2 veces por día a las 8:00 a.m. y 3:00 p.m. para monitorear fluctuaciones de intensidad lumínica.

**f. Transparencia**

La transparencia fue medida diariamente con un disco Secchi marca LA MOTTE, 2 veces por día en el horario de 8:00 a.m. y 3:00 p.m. Los valores fueron registrados en centímetros (cm)

**g. Turbidez**

La turbidez fue medida interdiariamente a las 10:00 a.m. empleando un turbidímetro marca LA MOTTE. El volumen de muestra empleada fue de 10 ml y los valores fueron expresados en NTU.

Los siguientes parámetros fueron evaluados mediante el método espectrofotométrico, utilizando una muestra diluida al 10% con agua desionizada. El equipo empleado fue un espectrofotómetro de la marca HACH modelo *DR/2500 Spectrophotometer Water Analyzer 59000-60*. Luego, se procedió a filtrar las muestras según lo descrito en las pruebas de alcalinidad.

**h. Ortofosfatos ( $\text{PO}_4$ )**

El ortofosfato fue determinado interdiariamente y una vez por día (10:00 a.m.) mediante el método de HACH 8048 (*Orthophosphate*). Fue expresado en  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ortofosfatos.

**i. Nitrógeno Amoniacal Total (NAT)**

El NAT fue medido diariamente y una vez por día (10:00 a.m.) mediante el método de HACH 8155 (Nessler). La absorbancia fue medida en 655 nm. Fue expresado en  $\text{mg.L}^{-1}$  de NAT.

**j. Nitritos y Nitratos ( $\text{NO}_2$  y  $\text{NO}_3$ )**

Fueron medidos interdiariamente y una vez por día (10:00 a.m.) mediante los métodos HACH 8507 (diazotización) y 8039 (reducción de cadmio). La absorbancia fue medida en 507nm y 500nm; y fueron expresados en  $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{NO}_2$  y en  $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{NO}_3$  respectivamente

### **3.2.5. MANEJO DE LA CALIDAD DEL AGUA DEL BIOREACTOR**

**a. Ajuste de Alcalinidad**

Consistió en la adición de bicarbonato de sodio comercial con el fin de mantener una alcalinidad de  $100 \text{ mg CaCO}_3.\text{L}^{-1}$  tal y como se realizó en experimentos anteriores (Azim y Little 2008, Ray *et al.* 2010b, Hargreaves 2013) cuyo valor es recomendado para el buen funcionamiento del sistema con tecnología biofloc ya que con el tiempo, este pierde su capacidad buffer (Azim *et al.* 2008) generando fluctuaciones significativas de pH (Boyd 2000). Esta adición se realizó utilizando el Cuadro 4 propuesto por Loyless y Malone (1997).

Si la alcalinidad alcanzaba los  $60 \text{ mg CaCO}_3.\text{L}^{-1}$ , se procedía a la adición de bicarbonato de sodio comercial basado en el incremento de alcalinidad a realizar (Hasta los  $100 \text{ mg. CaCO}_3.\text{L}^{-1}$ ) y el volumen de agua del tanque, el cual fue de 1500 litros. El bicarbonato de sodio estimado, era diluido en agua nueva y filtrado por una tela fina de nylon para eliminar las impurezas que pudiese presentar.

**b. Adición de Melaza**

Los sistemas con tecnología biofloc están basados en el desarrollo y control de organismos heterotróficos (Avnimelech 2007, De Schryver *et al.* 2008, Ekasari *et al.* 2010) los cuales dependen de sustratos orgánicos como el carbono y nitrógeno. (Avnimelech 1999). Si estos son balanceados correctamente en el agua, el amonio en conjunto con el nitrógeno orgánico residual, se convertirán en biomasa proteica (Schneider *et al.* 2005, Avnimelech *et al.* 2008, Crab *et al.* 2012) pudiendo ser utilizados como una fuente de alimento (Chamberlain *et al.* 2001).

El ratio de carbono/ nitrógeno igual o mayor a 10:1 permiten una eficiente asimilación del amonio (Ray *et al.* 2011) eliminado así los compuestos nitrogenados que pueden ser nocivos para los peces (Crab *et al.* 2007).

**Cuadro 4: Dosis de Bicarbonato de sodio (g) añadido para corregir la alcalinidad.**

Volumen del sistema		Dosificación de Bicarbonato de Sodio - NaHCO <sub>3</sub> (g)										
		Incremento de alcalinidad (mg CaCO <sub>3</sub> .L <sup>-1</sup> )										
(Galones)	(Litros)	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	200
10	38	<1	1	2	3	3	4	5	5	6	6	15
20	76	1	3	4	5	6	8	9	10	11	13	25
30	114	2	4	6	8	10	11	13	15	15	20	40
40	151	3	5	8	10	13	15	20	20	25	25	50
50	189	3	6	10	13	15	20	25	25	30	30	65
60	227	4	8	11	15	20	20	25	30	35	40	65
70	265	5	9	13	20	20	25	30	35	40	45	90
80	303	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	100
90	341	6	11	15	25	30	35	40	45	50	55	110
100	379	6	13	20	25	30	40	45	50	55	65	130
200	757	13	25	40	50	65	75	90	100	110	130	250
300	1136	20	40	55	75	95	110	130	150	170	190	380
400	1514	25	50	75	100	130	150	180	200	220	260	510
500	1893	30	65	95	130	160	190	220	260	280	320	640
600	2271	40	75	110	150	190	220	260	300	340	380	760
700	2650	45	90	130	180	220	260	320	360	400	450	890
800	3028	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500	1020
900	3407	60	110	170	220	280	340	400	450	500	550	1150
1000	3785	65	130	190	250	300	400	450	500	550	600	1270

FUENTE: Loyless y Malone 1997



La melaza es considerada como una buena fuente de carbono orgánico a emplear (Schneider *et al.* 2006a, Samocha *et al.* 2007, Taw 2010).

Para la determinación de la cantidad de melaza a agregar se realizó un cálculo basado en la concentración de NAT en el agua del bioreactor (Adaptado de Luo *et al.* 2013).

$$\text{Cantidad de melaza} = \frac{\text{NAT} \times 1000 \times V \times \text{C/N}}{\% \text{ C}}$$

Dónde:

NAT: Es la concentración de nitrógeno amoniacal total en el agua del bioreactor expresado en miligramos por litro.

1000: Es el factor de conversión de miligramos a gramos.

V: Es el volumen de agua del bioreactor expresado en litros. Para el experimento fue de 1500 litros.

C/N: Es la relación de carbono-nitrógeno a utilizar. Para el experimento fue de 10.

%C: Es el porcentaje de carbono presente en un gramo de melaza. Para el experimento fue del 53 por ciento.

### **3.2.6. PROCESAMIENTO Y ANALISIS DE DATOS**

Los análisis físicos y químicos correspondientes a la alcalinidad, luz, turbidez, sólidos sedimentables, nitritos, nitratos, nitrógeno amoniacal total, y ortofosfatos fueron realizados en el laboratorio de Limnología de la Facultad de Pesquería de la Universidad Nacional Agraria La Molina. La luz, transparencia, temperatura, oxígeno disuelto y pH fueron medidos *in situ* dentro del sistema invernadero del CINPIS (Centro de Investigación Piscícola) de la Facultad de Pesquería – UNALM. Con los valores de NAT, pH y temperatura, obtenidos en laboratorio, se determinaron los valores de amoniaco y amonio. Para ello se empleó el Cuadro 5.

Para el procesamiento estadístico se dividió el bloque de datos en 2 componentes: Uno con una predominancia autotrófica (sin adición y control del carbono orgánico) y otro con una predominancia heterotrófica (con adición y control del carbono orgánico en una tasa de 10:1).

Para cada bloque, se efectuó un análisis multivariado determinando las correlaciones de Pearson ( $P \leq 0.05$ ) entre cada uno de los parámetros de calidad de agua medidos en el transcurso de la etapa experimental. Adicionalmente se realizó el análisis de componentes principales para determinar el o los parámetros de calidad de agua que influyen más en la dinámica del nitrógeno y la estabilidad del bioreactor.

**Cuadro 5: Porcentaje de amoníaco en función al NAT, temperatura y pH.**

Temperatura (°C)	pH								
	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	9.5	10.0
14	0.0254	0.0802	0.2530	0.796	2.480	7.43	20.20	44.50	71.70
15	0.0274	0.0865	0.2730	0.859	2.670	7.97	21.50	46.40	73.30
16	0.0295	0.0933	0.2940	0.925	2.870	8.54	22.80	48.30	74.70
17	0.0318	0.1010	0.3170	0.996	3.080	9.14	24.10	50.20	76.10
18	0.0343	0.1080	0.3420	1.070	3.310	9.78	25.50	52.00	77.40
19	0.0369	0.1170	0.3680	1.150	3.560	10.50	27.00	53.90	78.70
20	0.0397	0.1250	0.3960	1.240	3.820	11.20	28.40	55.70	79.90
21	0.0427	0.1350	0.4250	1.330	4.100	11.90	29.90	57.50	81.00
22	0.0459	0.1450	0.4570	1.430	4.390	12.70	31.50	59.20	82.10
23	0.0493	0.1560	0.4910	1.540	4.700	13.50	33.00	60.90	83.20
24	0.0530	0.1670	0.5270	1.650	5.030	14.40	34.60	62.60	84.10
25	0.0569	0.1800	0.5660	1.770	5.380	15.30	36.30	64.30	85.10
26	0.0610	0.1930	0.6070	1.890	5.750	16.20	37.90	65.90	85.90
27	0.0654	0.2070	0.6510	2.030	6.150	17.20	39.60	67.40	86.80
28	0.0701	0.2210	0.6970	2.170	6.560	18.20	41.20	68.90	87.50
29	0.0752	0.2370	0.7470	2.320	7.000	19.20	42.90	70.40	88.30
30	0.0805	0.2540	0.7990	2.480	7.460	20.30	44.60	71.80	89.00

FUENTE: Adaptado de CEPIS 2000.

La tabulación de datos se realizó en una hoja de cálculo de Microsoft Excel (v. 2010) empleando agrupaciones con tablas dinámicas, y las correlaciones de Pearson y el análisis de componentes principales con el *software SPSS Statistics Base v. 22*. Se elaboraron gráficos utilizando el programa Microsoft Excel (v. 2010)

El protocolo de manejo del bioreactor de biofloc (BFT) de agua dulce, describirá la instalación, funcionamiento, manejo y monitoreo necesario para su buen funcionamiento, basados en los resultados obtenidos en el presente trabajo.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. PROCESOS DE CONVERSIÓN DE LOS PRINCIPALES COMPUESTOS NITROGENADOS (NAT, N-NO<sub>2</sub> y N-NO<sub>3</sub>) EN EL BIOREACTOR CON BFT

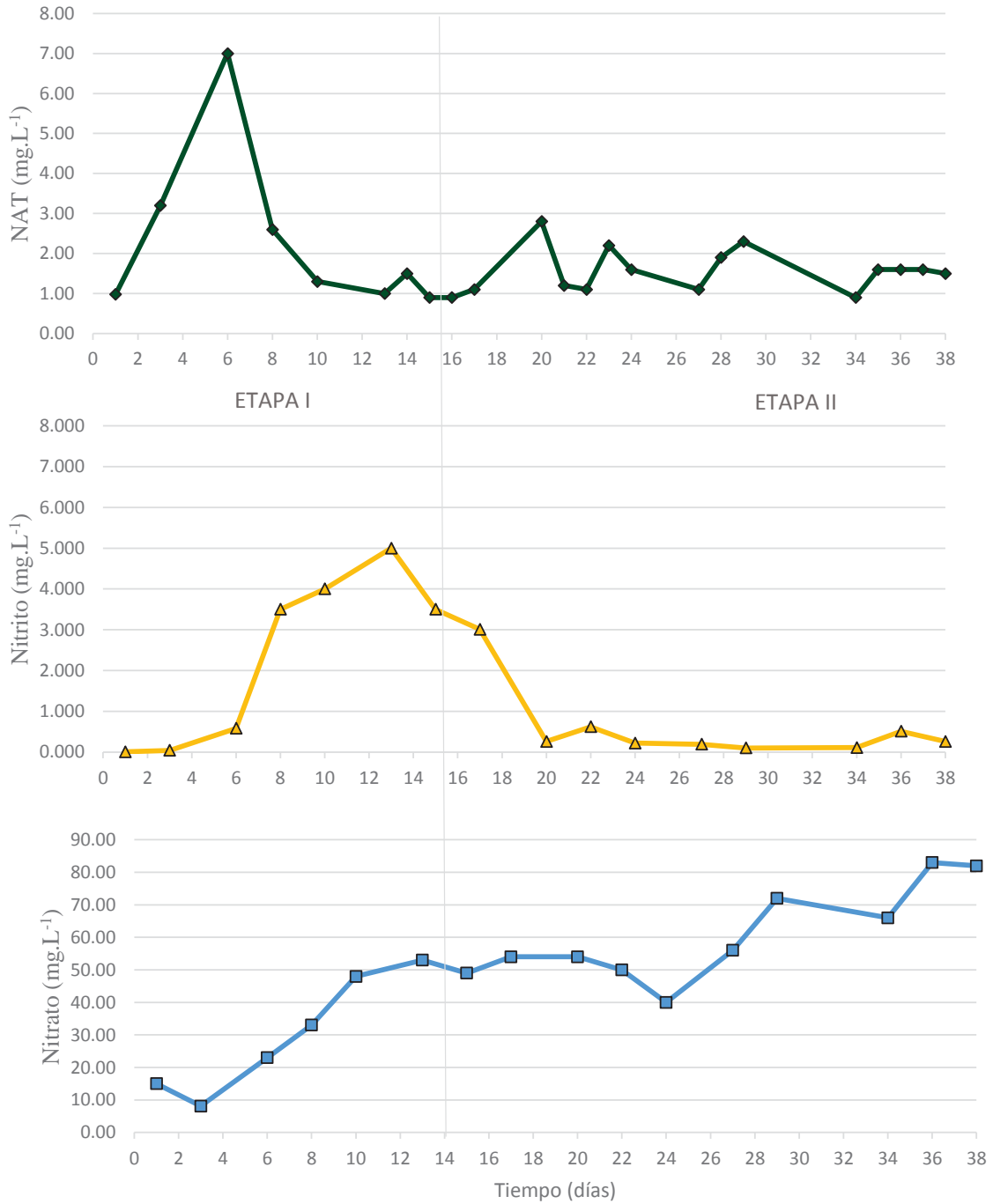
Los valores máximos y mínimos de los principales compuestos nitrogenados registrados semanalmente durante los 38 días experimentales dentro del bioreactor de biofloc se presentan en el Cuadro 6.

**Cuadro 6: Valores máximos y mínimos de los principales compuestos nitrogenados.**

	NAT (mg.L <sup>-1</sup> )	NO <sub>2</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	N-NH <sub>3</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )
<b>SEMANA 1</b>	0.98 - 7.00	0.01 - 0.58	8.10 - 23.00	0.09 - 0.67
<b>SEMANA 2</b>	1.00 - 2.60	3.50 - 5.00	33.00 - 53.00	0.03 - 0.17
<b>SEMANA 3</b>	0.90 - 2.80	0.26 - 4.00	49.00 - 54.00	0.06 - 0.17
<b>SEMANA 4</b>	1.10 - 2.20	0.19 - 0.62	40.00 - 72.00	0.04 - 0.11
<b>SEMANA 5</b>	0.90 - 2.30	0.10 - 0.11	66.00 - 72.00	0.07
<b>SEMANA 6</b>	1.50 - 1.60	0.26 - 0.51	82.00 - 83.00	0.05

En el Cuadro 6 se observa que los valores de NAT presentaron concentraciones máximas en la primera semana (7 mg.L<sup>-1</sup>) correspondiente a la etapa de estabilización del bioreactor en la cual no se agregó melaza. Así mismo la concentración máxima de nitrito (5 mg.L<sup>-1</sup>) fue en la segunda semana. El aumento de NAT y nitrito al inicio del experimento indicó los procesos de conversión realizados por el aumento de la densidad de bacterias nitrificadoras (Ebeling *et al.* 2006). Los valores de amoníaco en la quinta y sexta semana no presentaron variación diaria. Por otro lado, las concentraciones de nitratos se incrementaron hasta permanecer sin mucha variación al final del experimento.

Las fluctuaciones diarias de los principales compuestos nitrogenados inorgánicos, se presentan en la Figura 1.



**Figura 1: Cambios en las concentraciones (mg.L<sup>-1</sup>) de las formas de nitrógeno inorgánico disueltas.**

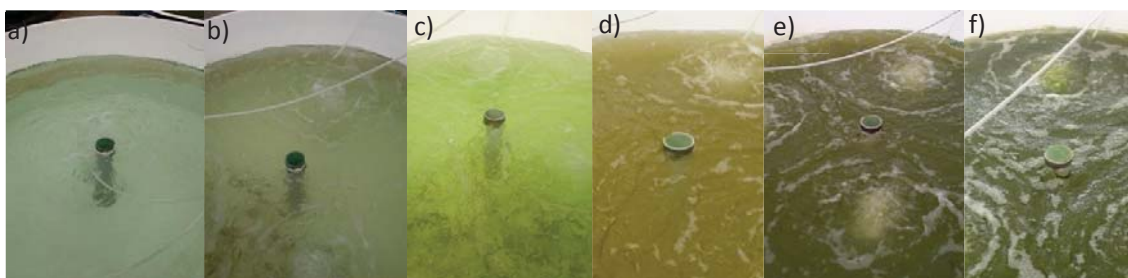
En la Figura 1 se observa que los niveles del NAT se incrementaron hasta el sexto día llegando a un valor máximo de  $7 \text{ mg.L}^{-1}$  a partir del cual descendió gradualmente hasta el décimo día. Después de ello, se mantuvo estable en un rango aproximado de 1 a  $3 \text{ mg.L}^{-1}$  hasta el fin del experimento.

Durante los primeros 14 días de experimento, no se agregó ninguna fuente de carbono, tal y como sugieren Nootong *et al.* (2011) y Asaduzzaman *et al.* (2008) como una estrategia para permitir la estabilización de los parámetros de calidad del agua. En esta fase, los cambios en la calidad del agua son muy similares a los que se dan en los sistemas tradicionales, tal y como describe Kubitza (2011) en un experimento realizado con ejemplares de tilapia con 25g de peso promedio en sistemas biofloc. Estas aguas son caracterizadas con concentraciones elevadas de nitrógeno amoniacal total y nitritos (Cuadro 6) producto de la excreción de los peces dentro de un sistema en el cual, las bacterias nitrificantes están en proceso de colonización (Timmons *et al.* 2002, Hargreaves 2013). Luo *et al.* (2014) también reportaron niveles altos de NAT y  $\text{NO}_2$  de  $60 \pm 0.45 \text{ mg.L}^{-1}$  y  $119 \pm 2.10 \text{ mg.L}^{-1}$  respectivamente debidos a la alta carga de  $8 \text{ Kg.m}^{-3}$  en su cultivo de tilapia. Cuando el sistema se estabilizó, estos valores comenzaron a decrecer hasta valores mínimos.

Avnimelech (2006), Samocha *et al.* (2007), Sesuk *et al.* (2009) y Hargreaves (2013), indican que los valores altos de NAT o nitritos al inicio del experimento pueden reducirse y controlarse mediante la adición de una fuente de carbono orgánico por lo cual, al momento de suministrarlo, se observó una rápida disminución de su concentración de 7 a  $1 \text{ mg.L}^{-1}$ . (Figura 1). La fuente de carbono fue la melaza (53% de Carbono), añadida después de 2 semanas ya que si se realiza al inicio pudo haber prolongado el tiempo requerido para la estabilización del sistema (Cedano-Castro *et al.* 2013, Hargreaves 2013).

