

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**

**LA MOLINA**

**FACULTAD DE PESQUERÍA**



**TESIS**

**“CRECIMIENTO BACTERIANO EN UN SISTEMA DE BIOFLOC A  
DIFERENTES NIVELES DE PROTEÍNA DEL ALIMENTO DE  
ALEVINES DE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*)”**

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

Presentado por:

**PRISCILLA PAMELA VERÁSTEGUI SIERRA**

**LIMA – PERÚ**

**2019**

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

FACULTAD DE PESQUERÍA

“CRECIMIENTO BACTERIANO EN UN SISTEMA DE BIOFLOC A  
DIFERENTES NIVELES DE PROTEÍNA DEL ALIMENTO DE  
ALEVINES DE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*)”

Presentado por:

Priscilla Pamela Verástegui Sierra

Trabajo Académico para optar el Título de:

INGENIERO PESQUERO

Sustentado y aprobado por el siguiente jurado

---

**Ing. Anibal Verástegui Maíta**

Presidente

---

**Mg. Jessie Marina Vargas Cárdenas**

Miembro

---

**Mg. Fernando Galecio Regalado**

Miembro

---

**Mg. Beatriz Elena Angeles Escobar**

Asesor

---

**Ing. Nancy Martinez Ordinola**

Asesor

A mis padres, con todo mi amor.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a mi asesora Beatriz Ángeles por el respaldo brindado en la elaboración del presente trabajo, por sus conocimientos impartidos y su actitud para poner siempre una sonrisa. Agradezco a mis grandes compañeras de trabajo Gianela Bernuy y Sandra Portugal, sin su temple, valentía y ocurrencias el proceso no hubiera sido igual de enriquecedor. Y a todas las personas que permitieron que este trabajo salga adelante, gracias por sus consejos y recomendaciones.

Finalmente, a mi familia y en especial a mis padres por su paciencia y confianza.

# ÍNDICE GENERAL

**DEDICATORIA**

**AGRADECIMIENTOS**

**ÍNDICE DE TABLAS**

**ÍNDICE DE FIGURAS**

**ÍNDICE DE ANEXOS**

**RESUMEN**

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b>	<b>4</b>
2.1	Desechos de la acuicultura intensiva	4
2.2	Sistemas con tecnología Biofloc (TBF)	5
2.3	Vías bacterianas de asimilación de nitrógeno	7
2.4	Crecimiento de bacterias heterótrofas en BFT	11
2.4.1	Temperatura	11
2.4.2	Oxígeno Disuelto (OD)	12
2.4.3	Degradación de materia orgánica y la relación C:N	13
2.4.4	Alcalinidad y pH	16
2.4.5	Control y mantenimiento de los niveles de sólidos	17
2.5	Cultivo de tilapia ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) en BFT	20
<b>III.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>22</b>
3.1	Lugar y periodo experimental	22
3.2	Etapa pre - experimental	22
3.3	Diseño experimental e instalaciones	23
3.4	Mantenimiento de las unidades experimentales	24
3.5	Métodos de muestreo	28
3.6	Procesamiento de datos	32

<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSION</b>	<b>34</b>
4.1	Control de parámetros abióticos	34
4.1.1	Temperatura y oxígeno	34
4.1.2	pH y alcalinidad total	36
4.1.3	Luminosidad y turbidez	38
4.2	Densidad de colonias bacterianas heterótrofas	40
4.3	Nivel de sólidos en los medios de cultivo	44
4.4	Asimilación biológica del Nitrógeno Amoniacal (NAT) y amoníaco (N- HN <sub>3</sub> )	50
4.5	Producción del cultivo: crecimiento y supervivencia	56
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>60</b>
<b>VI.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>61</b>
<b>VII.</b>	<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>62</b>
<b>VIII.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>68</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros de cuantificación de sólidos y métodos para su estimación (Modificado de De Schryver <i>et al.</i> , 2008)	19
Tabla 2. Composición del alimento balanceado	24
Tabla 3. Tasa de alimentación empleada durante ocho semanas experimentales	25
Tabla 4. Relación C:N del alimento balanceado empleado	25
Tabla 5. Medición de parámetros abióticos y equipos empleados	27
Tabla 6. Métodos para la determinación de compuestos nitrogenados	32
Tabla 7. Concentración promedio semanal de la densidad de bacterias heterótrofas producidas con los tratamientos aplicados.	34
Tabla 8. Concentración promedio semanal de la densidad de bacterias heterótrofas producidas con los tratamientos aplicados	40
Tabla 9. Concentración de sólidos sedimentables (SS), sólidos suspendidos totales (SST), sólidos suspendidos volátiles (SSV) y turbidez	45
Tabla 10. Concentración promedio de nitrógeno amoniacal total NAT ( $\text{mg.L}^{-1}$ ), amoníaco $\text{NH}_3\text{-N}$ ( $\text{mg.L}^{-1}$ ), nitritos $\text{NO}_2\text{-N}$ ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) y nitratos $\text{NO}_3\text{-N}$ ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	51
Tabla 11. Concentración promedio semanal de nitrógeno amoniacal total NAT ( $\text{mg.L}^{-1}$ ), nitritos $\text{NO}_2\text{-N}$ ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) y nitratos $\text{NO}_3\text{-N}$ ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	52
Tabla 12. Valores de los parámetros de crecimiento y sobrevivencia de alevines de tilapia macho ( <i>O. niloticus</i> ), sometidos a los tres tratamientos aplicados	57

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Uso del biofloc en la unidad de cultivo, utilizando alimento con bajo contenido de N y adición de una fuente de carbono (Adaptado de Crab <i>et al.</i> , 2012).	6
Figura 2. Determinación de la cantidad carbono orgánico para metabolizar la concentración nitrógeno en el agua, suministrando alimento con 30% de proteína (Modificado de De Schryver <i>et al.</i> , 2008).	15
Figura 3. Aleatorización de los tratamientos en las unidades de cultivo.	23
Figura 4. Variación semanal promedio de la temperatura (T) y concentración de oxígeno disuelto ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	36
Figura 5. Variación promedio semanal de la alcalinidad ( $\text{mg.L}^{-1} \text{CaCO}_3$ ) en los tres tratamientos aplicados.	38
Figura 6. Influencia de la luminosidad sobre la turbidez registrados en los tres tratamientos aplicados.	39
Figura 7. Densidad promedio de bacterias ( $\log \text{UFC.ml}^{-1}$ ) según la concentración de la proteína del alimento suministrado.	41
Figura 8. Abundancia promedio de bacterias heterótrofas momentos previos a las filtraciones de sólidos de las unidades experimentales.	42
Figura 9. Comportamiento de los sólidos sedimentables (SS) y sólidos suspendidos totales (SST) sometidos a filtraciones.	47
Figura 10. (a) Coloración del biofloc en los tratamientos durante la tercera semana; (b) proceso de sedimentación y visualización del biofloc del tratamiento T3 (que presenta 40% de proteína en la dieta).	48
Figura 11. Comparación de las concentraciones promedio semanales de Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV) y la densidad promedio de bacterias heterótrofas.	50
Figura 12. Comportamiento de los niveles promedio semanal de nitritos presentes en los tres tratamientos aplicados.	54
Figura 13. Comportamiento de los niveles promedio semanal de nitratos presentes en los tres tratamientos aplicados.	54
Figura 14. Incremento semanal de la biomasa de alevines de tilapia ( <i>O. niloticus</i> ), sometidos a tres tratamientos durante ocho semanas.	58