Al primer día de la adición de melaza, (Día 14) los valores de NAT comenzaron a mantenerse estables con concentraciones menores a los  $3 \text{ mg.L}^{-1}$  (Figura 1). Las fuentes de carbono orgánico fueron eficientes para el control del nitrógeno inorgánico en el tanque (Avnimelech *et al.* 1992) ya que un incremento del NAT hubiera indicado la insuficiencia de este elemento (Megahed 2010).

A su vez, los valores de nitritos comenzaron a subir coincidentemente con la caída del NAT debido al proceso natural que ocurre en el ciclo del nitrógeno producto de la oxidación quimioautotrófica de las bacterias sobre el NAT (Ray *et al.* 2011, Avnimelech 2012, Castillo-Soriano *et al.* 2013) tal y como se presentó en investigaciones anteriores como el de Asaduzzaman *et al.* (2009) y Green (2010) quienes trabajaron con camarones y bagres de canal respectivamente, en condiciones de cero recambio de agua.



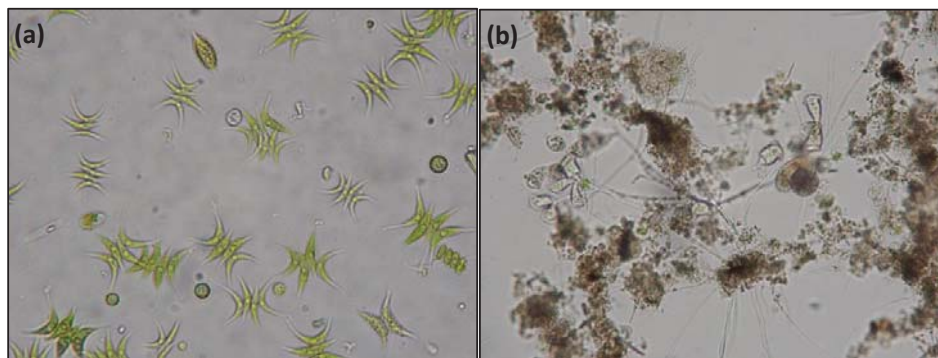
Días experimentales: a) Día 1, b) Día 3, c) Día 5, d) Día 8, e) Día 14, f) Día 18

**Figura 2: Cambio en la coloración del agua en el tanque bioreactor.**

Así mismo, el cambio en la coloración del agua (Figura 2) debida a la entrada de luz solar, desde un color transparente a un verde oscuro, indicó la presencia de algas que también permitieron la remoción del nitrógeno amoniacal total mediante la fotosíntesis. Baloi *et al.* (2013) y Hargreaves (2006) quienes realizaron trabajos experimentales en condiciones de luz solar permanente con langostinos y tilapias, respectivamente, indicaron comportamientos similares.

Debido a que las algas presentan límites en el control de la cantidad de nitrógeno (Avnimelech *et al.* 1982, Brune *et al.* 2003); los organismos heterotróficos requieren elevadas cantidades de oxígeno para asimilar el amonio (Avnimelech 2009) y las bacterias nitrificantes son lentas para establecerse (Ray *et al.* 2009), la presencia conjunta de estos 3 grupos es posible en los sistemas con BFT. Es por ello que en el presente experimento se distinguieron 2 etapas diferenciadas: (1) Primera Etapa del día 1 al día 14 sin adición ni control de una relación de C:N en el agua con predominancia de organismos autotróficos y (2) Segunda Etapa del día 14 al día 38 (Fin del Experimento) con adición y control de una relación de C:N de 10:1 en el agua con predominancia de organismos heterotróficos. (Figura 3)

Aunque en este trabajo no se estimó las densidades de fitoplancton ni de bacterias, el cambio en la coloración del agua de verde a marrón a partir del décimo cuarto día experimental, indicó el paso de un sistema dominado por el fitoplancton (Autotrófico) a uno dominado por bacterias (Heterotrófico). Poleo *et al.* (2011) quienes experimentaron con la cachama blanca en sistemas biofloc presentaron un comportamiento similar en sus estanques. En la Figura 3 se observa la presencia de fitoplancton en la primera etapa, y bacterias heterotróficas en mayor proporción en la segunda etapa experimental.



(a) Etapa I: Predominancia de organismos autotróficos (del día 1 al 14).

(b) Etapa II: Predominancia de organismos heterotróficos (del día 14 al 38).

**Figura 3: Organismos presentados en las 2 etapas experimentales.**

El nitrito presentó un comportamiento similar incrementando su concentración hasta los 5 mg.L<sup>-1</sup> en el décimo tercer día a partir del cual, comenzó a descender hasta valores muy cercanos a cero hasta el fin del experimento. Los valores altos de nitritos encontrados en el bioreactor, después de la caída del NAT en el día 6, son producto de la oxidación del nitrógeno amoniacal a nitritos por las bacterias oxidadoras del amoniac que incluyen a los géneros *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, entre otros, tal y como indican Avnimelech *et al.* 1986, Ebeling *et al.* 2006, Lekang 2007 y Avnimelech 2012. La presencia del nitrito es común siempre en los sistemas intensivos (Avnimelech *et al.* 1994, Wang *et al.* 2004 y Luo *et al.* 2014) ya que es un intermediario tanto en la nitrificación como en la denitrificación (Ruiz *et al.* 2003 y Chuang *et al.* 2007) debida a la inhibición libre del NH<sub>3</sub> durante estos procesos (Shi *et al.* 2004).

Las bajas concentraciones de nitritos presentadas a partir del vigésimo día experimental se debe a la completa oxidación del amonio a nitrato (Cohen *et al.* 2005).

Así mismo McIntosh *et al.* (2000), Burford *et al.* (2004), Avnimelech y Kovcha (2009); Ray *et al.* (2010b), Vinatea *et al.* (2010) y Luo *et al.* (2012), presentaron en sus respectivos estudios que la calidad de agua en sistemas de cero recambio, reportan siempre bajas concentraciones de nitrito y amonio producto de la presencia de la comunidad microbiana mayoritariamente heterotrófica, resultando en la remoción de todos esos compuestos.

El amoníaco ( $\text{N-NH}_3$ ) se mantuvo en niveles menores a  $0.06 \text{ mg.L}^{-1}$  exceptuando en la primera semana correspondiente a la de estabilización, donde los niveles de NAT también fueron altos. Según el Cuadro 5, a un pH de 8 y temperaturas de  $28^\circ\text{C}$  aproximadamente, los porcentajes de nitrógeno amoniacal total con respecto al NAT representan un 6.5% aproximadamente y si estos siguen en aumento los porcentajes son aún mayores.

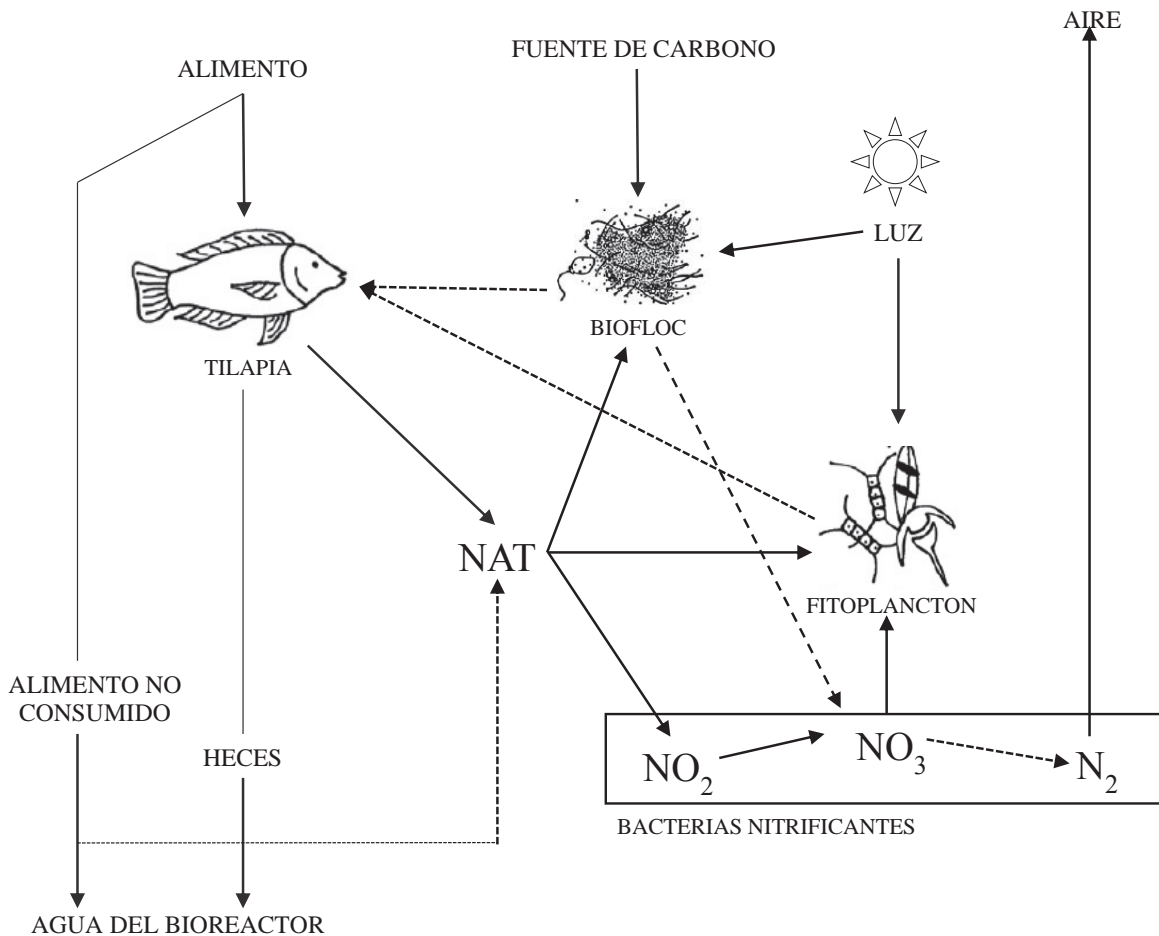
Para la tilapia del Nilo se ha calculado la  $\text{LC}_{50}$  (Concentración Letal Media) de amoníaco en 48 horas para larvas de  $1.007\text{-}1.010 \text{ mg.L}^{-1}$  y  $7.39\text{-}7.41 \text{ mg.L}^{-1}$  con alevines de aproximadamente 1g de peso promedio (Benli y Koksak 2005). Por otra parte las tilapias muestran sensibilidad a concentraciones elevadas de nitritos. EL  $\text{LC}_{50}$  de 96 horas para *O. aureus* fue de  $16.2 \text{ mg.L}^{-1}$  a un pH de 7.2 y  $22 \text{ mg.L}^{-1}$  de cloruros (Palachek y Tomasso 1984). Lossordo (1997) recomienda mantener los niveles de nitrito por debajo de los  $5 \text{ mg.L}^{-1}$ . En esta experiencia, tanto los niveles de nitritos como de amoníaco se encontraron por debajo de los límites antes mencionados sin afectar la supervivencia de las tilapias dentro del bioreactor.

El nitrato en cambio, aumento hasta los  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  hasta el décimo primer día a partir del cual se mantuvo en un rango de  $50$  a  $70 \text{ mg.L}^{-1}$  hasta el día 30. A partir de este día se incrementó en  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  manteniéndose sin variaciones significativas hasta el fin del experimento. En principio, los peces en general toleran altas concentraciones de nitratos; sin embargo, se ha observado que concentraciones de  $600$  o  $700 \text{ mg.L}^{-1}$  afectan el consumo de alimento en tilapias (Rakocy *et al.* 1989, Rakocy *et al.*, 2000). En el presente experimento, los valores estuvieron muy por lo bajo de los límites tolerables.

Esta acumulación de nitrato en el bioreactor se debe a que es el producto final del ciclo del nitrógeno después de la reducción de amonio a nitrito y luego a nitrato (Brune *et al.* 2003, Schrader *et al.* 2011) por la presencia de las bacterias oxidadoras del nitrito que incluye a los géneros *nitrobacter*, *nitrococcus*, entre otros (Ebeling *et al.* 2006).



El nitrato en el bioreactor de biofloc, a diferencia de lo que ocurre en los sistemas de recirculación, presenta una acumulación leve en su concentración debido a que algunos organismos pertenecientes al fitoplancton tienen la capacidad de asimilarlo (Figura 4). Por otra parte Hargreaves (2006), menciona que las bacterias nitrificantes son afectadas por el aumento de la carga de materia orgánica en el sistema por lo cual, con el incremento de la turbidez (Figura 12) y el nivel de sólidos sedimentables (Figura 15), se produjo una inhibición parcial de estas conllevando a la detención de la nitrificación responsable de la oxidación del NAT a nitrito y luego a nitratos (Ling y Chen 2005).



FUENTE: Adaptado de Crab 2007.

**Figura 4: Dinámica del nitrógeno inorgánico en el bioreactor de biofloc.**

Una inhibición casi completa de la nitrificación se lleva a cabo cuando el biofloc pasa a una etapa totalmente heterotrófica en la cual la formación de nitritos y nitratos es mínima. Vinatea *et al.* (2010) mostraron un trabajo en el cual se aprecia el cambio completo de un sistema autotrófico a un heterotrófico mediante la medición de fotosíntesis neta en la cual, la cantidad de nitratos disminuía. Debido a que en los sistemas con BFT los niveles de materia orgánica son altos permitiendo un mayor crecimiento de los organismos heterotróficos esto puede resultar en la inhibición total de la nitrificación por competencia de espacio (Hargreaves 2006). De haberse medido los niveles de nitrato durante un periodo más extenso, se podría haber detectado el punto de cambio a una etapa netamente heterotrófica en la cual hubiera presentado fluctuaciones mínimas de nitrato.

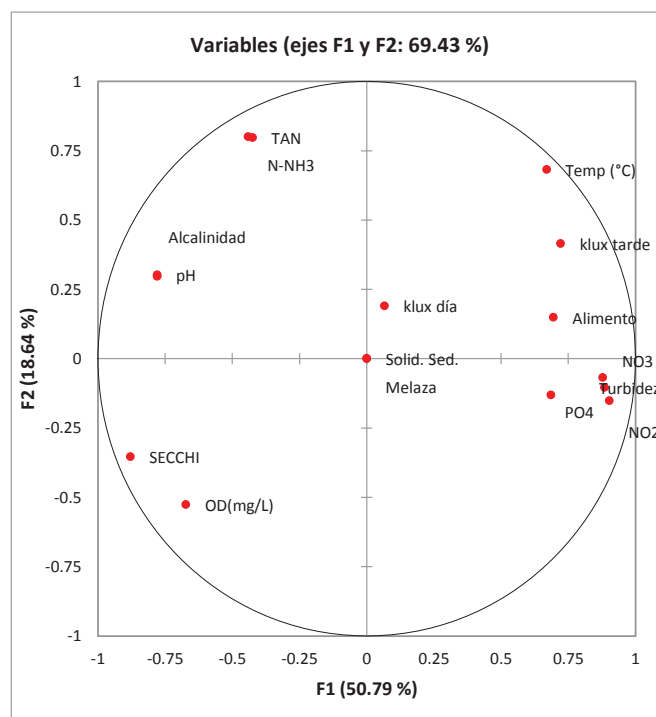
Por otra parte, Allen *et al.* (2002) indican que las bacterias heterotróficas realizan un consumo significativo del nitrato en el agua (alrededor del 16% en aguas saladas según Spotte y Adams 1983) en zonas eufóticas (presencia de luz), disminuyendo una fracción de su concentración.

En resumen, en la figura 4 se observa un esquema en el cual se distingue las transformaciones y/o asimilaciones del NAT en el bioreactor mediante 3 rutas: (1) Remoción fotoautotrófica por algas, (2) Inmovilización por bacterias heterotróficas como biomasa proteica microbiana y (3) Oxidación quimioautotrófica hasta nitrato por las bacterias nitrificantes (Ebeling *et al.* 2006, Azim y Little 2008, Avnimelech 2012).

## 4.2. EVALUACIÓN DE LA RELACIÓN DE LOS PRINCIPALES COMPUESTOS NITROGENADOS CON LAS VARIABLES FÍSICAS Y QUÍMICAS QUE INFLUYEN EN LA ESTABILIDAD DEL BIOREACTOR CON BFT

### 4.2.1. ANÁLISIS DE CORRELACIÓN DE PEARSON ENTRE LOS PRINCIPALES COMPUESTOS NITROGENADOS Y LAS VARIABLES FÍSICAS Y QUÍMICAS PARA LAS ETAPAS EXPERIMENTALES I Y II

El análisis de componentes principales entre los diferentes compuestos nitrogenados y los parámetros físicos y químicos evaluados en el bioreactor para la etapa I, se presenta en la Figura 5. Los valores numéricos de correlación de Pearson ( $P \geq 0.5$ ) obtenidos para esta etapa, se presentan en el Anexo 1.



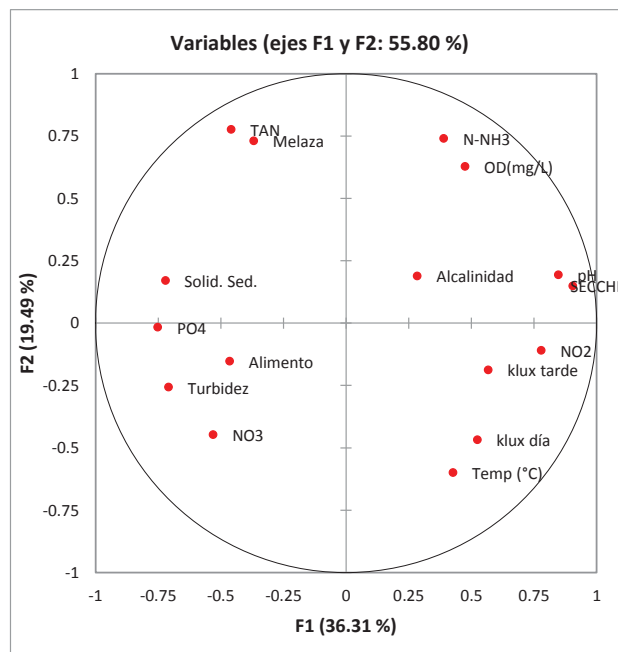
**Figura 5: Análisis de componentes principales en la etapa I (autotrófica)**

En la Figura 5 se observa que los valores de NAT presentan una correlación significativa de 0.513 con el pH, y de 0.975 con el amoníaco.

Por otra parte, el nitrito presentó correlaciones altas con la turbidez (0.988) y con el nitrato (0.959), y significativas con el oxígeno disuelto (-0.551), el pH (-0.598), ortofosfatos (0.673), la alcalinidad (-0.647), la cantidad de alimento (0.586), la transparencia medida con el disco Secchi (-0.636) y con la intensidad lumínica medida en Klux (0.508).

Así mismo, el Nitrato presentó correlaciones altas con la turbidez (0.922) y con el nitrito (0.959), y significativas con el oxígeno disuelto (-0.530), el pH (-0.524), ortofosfatos (0.665), la alcalinidad (-0.637), la cantidad de alimento (0.508), la transparencia medida con el disco Secchi (-0.633) y con la intensidad lumínica medida en Klux (0.634).