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Tabla de valores de corrección de alcalinidad (Loyless y Malone, 2011)	68
ANEXO 2. Porcentaje de concentración de amonio no ionizado (H-NH <sub>3</sub> ) según Thurston <i>et al.</i> , (1979).	69
ANEXO 3. Resultados de la prueba ANOVA de medidas repetidas y prueba de comparación Tukey para evaluar la población de bacterias heterotróficas.	70
ANEXO 4. Abundancia de bacterias heterotróficas previo a la filtración.	71
ANEXO 5. Valores promedio semanales de sólidos sedimentables (SS), sólidos suspendidos totales (SST) y sólidos suspendidos volátiles (SSV).	72
ANEXO 6. Ración diaria de alimento y melaza suministrados a los tratamientos, durante ocho semanas.	73
ANEXO 7. Resultados de la prueba de Correlación de Pearson entre las colonias de bacterias (Log UFC/ml), SST (sólidos suspendidos totales) y NAT (nitrógeno amoniacal total).	74
ANEXO 8. Fotografías complementarias	74

## RESUMEN

El presente trabajo tuvo como finalidad evaluar la densidad de bacterias y su relación con la calidad de agua en un cultivo experimental de peces empleando Tecnología Biofloc (TBF). El estudio se desarrolló en el Centro de Investigación Piscícola (CINPIS) de la Universidad Nacional Agraria La Molina (Lima – Perú) durante 8 semanas, donde se comparó los efectos de la aplicación de tres porcentajes de proteína del alimento en la producción de bacterias heterótrofas en un cultivo experimental de Tilapia Nilótica (*Oreochromis niloticus*), los tratamientos proteicos empleados fueron de 30 por ciento (T1), 35 por ciento (T2) y 40 por ciento (T3) bajo un diseño experimental de 3x3 aleatorizado. Se empleó la relación C:N de 10:1 y se estandarizó la concentración de bicarbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) superior a  $70 \text{ mg.L}^{-1}$  en todos los tratamientos para promover el crecimiento bacteriano. Las condiciones medioambientales fueron mantenidas con un promedio de  $28.2 \pm 0.5^\circ\text{C}$  de temperatura,  $6.74 \pm 0.3 \text{ mg.L}^{-1}$  de oxígeno disuelto (OD), pH a  $7.72 \pm 0.12$  y se realizaron filtraciones semanales para mantener los niveles de sólidos en rangos adecuados ( $\text{SST} < 500 \text{ mg.L}^{-1}$ ). La densidad de bacterias heterótrofas fue estadísticamente superior en el tratamiento T3 ( $5.94 \pm 0.55 \text{ logUFC.ml}^{-1}$ ) el cual consumió rápidamente carbonatos hasta un valor de  $57.91 \text{ mg.L}^{-1}$ , esta estuvo influenciada principalmente por la relación C:N y la fuente de carbono empleado (melaza) que tuvo un efecto en los niveles de sólidos en los tratamientos, especialmente en los tratamientos T2 y T3 ( $525.45 \pm 50.31 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Los valores promedio de amoníaco se mantuvieron alrededor de los  $0.08 \pm 0.012 \text{ mg.L}^{-1}$  en todos los tratamientos indicando que el sistema de depuración de nutrientes fue efectivo sobre todo en los tratamientos que recibieron mayor cantidad de proteínas, y que a su vez permitieron un mejor crecimiento de los peces cultivados en comparación a los tratamientos que recibieron alimento con bajas concentraciones proteicas.

*Palabras clave:* bacterias heterótrofas, calidad de agua, tecnología biofloc, sólidos suspendidos, nitrógeno amoniacal total.

## ABSTRACT

This research evaluates the density of bacteria and its relationship with water quality in an experimental fish culture using Biofloc Technology (TBF). The study was developed at the Fish Research Center (CINPIS) of the National Agrarian University La Molina (Lima - Peru) for 8 weeks, where three different percentages of protein were used to compare the effects on applying in production of heterotrophic bacteria in experimental culture of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Protein treatments used were 30 percent (T1), 35 percent (T2) and 40 percent (T3) under a randomized 3x3 experimental design. The C:N ratio of 10:1 was used and the concentration of calcium bicarbonate ( $\text{CaCO}_3$ ) above  $70 \text{ mg.L}^{-1}$  was standardized in all treatments to promote bacterial growth. The environmental conditions were maintained with an average temperature of  $28.2 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $6.74 \pm 0.3 \text{ mg.L}^{-1}$  of dissolved oxygen (OD), pH at  $7.72 \pm 0.12$  and weekly filtrations to maintain solids levels inadequate ranges (SST  $<500 \text{ mg.L}^{-1}$ ). The density of heterotrophic bacteria was statistically higher in the T3 treatment ( $5.94 \pm 0.55 \text{ logUFC.ml}^{-1}$ ) which quickly consumed carbonates up to a value of  $57.91 \text{ mg.L}^{-1}$ , this was mainly influenced by the C: N ratio and the source of carbon used (molasses) that had an effect on the levels of solids in treatments, especially in treatments T2 and T3 ( $525.45 \pm 50.31 \text{ mg.L}^{-1}$ ). The average ammonia values remained around  $0.08 \pm 0.012 \text{ mg. L}^{-1}$  in all the treatments that indicate the effectiveness of the nutrient purification system, especially in the treatments that received a greater amount of protein, and which in turn allowed a better growth of farmed fish compared to the treatments that received food with low protein.

*Keywords: heterotrophic bacteria, water quality, biofloc technology, suspended solids, ammonial total nitrogen.*

## I. INTRODUCCIÓN

La acuicultura es una actividad que permite la producción de proteína para los seres humanos y complementa la disponibilidad limitada de las pesquerías sobre - explotadas (Cullis-Suzuki y Pauly 2010). La oferta mundial per cápita de pescado alcanzó un nuevo máximo histórico de 20 kg en 2014, gracias a un intenso crecimiento de la acuicultura, que en la actualidad proporciona la mitad de todo el pescado destinado al consumo humano, asimismo la población mundial aumentará a 9.7 millones de personas en el año 2050 (FAO, 2016) generando un incremento en la demanda de alimentos, incluyendo los de origen acuático. Por ello, la intensificación en la producción acuícola es necesaria para cubrir las necesidades alimenticias de la población; sin embargo, este crecimiento implica mayor uso de volúmenes de agua, así como harina y aceite de pescado (Avnimelech *et al.* 2008).