El análisis de componentes principales entre los diferentes compuestos nitrogenados y los parámetros físicos y químicos evaluados en el bioreactor para la etapa II, se presenta en la Figuras 6. Los valores numéricos de correlación de Pearson ( $P \geq 0.5$ ) obtenidos para esta etapa, se presentan en el Anexo 2.



**Figura 6: Análisis de componentes principales en la etapa II (heterotrófica).**

En la Figura 6 se observa que los valores de NAT presentan una correlación alta con la melaza (0.862), y otras significativas con el nitrógeno amoniacal (0.556) y con la intensidad lumínica (-0.559) medida en Klux.

Por otra parte, el nitrito presentó correlaciones altas con los ortofosfatos (-0.755), y significativas con los sólidos sedimentables (-0.527), turbidez (-0.729) y con la transparencia (0.672). Así mismo, el Nitrato presentó solo una correlación significativa con el oxígeno disuelto (-0.633).

#### **4.2.2. ANALISIS DE LOS PARAMETROS DE CALIDAD DE AGUA Y SU RELACION CON LA ESTABILIDAD DEL BIOREACTOR**

En el Cuadro 7 se presenta los rangos obtenidos de temperatura del agua promedio diaria y las temperaturas máximas y mínimas ambientales.

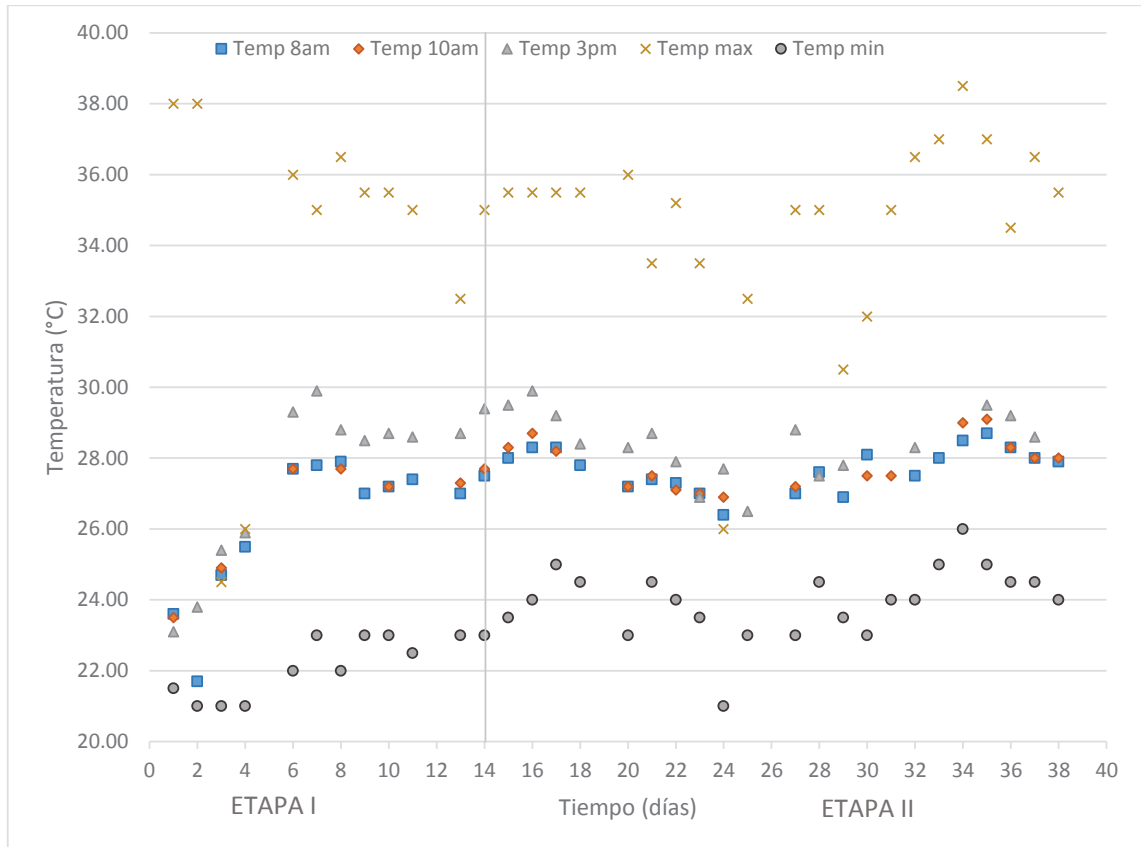
**Cuadro 7: Rangos semanales de temperaturas del agua promedio diaria; temperatura máxima y mínima ambiental.**

	<b>T<sub>Min</sub> ambiental (°C)</b>	<b>T<sub>Max</sub> ambiental (°C)</b>	<b>T<sub>Promedio</sub> del agua (°C)</b>
<b>SEMANA 1</b>	21.0 - 23.0	24.5 - 38.0	22.7 - 28.8
<b>SEMANA 2</b>	22.0 - 23.0	32.5 - 36.5	27.6 - 28.2
<b>SEMANA 3</b>	23.0 - 25.0	33.5 - 35.5	27.5 - 28.9
<b>SEMANA 4</b>	21.0 - 24.5	26.0 - 35.2	26.5 - 27.6
<b>SEMANA 5</b>	23.0 - 26.0	30.5 - 38.5	27.3 - 29.1
<b>SEMANA 6</b>	24.0 - 24.5	34.5 - 36.5	27.9 - 28.6

Se puede observar que las temperaturas ambientales mínimas y máximas aumentaron desde 21.0°C hasta alcanzar en algunos días 38.5°C respectivamente durante el experimento. Esto se debió al cambio de estación de primavera a verano en los meses de noviembre y diciembre. Así mismo, la baja temperatura del agua cercana a los 21°C al inicio del experimento, se debe al calentamiento progresivo del agua ya que recién el día 1 correspondiente a la siembra de los peces en el tanque bioreactor, se colocaron los calentadores con termostato. El invernadero, durante todo el experimento, permitió la acumulación del calor dentro del ambiente permitiendo que la temperatura promedio diaria no tuviera variaciones significativas a lo largo del experimento ( $28.26 \pm 6.09$  °C)

Cuando se presentaron días muy soleados, en donde la temperatura ambiental estaba por encima de los 35°C, se permitió la circulación del aire externo para evitar un aumento excesivo de la temperatura del agua.

Las temperaturas bajas del agua en los primeros días del experimento (Figura 7), no afectaron significativamente a los peces (Mortalidad = 0%, ver Anexo 3) ni a los organismos del floc. Crab *et al.* (2009), quien trabajó con temperaturas aún más bajas cercanas a los 14°C, no reportó problemas en su cultivo de tilapia. La temperatura promedio diaria se mantuvo en un rango de 26 a 29°C hasta el fin del experimento. En la figura 7 se observa la fluctuación de las temperaturas durante toda la etapa experimental.



**Figura 7: Variación de la temperatura del agua del bioreactor y las temperaturas máximas y mínimas del aire dentro del invernadero.**

La temperatura del agua es una variable importante en el cultivo de peces y está directamente relacionada con sus procesos fisiológicos. (Timmons *et al.* 2002). Cada especie de pez tiene un rango de temperatura óptima en el cual se favorece su crecimiento y para el caso específico de alevinos de tilapia, se consideran como óptimos los rangos de temperatura entre 26 y 30°C (Meyer 2004, El-Sayed 2006).

Es por ello que en el transcurso de toda la etapa experimental, se mantuvo la temperatura promedio en un rango de 27°C a 28.5°C (Figura 7) tratando de asemejar a las condiciones experimentales con tilapia presentadas por Azim y Little (2008) quienes emplearon un rango entre 26-30°C, Poleo *et al.* (2011) con temperaturas promedio de 26.9°C, Widanarni *et al.* (2012), un rango entre 26-29°C y Luo *et al.* (2014), entre 24 y 26°C; todos ellos indicando que fueron temperaturas optimas de producción.

Para la Etapa I, se encontró que la temperatura tuvo una correlación indirecta (-0.854) con el nivel de oxígeno disuelto debido a que afectó su solubilidad en el medio aun manteniendo una aireación fuerte; y otra de -0.876 con la transparencia (medida con el disco Secchi).

La Figura 3a muestra que la producción de fitoplancton en el tanque originó un cambio de color de transparente hasta un verde oscuro (Figura 2) disminuyendo la transparencia constantemente.

La intensidad lumínica (medida en KLux) presentó una correlación positiva de 0.723 deduciendo que la presencia de luz solar durante el experimento permitió un aumento de la temperatura del agua en el cultivo.

Los rangos semanales de Oxígeno disuelto promedio diario, obtenidos durante la fase experimental se presentan en la siguiente tabla:

**Cuadro 8: Rangos semanales de oxígeno disuelto promedio diario.**

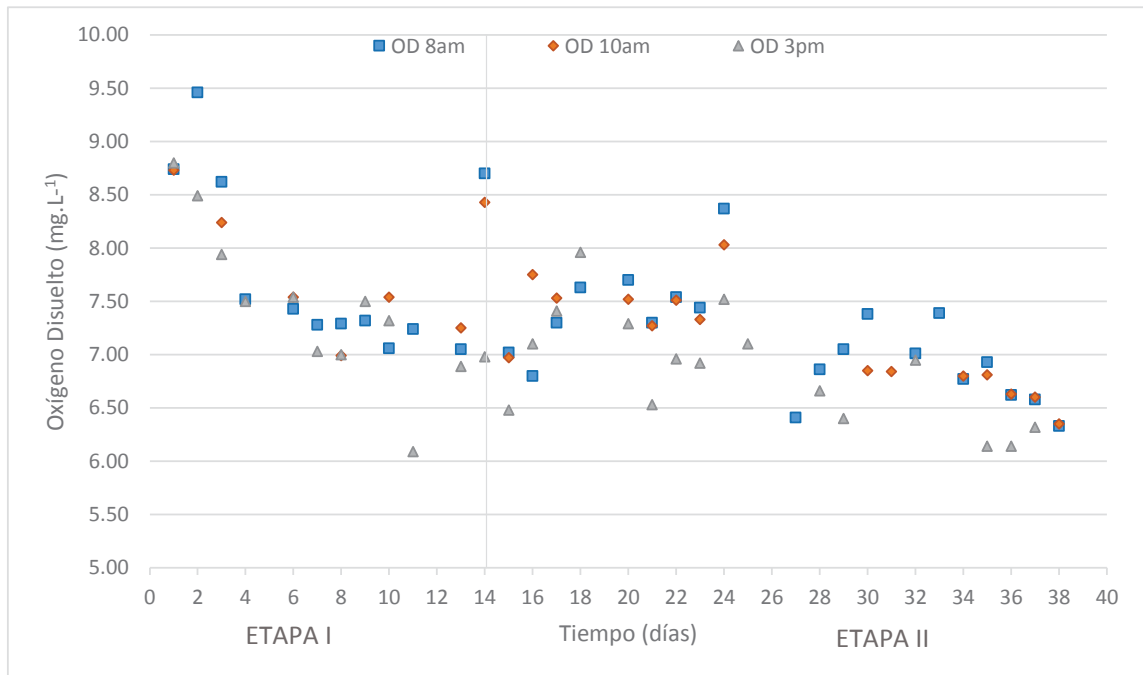
	Oxígeno Disuelto (mg.L <sup>-1</sup> )
<b>SEMANA 1</b>	7.16 - 8.98
<b>SEMANA 2</b>	7.06 - 8.04
<b>SEMANA 3</b>	6.82 - 7.80
<b>SEMANA 4</b>	6.41 - 7.97
<b>SEMANA 5</b>	6.63 - 7.39
<b>SEMANA 6</b>	6.14 - 6.32

En el Cuadro 8 se observa que los valores de oxígeno disuelto (OD) disminuyeron durante la etapa experimental, debido al incremento constante de la temperatura del agua (Cuadro 7) indicando una correlación de -0.854 en la etapa I; ya que según Boyd (1998), De Schryver *et al.* (2008) y Ogello *et al.* (2014), es de esperar que a mayor temperatura el OD sea menor.

En la etapa II no se mostró ninguna correlación con la temperatura debido a que su disminución está dada predominantemente por la elevada respiración que hay en el bioreactor por parte de los organismos heterotróficos (Figura 3b) disminuyendo así la transparencia del agua (Correlación de 0.539).

Saavedra (2006) indica que valores por encima a los 5 mg.L<sup>-1</sup> de OD son óptimos para el cultivo de la tilapia por lo cual, este parámetro no sería limitante para la producción de alevinos de tilapia bajo esta nueva tecnología debido a que se reportaron concentraciones mayores durante toda la etapa experimental teniendo como valor mínimo en la última semana una concentración de 6.14 mg.L<sup>-1</sup>. (Ver Cuadro 8).

La variación de la concentración de oxígeno disuelto durante toda la etapa experimental se presenta en la Figura 8.



**Figura 8: Variación de la concentración de oxígeno disuelto en el bioreactor.**

En la Figura 8 se observa que los valores de OD se mantuvieron en un rango aproximado de 6.0 mg.L<sup>-1</sup> hasta casi 9 mg.L<sup>-1</sup> a lo largo de la etapa experimental.

El sistema utilizado para la aireación y circulación del agua, colocado con el objetivo principal de mantener suspendida la materia orgánica, permitió altas concentraciones de OD, tal y como se observa en la Figura 8.



El OD en la etapa I, presentó una correlación inversa de -0.575 con la turbidez relacionada al aumento constante de la biomasa de peces (Anexo 3), la adición de alimento, las tasas de excreción y el incremento de la densidad de organismos heterotróficos oxidadores del NAT (Figura 1). Avnimelech *et al.* (2008) indica que la relación que existe entre la caída de oxígeno y el incremento de la turbidez en los sistemas con BFT, presentan este tipo de comportamiento.

Un factor importante que influye en el nivel de OD según Allan y Maguire (1992) y Boyd (1998), se debe a que las bacterias descomponedoras de la materia orgánica y organismos heterotróficos en general, realizan un consumo significativo de este. Sin embargo, no se reportó para la etapa II ninguna correlación significativa del OD con el nivel de sólidos sedimentables o la turbidez indicando que la constante aireación y circulación del agua permitió un tenor de oxígeno adecuado para todos los procesos biológicos y químicos dentro del bioreactor realizados por los peces, bacterias, algas y otros organismos. Adicionalmente el fitoplancton puede ser un consumidor de una gran parte del OD en el agua (Vinatea *et al.* 2009) pero debido a que los consumos más significativos se dan a partir de las 6 p.m. (Roldán 1992) no se puede afirmar su efecto directo en la concentración de OD. A pesar de ello, aún sin realizar un monitoreo del bioreactor a partir de esa hora, no se presentó mortalidades en peces (Anexo 3) o registro de valores anómalos durante la etapa experimental.

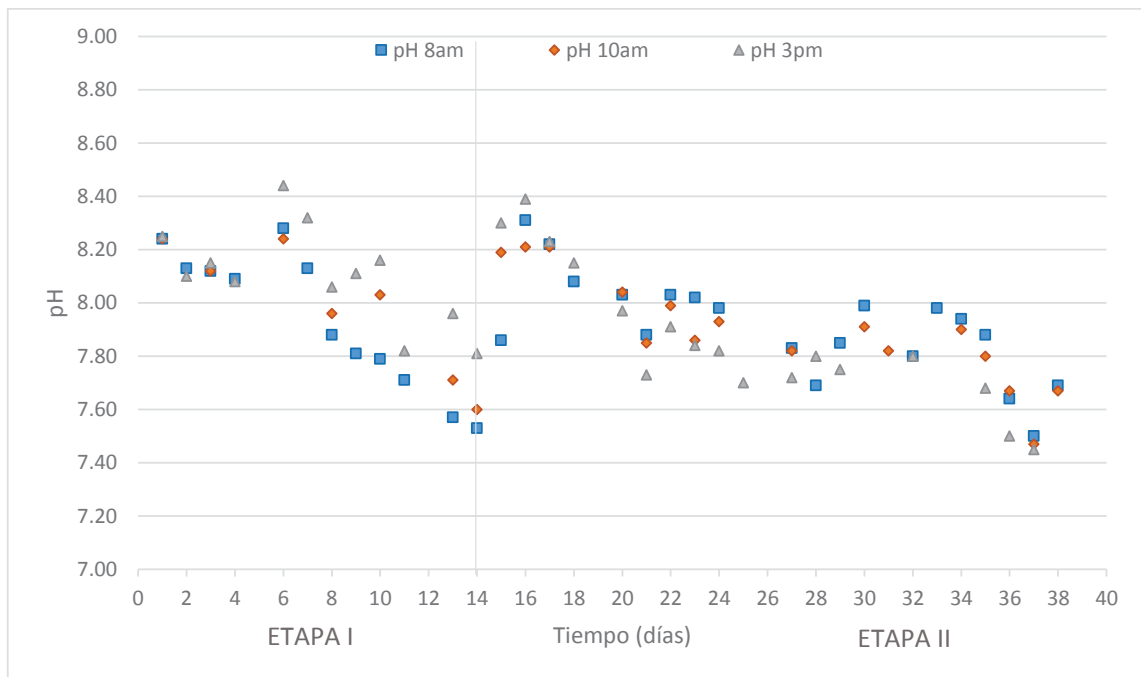
Así mismo, el OD presentó un valor de correlación inversa con el nitrito (-0.551) y con el nitrato (-0.530) en la Etapa I y otra correlación inversa con el nitrato (-0.633) para la Etapa II. Estas correlaciones son explicadas en la Figura 1 donde se observa que el proceso de nitrificación se mantuvo durante toda la etapa experimental por lo cual, los procesos de oxidación del NAT y del nitrito hasta llegar finalmente a nitrato fueron permanentes implicando según Ebeling *et al.* (2006), un consumo de OD constante.

Asaduzzaman *et al.* (2010) observó que los altos valores de OD mantenidos en el agua se deben en parte al comportamiento de las tilapias. Investigaciones anteriores como las de Jiménez-Montealegre *et al.* (2002) y Phan-Van *et al.* (2008); reportan que la tilapia presenta una actividad bioturbulenta que permite el paso del oxígeno disuelto hacia las capas inferiores del tanque mejorando las condiciones aeróbicas del mismo.

La observación realizada diariamente en el bioreactor, mostraba un constante nado de los peces por toda la columna de agua incluyendo saltos a los primeros días de iniciado el experimento corroborando el comportamiento indicado anteriormente.

Por otra parte, el pH fue un parámetro importante durante toda la etapa experimental presentando correlaciones altas (Anexo 1 y 2) con la mayoría de los parámetros de calidad del agua medidos en cada etapa, siendo más significativas su relación con la turbidez y la transparencia la cual se discutirá más adelante.