Actualmente las fuentes mundiales de agua dulce son cada vez más escasas siendo el 41 por ciento de la población mundial que vive con disponibilidad de agua restringida (Avnimelech *et al.* 2008), ante esta situación y con la finalidad de reducir el uso del recurso agua en la actividad acuícola, se han desarrollado sistemas de producción intensivos con sostenibilidad ambiental, los más notables son los sistemas de recirculación en acuicultura (RAS, por sus siglas en inglés), capaces de incrementar los volúmenes de producción utilizando una infraestructura que permite recircular el agua manteniendo su calidad apta para el crecimiento de los organismos cultivados. Sin embargo, los costos de instalación y mantenimiento son un factor limitante, siendo inviable económicamente para muchos productores (Gutierrez-Wing y Malone 2006). Además de eso, las altas densidades cultivadas y uso de grandes cantidades de alimento conducen a la formación de residuos sólidos que pueden afectar directamente el medio ambiente si no son debidamente tratados.

En consecuencia, el objetivo que la actividad acuícola debe cumplir es la intensificación en la producción sin aumentar significativamente el uso de los recursos naturales básicos como el recurso hídrico (Avnimelech 2009) y que proporcione una equitativa relación costo/beneficio, apoyando la sostenibilidad económica y social (Avnimelech *et al.* 2008).

Una alternativa de producción en respuesta a los problemas expuestos es el uso de la Tecnología Biofloc (BFT, por sus siglas en inglés), en el cual se promueve el crecimiento de bacterias heterótrofas que reciclan los compuestos tóxicos provenientes de las excretas de los peces principalmente de nitrógeno amoniacal total (TAN), reduciendo sus niveles y mejorando la calidad del agua (De Schryver *et al.* 2008; Crab 2010). Esto se logra a través de la manipulación en las proporciones carbono/nitrógeno (C:N) en el agua permitiendo la asimilación de los compuestos nitrogenados siendo destinados a la producción de proteína microbiana que sirve como alimento adicional para las especies objetivo (Jorand *et al.* 1995; Crab *et al.* 2009; Avnimelech 1999 citado por Widanarni *et al.* 2012).

Uno de los aspectos que toma gran importancia en el manejo de esta biotecnología es el adecuado control de los sólidos en suspensión (Ebeling *et al.* 2006, Schweitzer *et al.* 2013, De Schryver 2008, Avnimelech 2011). Los recambios de agua reducidos y la alta adición de materia orgánica contribuye a altas tasas de crecimiento de bacterias heterótrofas y en consecuencia un incremento de sólidos en el sistema (Schweitzer *et al.* 2013). Ebeling *et al.*, (2006) reportan que, en sistemas heterótrofos, la densidad de los sólidos suspendidos y el oxígeno son parámetros que deben estar en constante monitoreo pues un manejo deficiente en los niveles de sólidos provocaría efectos negativos en el sistema como un descenso de oxígeno disuelto en el agua, obstrucción de las branquias y estrés, causando efectos negativos en el crecimiento de las especies en cultivo (Crab *et al.* 2007, Avnimelech 2011).

La producción de sólidos en un sistema con BFT está influenciada por la cantidad de materia orgánica que ingresa al cultivo (Avnimelech 2007), principalmente por la adición carbono y nitrógeno a través del alimento, siendo éstos los principales elementos para promover el crecimiento bacteriano. Los factores que “controlan naturalmente” los niveles de biofloc dentro del sistema son la biodegradación por parte de los organismos y microorganismos presentes (Tacon *et al.* 2002; Burford *et al.* 2004); sin embargo, los peces o crustáceos no siempre consumen el biofloc al ritmo que éste se genera. Entonces, se debe considerar que mayores cantidades de materia orgánica pueden acelerar el crecimiento

bacteriano y la madurez del biofloc, llevando a incrementar la carga en el sistema (Van Wyk 2006), sin embargo, si no se tiene el control de la producción del floc microbiano y la presencia de sólidos en suspensión, se dificultará la operatividad del sistema interfiriendo en el adecuado funcionamiento de los procesos de respiración y crecimiento de los organismos cultivados.

Un estudio para encontrar el nivel mínimo de proteína en el alimento que promueva el crecimiento de una población bacteriana y que permita controlar los niveles de amoníaco, evitando sobrecargar el sistema y sin afectar el crecimiento del cultivo objetivo debe ser evaluado, permitiendo optimizar el uso de la proteína, pues es el insumo más costoso en la elaboración de dietas balanceadas en acuicultura. Este estudio contribuirá a tener un mayor entendimiento de los factores que influyen el crecimiento de la comunidad bacteriana del biofloc, permitiendo mejorar la operatividad de esta tecnología.

El objetivo general de la presente investigación fue evaluar la densidad bacteriana heterótrofa en cultivos biofloc, su capacidad de asimilación de nitrógeno y el efecto que genera en la producción de sólidos, poniendo a prueba diferentes porcentajes de proteína suministrados en alimento balanceado (se maneja la misma relación C:N en todos los tratamientos). Para lograrlo se plantea como objetivos específicos 1) cuantificar el crecimiento poblacional de bacterias heterótrofas (UFC) en sistemas BFT en relación a diferentes porcentajes de proteína usados en el alimento para peces en etapa de alevinaje 2) evaluar la relación existente entre los porcentajes de proteína de las dietas con los niveles de biofloc evaluado en términos de Sólidos Suspendidos Totales (SST), Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV), Sólidos Sedimentables (SS) y finalmente, 3) evaluar la relación de sólidos suspendidos Totales (SST), la población de bacterias heterótrofas y los niveles de Nitrógeno Amoniacal Total (NAT) presentes en el agua de cultivo.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Desechos de la acuicultura intensiva

La acuicultura intensiva es aquella en la que se logra alcanzar rendimientos mayores a los que la capacidad del medio natural permite, pues se ejerce un alto grado de control sobre el manejo del agua y de los organismos mediante técnicas y sistemas especializados. Estos sistemas usan infraestructura tecnificada, las densidades de siembra son mayores y se suministra alimento formulado, así como aireación (Hargreaves, 2006; Crab *et al.* 2007). Sin embargo, estos sistemas de régimen intensivo presentan una producción continua de residuos nitrogenados en niveles que dependen de la dieta, los procedimientos de alimentación y de las condiciones generales del cultivo. Estos residuos se convierten en un factor limitante para el crecimiento y sobrevivencia de los peces, así removerlo o transformarlo en nitrógeno no tóxico es esencial cuando se pretende aumentar la biomasa del sistema y disminuir los riesgos (Avnimelech 2009, Ebeling y Timmons 2006, Hargreaves 1998). Asimismo, se debe tener en cuenta que la presencia de materia orgánica en los efluentes no tratados procedentes de la industria acuícola causa efectos negativos y riesgos a largo plazo en el medio ambiente (Piedrahita 2013).

Los peces confinados normalmente reciben alimento con alto nivel de proteína, parte de ella es asimilada y destinada al mantenimiento, crecimiento o reproducción de los organismos acuáticos. Se ha reportado que el pez puede asimilar sólo el 20 – 30 por ciento del nitrógeno adicionado en la dieta (Gross *et al.* 2000, Avnimelech y Ritvo 2003, De Schryver 2008), el restante es excretado como nitrógeno amoniacal total, en forma de amonio ionizado ( $\text{NH}_4^+$ ) y amonio no ionizado ( $\text{NH}_3$ ), a través de las branquias y como urea en la orina, que son la principal forma de excreción de nitrógeno de los peces (Azim y Little, 2008).