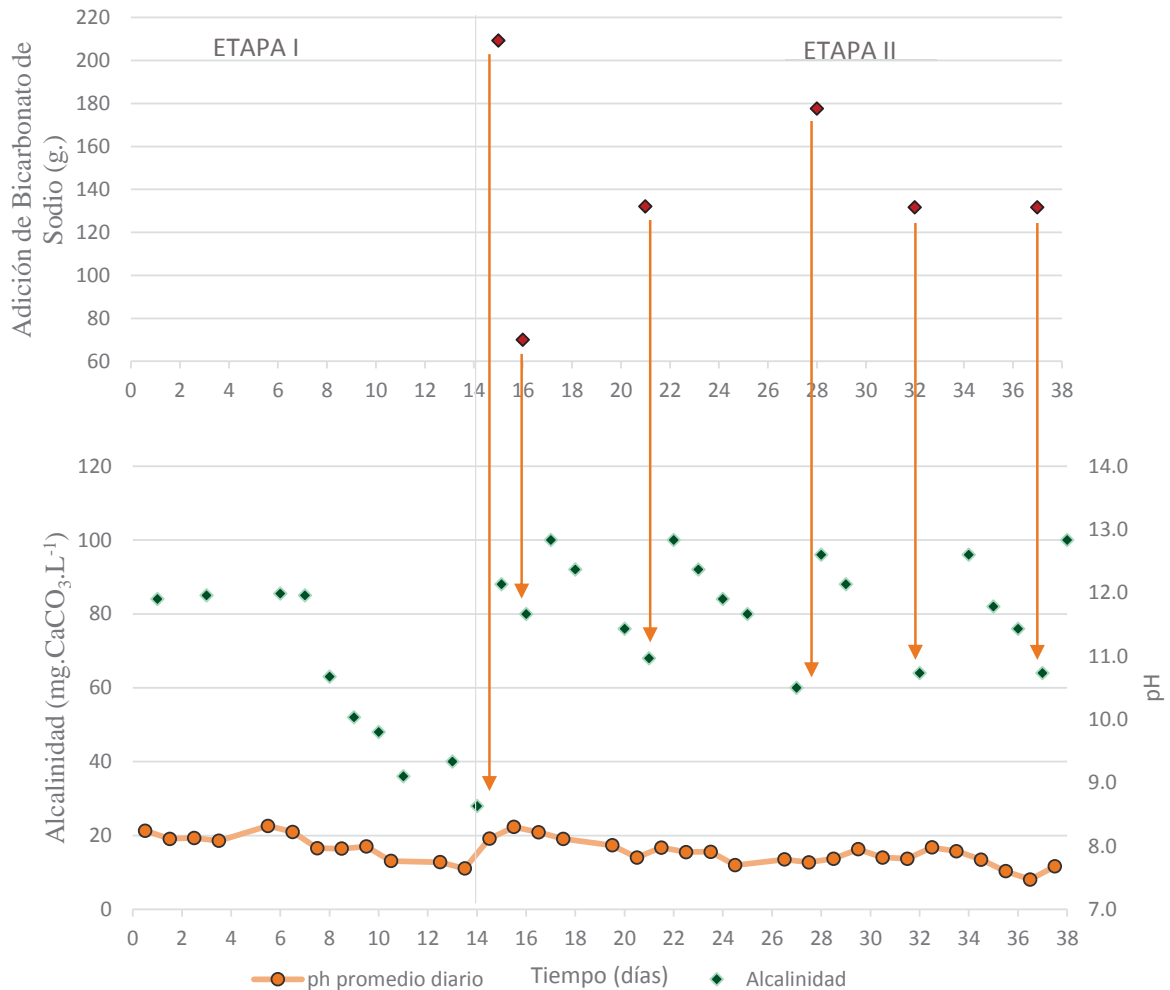
Las fluctuaciones de pH durante toda la etapa experimental se presentan en la Figura 9. Estas se encontraron en un rango de 7.4 a 8.5 con valores máximos de 8.39 y valores mínimos de 7.45 en el quinto y décimo cuarto día experimental respectivamente.



**Figura 9: Variación del pH en el agua del bioreactor.**

Dentro de los aspectos limnológicos de importancia para la vida acuática se destaca el equilibrio ácido-base que está directamente relacionado con la temperatura y principalmente con su pH (Aride *et al.* 2007) y la alcalinidad (Andrade *et al.* 2007).

El pH fue un parámetro difícil de controlar en el bioreactor con BFT debido a los diferentes procesos químicos y biológicos que se dan en el agua que implicaron un consumo de la alcalinidad. (Ogello *et al.* 2004, Ebeling *et al.* 2006, Crab 2010).



**Figura 10: Fluctuación del pH en función a la variación de la alcalinidad; y el efecto de la adición de bicarbonato de sodio en la concentración de la alcalinidad.**

Las variaciones diarias de pH mostradas en la figura 10, se deben en parte al aumento de la temperatura en el transcurso del día (Figura 7), donde se obtuvieron valores promedio de 27.16°C a las 8 a.m., 27.46°C y 28.03°C a las 3 p.m. a lo largo de toda la etapa experimental acelerando todos los procesos metabólicos de crecimiento y reproducción de los organismos del floc (Hargreaves 2004, Pérez-Fuentes *et al.* 2013).

Estos incrementos de temperatura, sumados a la presencia de organismos fitoplanctónicos (Fotosíntesis) en el bioreactor (Principalmente en la etapa I), propiciaron el consumo de las reservas alcalinas sobre todo cuando el pH del agua reportó valores mayores a 8.3 donde ya no hay presencia de CO<sub>2</sub> libre y por ende, este es obtenido mediante la hidrólisis del bicarbonato liberando iones hidróxido. (Cavalcante y Do Carmo 2010, Poleo *et al.* 2011).

Esta relación se observa en la Figura 10, en donde a una disminución de la alcalinidad, el pH comienza a disminuir en la etapa I con una correlación de 0.940. Para la segunda etapa, la alcalinidad no presentó una correlación significativa con el pH debido a que para mantener estable el bioreactor (comparando con la primera etapa donde no se realizó un control de este), se realizó una adición de bicarbonato de sodio, convirtiendo este parámetro en un valor constante.

Para aguas con una baja alcalinidad, como las utilizadas en el CINPIS, esto fue un problema significativo requiriendo una adición de alcalinidad en forma de bicarbonato de sodio (Figura 10) para mantenerla en niveles de 100 mg CaCO<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup> o más, tal y como sugieren Ebeling *et al.* (2006), Azim y Little (2008) y Hargreaves (2013).

El ajuste de la alcalinidad se realizó con el fin de mantener estable el pH del tanque bioreactor ya que, Mikkelsen *et al.* (1996) indican que los cambios bruscos del pH diarios, pueden afectar la estabilidad de los biofloc presentes y por otro lado, pueden afectar a los peces de cultivo ocasionando mortalidades y mal funcionamiento fisiológico (Portz *et al.* 2006).

El presente estudio no reportó ninguno de los problemas mencionados, debido a que el manejo de la alcalinidad durante la segunda etapa, permitió un pH entre 7.45 y 8.44 los cuales se encuentran entre los límites aceptables por los alevinos de tilapia según El-Sayed (2006) y dentro de los rangos óptimos de manejo de los sistemas BFT (Avnimelech, 2012).

El consumo de alcalinidad se debe también a la nitrificación ya que, según Ebeling *et al.* (2006), se consume una cantidad significativa de este (7.05 g de CaCO<sub>3</sub> por gramo de nitrógeno) alterando la concentración de carbonatos y la capacidad buffer del agua.

Esto se ve reflejado principalmente en la primera etapa, en donde se encontró valores de correlación inversas del alcalinidad con los nitritos (-0.647) y nitratos (-0.637) por lo cual, conforme la concentración de nitritos y sobretodo nitratos aumentaron en el agua (Figura 1), esta efectivamente disminuyó y a su vez, los valores de pH (correlación de 0.940). Una dinámica similar fue presentada en el trabajo de Green (2010) con bagres de canal. A su vez, otros reportes anteriores (Gujer y Jenkins 1974, Sharma y Ahlert 1977) indican que para oxidar 1 mg de NAT se requiere aproximadamente 4 mg de OD y 8 mg de bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) confirmando esta correlación indirecta.

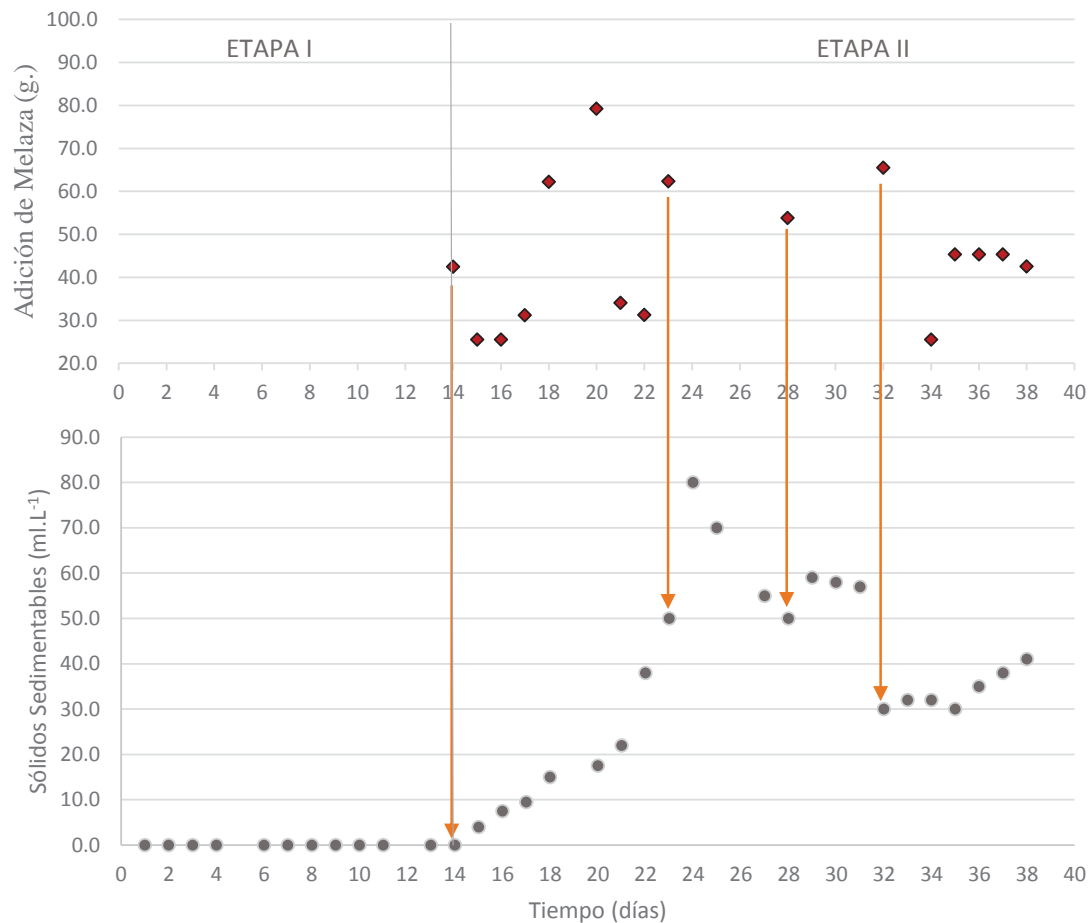
Otra causa de la disminución de la alcalinidad, se debió a los procesos heterotróficos que dominan los sistemas BFT (predominantes en la etapa II). Ebeling *et al.* (2006), indican que la toma de nitrógeno en el agua por los organismos del floc consumen la mitad de la alcalinidad que la nitrificación (3.57 g alcalinidad/g NAT) pero aun así sigue siendo significativa. Sin embargo, debido al control de este parámetro durante la etapa II por encima de los 60 mg  $\text{CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ , no se mostró una correlación con los indicadores de crecimiento de organismos heterotróficos como son principalmente los sólidos sedimentables y la turbidez.

Los días 21, 26, 31 y 36; cuyos valores de alcalinidad fueron menores a 75 mg  $\text{CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ , los sólidos sedimentables demoraron mucho en sedimentar dentro del Cono Imhoff (Figura 11b). Además de ello, se presentó la formación de una espuma de color blanca en la superficie del tanque similar a la reportada por Kubitzka (2011).



**Figura 11: (a) Formación del *Bulking* y *Foaming* en el bioreactor y (b) Sedimentación lenta del biofloc en el cono imhoff.**

Estas desaparecían en el transcurso de uno o dos días después de haber agregado una fuente de bicarbonato al agua para aumentar la alcalinidad (Figura 10). Estos síntomas encontrados son denominados *Bulking* y *Foaming* (Arellano 2005), (Figura 11a) los cuales son originados por organismos filamentosos que predominan cuando existe un desbalance de los niveles de carbono inorgánico del agua (Reyes 2009) y un déficit de oxígeno (Ogello *et al.* 2014). Sin embargo, la solución se logró exclusivamente con la adición de bicarbonato ya que el oxígeno disuelto siempre se mantuvo por encima de los niveles recomendados.



**Figura 12: Variación de la concentración de sólidos sedimentables en el bioreactor en función a la adición de melaza.**

En la Figura 12, se presenta la variación de la concentración de sólidos sedimentables en función a la adición de melaza en el bioreactor. Para la primera etapa no se realizó adición de melaza para mantener un medio predominantemente autotrófico y permitir la estabilización del sistema como se mencionó anteriormente.

El nivel de sólidos sedimentables se mantuvo en  $0 \text{ ml.L}^{-1}$  hasta el décimo quinto día a partir del cual se incrementó debido a la adición de melaza. La adición continuó en función a la concentración del NAT (Luo *et al.* 2013) hasta el día 24 a partir del cual se detuvo debido a un gran incremento inusual de  $50 \text{ ml.L}^{-1}$  hasta  $80 \text{ ml.L}^{-1}$  superando el rango óptimo para la tilapia que está entre  $25 \text{ ml.L}^{-1}$  y  $50 \text{ ml.L}^{-1}$  (Hargreaves 2013). Cuando el nivel bajó a los  $50 \text{ ml.L}^{-1}$  en el día 28, se volvió a agregar melaza. El día 31 se volvió a agregar la fuente de carbono debido a una caída de  $57 \text{ ml.L}^{-1}$  hasta  $30 \text{ ml.L}^{-1}$ . Hasta el fin del experimento, el nivel de sólidos sedimentables llegó a los  $40 \text{ ml.L}^{-1}$  (Figura 16).

Los sistemas Biofloc son operados típicamente como sólidos suspendidos (Avnimelech *et al.* 1982, Avnimelech 1999, Hari *et al.* 2004) pero manejados a niveles de sólidos sedimentables por lo que la medición de este parámetro fue obligatorio en la segunda etapa. Estos fueron monitoreados diariamente ya que la funcionalidad del sistema biofloc depende de la biofiltración (el control del NAT) y la demanda de OD del agua, los cuales según Hargreaves (2013), se incrementan directamente al incrementar los niveles de sólidos suspendidos en el agua.

Los niveles de sólidos sedimentables no fueron mantenidos a niveles por encima de los  $70 \text{ ml.L}^{-1}$  o por debajo de los  $30 \text{ ml.L}^{-1}$  ya que según Hargreaves (2013), esas concentraciones pueden afectar la biofiltración en el bioreactor o un consumo excesivo de oxígeno disuelto. Por ello, los valores de NAT,  $\text{NO}_2$  y  $\text{NO}_3$  no mostraron anomalías en su dinámica. Estudios anteriores como los de Azim *et al.* (2008), Azim y Little (2008) y Luo *et al.* (2014) presentaron una dinámica de estos compuestos similar a la obtenida en el experimento (Figura 1).

Como se mencionó anteriormente, el OD no fue un factor limitante en el mantenimiento de los bioflocs (expresados como sólidos sedimentables) debido a la fuerte aireación y circulación del sistema (la correlación entre los sólidos sedimentables y el OD no fue significativa). Cabe agregar que a pesar de la presencia predominante de organismos heterotróficos, la presencia de microalgas (Figura 3b) contribuyó con el suministro de oxígeno mediante la fotosíntesis.

Como se mencionó anteriormente, los sólidos sedimentables representan la densidad de organismos heterotróficos presentes en los bioreactores de BFT (Luo *et al.* 2012) debido a que según Timmons *et al.* (2009) y Cedano-Castro (2013), la biomasa de organismos heterotróficos es 40 veces mayor que la biomasa de bacterias autotróficas generada en el proceso de nitrificación.

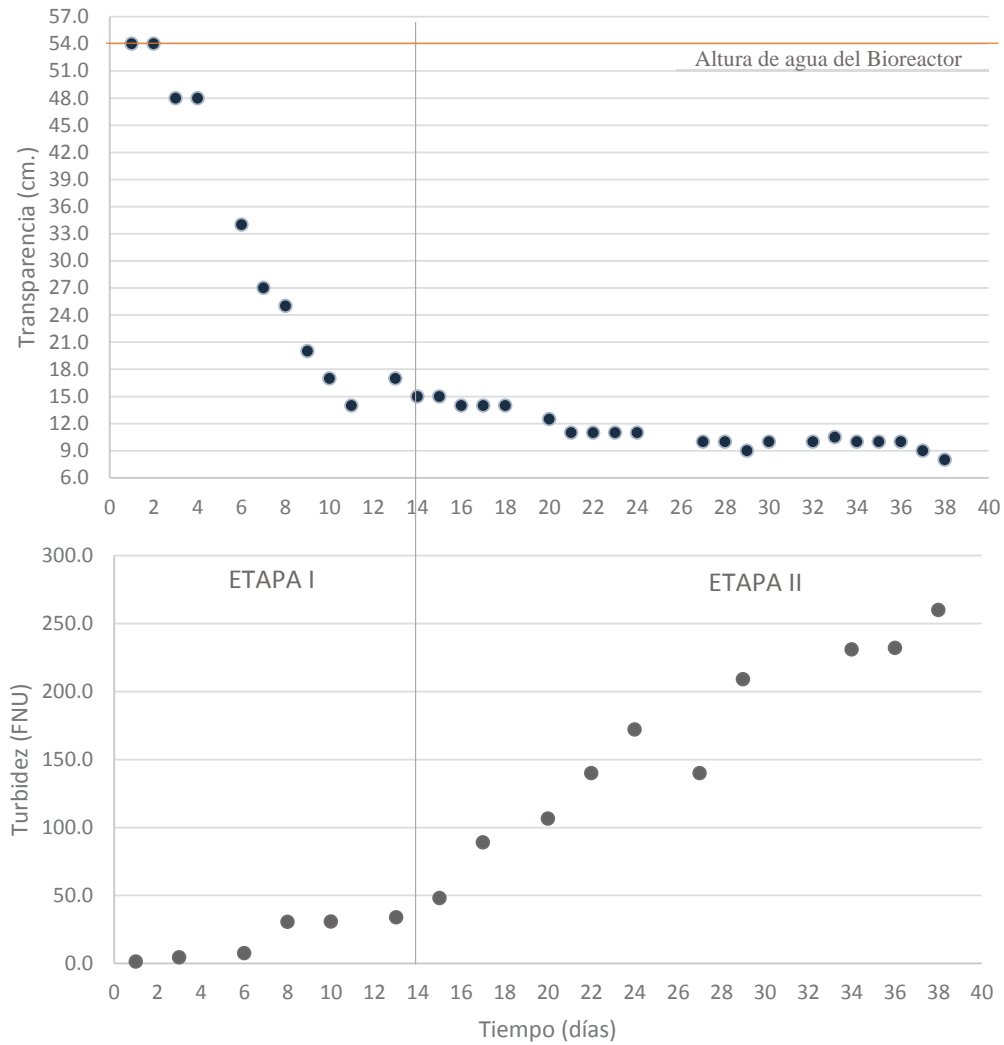
Para que estos organismos dominen sobre los autotróficos, se debe mantener altas relaciones de C:N = 10:1 o más (Ekasari *et al.* 2010, Xu y Pan 2012) de forma tal que ellos puedan asimilar el NAT (Figura 4) para producir células proteicas que sirvan como alimento suplementario para los animales de cultivo. (Moss *et al.* 1999, Browdy *et al.* 2001, Burford y Lorenzen 2004, Samocha *et al.* 2007). Así, la disponibilidad de NAT para las bacterias nitrificantes es mínima permitiendo una baja acumulación de nitritos (correlación de -0.527). De esta forma se logra definir que para el establecimiento de un bioreactor de biofloc se debe pasar por dos etapas bien diferenciadas en las cuales la primera será autotrófica y la segunda heterotrófica debido a la predominancia de los organismos que los conforman respectivamente.