En cultivos de peces la forma no ionizada ( $\text{NH}_3$ ) es altamente tóxica y la concentración letal varía entre especies en un rango de 1 - 2  $\text{mg.L}^{-1}$ , agudizándose cuando la concentración de oxígeno es baja (Avnimelech 2009), causando reducción de la sobrevivencia y crecimiento (Avnimelech y Ritvo 2003). El término nitrógeno amoniacal total (TAN) se refiere a la suma de ambas formas y es representada como  $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ , siendo representadas por la siguiente ecuación de equilibrio cuando se encuentran en medio acuoso.



Los efectos tóxicos del amonio están relacionados principalmente a la forma no ionizada o amoniaco ( $\text{NH}_3$ ), debido a la facilidad con que la molécula se difunde rápidamente dentro de las células de los peces (Körner *et al.* 2001). La gran mayoría de las membranas biológicas son permeables al amoniaco, pero relativamente impermeable al amonio ionizado ( $\text{NH}_4^+$ ). La concentración relativa de  $\text{NH}_3$  incrementa con el aumento de la temperatura y del pH, y disminuye con el aumento de la salinidad (Timmons *et al.* 2002, Ebeling *et al.* 2006). En cultivos comerciales la alimentación es la mayor fuente de nitrógeno amoniacal total siendo uno de los productos finales del metabolismo de las proteínas (Walsh y Wright 1995 citado en Crab *et al.* 2007).

## 2.2. Sistemas con tecnología Biofloc (TBF)

Se denomina “bioflocs” a los agregados de bacterias, algas, protozoos y otros tipos de materia orgánica particulada (excretas, restos de alimento, detritus, etc.). Estos agregados también llamados flóculos, se encuentran unidos por una matriz de mucus segregada por las bacterias heterótrofas (Jorand *et al.* 1995, Ebeling *et al.* 2006, Avnimelech 2008). Para promover su crecimiento las bacterias toman nutrientes del medio que las rodea, estos son principalmente carbono y nitrógeno pues son parte de su composición y son requeridos para formar nuevas células (Hargreaves 2013). Por ello, en sistemas acuícolas se debe ajustar la proporción de carbono y nitrógeno en el agua a través de la adición de fuentes externas de carbono, o también reduciendo los niveles de proteína del alimento (Hargreaves, 2013). En condiciones favorables y con una relación C:N mayor a 10/1

(Azim y Little 2008, Avnimelech 2009), las bacterias satisfacen su demanda de nitrógeno presente en el agua de cultivo como amonio (en su forma ionizada o no ionizada), de esta forma los niveles de compuestos nitrogenados son controlados en el sistema de cultivo (Hargreaves, 2013).

Por lo expuesto Schweitzer *et al.*, (2013) señalan que en sistemas con BFT la proteína que ingresa a la unidad de cultivo es doblemente eficaz porque primero es consumida por los peces (o crustáceos) a través del alimento balanceado y luego, cuando es consumido en forma de proteína microbiana (Figura 1). Esto permite aprovechar la proteína no consumida por los organismos de cultivo y disponible en el agua de cultivo (Gross *et al.* 2000, Avnimelech y Ritvo 2003, De Schryver 2008).

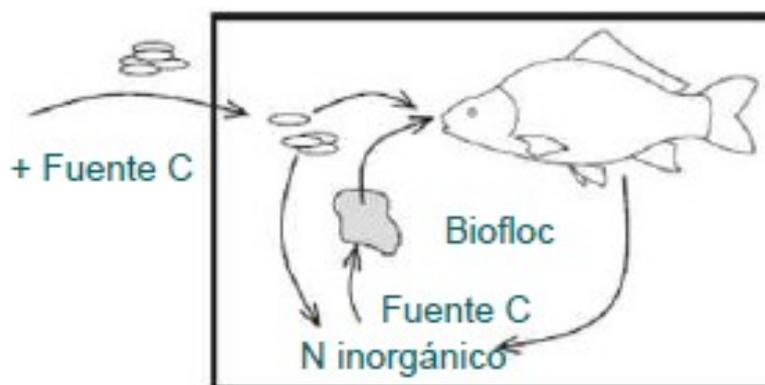


Figura 1. Uso de biofloc en la unidad de cultivo, utilizando alimento con bajo contenido de N y adición de una fuente de carbono (Adaptado de Crab *et al.*, 2012).

La floculación de las comunidades microbianas es un proceso complejo. Los principales constituyentes que se pueden encontrar dentro de los flóculos son estructuras extracelulares que forman una matriz encapsulando las células microbianas, y desempeñan un papel importante en la unión de los componentes para la floculación y representan hasta el 80% de la masa total (Liu y Fang, 2003). Por lo general están compuestas de polisacáridos, proteínas, compuestos húmicos, ácidos nucleicos y lípidos (Zita y Hermansson 1994). El conocimiento de cómo promover la formación de flocs en sistemas de lodo activo puede ser usado en aplicaciones para BFT en acuicultura (De Schryver *et al.* 2008).

Cabe señalar que, en comparación con otras tecnologías de tratamiento de agua en la acuicultura, la BFT es uno de los sistemas que permite la intensificación del cultivo con un costo relativamente razonable de inversión y funcionamiento (Avnimelech 2009, De Schryver *et al.* 2008, Avnimelech 2011).

### 2.3. Vías bacterianas en la asimilación de nitrógeno

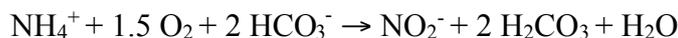
Ebeling *et al.*, (2006) señalan que los microorganismos que contribuyen significativamente en la depuración de compuestos nitrogenados en sistemas con cero recambio de agua se clasifican en la acción dos tipos de bacteria: la quimio - heterótrofa y la quimio – autótrofa, estas últimas también llamadas nitrificantes. Michaud *et al.*, (2006) afirma que las poblaciones bacterianas tanto autótrofas como heterótrofas entran en competencia por alimento, ya que las dos requieren nitrógeno para sus reacciones metabólicas.

- Bacteria quimio-autótrofa

La nitrificación es un proceso autotrófico, es decir la energía necesaria para el crecimiento bacteriano se obtiene de la oxidación de compuestos de nitrógeno, principalmente del amoníaco. Para la síntesis de células nuevas los organismos nitrificadores emplean dióxido de carbono (carbono inorgánico), en lugar de carbono orgánico. Las bacterias nitrificantes obtienen la fuente de carbono de compuestos inorgánicos como el dióxido de carbono y nutrientes inorgánicos disueltos, como los carbonatos y compuestos nitrogenados (Ebeling *et al.*, 2006).

La oxidación del amonio es un proceso que se realiza en dos etapas, en el que toman parte dos familias de microorganismos, *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*. En la primera etapa, el amonio es convertido a nitrito y en la segunda, éste es convertido a nitrato (Anthonisen *et al.*, 1976). El crecimiento de las *Nitrosomonas* está limitado por la concentración de nitrógeno amoniacal y el de las *Nitrobacter* por la concentración de nitritos. Normalmente la reacción de formación de nitritos es más lenta que la de formación de nitratos por el establecimiento de las colonias de *Nitrobacter* (Ray *et al.* 2010).

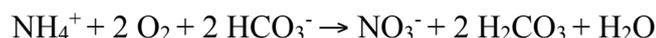
- Oxidación de bacterias *Nitrosomonas*:



- Oxidación de bacterias *Nitrobacter*:



- Oxidación global:



Estas reacciones normalmente tienen lugar a un pH de 7.5 a 8.6 (Hargrove *et al.* 1996, Atlas *et al.* 2002). Como se observa en la primera fase, la producción de nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) da lugar a la reacción de amonio con el ión bicarbonato ( $\text{CO}_3\text{H}^-$ ) en presencia de oxígeno eliminando ácido carbónico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ) y agua, es decir en la nitrificación también se consume alcalinidad generando un decremento del pH. En medios acuáticos donde la alcalinidad no es suficiente se genera un rápido decremento de pH que da lugar a una rápida disminución de la tasa de nitrificación. Asimismo, las concentraciones de oxígeno disuelto que estén por encima de  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  son esenciales para que ocurra el proceso de nitrificación. Si los niveles de oxígeno disuelto caen por debajo de este valor, este se convierte en un factor limitante y la velocidad de nitrificación disminuye o el proceso se detiene.

Se ha descrito que la forma para eliminar el amonio en sistemas con cero recambios de agua dependerá de la disponibilidad del carbono y sus formas; sea como carbono inorgánico (en forma de alcalinidad) o carbono orgánico (aportes del alimento no consumido, excretas de peces o alguna otra fuente de carbono). Por ello en sistemas de recirculación donde los sólidos, que contienen carbono, son rápidamente removidos, el sistema desarrolla un sistema autótrofo el cual utiliza el carbono inorgánico de la alcalinidad. En contraste, en sistemas sin recirculación, los sólidos permanecen en el tanque y están disponibles para las bacterias heterótrofas; sin embargo, si la cantidad de materia orgánica no es suficiente, es decir si existe una baja relación C:N, se producirá la nitrificación autótrofa (Ebeling *et al.* 2006).

- Bacteria quimio-heterótrofa

La importancia de estas bacterias dentro del flujo de materia y energía fue revalorada a partir del concepto de “lazo microbiano” (“microbial loop”) establecido por Azam *et al.*, (1983), teniéndose en cuenta desde entonces dos funciones fundamentales: su actividad mineralizadora, que forma parte de la capacidad de autodepuración del ecosistema, y que pone a disposición de los productores primarios elementos nutritivos, y la producción de biomasa bacteriana que es consumida eficazmente por depredadores superiores (Sherr y Sherr 2000).

Están equipadas con un aparato enzimático que les permite utilizar más rápidamente los sustratos solubles biodegradables, por ello aumenta su población en tiempo cortos dependiendo de la concentración de alimento (Schveitzer *et al.* 2013). El proceso de degradación de la materia orgánica se considera la actividad fundamental de las bacterias heterótrofas en cuerpos acuáticos del medio natural. Este proceso constituye la clave del mecanismo de autodepuración (Kirchman y Williams 2000).

La inmovilización del amonio puede ocurrir en días hasta horas con suficiente cantidad de compuestos orgánicos simples (ej. azúcar, melaza, harina de yuca, etc.). Avnimelech (2012) señala que cuando hay disponibilidad de sustratos y las condiciones son favorables puede tomar sólo 30 minutos para la multiplicación bacteriana y en un periodo de 24 horas una sola bacteria puede multiplicarse hasta llegar a formar  $3 \times 10^{14}$  células. De Schryver *et al.*, (2008) y Hargreaves (2006) señalan que 1.0 g de hidratos de carbono tiene un rendimiento alrededor de 0.4 g de peso seco celular bacteriano. Ebeling *et al.*, (2006) indica que, en contraste a la reacción de nitrificación, la mayoría de energía en el metabolismo heterótrofo es conducido a la síntesis de células, aunque este número es muy dependiente de tipo de microorganismo bacteriano y del sustrato que se emplee. La reacción del metabolismo bacteriano es la siguiente (Ebeling *et al.* 2006):



El balance estequiométrico de la reacción indica que remover 1 g de amonio consume 15.2 g de carbohidratos, 3.6 g de carbonatos del agua, 4.7 g de oxígeno y 9.7 g de CO<sub>2</sub> (Collazos-Lasso y Arias-Castellanos, 2015).

Por otro lado, la producción de masa celular de los organismos nitrificadores por unidad de sustrato metabolizado es menor que la producción de los organismos heterótrofos, sólo el 10 – 14 por ciento del proceso de la nitrificación es convertido en material celular comparado con el 50 por ciento generado en el proceso de oxidación heterótrofa (Ebeling *et al.*, 2006).

La habilidad de las células bacterianas para multiplicarse en un corto tiempo es considerable, especialmente en aguas ricas en nutrientes (Lee, 1993). Las poblaciones en una comunidad microbiana tienden a sufrir cambios en respuesta a estresores ambientales, en general, un medio ambiente estresante resulta en la disminución de la diversidad de la comunidad microbiana (Hung-Hung 2001). Además, no puede dejar de señalarse el efecto de la depredación dentro mismo ecosistema, en ambientes naturales es el principal factor que rige la variación estacional de la biomasa bacteriana (Gude 1993).

Particularmente en los sistemas acuícolas dependen de los procesos del fitoplancton, las bacterias y demás microorganismos, los cuales presentan una estrecha relación con las características físico - químicas de la calidad de agua (Avnimelech 2012). Ebeling (2006) manifiesta que la sobreproducción de fitoplancton es común cuando la cantidad de nutrientes exceden la capacidad de asimilación del microorganismo. Según Vadstein (1989) esta sobreproducción también se incorpora al ciclo del carbono sirviendo como sustrato para el desarrollo de las bacterias heterótrofas y el zooplancton.

Se ha reportado que los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Alcaligenes*, *Moraxella* y *Flavobacteria* son bacterias que degradan sustratos orgánicos complejos por presentar enzimas específicas (Arellano 2005).

## 2.4. Crecimiento de bacterias heterótrofas en BFT

Además de la materia orgánica, existe una serie de factores físicos y químicos que afectan no sólo el tamaño y la composición de las comunidades microbianas, sino también, la morfología y la fisiología de cada microorganismo en particular, como son: la temperatura, el pH, el oxígeno, la presión y la luz, entre otros (Miravet 2016).

En cada organismo existe un intervalo de tolerancia a las diferentes variables dentro del cual existen valores adecuados en los que ocurre la velocidad máxima de reproducción (Madigan *et al.* 1999). No todos los microorganismos pueden crecer y reproducirse bajo idénticas condiciones, el predominio de un grupo u otro se dará de acuerdo a las condiciones que prevalezcan en un determinado momento (Kirchman y William 2000), fuera de ese intervalo es posible que sobreviva, pero en estado de latencia (Atlas y Bartha 1997)

### 2.4.1. Temperatura

Según los diferentes intervalos de temperaturas en que pueden crecer los microorganismos se han clasificado en psicrófilos (0-20°C), mesófilos (14-45°C), termófilos (42-69°C) e hipertermófilos (hasta 110°C). Los mesófilos se encuentran en animales de sangre caliente y en ambientes de latitudes templadas y tropicales (Miravet, 2015). Dado que la tecnología Biofloc se aplica en el cultivo de especies tropicales, como en el presente estudio, se espera encontrar una comunidad bacteriana del tipo mesófilo.