Los sólidos sedimentables (en la etapa II), presentaron una correlación directa con el pH de 0.536 a pesar de su baja fluctuación. Esto indicó que al disminuir el pH, la concentración de estos se ven reducidos. Debido a que la alcalinidad fue una constante en la segunda etapa, no existe una correlación significativa con los sólidos sedimentables (Anexo 2) sin embargo, debida a la alta correlación que hay entre la alcalinidad y el pH, se deduce que la alcalinidad es un parámetro limitante en la formación del floc. Si ésta no hubiera sido controlada, el pH hubiera disminuido afectando el nivel de los sólidos sedimentables y por lo tanto la densidad de los organismos heterotróficos.

Por otro lado, se empleó como fuente de carbono la melaza debido a que en estudios anteriores como los de Samocha *et al.* (2007), indican que esta no afecta el comportamiento productivo de las especies ni tampoco la calidad del agua. Cuando un organismo heterotrófico toma carbono de una fuente orgánica como la melaza, también realiza la toma del nitrógeno en su medio acuoso con el fin de producir biomasa proteica aumentando el volumen del floc (Avnimelech y Kochva 2009) como se observa en la Figura 16.



Por ello, en las Figuras 1 y 12, el nivel de sólidos sedimentables comienza a incrementarse mientras que el NAT y los nitritos siguen disminuyendo debido al inicio de la adición de melaza a partir del decimo quinto día experimental.



**Figura 13: Variación de la transparencia y turbidez del agua en el bioreactor.**

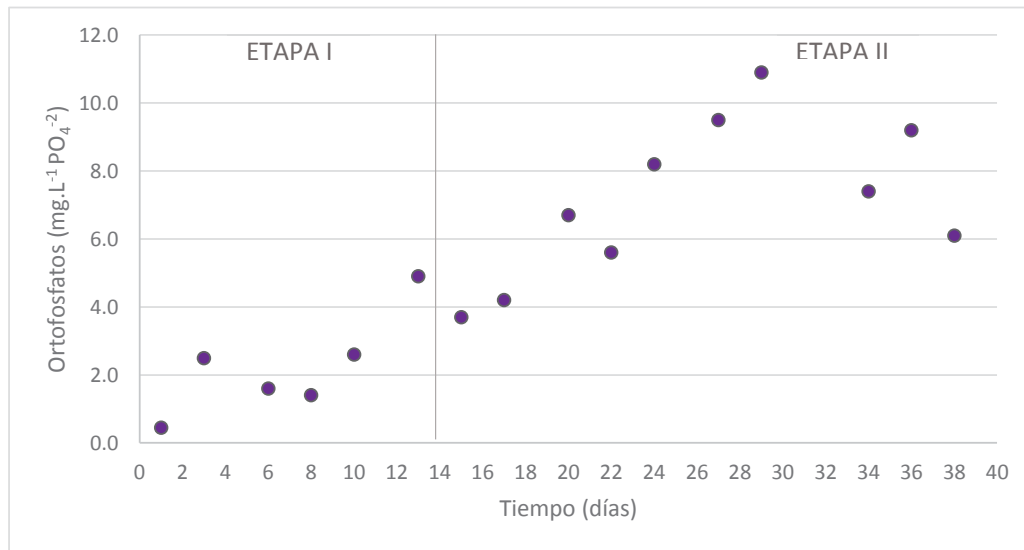
Otras formas indirectas de evaluar el nivel de sólidos sedimentables se realizan mediante la determinación de la transparencia y turbidez del agua (Hargreaves 2013).

Conociendo que la altura del tanque fue de 54 cm, el agua presentó una transparencia del 100 % al inicio del experimento. El crecimiento constante de la población algal por la coloración verde del agua (Figura 2) hasta el día 15 originó una disminución de la visibilidad.

Desde ese momento, se comenzó la adición de melaza hasta el fin del experimento manteniendo un valor constante entre 10 y 8 cm de transparencia (Figura 13).

La transparencia se considera como un indicador indirecto de la productividad primaria y esta a su vez se ve influenciada por la temperatura por lo cual, a mayor temperatura se presentó una menor transparencia (-0.876, etapa I) debida a la aceleración de los procesos metabólicos de los organismos fitoplanctónicos aumentando su densidad y disminuyendo la transparencia. A su vez, la alta densidad de ellos permite la producción de OD (correlación de 0.770, etapa I y 0.539, etapa II) y una disminución del CO<sub>2</sub> libre propiciando un incremento de pH (correlación de 0.668, etapa I y 0.862, etapa II).

La turbidez por su parte, presenta una relación inversa a la transparencia (correlación de -0.640) ya que conforme esta aumenta, la transparencia disminuye (Cano 2005, Avnimelech 2012). La turbidez presentó un valor inicial de 1.3 FNU alcanzando valores de 250 FNU o NTU hasta el fin del experimento debido a la disminución de la transparencia (correlación de -0.720) ocasionada a su vez, por el aumento de los sólidos suspendidos en el bioreactor (Figura 12).



**Figura 14: Variación de la concentración de ortofosfatos en el bioreactor.**

La dinámica del ortofosfato (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) fue evaluada debido a que a diferencia de los sistemas convencionales, donde el fósforo añadido al agua por medio del alimento (un 80-90%) es liberado al agua e inutilizado (Barak *et al.* 2003), en los sistemas BFT si es aprovechado.

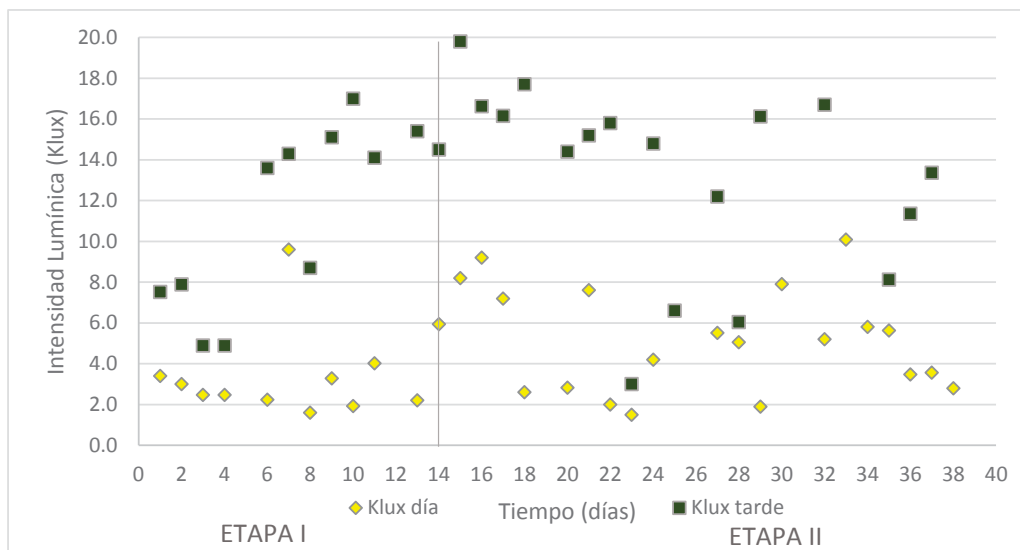
En la Figura 14 se observa que el ortofosfato alcanzó un valor entre  $0.09 \text{ mg.L}^{-1}$  y  $10.9 \text{ mg.L}^{-1}$  desde el inicio hasta el final del experimento. Los valores iniciales de ortofosfatos fueron bajos en el agua pero se fueron incrementando a medida que se adicionó el alimento ya que éste, es la fuente de este compuesto en el agua.

Los niveles de ortofosfatos en el agua son utilizados para el crecimiento y reproducción del biofloc y no son utilizados por el pez (Luo *et al.* 2014). Se conoce que el biofloc es consumido por los peces, y el ortofosfato presente en ellos puede ser asimilado mucho más rápido que el que se encuentra en el alimento, mientras que la porción restante es la colectada en las muestras del presente estudio. Esta dinámica podría explicar las fluctuaciones entre días que no presentan una tendencia fija de crecimiento o decrecimiento, sin embargo, se puede ver una acumulación del mismo debido a que no existe ningún proceso que permita su eliminación hacia la atmósfera (Ríos 2009). Adicionalmente, Ray *et al.* (2010b) indicaron que las algas, además de emplear el NAT para construir estructuras celulares como proteínas y azúcares, necesita también consumir fósforo afectando su concentración en el bioreactor.

La incidencia de la luz en el bioreactor fue medida en Klux y presentó un incremento progresivo empezando en un rango de  $1.5 \text{ Klux}$  a  $10.09 \text{ Klux}$  a las 8 a.m. y entre  $3.0 \text{ Klux}$  y  $19.80 \text{ Klux}$  a las 3p.m. Los valores más bajos de cada rango se presentaron en días nublados. Estos incrementos de intensidad lumínica permitieron a los organismos autotróficos realizar fotosíntesis y por ende crecer y reproducirse en el agua. Estos, al pertenecer al biofloc, permitieron su desarrollo en volumen y densidad (Neal *et al.* 2010) siendo un factor en el incremento de la concentración de sólidos sedimentables (Figura 12), la coloración inicial del agua (Figura 2) y el aumento de la turbidez del agua. (Baloi *et al.* 2013).

En la Figura 15 se presenta la variación de la intensidad lumínica (Klux) en la superficie del agua del bioreactor durante la fase experimental.

La intensidad lumínica en el día corresponde a una medición realizada a las 8 a.m. la cual fue tomada generalmente cuando aún el cielo permanecía nublado. Por otra parte, la intensidad lumínica medida en la tarde corresponde a una medición tomada a las 3 p.m.



**Figura 15: Variación de la intensidad lumínica en Klux en la superficie del agua del bioreactor.**

Sin embargo registros tomados a partir de las 11 a.m. mostraron valores similares a los obtenidos a las 3 p.m. por lo cual se establece esta medición como la más significativa en relación con la dinámica de los parámetros de calidad del agua.

Para la primera etapa, la intensidad lumínica presentó una correlación de 0.723 con la temperatura ya que se realizó un proceso de transferencia de calor dentro del invernadero (como se mencionó anteriormente), incrementándola conforme la intensidad de luz se volvía más fuerte. A su vez, al aumentar la temperatura del agua, también afectó la solubilidad de los gases manteniendo una correlación negativa con el OD (-0.551).

Así mismo las bacterias nitrificantes necesitan una fuente de luz (Energía) para realizar la oxidación del NAT a nitritos y de nitritos a nitratos (Ebeling *et al.* 2006) por lo cual las correlaciones de nitrito y nitrato con la intensidad de luz fueron directas (0.508 y 0.634, respectivamente).

Por otra parte, en la segunda etapa, la intensidad de luz no presentó correlaciones significativas con ningún parámetro de calidad de agua a excepción de la transparencia lo cual se discutió anteriormente.

En el cuadro 9 se presenta el cambio en las concentraciones de los principales aniones y cationes durante el transcurso del experimento.

**Cuadro 9: Cambio en las concentraciones de los principales aniones y cationes en el bioreactor del inicio al final de la etapa experimental.**

Parámetro	Unidades	Inicio del Experimento	Final del Experimento
<b>Calcio</b>	mg.L <sup>-1</sup>	206.00	436.00
<b>Magnesio</b>	mg.L <sup>-1</sup>	62.95	84.30
<b>Potasio</b>	mg.L <sup>-1</sup>	13.71	64.12
<b>Sulfatos</b>	mg.L <sup>-1</sup>	670.08	790.08
<b>Cloruros</b>	mg.L <sup>-1</sup>	710.00	887.5
<b>Dureza Total</b>	mg CaCO <sub>3</sub> .L <sup>-1</sup>	773.62	1435.85

La alta dureza total inicial es propia del agua de pozo del CINPIS. Esta aumentó durante el experimento, debido a la acumulación de calcio proveniente del alimento suministrado ya que Poleo *et al.* (2011) indican que los alimentos comerciales generalmente contienen entre sus ingredientes cantidades significativas de carbonatos y fosfatos de calcio.

Según Tehicú (2004), debido a la disminución de la alcalinidad durante el experimento y al tener la necesidad de añadir bicarbonato de sodio, éste también permitió un incremento de la dureza debida a la formación de carbonatos de calcio y magnesio en el agua por sus elevadas concentraciones.

El calcio y el magnesio son los cationes más abundantes en las aguas dulces. Su actividad química es muy similar y en particular en la formación de sales de carbonato, que pueden ser limitantes en los procesos biológicos de cualquier cuerpo acuático (Roldán, 1992).

Para el caso de los sistemas biofloc que emplean bacterias heterotróficas para convertir los nutrientes del agua en biomasa bacteriana (Schneider *et al.* 2006b, De Schryver and Verstraete 2009), sobre todo el nitrógeno amoniacal (Kunh *et al.* 2010), se ha demostrado que los cationes divalentes facilitan la biofloculación (formación e incremento del floc) debido al fenómeno de puentes catiónicos (Luo *et al.* 2013).

Como se indicó anteriormente, el incremento de los sólidos sedimentables es un indicador del crecimiento de la densidad de organismos heterotróficos por lo cual, un incremento de estos cationes divalentes permitirán el desarrollo favorable del biofloc.

Por lo tanto, este incremento presentado hasta el fin del experimento de 206 a 436 mg.L<sup>-1</sup> de calcio y de 65.95 mg.L<sup>-1</sup> a 84.30 mg.L<sup>-1</sup> de magnesio, mejoró las propiedades de sedimentación del biofloc e incrementó la fuerza de unión entre ellos, ya que según Sobeck y Higgins (2002), estos cationes también son los responsables de estas propiedades particulares de un buen biofloc. La fuerza de unión y la facilidad con la que sedimentan se puede observar en el transcurso del experimento al momento de utilizar los conos Imhoff en donde, conforme pasaban los días, la sedimentación se estabilizaba más rápido y además de ello nunca se formaron espacios de aire entre los sólidos sedimentables dentro del cono. Arabi y Nakhla (2009) también reportaron que el calcio tiene un efecto positivo en la formación del floc al incrementar su concentración en el agua. (Figura 16)



**Figura 16: Incremento en la concentración de sólidos sedimentables en el bioreactor.**

La disponibilidad de sulfatos y cloruros en el agua, provenientes de la adición de agua para cubrir las pérdidas por evaporación y de la melaza (Fajardo y Sarmiento 2007) pudieron haber originado también la formación de sulfatos o cloruros de calcio y magnesio (Roldan 1992), los cuales forman parte de los valores de dureza permanente (no precipitan y no pueden ser utilizados por los organismos acuáticos), obtenidos en el experimento.

Por otra parte, los altos niveles de cloruros reportados (Cuadro 9) característicos del agua de pozo del CINPIS y agregados a través la melaza (Fajardo y Sarmiento 2007), generaron un efecto antagónico con el nitrito tóxico (Avnimelech 2012), evitando la mortalidad de peces en el bioreactor por intoxicación (Anexo 3).

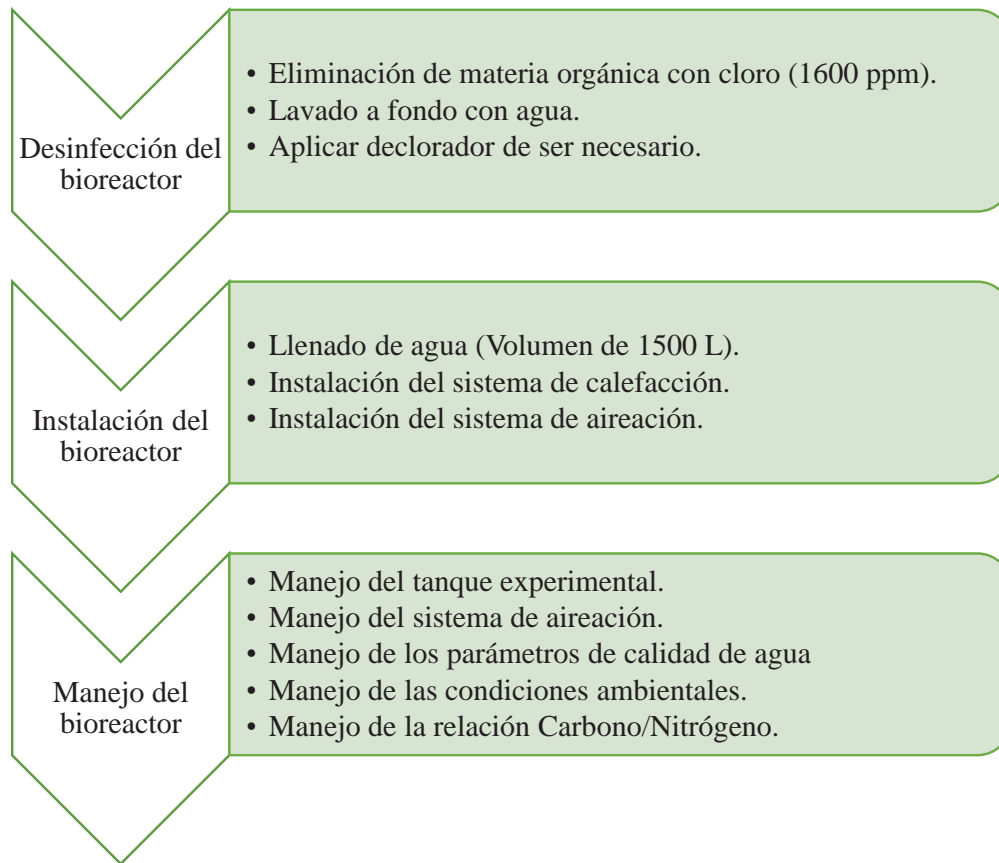
El potasio es un anión que regularmente se encuentra en bajas concentraciones en las aguas dulces (Roldan 1992). Debido al mínimo aporte de agua que se realiza al sistema para cubrir la las pérdidas por evaporación, todas las heces y desechos de las tilapias se acumulan en el sistema y es dentro de ellas que tienden a acumularse (Roldan 1992), mostrando un incremento en su concentración (Cuadro 9).

#### **4.3. ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO DE PUESTA EN MARCHA Y MANTENIMIENTO DE UN BIOREACTOR CON BFT EN AGUA DULCE.**

El presente protocolo se implementó en los tanques del Invernadero del Centro de Investigación Piscícola (CINPIS) de la Facultad de Pesquería UNALM, con la finalidad de llevar a cabo la fase experimental de la presente tesis durante el periodo de Noviembre y Diciembre del 2013.

El adecuado manejo del bioreactor permitió mantener las condiciones ambientales y de calidad de agua requeridas durante su estabilización y a su vez, óptimas para la sobrevivencia y crecimiento de los alevinos machos de tilapia (*Oreochromis niloticus*) al momento de su puesta en marcha y funcionamiento. El control del incremento de desechos tóxicos como lo son el  $\text{NH}_3$  (amoníaco) y  $\text{NO}_2$  (nitritos), y de la variación de la calidad de agua, son necesarios para disminuir el riesgo de mortandad de los animales por factores medioambientales, durante la fase experimental.