Teniendo en cuenta este amplio rango de crecimiento, se recomienda manejar el metabolismo de la biomasa bacteriana a temperaturas intermedias de 20°C a 25°C para controlar la producción de sólidos en el cultivo (Wilén *et al.* 2000, De Schryver *et al.* 2008). En contraste, temperaturas menores a 10°C generan un decremento de la producción celular microbiana que conlleva a una rápida sedimentación de los flocs (defloculación) provocando el desaprovechamiento como alimento, mientras que temperaturas cercanas a 35°C resultan en la formación de *bulking*, producido por la excesiva producción de polisacáridos (Krishna y Van Loosdrecht 1999).

La temperatura es un factor que afecta la disponibilidad de oxígeno disuelto en el medio acuático (Boyd 1990), por ello el incremento de la biomasa de las especies cultivadas dependerá del buen manejo de este parámetro. Sin embargo, se debe considerar que la temperatura no es un factor que se puede ajustar fácilmente sin imponer considerables costes adicionales de funcionamiento, especialmente en estanques al aire libre (De Schryver *et al.* 2008), una alternativa que puede mitigar estos costos es el uso de invernaderos.

#### 242. Oxígeno Disuelto

El predominio de las condiciones aeróbicas es un pre-requisito para la operación de este tipo de sistemas (Avnimelech, 2008), pues proveen oxígeno a los animales de cultivo y a las comunidades y organismos del biofloc, evitando crear zonas anóxicas. Las concentraciones de OD deben ser superiores a  $4 \text{ mg.L}^{-1}$  (Avnimelech 2011, Avnimelech *et al.* 2008). De Schryver *et al.*, (2008) señalan que a bajos niveles de oxígeno disuelto ( $0.5 - 2.0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) existen pobres propiedades de sedimentación y gran volumen en el biofloc, propios de la aparición de *bulking*, causado por la aparición de microorganismos filamentosos en condiciones de poca oxigenación y gran cantidad de nutrientes. Niveles adecuados de oxígeno disuelto y turbulencia propician la fragmentación de los bioflocs generando una mayor velocidad de sedimentación, esto es beneficioso pues facilita la remoción de sólidos del sistema cuando sea requerido. Las bacterias estrictamente aeróbicas utilizan el oxígeno como aceptor terminal de hidrógeno en la respiración, por lo que el oxígeno molecular es vital para estos microorganismos. En aguas bien oxigenadas, fluctuaciones en el contenido de oxígeno disuelto no afectan grandemente las funciones vitales, siempre y cuando la concentración de éste no decaiga significativamente; sin embargo, en aguas pobres en oxígeno, una pequeña disminución del contenido de oxígeno provoca grandes cambios en las comunidades microbianas (Reinheimer 1981 citado en Miravet 2015).

Asimismo, la aireación mecánica juega un rol importante para mantener buenas condiciones de calidad de agua en estanques. Por un lado influye sobre la concentración de

oxígeno disuelto que repercute en gran medida el crecimiento y supervivencia de la especie cultivada. Por otro lado, mantiene un ambiente óptimo para la respiración de los microorganismos presentes en el agua, y la oxidación de los distintos compuestos inorgánicos presentes (Boyd 2001).

#### 243. Degradación de materia orgánica y relación C:N

El proceso de degradación de la materia orgánica se considera la actividad fundamental de las bacterias heterótrofas en medios acuáticos naturales. Este proceso constituye la clave del mecanismo de autodepuración (Kirchman y Williams 2000 citados en Miravet 2003). Las bacterias heterótrofas se alimentan con sustrato orgánico que contiene principalmente carbono y nitrógeno, que los toman del agua con el fin de producir la proteína necesaria para el crecimiento y la multiplicación celular (Arias y Collazos 2015). En sistemas de producción acuícola el control de la acumulación de nitrógeno inorgánico se basa en el metabolismo del carbono y la inmovilización de nitrógeno por células microbianas (Avnimelech 2012, Avnimelech 1999), que se logra a través de balancear estos dos elementos presentes en el medio de cultivo. Los aportes de restos nitrogenados de los peces (excreción y alimento no consumido) al disolverse desequilibran la relación del nitrógeno con el carbono (Samocha *et al.* 2007) siendo necesario agregar cantidades adicionales de carbono.

Goldman *et al.*, (1987) citado en Azim *et al.*, (2008) señalan que una relación mínima aproximada de 5:1 ya es capaz de permitir el crecimiento bacteriano. Asimismo, Ebeling *et al.*, (2006) indica que no todo el carbono presente está disponible en consecuencia manejar una baja relación C:N puede conllevar a no lograr la depuración efectiva del agua de cultivo; contrario a ello, una alta dosificación de la fuente de carbono orgánico al agua induce una disminución en los niveles de oxígeno disuelto debido al incremento de metabolismo microbiano aeróbico (De Schryver *et al.* 2008). Las raciones usadas en el cultivo de peces generalmente contienen alto contenido proteico (aproximadamente 40 por ciento de proteína) aportando una relación baja de C:N (8:1) (Avnimelech 2011), esto se debe a que en sistemas convencionales el objetivo es el crecimiento de los peces en cultivo más no de dar condiciones para el crecimiento de la población bacteriana.

La capacidad de controlar la relación C:N depende de la formulación del alimento, la eliminación o adición de sólidos orgánicos de carbono, el uso de una determinada fuente de carbono, entre otros factores que permiten a los técnicos y productores acuícolas definir cuál es la mejor estrategia para el manejo de sus sistemas de producción, en este sentido las relaciones C:N han variado entre autores reportando tasas > 10:1 (Azim *et al.* 2008), 12 - 13:1 (Schneider *et al.* 2006), 15:1 (Monroy *et al.* 2013), 20:1 (Ekasari 2014, Emerenciano, 2012, Emerenciano *et al.* 2012, Craig *et al.* 2012, Avnimelech 2009, De Shryver 2008; Avnimelech 1999), en cultivo de tilapias.

Para comprender la efectividad del mantenimiento de la relación C:N citados, se deber tener ciertas consideraciones en el análisis a la hora de optar por una u otra estrategia a implementar en un sistema acuícola. Mientras que unos autores calculan y manejan con adición de carbono (de una fuente externa) la relación C:N contenida en la formulación del alimento (Avnimelech 2012, De Schryver *et al.* 2008, Crab *et al.* 2009) otros investigadores lo calculan de la relación presente en el agua de cultivo luego de la alimentación (Mejia 2014) y adicionan el carbono restante para neutralizar la concentración de nitrógeno obtenida; el primero es un método de estimación matemática teórica y en el segundo caso un método directo a través de un análisis químico *in situ*. Por otra parte, otros autores sugieren un periodo de estabilización del bifloc empleando primero bioreactores a los que se adiciona grandes aportes de carbono para asegurar el establecimiento de bacterias heterótrofas, y en la fase de cultivo emplean alimento con bajo contenido de proteína (para mantener la alta relación C:N) y sólo ocasionalmente refuerzan el sistema con cantidades mínimas de alguna fuente de carbono.