Este protocolo pretende aportar a esta labor, indicando el procedimiento a seguir en el manejo de la calidad de agua mediante los tratamientos biológicos y microbiológicos del mismo, el control de la temperatura, pH, aireación, alcalinidad, sólidos sedimentables, turbidez, transparencia y el uso adecuado de la melaza como fuente de carbono durante la ejecución de la tesis.



**Figura 17: Flujograma para el correcto establecimiento y manejo del bioreactor de biofloc.**

#### **4.3.1. DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA**

El objetivo principal del Bioreactor con tecnología biofloc (BFT) es el tratamiento y reúso del agua dulce y la producción de biofloc para ser utilizados en la crianza de alevinos machos de Tilapia (*Oreochromis niloticus*) teniendo en cuenta los parámetros medioambientales y calidad de agua considerada en la propuesta de la presente tesis.

##### **a. Unidad Experimental**

Constituido por un tanque de fibra de vidrio circular de 2 m<sup>3</sup> de volumen (volumen utilizado de 1.5 m<sup>3</sup>) con un sistema de drenaje central y control de nivel de agua mediante un tubo vertical de PVC. Se muestra en la Figura 18.



El bioreactor debe ser acondicionado con 3 calentadores de 300 W para poder operar a una temperatura de 28°C. Además de ello, 3 piedras difusoras de cerámica modelo AS15S (15x4), deben ser colocadas en el fondo y distribuidas simétricamente para una correcta aireación.



**Figura 18: Bioreactor con tecnología biofloc instalado (Día 1).**

**b. Sistema de Aireación.**

Compuesto por una bomba de aire (*Blower*) marca *Sweewater* de 1/3 HP, tubos de PVC, manguerillas plásticas, válvulas, abrazaderas y difusores para la distribución del aire en el bioreactor de biofloc. (Figura 19)



**Figura 19: (a) Bomba de aire y (b) manguerillas y válvulas, empleadas en el sistema de aireación.**

**c. Sistema de Calefacción**

Conformado por 3 calentadores con termostato de 300 W cada uno (marca SOBO) ubicados en las paredes del bioreactor (Figura 20).

### **4.3.2. MANEJO DEL BIOREACTOR DE BIOFLOC**

#### **a. Manejo del tanque experimental**

Antes de preparar el bioreactor, el tanque a utilizar debe ser limpiado exhaustivamente por dentro con abundante agua y luego debe ser enjuagado para eliminar residuos sólidos o materia orgánica residual.

De ser necesario, se puede realizar la desinfección del tanque con una solución clorada de 1600 ppm aplicada mediante spray o empapando con esponja, toda la superficie. Se debe dejar actuar por un periodo entre 24 y 48 horas.

Luego, lavar el tanque y llenarlo de agua con suficiente aireación. Después de 48 horas se debe verificar si todo el cloro ha sido eliminado. Se puede aplicar declorador si se verifica la presencia de cloro residual (1 gota por cada litro de agua).

Vaciar el tanque y dejarlo seco hasta su uso.

El tubo central de desagüe debe ser cubierto con malla para evitar el escape de animales por el sistema de drenaje.

El nivel del agua promedio es de 0.54 m y debe ser controlado únicamente realizando el ingreso de agua nueva para cubrir las pérdidas por evaporación. El bioreactor en otras circunstancias seguirá manteniéndose con cero recambio de agua.

#### **b. Manejo del Sistema de Aireación**

El sistema de aireación debe asegurar una distribución adecuada del aire en el bioreactor de biofloc. Los caudales de aire se regulan mediante las válvulas para cada una de las manguerillas de plástico dispuestas en el tanque con su respectiva piedra difusora.

Verificar diariamente que los difusores no se desprendan, ni se obturen. Esto se evita limpiándolos 2 veces por semana con abundante agua y un cepillado suave.

El filtro del *blower* debe ser limpiado o cambiado una vez por año, de acuerdo a las recomendaciones de fábrica, para un mejor funcionamiento del equipo.

Se recomienda tener un grupo de respaldo para evitar la falta de aireación por problemas de deterioro o desperfecto del *blower* en uso. Igualmente, se recomienda contar con un grupo electrógeno para evitar la suspensión de la aireación por algún corte eléctrico ya que el sistema soporta menos de 2 horas antes de comenzar a desestabilizarse y/o perder la densidad de los organismos que conforman el biofloc por anoxia y falta de recirculación del agua (este periodo podría ser menor dependiendo de la carga del sistema).

### **c. Manejo de los Parámetros de Calidad de Agua**

Los sólidos particulados totales (sólidos suspendidos y sedimentables) en el bioreactor lo constituyen principalmente el alimento, heces, biofloc y detritus. Estos son acumulados en el tanque producto de la alimentación, excreción y crecimiento de las tilapias.

Por ello se debe realizar el control y monitoreo del mismo mediante el uso de un cono Imhoff, el cual registra el nivel de sólidos suspendidos en  $\text{ml.L}^{-1}$  y cuyo valor no debe sobrepasar los  $50 \text{ ml.L}^{-1}$  para la tilapia (Hargreaves 2013).

Para la medición de los sólidos particulados totales, puede emplearse un turbidímetro. Así mismo, para la determinación de la transparencia, esta puede realizarse con un disco Secchi. Estos 2 parámetros pueden proporcionarnos información acerca del crecimiento de la población que conforma el biofloc y el aumento de su densidad.

La luz incidente en el bioreactor permite a las microalgas y otros organismos su crecimiento mediante la fotosíntesis. El control de una sobre-densidad de estas, se realiza mediante el monitoreo de la luz expresada en Klux mediante el uso de un luxómetro.

La temperatura debe mantenerse entre  $26 - 29^{\circ}\text{C}$  como rango determinado para el desarrollo de la fase experimental de la tesis. Para mantener los valores dentro del rango, debe ajustarse el termostato de los calentadores y controlar la temperatura ambiental (se explica posteriormente).

La aireación debe mantenerse constante y con suficiente turbulencia para mantener los niveles de oxígeno disuelto entre  $6 \text{ a } 8 \text{ mg.L}^{-1}$  y a su vez evitar la sedimentación del biofloc.

La alcalinidad debe ser monitoreada diariamente para evitar que los niveles bajen de los 75 mg CaCO<sub>3</sub> en el cual comienza a formarse una excesiva cantidad de espuma blanca en la parte superior conocida como *Foaming*. Esta debe ser incrementada mediante la adición de bicarbonato de sodio empleando el Cuadro 4, el cual está en función al incremento de alcalinidad y al volumen de agua del bioreactor. (Loyless y Malone 1997)

El pH deberá mantenerse entre un rango de 6.80 a 8.00 como máximo para mantener la estabilidad del bioreactor. La alcalinidad, al reforzar la capacidad buffer del agua, permite que la fluctuación del pH en el día no sea significativa.

Para el monitoreo de los compuestos nitrogenados (NAT, nitratos y nitritos), éstos deberán ser determinados máximo interdiariamente debido a la dinámica que presentan en el sistema con tecnología biofloc. El nitrito deberá registrarse solo en las primeras semanas después de instalado el bioreactor. Después de ello, deberá desaparecer o llegar a niveles mínimos cercanos a cero ya que todo es transformado finalmente en nitratos. Parte del NAT que no pasa a nitritos es mineralizado directamente y convertido en proteína microbiana. Este parámetro es el más importante para establecer una correcta relación carbono – nitrógeno en el agua del bioreactor por lo cual, su medición debe ser diaria después de 2 horas de haber suministrado el alimento balanceado en el bioreactor.

Para evitar interferencias en la medición de los compuestos nitrogenados, la muestra de agua deberá ser filtrada previamente con una malla fina de 700 micras seguida de papel filtro marca *Whatman qualitative* de 90 mm de diámetro.

#### **d. Manejo de las Condiciones Ambientales**

El invernadero del CINPIS en donde se encuentra el bioreactor de biofloc mantiene la temperatura dentro de él, permitiendo que la temperatura del agua se mantenga en un rango estable. Sin embargo, en algunos periodos del día, la temperatura del aire interno puede subir demasiado originando un incremento de la temperatura del agua fuera de los rangos de manejo. Debido a ello, las temperaturas máximas y mínimas del aire deben ser registradas diariamente.

Cuando la temperatura del aire sobrepasa los 30°C las ventanas del invernadero deben abrirse para permitir la circulación de aire fresco. Durante los meses de frío, mantener las puertas y ventanas cerradas del ambiente para evitar fuga de aire caliente.

**e. Manejo de la Relación Carbono/Nitrógeno**

La estabilización del bioreactor de biofloc depende tanto del manejo del cultivo de los peces (o crustáceos) como del control y manejo de la comunidad de organismos heterotróficos. Un punto importante para ello, es el control del nitrógeno inorgánico tóxico mediante el ajuste de la relación C/N para lograr su conversión y mineralización en proteína microbiana. El rango óptimo de Carbono/Nitrógeno para la producción de biofloc, y que puedan ser toleradas por la tilapia, es de 10:1 hasta 20:1.

Para mantener una tasa de 10:1, la cual fue utilizada en la presente tesis, se debe realizar las siguientes actividades:

- Medir el NAT (Nitrógeno Amoniacal Total), 2 horas después de haber suministrado alimento, ya que según Lopez y Cruz (2011), es el tiempo o periodo postprandial después del cual se realiza la mayor producción de amonio producto de la digestión total del alimento consumido para tilapia.
- El NAT medido, expresado en  $\text{mg.L}^{-1}$ , multiplicarlo por el volumen total del tanque en litros.
- Multiplicar el valor por su factor de conversión para transformarlo en gramos.
- Conociendo que la tasa a emplear es de 10:1, multiplicar la cantidad de NAT en gramos por 10.
- Conociendo que la melaza empleada en la presente tesis presentó un porcentaje de 53% de carbono orgánico, dividir el valor del punto “d” entre 0.53.

Por último la fórmula que permite hacer un cálculo directo sería:

$$\text{Cantidad de melaza} = \frac{\text{NAT} \times 1000 \times V \times \text{C/N}}{\% \text{ C}}$$

Dónde:

NAT: Es la concentración de Nitrógeno Amoniacal Total en el agua del bioreactor expresado en miligramos por litro.

1000: Es el factor de conversión de miligramos a gramos.

V: Es el volumen de agua del bioreactor expresado en litros. Para el experimento fue 1500 L.

C/N: Es la relación de carbono-nitrógeno a utilizar. Para el experimento fue de 10.

%C: Es el porcentaje de carbono presente en un gramo de melaza. Para el experimento fue del 53 por ciento.

La melaza se irá añadiendo al bioreactor hasta alcanzar una concentración de sólidos sedimentables de  $50 \text{ ml.L}^{-1}$  medidos con el cono Imhoff. Cuando los valores de sólidos superan los  $50 \text{ ml.L}^{-1}$ , la adición de melaza deberá ser suspendida hasta que retorne nuevamente al valor deseado.

## V. CONCLUSIONES

- La correcta estabilización de un bioreactor con BFT se obtiene manejando el sistema en 2 etapas diferenciadas por la predominancia de un tipo de organismos en cada una: Etapa I (autotrófica) y la Etapa II (heterotrófica).
- En el bioreactor evaluado, la dinámica del nitrógeno inorgánico estuvo regida por tres procesos diferenciados: La nitrificación, asimilación algal y la asimilación por bacterias heterotróficas.
- Las variables físicas, en relación a los compuestos nitrogenados, que influyeron en la estabilidad del bioreactor con BFT evaluado, fueron: La transparencia, turbidez, nivel de sólidos sedimentables, la temperatura y la intensidad de luz.
- Las variables químicas, en relación a los compuestos nitrogenados, que influyeron en la estabilidad del bioreactor con BFT evaluado, fueron: La alcalinidad, el OD y el pH.
- Los resultados de la evaluación del bioreactor con BFT permitieron establecer un protocolo de puesta en marcha y mantenimiento según las condiciones específicas de calidad de agua que presenta el CINPIS (Centro de Investigación Piscícola).
- El valor mínimo para mantener estables los procesos metabólicos heterotróficos en el sistema fue de 75 mg.  $\text{CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ .
- La acumulación de calcio y magnesio en el bioreactor con BFT evaluado, permitieron un mejor manejo y control de los sólidos sedimentables.

## VI. RECOMENDACIONES

Se recomienda mantener un control diario de la alcalinidad en aguas cuyas reservas son muy bajas, debido a que niveles por debajo a los 75 mg de  $\text{CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$  comienzan a aparecer problemas en el sistema como lo son el *bulking* filamentoso y el *foaming*.

Se recomienda mantener un control diario de los niveles de NAT, N-NO<sub>2</sub>, N-NO<sub>3</sub> y N-NH<sub>3</sub> debido a su dinamismo en el agua, a fin de mantener los metabolitos tóxicos siempre por debajo de los límites tolerables para la producción de alevinos machos de tilapia.

Replicar el experimento en aguas con capacidad buffer (altas reservas de alcalinidad) para determinar la relación de los principales compuestos nitrogenados con los parámetros físicos y químicos del agua en contraste al sistema desarrollado en aguas con bajas reservas de alcalinidad.

El periodo de evaluación presentó datos entre las épocas de primavera y verano en donde se presentó una intensidad lumínica significativa por lo que se recomienda evaluar un bioreactor con BFT en el periodo de invierno (poca intensidad lumínica) para ver si existe o no un cambio en la dinámica del nitrógeno y la relación de este con otros parámetros físicos y químicos, con el cambio de estación.



## VII. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

ALICORP. 2002. Producción de Alimentos Acuícolas. Workshop Internacional de Tilapia, cultivo y comercialización. San Martín, PE.

ALLAN, G; MAGUIRE, G. 1992. Effects of stocking density on production of *Penaeus monodon*: Fabricius in model farming ponds. *Aquaculture*. 107: 49 – 66.

ALLEN, A; HOWARD-JONES, M; BOOTH, M; FRISCHER, M; VERITY, P; BRONK, D; SANDERSON, M. 2002. Importance of heterotrophic bacterial assimilation of ammonium and nitrate in the Barents Sea during summer. *Journal of Marine Systems*. 38: 93-108.

ANDRADE, L; BARBOZA, R; BECKER, A; ROSSATO, L; DA ROCHA, J. 2007. Interaction of water alkalinity and stocking density on survival and growth of Silver catfish, *Rhamdia quelen*, juveniles. *Journal of the World Aquaculture Society*. 38(3): 454-458.

APHA. 1998. Standard methods for the examination of the water and wastewater. 22 ed. American Public Health Association, Washington, EU.

ARABI, S; NAKHLA, G. 2009. Impact of cation concentration on fouling in membrane bioreactors. *Journal of Membrane Science*. 343: 110-118.

ARELLANO, R. 2005. Evaluación de la proliferación de *bulking* en sistemas de tratamiento de lodos activos. Universidad del Bio-Bio. 124 p.

ARIDE, P; ROUBACH, R; VAL, A. 2007. Tolerance response of Tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier) to water pH. *Aquaculture Research*. 38(6): 588-594.

ASADUZZAMAN, M; WAHAB, M; VERDEGEM, M; HUQUE, S. 2008. C/N ratio control and substrate addition for periphyton development jointly enhance freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* production in ponds. *Aquaculture*. 280: 117-123.

ASADUZZAMAN, M; WAHAB, M; VERDEGEM, M; BENERJEE, S; AKTER, T; HASAN, N; AZIM, M. 2009. Effects of addition of tilapia *Oreochromis niloticus* and substrates for periphyton developments o pond ecology and production in C/N controlled freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* farming systems. *Aquaculture*. 287: 371-380.

ASADUZZAMAN, M; RAHMAN, M; AZIM, M; ISLAM, M; WAHAB, M; VERDEGEM, M; VERRETH, J. 2010. Effect of C/N ratio and substrate addition on natural food communities in freshwater prawn monoculture ponds. *Aquaculture*. 206: 127-136.

ASTILAPIA (Asociación Sinaloense de Productores de Tilapia, A. C.). 2009. Curso – Taller: Cultivo de tilapia (*Oreochromis spp.*) a alta densidad en módulos flotantes, con énfasis en buenas prácticas de producción acuícola para la inocuidad alimentaria y para la generación de un producto de calidad suprema. Sinaloa, MX. 98 p.

AVNIMELECH, Y; TROEGER, W; REED, L. 1982. Mutual flocculation of algae and clay: Evidence and implications. *Science*. 216: 63-65.

AVNIMELECH, Y; WEBER, B; HEPHER, B; MILSTEIN, A; ZORN, M. 1986. Studies in circulated fish ponds: Organic matter recycling and nitrogen transformation. *Aquaculture and Fishing Management*. 17: 231-242.

AVNIMELECH, Y; MOKADY, S. 1988. Protein biosynthesis in circulated ponds. In: Pullin R.; Bhukaswan, T.; Tonguthai, K.; Maclean, J., editors. *Proceedings of Second International Symposium on Tilapia in Aquaculture*, Department of Fisheries of Thailand and ICLARM, Manila, Philippines, 301-309 pp.

AVNIMELECH, Y; MOKADY, S; SCHROEDER, G. 1989. Circulated ponds as efficient bioreactors for single-cell protein production. *Israel Journal of Aquaculture Bamidgeh*. 41: 58-66.

AVNIMELECH, Y; DIAB, S; KOCHVA, M; MOKADY, S. 1992. Control and utilization of inorganic nitrogen in intensive fish culture ponds. *Aquaculture and Fisheries Management*. 23: 421-430.

AVNIMELECH, Y. 1993. Control of microbial activity in aquaculture systems: Active suspension ponds. *World of Aquaculture*. 34: 19-21.

AVNIMELECH, Y; KOCHVA, M; DIAB, S. 1994. Development of controlled intensive aquaculture systems with a limited water exchange and adjusted C to N ratio. *Israel Journal of Aquaculture*. 46: 119-131.

AVNIMELECH, Y.; MOZES, N; DIAB, S; KOCHBA, M. 1995. Rates of Organic carbon and nitrogen degradation in intensive fish ponds. *Aquaculture*. 134: 211-216.

AVNIMELECH, Y. 1999. Carbon/Nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture*. 176: 227-235.

AVNIMELECH, Y; RITVO, G. 2003. Shrimp and fish pond soils: Processes and management. *Aquaculture*. 220: 549-567.

AVNIMELECH, Y. 2005. Tilapia harvest microbial flocs in active suspension research pond. *Global Aquaculture Advocate*.

AVNIMELECH, Y. 2006. Bio-filters: The need for a new comprehensive approach. *Aquacultural Engineering*. 34: 172 – 178.

AVNIMELECH, Y. 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. *Aquaculture*. 264: 140-147.

AVNIMELECH, Y; VERDEGEM, M; KURUP, M; KESHAVANATH, P. 2008. Sustainable land-based aquaculture: Rational utilization of water, land and feed resources. *Mediterranean Aquaculture Journal*. 1(1): 45-55.

AVNIMELECH, Y; KOVCHA, M. 2009. Evaluation of Nitrogen uptake and excretion by tilapia in biofloc tanks, using <sup>15</sup>N tracing. *Aquaculture*. 287: 163-168.

AVNIMELECH, Y. 2011a. Tilapia Production Using Biofloc Technology (BFT). Better Science, Better fish, better live: Proceedings of the ninth international symposium on tilapia in aquaculture. Section VI. Pg 362.

AVNIMELECH, Y. 2011b. BioFloc Technology (BFT): A brief summary. Better Science, Better fish, better live: Proceedings of the ninth international symposium on tilapia in aquaculture. Section VI. Pg 359.

AVNIMELECH, Y. 2012. Biofloc Technology. A Practical Guide Book.2 ed. Louisiana. US. The World Aquaculture Society. 272 p.

AZIM, M; MILSTEIN, A; WAHAB, M; VERDEGEM, M. 2003a. Periphyton-water quality relationships in fertilized fishponds with artificial substrates. *Aquaculture*. 228: 169-187.

AZIM, M; VERDEGEM, M; MANTINGH, I; VAN DAM, A; BEVERIDGE, M. 2003b. Ingestion and utilization of periphyton grown on artificial substrates by Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture Research*. 34: 85-92.

AZIM, M; LITTLE, D. 2008. The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: Water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*. 283: 29-35.

AZIM, M; LITTLE, D; BRON, J. 2008. Microbial protein production in activated suspension tanks manipulating C:N ratio in feed and the implications for fish culture. *Bioresource Technology*. 99: 3590-3599.

BALTAZAR, P; PALOMINO, A. 2004. Manual de Cultivo de Tilapia. FONDEPES (Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero). 112 p.

BALOI, M; ARANTES, R; SCHVEITZER, R; MAGNOTTI, C; VINATEA, L. 2013. Performance of Pacific White shrimp *Litopenaeus vannamei* raised in biofloc systems with varying level of light exposure. *Aquacultural Engineering*. 52: 39-44.

BARAK, Y; CYTRYN, E; GELFAND, I; KROM, M; VAN RIJIN, J. 2003. Phosphorus removal in a marine prototype, recirculating aquaculture system. *Aquaculture*. 220: 313-326.

BARRERA, R; PAZ, C. 2006. Control de alevinos de tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Perciforme: Cichlidae) usando guapote lagunero (*Parachromis dovii*) (Perciforme: Cichlidae) en los estanques de la Universidad Earth. Tesis Ingeniero. Guácimo, CR. Universidad Earth.

BENLI, A; KÖKSAL, G. (2005). The acute toxicity of ammonia on tilapia (*Oreochromis niloticus*) larvae and fingerlings. *Turk Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 29: 339-344.

BORROVICH, E. 2010. Efecto de la Temperatura y aireación constante sobre el crecimiento y la sobrevivencia de alevines de *Oreochromis niloticus* (Tilapia gris) y *Oreochromis spp.* (Tilapia roja) durante la inversión sexual. Tesis Ing. Lima, PE. Universidad Nacional Agraria La Molina. 79 p.

BOYD, C. 1998. Pond water aeration systems. *Aquacultural Engineering*. 18: 9-40.

BOYD, C. 2000. *Water Quality: An Introduction*. 1 ed. Norwell, EU. Kluwer Academic Publishers. 330 p.

BOYD, C. 2003. Guidelines for aquaculture effluent management at the farm-level. *Aquaculture*. 226: 101-112.

BROWDY, C; BRATVOLD, D; STOKES, A; MCINTOSH, R. 2001. Perspectives on the application of closed shrimp culture systems. The World Aquaculture Society. Louisiana, EU.

BRUNE, D; SCHWARTZ, G; EVERSOLE, A; COLLIER, J; SCHWEDLER, T. 2003. Intensification of pond aquaculture and high rate photosynthetic systems. *Aquacultural Engineering*. 28:65-86.

BURFORD, M; THOMPSON, P; MCINTOSH, R; BAUMAN, R; PEARSON, D. 2003. Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize. *Aquaculture*. 219: 393-411.

BURFORD, M; LORENZEN, K. 2004. Modeling nitrogen dynamics in intensive shrimp ponds: The role of sediments remineralization. *Aquaculture*. 229(1-4): 129-145.

BURFORD, M; THOMPSON, P; MCINTOSH, R; BAUMAN, R; PEARSON, D. 2004. The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity zero-exchange system. *Aquaculture*. 232: 527-537.

CANO, C. 2005. Evaluación limnológica de la laguna de La Molina durante las estaciones verano - otoño (2003). Tesis Ing. Lima, PE. Universidad Nacional Agraria La Molina. 134 p.

CANTOR, F. 2007. Manual de Producción de Tilapia. Puebla, CO. 135 p.

CARBÓ, R; CELADES, J. 2012. Ensayos preliminares de engorde de Tenca (*Tinca tinca*) con Tecnología de Biofloc. IRTA (Investigación y Tecnología Agroalimentaria).

CASTILLO-SORIANO, F; IBARRA-JUNQUERA, V; ESCALANTE-MINAKATA, P; MENDOZA-CANO, O; ORNELAS-PAZ, J; ALMANZA-RAMIREZ, J; MEYER-WILLEVER, A. 2013. Nitrogen dynamics model in zero water Exchange, low salinity intensive ponds of White shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at Colina, Mexico. *Latin American Journal Aquaculture Research*. 41(1): 68-79.

CAVALCANTE, D; DO CARMO, M. 2010. Efeito da fotossíntese na alcalinidade da água de cultivo da tilapia do Nilo. *Revista Ciência Agronômica*, 41(1): 67-72.

CEDANO-CASTRO, M; LUJAN-BULNES, A; SUÁREZ-MARIN, H. 2013. Crianza de *Oreochromis niloticus* Var Chitralada en sistema bio-floc en la Empresa PRODUMAR SA, Guayaquil (Ecuador). REBIOLEST (Revista Científica de Estudiantes). 1(2): e79.

CEPIS (Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria). 2000. Contaminación del Agua. Eutrofización de lagos cálidos tropicales. Ambiente Ecológico. 25 p.

CHAMBERLAIN, G; AVNIMELECH, Y; MCINTOSH, R; VELASCO, M. 2001. Advantages of Aerated Microbial Reuse Systems with balanced C:N. I: Nutrient transformation and water quality benefits. Global Aquaculture Alliance.

CHUANG, H; OHASHI, A; IMACHI, H; TANDUKAR, M; HARADA, H. 2007. Effective partial nitrification to nitrite by down-flow hanging sponge reactor under limited oxygen conditions. Water Research. 41: 295-302.

COHEN, J; SAMOCHA, T; FOX, J; GANDY, R; LAWRENCE, A. 2005. Characterization of water quality factors during intensive raceway production of juvenile *Litopenaeus vannamei* using limited discharge and biosecure management tools. Aquacultural Engineering. 32:425-442.

CRAB, R; AVNIMELECH, Y; DEFOIRDT, T; BOSSIER, P; VERSTRAETE, W. 2007. Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. Aquaculture. 270: 1-14.

CRAB, R; KOCHVA, M; VERSTRAETE, W; AVNIMELECH, Y. 2009. Bio-flocs technology application in over-wintering of Tilapia. Aquacultural Engineering. 40 (3): 105–112.

CRAB, R. 2010a. Bioflocs Technology: An integrated system for the removal of nutrients and simultaneous production of feed in aquaculture. PhD Thesis. Ghent, BE. Ghent University. 178 p.

CRAB, R; CHIELENS, B; WILLE, M; BOSSIER, P; VERSTRAETE, W. 2010b. The effect of different carbon sources on the nutritional value of bioflocs, a feed for *Macrobrachium rosenbergii* postlarvae. *Aquaculture Research*. 41: 559-567.

CRAB, R; DEFOIRDT, T; BOSSIER, P; VERSTRAETE, W. 2012. Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges. *Aquaculture*. 356: 351-356.

CURTIN, L. 1993. Molasses – General considerations: Molasses in Animal Nutrition. National Feed Ingredients Association. West Des Moines, EU.

DE SCHRYVER, P; CRAB, R; DEFOIRDT, T; BOON, N; VERSTRAETE, W. 2008. The basics of bio-flocs technology: The added value for aquaculture. *Aquaculture*. 277: 125-137.

DE SCHRYVER; VERSTRAETE, W. 2009. Nitrogen removal from aquaculture pond water by heterotrophic nitrogen assimilation in lab-scale sequencing batch reactors. *Bioresource Technology*. 100: 1162-1167

DEMPSTER, P; BAIRD, D; DEVERIDGE, M. 1995. Can fish survive by filter-feeding on microparticles? Energy balance in tilapia grazing on algal suspension. *Journal of Fish Biology*. 47: 7-17.

EBELING, J; TIMMONS, M; BISOGNI, J. 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*. 257: 346-358.

EGNA, H; BOYD, C. 1997. Dinámica de los estanques en Acuicultura. (En línea). Consultado 31 May 2014. Disponible en: [http://www.produccionanimal.com.ar/produccion\\_peces/piscicultura/05-acuicultura\\_sagpya.pdf](http://www.produccionanimal.com.ar/produccion_peces/piscicultura/05-acuicultura_sagpya.pdf).

EKASARI, J; CRAB, R; VERSTRAETE, W. 2010. Primary Nutritional Content of Bio-Flocs Cultured with Different Organic Carbon Sources and Salinity. *HAYATI Journal of Biosciences*. 17(3): 125-130.

EL-SAYED, AF. 2006. *Tilapia Culture*. 1 ed. London, UK. CABI Publishing. 278 p.



EMERENCIANO, M; BALLESTER, E; CAVALLI, R; WASIELESKY, W. 2011. Effect of Biofloc technology (BFT) on the early postlarval stage of pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis*: Growth performance, floc composition and salinity stress tolerance. *Aquaculture International*. 19: 891-901.

EMERENCIANO, M; BALLESTER, E; CAVALLI, R; WASIELESKY, W. 2012a. Biofloc Technology application as a food source in a limited water exchange nursery system for pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) *Aquaculture Research*. 43: 447-457.

EMERENCIANO, M; CUZON, G; PAREDES, A; GAXIOLA, G. 2012b. Biofloc technology applied to intensive broodstock of pink shrimp *Farfantepenaeus duorarum* (Part I): Growth out, water quality, microorganisms profile and proximate analysis of biofloc. *Aquaculture Research* (submitted).

EMERENCIANO, M; GAXIOLA, G; CUZON, G. 2013. Biofloc Technology: A review for aquaculture Application and Animal Food Industry. Chapter 12. InTech.

FAJARDO, E; SARMIENTO, S. 2007. Evaluación de Melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis Microbiólogo Industrial. Bogotá, CO. Pontificia Universidad Javeriana.

GOLDMAN, J; CARON, D; DENNETT, M. 1987. Regulation of gross growth efficiency and ammonium regeneration in bacteria by substrate C:N ratio. *Limnology and Oceanography*. 32 (6): 1239-1252.

GONZALES, R. 2004. Evaluación de la calidad de agua y su influencia en el cultivo de la tilapia. (En línea). Consultado 31 May 2014. Disponible en: <http://www.vet-uy.com/articulos/piscicultura/050/020/pec020.htm>

GREEN, B. 2010. Effect of Channel Catfish stocking rate on yield and water quality in an intensive, mixed Suspended-Growth production system. *North American Journal of Aquaculture*. 106: 72-97.

GROSS, A; BOYD, C; WOOD, W. 2000. Nitrogen Transformations and balance in Channel catfish ponds. *Aquaculture Engineering*. 24: 1-14.

GUJER, W; JENKINS, D. 1974. A nitrification model for contact stabilization activated sludge process. *Water Research* 9(5): 5-6.

HARGREAVES, J. 2004. Managing Ammonia in Fish Ponds. SRAC (Southern Regional Aquaculture Center).N°4503.

HARGREAVES, J. 2006. Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. *Aquacultural Engineering*. 34: 344-363.

HARGREAVES, J. 2013. Biofloc Production Systems for Aquaculture. Southern Regional Aquaculture Center (SRAC). No 4503.

HARI, B; KURUP, B; VARGHESE, J; SHRAMA, J; VERDEGEM, M. 2004. Effects of carbohydrate addition on production in extensive shrimp culture systems. *Aquaculture*. 241: 179-194.

HASLUN, J; CORREIA, E; STRYCHAR, K; MORRIS, T; SAMOCHA, T. 2012. Characterization of Bioflocs in a No Water Exchange Super-Intensive System for the production of food size Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *International Journal of Aquaculture*. 2(6): 29-39.

HENZE, M; HARREMOES, P; ARVIN, E; COUR JANSEN, J. 1996. Waste water Treatment. Lyngby, Springer Verlag. New York, EU.

JIMÉNEZ-MONTEALEGRE, R; VERDEGEM, M; ZAMORA, J; VERRETH, J. 2002. Organic matter sedimentation and resuspension in tilapia (*Oreochromis niloticus*) ponds during a production cycle. *Aquacultural Engineering*. 26: 1-12.

KUBITZA, F. 2011. Cultivo de Tilapias en sistema de “Bioflocos”, sin renovación de agua. *Panorama da Acuicultura*.

KUNH, D; BOARDMAN, G; LAWRENCE, A; MARSH, L; FLICK, G. 2009. Microbial floc meal as a replacement ingredient for fish meal and soybean protein in shrimp feed. *Aquaculture*. 296: 51-57.

KUHN, D; LAWRENCE, A; BOARDMAN, G; PATNAIK, S; MARSH, L; FLICK, G. 2010. Evaluation of two types of biofloc derived from biological treatment of fish effluent as feed ingredients for pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 303: 28-33.

KUNH, D. 2012. Biofloc Technology options for Aquaculture: In-situ, Ex-situ Systems improve Water Quality, Provide Nutrition. Global Aquaculture Alliance.

LARRIVIERE, B; KUBA, R; GUADARMINO, P. 2002. Estudio de Prefactibilidad para la instalación de un centro de producción de alevinos revertidos de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*). Tesis Ing. Lima, PE. Universidad Nacional Agraria La Molina. 276 p.

LEKANG, OI. 2007. *Aquaculture Engineering*. 1 ed. Oxford, EU. Blackwell Publishing. 340 p.

LIÑAN, W. 2007. *Crianza de Tilapia*. 1 ed. Lima, PE. MACRO. 110 p. (Colección de Acuicultura).

LING, J; CHEN, 2005. Impact of organic carbon on nitrification performance of different biofilters. *Aquacultural Engineering*. 33: 150-162.

LOPEZ, B; CRUZ, L. 2011. Elaboración de una probiótico a base de microorganismos nativos y evaluación de su efecto benéfico al proceso digestivo de la Tilapia Roja (*Oreochromis spp.*) en etapa de engorde en la zona de Santo Domingo. Tesis Ing. Santo Domingo, EC. Escuela Politécnica del Ejército. 95 p.

LOSORDO, T. 1997. *Tilapia culture in intensive recirculating systems*. *Aquaculture Society*. 1 vol. Louisiana, EU. 185-211 pag.

LOYLESS, C; MALONE, R. 1997. A Sodium Bicarbonate Dosing Methodology for pH Management in Freshwater-Recirculating Aquaculture Systems, *The Progressive Fish-Culturist*. 59 (3): 198-205.

LUCHINI, L. 2006. Tilapia: Su cultivo y sistemas de producción. (En línea). Consultado 13 Mar. 2013. Disponible en: <http://www.minagri.gob.ar/SAGPyA/pesca/acuicultura.html>.

LUO, G; AVNIMELECH, Y; PAN, YF; TAN, HX. 2012. Inorganic nitrogen dynamics in sequencing Batch reactors using biofloc technology to treat aquaculture sludge. *Aquacultural Engineering*. 52:73-79.

LUO, G; LIANG, W; TAN, H; YAO, C; ZHANG, N; LU, L. 2013. Effects of calcium and magnesium addition on the start-up of sequencing batch reactor using biofloc technology treating solid aquaculture waste. *Aquacultural Engineering*. 57: 32-37.

LUO, G; GAO, Q; WANG, C; LIU, W; SUN, D; LI, L; TAN, H. 2014. Growth, digestive activity, welfare, and partial cost-effectiveness of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in a recirculating aquaculture system and an indoor biofloc system. *Aquaculture*. 422-423: 1-7.

MANJU, N; DEEPESH, V; ACHUTHAN, C; ROSAMMA, P; SINGH, I. 2009. Immobilization of nitrifying bacterial consortia on wood particles for bioaugmenting nitrification in shrimp culture systems. *Aquaculture*. 294: 65-75.

MASSER, M; RACKOCY, J; LOSORDO, T. 1999. Recirculating Aquaculture Tank Production Systems: Management of Recirculating Systems. SRAC (Southern Regional Aquaculture Center).452: 12.

MCINTOSH, D; SAMOCHA, T; JONES, E; LAWRENCE, A; MCKEE, D; HOROWITZ, S; HOROWITZ, A. 2000. The effect of a commercial bacterial supplement on the high-density culturing of *Litopenaeus vannamei* with a low-protein diet in an outdoor tank system and no water Exchange. *Aquacultural Engineering*. 21: 215-227.

MEGAHED, M. 2010. The effect of microbial biofloc on water quality, survival and growth of the green tiger shrimp (*Penaeus semisulcatus*) fed with different crude protein levels. Journal of The Arabian Aquaculture Society. 5(2).

MEYER, D; DE MEYER, S. 2003. Acuicultura: Manual de Practicas. III Reproducción de Peces. (En línea). Consultado 16 mar. 2013. Disponible en: <http://www.acuicultura.org/development/manuales/acua/acuicultura.html>.

MEYER, D. 2004. Introducción a la Acuicultura. EAP Zamorano, HO. 159 p.

MICHAUD, L; BLANCHETON, J; BRUNI, V; PIEDRAHITA, R. 2006. Effect of particulate organic carbon on heterotrophic bacterial populations and nitrification efficiency in biological filters. Aquacultural Engineering. 34: 224-233.

MIKKELSEN, L; GOTFREDSEN, A; AGERBAEK, M; NIELSEN, P; KEIDING, K. 1996. Effects of colloidal stability on clarification and dewatering of activated sludge. Water Science Technology. 34(3-4): 660-669.

MILSTEIN, A; AVNIMELECH, Y; ZORAN, M; JOSEPH, D. 2001. Growth performance of hybrid bass and hybrid tilapia in conventional and active suspension intensive ponds. Bamigeh. 53: 147-157.

MILSTEIN, A; PERETZ, Y; HARPAZ, S. 2009. Culture of organic tilapia to market size in periphyton-based ponds with reduced feed inputs. Aquaculture Research. 40: 55-59.

MOSS, S; PRUDER, G; SAMOCHA, T. 1999. Environmental management and control: Controlled ecosystem and biosecure shrimp grow-out system. World Aquaculture Society. Sydney AU.87-91 pp.

NEAL, R; COYDE, S; TIDWELL, J. 2010. Evaluation of stocking density and Light level on the growth and survival of the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, reared in Zero-Exchange Systems. Journal of the World Aquaculture Society. 41(4).

NOOTONG, K; PAVASANT, B; POWTONGSOOK, S. 2011. Effects of Organic Carbon addition in controlling inorganic nitrogen concentrations in a Biofloc System. *Journal of World Aquaculture Society*. 42(3): 339-346.

OCHIENG, E; MUSA, S; MULANDA, C; ABWAO, J; MBONGE, J. 2014. An appraisal of the Feasibility of Tilapia production in ponds using biofloc technology: A review. *International Journal of Aquatic Science*. 5(1): 21-39.

OLVERA-OLVERA, C; OLVERA-GONZALES, J; MENDOZA-JASSO, J; PENICHE-VERA, R; CASTAÑEDA-MIRANDA, R; HERRERA-RUIZ, G. 2009. Feed dosage and ammonium control device based on C/N ratio for a zero-discharge system. *International Journal of Agriculture & Biology*. 11 (2): 173-177.

OGELO, E; MUSA, S; AURA, C; ABWAO, J; MUNGUTI, M. 2014. An appraisal of the feasibility of tilapia production in ponds using biofloc technology: A review. *International Journal of Aquatic Science*. 5(1): 21-39.