Como se mencionó, dentro de las consideraciones más importantes al momento de hacer los cálculos para la adición de carbohidratos es que los niveles de proteína del alimento tienen estimada una relación C:N, en este sentido un concentrado con un 16% de proteína tiene una relación 20:1 siendo las condiciones iniciales de esta relación y sirven como un “factor de corrección” para las estimaciones (Avnimelech 2009).

Avnimelech *et al.*, (2009) y De Schryver *et al.*, (2008) plantean el cálculo matemático para determinar el carbono necesario para el estanque de cultivo basado en la cantidad de nitrógeno excretado por las especies cultivadas (Figura 2):

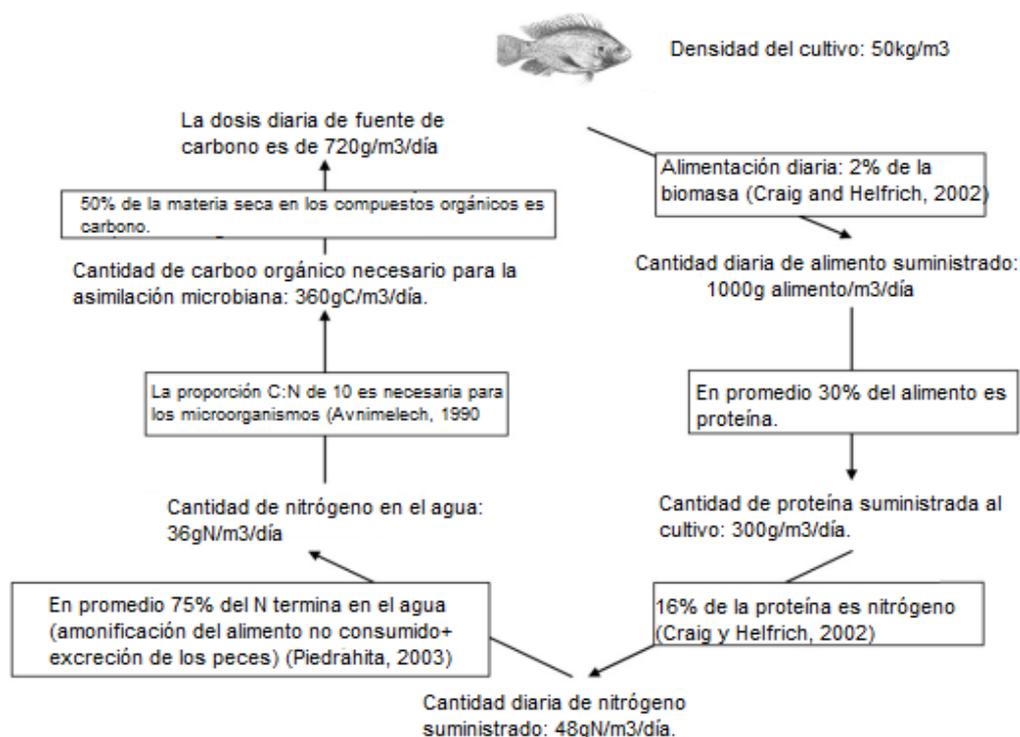


Figura 2. Determinación de la cantidad carbono orgánico suministrando alimento con 30 por ciento de proteína (Modificado de De Schryver *et al.*, 2008).

En referencia a la fuente de carbono, Avnimelech (2009), De Schryver (2008) y Kubitzka, (2011) plantean que el porcentaje de carbono que tienen las diferentes fuentes se aproxima al 50 por ciento, siendo la más utilizada la melaza (Monroy *et al.* 2013, Emerenciano 2012, Kuhn y Lawrence 2012, Avnimelech 2011, Schneider *et al.* 2006, Bufort *et al.* 2003).

La fuente de carbono orgánico de elección determinará en gran medida la composición de los flóculos producidos, principalmente en lo que se refiere al tipo y cantidad de los polímeros de almacenamiento (Hollinger *et al.* 2002, Oehmen *et al.* 2004 citados en De Schryver *et al.* 2008). Algunos investigadores sugieren que el azúcar y la melaza son asimilados más rápidamente por las bacterias, aumentando la producción de biofloc en

menos tiempo ya que se encuentra en su forma de carbono “lábil” o disponible (Hargreaves 2013).

Cabe señalar que, adheridas a la matriz de polisacáridos extracelulares de las bacterias se encuentran algas, algas verde-azules, bacterias, protistas, zooplancton y hongos incrustados, todos conocidos como perifiton (Van Dam *et al.* 2002) que contribuyen a la floculación. Dentro de estas comunidades, la biomasa de organismos autótrofos o heterótrofos domina, en función de la luz, el oxígeno disuelto y la disponibilidad de nutrientes como el carbono (De Schryver *et al.* 2008)

En lo que respecta a la estrategia de adición de carbono orgánico también resulta importante para el sistema con biofloc. El carbono orgánico se puede añadir en pequeñas cantidades y de modo casi continuo o se puede añadir en dosis mayores, pero a intervalos de tiempo regulares (De Schryver *et al.* 2008). Estas formas de adición influyen en el metabolismo de las bacterias y determinan la capacidad de producción de reservas celulares, también conocido como régimen de “banquetes y hambrunas” (Salehizadeh y Van Loosdrecht 2004 citados en Phulia 2012), en los cuales la biomasa microbiana almacena reservas celulares en condiciones de exceso de disponibilidad de nutrientes con las que los microorganismos pueden salvar los períodos de escasez de nutrientes. Por lo tanto, si uno de los beneficios del sistema Biofloc, es tener un aporte nutricional extra (Avnimelech 2006, Hari *et al.* 2006, Ponis *et al.* 2003, Spolaore *et al.* 2006, Wang 2003) los productos de almacenamiento pueden ser de gran importancia para el valor añadido que los bioflocs aportan a alimentación. Como tal, puede no ser aconsejable aplicar las fuentes de carbono orgánico en modo continuo si el objetivo es producir materiales de reserva.

#### 2.4.4. Alcalinidad y pH

La cantidad de carbonatos, medido en términos de alcalinidad del agua, puede ser un factor limitante que afecta los procesos metabólicos de las bacterias heterótrofas por ello la cantidad mínima requerida en el medio acuático debe ser mayor a  $50 \text{ mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ . Es

por ello que la alcalinidad es un parámetro que debe controlarse constantemente en los cultivos con biofloc (De Schryver *et al.* 2008).

Asimismo, la utilización de bicarbonato sódico, hidróxido o carbonato de calcio son eficaces para aumentar la alcalinidad y mantener el pH adecuado en el cultivo, dado que el metabolismo de los peces y microorganismos consumen cantidades importantes de alcalinidad se debe monitorear y evitar la reducción brusca de pH (De Schryver *et al.* 2008, Martins *et al.* 2017), ya que éste determina la estabilidad en los bioflocs presentes en los estanques de cultivo. Una fuente de carbonatos aumenta la capacidad buffer del agua (Hargreaves 2013, Martins *et al.* 2017), manteniendo los niveles de pH neutro a ligeramente alcalino (Collazo y Arias 2015).