ORDUZ, S; CONSTANZA, E. 2009. Análisis de las Características físico-químicas de aguas y suelos de cultivos acuícolas intensivos y súper intensivos. 1ed. Bogotá, CO. 80 p.

PALACHECK, R; TOMASSO, J. 1984. Toxicity of nitrite to channel catfish (*Ictalurus punctatus*), tilapia (*Tilapia aurea*), and largemouth bass (*Micropterus salmoides*): Evidence for a nitrite exclusion mechanism. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 41(12): 1739-1744.

PANJAITAN, P. 2004. Field and laboratory study of *Penaeus monodon* culture with zero water Exchange and limited water Exchange model using molasses as a carbon source. Thesis Ph. D. Darwin, AU. Charles Darwin University.

PÉREZ-FUENTES, J; PÉREZ-ROSTRO, C; HERNÁNDEZ-VERGARA, M. 2013. Pond-reared Malaysian prawn *Macrobrachium rosenbergii* with the biofloc system. *Aquaculture*. 400-401: 105-110.

PHAN-VAN, M; ROUSSEAU, D; DE PAUW, N. 2008. Effects of fish bioturbation on the vertical distribution on the vertical distribution of water temperature and dissolved oxygen in a fish culture-integrated wasted estabilization pond system in Vietnam. *Aquaculture*. 281: 28-33.

PIEDRAHITA, R. 2003. Reducing the potencial environmental impact of tank aquaculture effluents through intensification and recirculation. *Aquaculture*. 226: 35-44.

POLEO, G; ARANBARRIO, J; MENDOZA, L; ROMERO, O. 2011. Cultivo de Cachama Blanca en altas densidades y en dos sistemas cerrados. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 46 (4): 429-437.

POPMA, T; GREEN, B. 1990. Sex reversal of Tilapia in earthen ponds. Research and Development Series No. 35. International Center for Aquaculture, Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, EU.

PORTZ, D; WOODLEY, C; CECH, J. 2006. Stress-associated impacts of short-term holding on fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 16(2): 125-170.

PRODUCE (Ministerio de la Producción). 2012. Cosecha de recursos hidrobiológicos de la actividad de acuicultura según ámbito y especie (TM) – Anual (Estadísticas). (En línea). Consultado 26 Jun. 2014. Disponible en:  
<http://www.produce.gob.pe/index.php/estadistica/acuicultura>.

RAKOCY, J. 1989. Tank culture Tilapia. Southern Regional Aquaculture Center (SRAC).N°282.

RAKOCY, J; BAILEY, D; MARTIN, J; SHULTZ, R. 2000. Tilapia production systems for the Lesser Antiles and other resource-limited, tropical areas. In: International Symposium on tilapia in *Aquaculture*. 651-662 p.

RAKOCY, J; DANAHER, J; BAILEY, D; SHULTZ, C. 2011. Development of a Biofloc System for the Production of Tilapia. Better Science, Better fish, better live: Proceedings of the ninth international symposium on tilapia in aquaculture. Section VI. Pg 362.

RAY, A; SEABORN, G; LEFFER, J; WILDE, S; LAWSON, A; BROWDY, C. 2010a. Characterization of Microbial communities in minimal-exchange, intensive aquaculture systems and the effects of suspended solids management. *Aquaculture*. 310: 130-138.

RAY, A; LEWIS, B; BROWDY, C; LEFFLER, J. 2010b. Suspended solids removal to improve shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and an evaluation of a plan-based feed in minimal-exchange, superintensive culture systems. *Aquaculture*. 299: 89-98.

RAY, A; DILTON, K; LOTZ, J. 2011. Water quality dynamics and shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production in intensive. Mesohaline culture systems with two levels of Biofloc management. *Aquacultural Engineering*. 45: 127-136.

READ, P; FERNANDES, T. 2003. Management of environmental impacts of marine aquaculture in Europe. *Aquaculture*. 226: 139-163.

REYES, A. 2009. Análisis y control del abultamiento filamentoso en una planta de tratamiento de efluentes. Tesis ingeniero químico. Veracruz, MX. Universidad Veracruzana. 72 p.

RIOS, K. 2009. Dinâmica do nitrogênio e do fósforo no cultivo superintensivo dos camarões *Litopenaeus vannamei* e *Farfantepenaeus paulensis* sem renovação de água. Tese para obtenção do grau de mestre em Aqüicultura. Rio Grande, BR. Universidade Federal de Rio grande. 68 p.

ROLDAN, G. 1992. Fundamentos de Limnología Neotropical. 1 ed. Medellín, CO. Universidad de Antioquía. 529 p.

RUIZ, G; JAISON, D; CHAMY, R. 2003. Nitrification with high nitrite accumulation for the treatment of wastewater with high ammonia concentration. *Water Research*. 37: 1371-1377.

SAAVEDRA, M. 2006. Manejo del Cultivo de Tilapia. Managua, NI.



SAMOCHA, T; PATNAIK, S; SPEED, M; ALI, AM; BURGER, J; ALMEIDA, R; AYUB, Z; HARISANTEO, M; HOROWITZ, A; BROCK, D. 2007. Use of molasses as carbon source in limited discharge nursery and grow-out system for *Litopenaeus vannamei*. *Aquacultural Engineering*. 36: 184-191.

SASTRE, O; HERNÁNDEZ, G; CRUZ-CASALLAS, P. 2004. Influencia del peso corporal y de la temperatura del agua sobre el consumo de oxígeno de la Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 17:11-16.

SCHNEIDER, O; SERETI, V; EDING, E; VERRETH, J. 2005. Analysis of nutrient flows in integrated intensive aquaculture systems. *Aquacultural Engineering*. 32(3-4): 379-401.

SCHNEIDER, O; SERETI, V; EDING, E; VERRETH, J. 2006a. Molasses as C source for heterotrophic bacteria production on solid fish waste. *Aquaculture*. 261:1239-1248.

SCHNEIDER, O; SERETI, V; MACHIELS, M; EDING, E; VERRETH, J. 2006b. The potencial of producing heterotrophic bacteria biomass on aquaculture waste. *Water Research*. 40: 2684-2694.

SCHRADER, K; GREEN, B; PERSCHBACHER, P. 2011. Development of phytoplankton communities and common off-flavors in a biofloc technology system used for the culture of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquacultural Engineering*. 45:118-126.

SERFLING, S. 2006. Microbial Flocs: Natural Treatment Method Supports Fresh-Water, Marine Species in Recirculating Systems. *Global Aquaculture Alliance*.

SESUK, T; POWTONGSOOK, S; NOOTONG, K. 2009. Inorganic nitrogen control in a novel zero-exchanged aquaculture system integrated with airlift-submerged fibrous nitrifying biofilters. *Bioresource Technology*. 100: 2088-2094.

SHARMA, B; AHLERT, R. 1977. Nitrification and nitrogen removal. *Water Research*. 11: 897-925.

SHI, Y; WANG, X; YU, H; XIE, H; TENG, S; SUN, X; TIAN, B; WANG, S. 2011. Aerobic granulation for nitrogen removal via nitrite in a sequencing batch reactor and the emission of nitrous oxide. *Bioresource Technology*. 102: 2536-2541.

SOBECK, D; HIGGINS, M. 2002. Examination of three theories for mechanism of cation-induced bioflocculation. *Water Research*. 36: 527-538.

SPOTTE, S; ADAMS, G. 1983. Estimation of the allowable upper limit of ammonia in saline waters. *Marine Ecology Progress Series*. 10:207-210.

STICKNEY, R. 2005. *Aquaculture: An introductory text*. CABI Publishing. Cambridge, USA. p 256.

SUITA, S. 2009. O uso da dextrose como fonte de carbono no desenvolvimento de bioflocos e desempenho do camarão-branco (*Litopenaeus vannamei*) cultivado em sistema sem renovação de água. Tese de mestrado. Rio Grande do Sul, BR. Universidade Federal do Rio Grande.

TAW, N. 2010. *Biofloc Technology Expanding at White Shrimp Farms: Biofloc systems deliver high productivity with sustainability*. Global Aquaculture Alliance.

TEHICÚ, V. 2004. Exploración de posibilidades para proponer un tren de tratamiento para la remoción de dureza que logre la optimización técnica y económica del proceso. Tesis Ingeniería Química. Puebla, MX. Universidad de las Américas Puebla. 108 p.

TIMMONS, M; EBELING, J; WHEATON, F; SUMMERFELT, S; VINCI, B. 2002. *Recirculating Aquaculture Systems*, 2 ed. NRAC publication. Vol. 01-002.

TIMMONS, M; EBELING, J; PIEDRAHITA, R. 2009. *Acuicultura en Sistemas de Recirculación*. 1 ed. Limusa. EU.

TOLEDO-PÉREZ, S; GARCÍA-CAPOTE, M. 2000. Nutrición y alimentación de tilapia cultivada en América Latina y el Caribe. *Avances de Nutrición Acuícola IV*. p. 83-137.

VALBUENA, R; CRUZ, P. 2006. Efecto del peso corporal y temperatura del agua sobre el consumo de oxígeno de tilapia roja (*Oreochromis spp.*). REDALYC. 10 (1): 57-63.

VEGA-VILLASANTE, F; CORTÉS-LARA, M; ZÚÑIGA-MEDINA, L; JAIME-CEBALLOS, B; GALINDO-LOPEZ, J; BASTO-ROSALES, M; NOLASCO-SORIA, H. 2010. Cultivo de tilapia (*Oreochromis niloticus*) a pequeña escala ¿Alternativa alimentaria para familias rurales y periurbanas de México?. REDVET (Revista Electrónica de Veterinaria). 11 (3).

VINATEA, L; OLIVERA, A; VENERO, J; LEFFLER, J; BROWDY, C. 2009. Oxygen consumption of *Litopenaeus vannamei* juveniles in heterotrophic medium with zero water exchange. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 44 (5): 534-538

VINATEA, L; GÁLVEZ, A; BROWDY, C; STOKES, A; VENERO, J; HAVEMAN, J; LEWIS, B; LAWSON, A; SHULER, A; LEFFLER, J. 2010. Photosynthesis, water respiration and growth performance of *Litopenaeus vannamei* in a super-intensive raceway culture with zero Exchange: Interaction of water quality variables. Aquacultural Engineering. 42: 17-24.

WANG, W; WANG, A; ZHANG, YJ; LI, ZH; WANG, JX; SUN, RY. 2004. Effects of nitrite on lethal and immune response of *Machrobrachium nipponense*. Aquaculture 232: 679-686.

WIDANARNI; EKASARI, J; MARYAM, S. 2012. Evaluation of Biofloc Technology application on water quality and production performance of red tilapia *Oreochromis sp.* Cultured at different stocking densities. HAYATI Journal of Biosciences. 19 (2): 73-80.

XU, W; PAN, L. 2012. Effects of biofloc son growth performance, digestive enzyme activity and body composition of juvenile *Litopenaeus vannamei* in zero water exchange tanks manipulating C/N ratio in feed. Aquaculture. 356-357: 147-152.

## VIII. ANEXOS

**ANEXO 1:** Matriz de Correlación de Pearson entre los parámetros de calidad de agua en el bioreactor con BFT para la etapa I elaborado con el programa estadístico SPSS v. 22.

Variables	Solid. Sed.	Turbidez	Temp (°C)	OD(mg.L <sup>-1</sup> )	pH	TAN	NO <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub>	PO <sub>4</sub>	N-NH <sub>3</sub>	Alcalinidad	Alimento	Melaza	SECCHI	Klux día	Klux tarde
Solid. Sed.																
Turbidez	<b>1</b>		0.470	-0.575	-0.578	-0.387	<b>0.988</b>	<b>0.922</b>	<b>0.605</b>	-0.394	-0.623	<b>0.610</b>		-0.640	-0.140	0.471
Temp (°C)	0.470	<b>1</b>		-0.854	-0.373	0.187	0.436	0.441	0.269	0.159	-0.316	<b>0.631</b>		-0.876	0.292	<b>0.723</b>
OD(mg.L <sup>-1</sup> )	-0.575	-0.578	-0.854	<b>1</b>		0.365	-0.086	-0.530	-0.366	-0.079	0.334	-0.377		<b>0.770</b>	-0.071	-0.551
pH	-0.373	-0.373	0.365	0.365	<b>1</b>		0.513	-0.524	-0.525	<b>0.578</b>	<b>0.940</b>	-0.413		<b>0.688</b>	0.017	-0.417
TAN	0.187	-0.387	0.187	-0.086	0.513	<b>1</b>		-0.377	-0.250	<b>0.975</b>	0.478	-0.200		0.151	-0.128	-0.064
NO <sub>2</sub>	0.436	<b>0.988</b>	0.436	-0.551	-0.598	-0.445	<b>1</b>		<b>0.673</b>	-0.434	-0.647	<b>0.586</b>		-0.636	-0.123	<b>0.508</b>
NO <sub>3</sub>	0.441	<b>0.922</b>	0.441	-0.530	-0.377	-0.445	<b>0.959</b>	<b>1</b>	<b>0.665</b>	-0.324	-0.637	<b>0.508</b>		-0.644	-0.104	<b>0.634</b>
PO <sub>4</sub>	0.269	0.605	0.269	-0.366	-0.525	-0.250	0.673	<b>1</b>	<b>0.665</b>	-0.311	-0.485	<b>0.504</b>		-0.437	-0.067	0.381
N-NH <sub>3</sub>	0.159	-0.394	0.159	-0.079	0.578	0.975	-0.434	-0.324	-0.311	<b>1</b>	<b>0.500</b>	-0.285		0.166	-0.142	-0.009
Alcalinidad	-0.316	-0.623	-0.316	0.334	0.940	0.478	-0.647	-0.637	-0.485	<b>0.500</b>	<b>1</b>	-0.311		<b>0.659</b>	0.081	-0.487
Alimento	0.631	0.610	0.631	-0.377	-0.413	-0.200	<b>0.586</b>	<b>0.508</b>	<b>0.504</b>	-0.285	-0.311	<b>1</b>		-0.634	0.183	<b>0.504</b>
Melaza																
SECCHI	-0.640	-0.640	-0.876	0.770	0.688	0.151	-0.636	-0.644	-0.437	0.166	<b>0.659</b>	-0.634		<b>1</b>	-0.185	-0.863
Klux día	-0.140	-0.140	0.292	-0.071	0.017	-0.128	-0.123	-0.104	-0.067	-0.142	0.081	0.183		-0.185	<b>1</b>	0.275
Klux tarde	0.471	0.471	0.723	-0.551	-0.417	-0.064	<b>0.508</b>	<b>0.634</b>	0.381	-0.009	-0.487	<b>0.504</b>		-0.863	0.275	<b>1</b>

**ANEXO 2:** Matriz de Correlación de Pearson entre los parámetros de calidad de agua en el bioreactor con BFT para la etapa II elaborado con el programa estadístico SPSS v. 22.

Variables	Solid. Sed.	Turbidez	Temp (°C)	OD(mg.L <sup>-1</sup> )	pH	TAN	NO <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub>	PO <sub>4</sub>	N-NH <sub>3</sub>	Alcalinidad	Alimento	Melaza	SECCHI	Klux día	Klux tarde
Solid. Sed.	<b>1</b>	0.395	-0.733	-0.064	-0.536	0.289	-0.527	0.171	0.548	-0.346	-0.056	0.272	0.166	-0.608	-0.333	-0.490
Turbidez	0.395	<b>1</b>	-0.026	-0.360	-0.522	0.104	-0.729	0.350	0.585	-0.511	0.087	0.230	0.007	-0.720	-0.326	-0.271
Temp (°C)	-0.733	-0.026	<b>1</b>	-0.280	0.265	-0.468	0.326	0.046	-0.253	-0.103	0.007	0.011	-0.415	0.266	0.437	0.357
OD(mg.L <sup>-1</sup> )	-0.064	-0.360	-0.280	<b>1</b>	0.637	0.115	0.100	-0.633	-0.227	0.416	0.236	-0.496	0.208	0.539	0.050	0.231
pH	-0.536	-0.522	0.265	0.637	<b>1</b>	-0.277	0.446	-0.391	-0.449	0.491	0.374	-0.538	-0.221	0.862	0.407	0.460
TAN	0.289	0.104	-0.468	0.115	-0.277	<b>1</b>	-0.379	-0.082	0.363	0.566	-0.047	0.278	0.817	-0.323	-0.559	-0.372
NO <sub>2</sub>	-0.527	-0.729	0.326	0.100	0.446	-0.379	<b>1</b>	-0.366	-0.755	0.256	0.204	-0.136	-0.343	0.672	0.447	0.285
NO <sub>3</sub>	0.171	0.350	0.046	-0.633	-0.391	-0.082	-0.366	<b>1</b>	0.530	-0.404	-0.420	0.148	0.069	-0.435	-0.035	-0.247
PO <sub>4</sub>	0.548	0.585	-0.253	-0.227	-0.449	0.363	-0.755	0.530	<b>1</b>	-0.293	-0.400	0.162	0.255	-0.541	-0.302	-0.225
N-NH <sub>3</sub>	-0.346	-0.511	-0.103	0.416	0.491	0.566	0.256	-0.404	-0.293	<b>1</b>	0.174	-0.116	0.456	0.451	-0.068	0.017
Alcalinidad	-0.056	0.087	0.007	0.236	0.374	-0.047	0.204	-0.420	-0.400	0.174	<b>1</b>	-0.071	-0.248	0.198	-0.172	-0.057
Alimento	0.272	0.230	0.011	-0.496	-0.538	0.278	-0.136	0.148	0.162	-0.116	-0.071	<b>1</b>	-0.061	-0.454	-0.205	-0.346
Melaza	0.166	0.007	-0.415	0.208	-0.221	0.817	-0.343	0.069	0.255	0.456	-0.248	-0.061	<b>1</b>	-0.245	-0.490	-0.295
SECCHI	-0.608	-0.720	0.266	0.539	0.862	-0.323	0.672	-0.435	-0.541	0.451	0.198	-0.454	-0.245	<b>1</b>	0.340	0.505
Klux día	-0.333	-0.326	0.437	0.050	0.407	-0.559	0.447	-0.035	-0.302	-0.068	-0.172	-0.205	-0.490	0.340	<b>1</b>	0.237
Klux tarde	-0.490	-0.271	0.357	0.231	0.460	-0.372	0.285	-0.247	-0.225	0.017	-0.057	-0.346	-0.295	0.505	0.237	<b>1</b>

**ANEXO 3:** Parámetros de crecimiento de la Tilapia (*Oreochromis niloticus*) mantenida en el bioreactor de biofloc durante la etapa experimental.

<b>Biometrías</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Biomasa (g.)</b>	<b>Individuos</b>	<b>Peso promedio (g.)</b>	<b>Mortalidad (%)</b>	<b>TA (%)</b>	<b>Variación de Biomasa (g.)</b>	<b>Densidad de Carga (Kg.m<sup>-3</sup>)</b>
<b>INICIAL</b>	Día 1	3018.09	176	17.15	-	4.5	-	2.10
<b>N°1</b>	Semana 1	3667.44	176	20.84	0%	4.5	649.35	2.44
<b>N°2</b>	Semana 2	4214.74	176	23.95	0%	4.5	547.30	2.81
<b>N°3</b>	Semana 3	4634.30	176	26.33	0%	4.5	419.56	3.09
<b>N°4</b>	Semana 4	5043.70	176	28.66	0%	4.5	409.4	3.36
<b>FINAL</b>	Día 38	5461.80	176	31.03	0%		418.1	3.64