El pH influye en el crecimiento microbiano ya que muchas enzimas se inactivan a valores muy altos o muy bajos de pH; sin embargo, también varían los intervalos de tolerancia al pH de los distintos microorganismos (Miravet 2015). El pH y la alcalinidad en sistemas de producción con BFT normalmente permanecen estables en el agua con rangos y valores de 7 – 9 y > 50 mg de CaCO<sub>3</sub> /L respectivamente, existiendo una relación directa entre los procesos de nitrificación y la alcalinidad e inversos en relación con el pH, en este sentido cuando el pH es alto promueve toxicidad por amonio no ionizado (Avnimelech 2009, Hargreaves 2013), sin embargo una alcalinidad entre 40 – 100 mg.L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub> genera un efecto buffer que disminuye la oscilación del pH (Boyd, 2002; Hargreaves, 2013). También la temperatura del agua afecta al pH teniendo correlaciones positivas, es decir que mayor temperatura mayor pH y mayor amonio tóxico (Emerson, 1975 citado en Arias y Collazos, 2015).

#### 245. Control y mantenimiento de los niveles de sólidos

En la matriz del flóculo se da una combinación de propiedades físicas, químicas múltiples fenómenos biológicos (De Schryver *et al.*, 2008). Por ello, un estudio cuantitativo y predictivo podría resultar muy complicado debido a que una serie de procesos son llevados a cabo simultáneamente, además el cambio de concentración de los flóculos con el tiempo

se ve afectada por predación por otros microorganismos y biodegradación, el consumo de bioflocs por los peces, las condiciones ambientales y operativas en el manejo como por la cosecha, el tiempo de residencia del agua, la intensidad de mezclado, entre otros (Avnimelech, 2007).

Avnimelech (1999) señala que una forma práctica de cuantificar el biofloc es a través de métodos de sedimentación con uso del cono Imhoff, que permite conocer los mililitros partículas sedimentadas por litro de agua de biofloc en un determinado tiempo, conocidos como sólidos suspendidos (SS). Por otro lado, el método gravimétrico permite determinar el peso seco total de todas las partículas en suspensión, llamados sólidos suspendidos totales (SST) y se cuantifica en gramos por litro de muestra. Asimismo, una forma indirecta de determinar la concentración de la biomasa bacteriana es a través de la cuantificación de los Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV) que permite estimar la concentración de microorganismos contenida en la biomasa y así monitorear su crecimiento (Azim *et al.*, 2008).

Los altos niveles sólidos suspendidos (superiores a  $500 \text{ ml.g}^{-1}$ ) generan la obstrucción de branquias, reduciendo la captación de oxígeno y el crecimiento de los organismos; este estrés y su impacto en el cultivo dependerá principalmente de las especies y de la disponibilidad de oxígeno disuelto en el agua (Colt, 2006; Huntingford *et al.*, 2006). En la Tabla 1 se presenta un resumen de estos métodos de cuantificación de sólidos.

**Tabla 1: Parámetros de cuantificación de sólidos y métodos para su estimación (Modificado de De Schryver et al., 2008).**

Definición		Determinación	Rangos recomendados
Sólidos Suspendidos (SS)	Son los materiales que sedimentan de una suspensión en un período de tiempo definido.	Mediante el uso de un cono Imhoff	Se sugiere que en cultivo de peces no debe superar los 50 ml.L <sup>-1</sup> (Avnimelech, 2011).
Sólidos Suspendidos Totales (SST)	La cantidad de materia particulada presente en una muestra de agua del estanque (g.L <sup>-1</sup> SST)	Las partículas son separadas del agua por filtración o centrifugación y son secadas durante una hora a 100°C.	0.2 -1.0 g.L <sup>-1</sup> (De Schryver <i>et al.</i> , 2008).
Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV)	La cantidad de materia orgánica en forma particulada de una muestra del tanque (g.L <sup>-1</sup> SSV)	Después del secado, los sólidos suspendidos son incinerados a 550±50°C. Los SST menos el producto de la incineración es el valor de los SSV.	N.D.

\* La determinación de los parámetros se lleva a cabo por métodos estándar de acuerdo con los métodos estandarizados de evaluación de calidad de agua (APHA, 2012) a menos que se indique lo contrario.

## 2.5. Cultivo de tilapia (*Oreochromis niloticus*) en BFT

La tilapia pertenece a la familia de los cíclidos (*ciclididae*), es una especie de origen africano y habita regiones tropicales del mundo que presentan condiciones favorables para su reproducción y crecimiento. En Perú las principales especies comerciales son la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) y la tilapia roja (*Oreochromis spp*) (Argumedo y Rojas, 2000). La tilapia presenta cualidades potenciales para intensificar su cultivo, entre ellas encontramos el crecimiento acelerado, tolerancia a altas densidades, adaptación al cautiverio, aceptación a una amplia gama de alimentos, resistencia a enfermedades y aclimatación en medios acuáticos (dulces, salobres o marinos) y tolerancia a bajos niveles de oxígeno, eficiencia de conversión alimenticia, entre otras características; por ello es una especie óptima para desarrollar su cultivo intensivo en cultivos con Tecnología Biofloc (Emerenciano 2012). Comercialmente, la tilapia presenta características atractivas como carne blanca y rendimiento en el filete por ello se reportan importantes producciones acuícolas en los últimos 10 años (FAO 2016).

En referencia a la adaptabilidad de las tilapias en cultivos biofloc, Magondu *et al.* (2013) indican que los peces como la tilapia son capaces de alimentarse filtrando las partículas sólidas del medio. Avnimelech (2007) evaluó la asimilación de los bioflocs en el cultivo de tilapia (*Oreochromis niloticus*) concluyendo que pueden ser una fuente potencial efectiva de alimento para esta especie; asimismo indica que los flocs microbianos contribuyen con casi el 50% del requerimiento de proteína para su crecimiento. Por su parte Azim y Little (2008) evaluaron el uso de BFT en cultivo de tilapia del Nilo determinando que la producción neta de pescado fue 45% más alta que en los tanques con cultivos convencionales.

Los parámetros mencionados a continuación deben ser considerados para brindar las condiciones adecuadas de cultivo para esta especie. Oxígeno disuelto, se recomiendan valores por encima de los 3 - 4 mg.L<sup>-1</sup> (Saavedra, 2006), los peces tropicales pueden sobrevivir con valores menores a 0.5 mg.L<sup>-1</sup>, gracias a su capacidad de disminuir su consumo de oxígeno y de extraerlo de la interfase agua – aire; sin embargo, con concentraciones menores a 3 mg.L<sup>-1</sup> su metabolismo y crecimiento comienzan a disminuir (Popma y Lovshin, 1996).

Las tilapias son animales poiquiloterms (su temperatura corporal depende de la temperatura del medio) y altamente termófilos (dependientes y sensibles a los cambios de temperatura). Habitan naturalmente a temperaturas que oscilan entre 20 y 30°C (Baltazar y Palomino 2004), siendo preferible una temperatura de 27°C (Baltazar y Palomino 2004, Saavedra 2006). Viven en medios acuáticos con una dureza normalmente alta para proporcionar una buena condición de mucus en la piel y el rango óptimo de pH del medio se debe encontrar entre 6.5 y 8.5, siendo 7.5 ideal para su crianza, mientras los valores entre 4.5 y 5.5 son perjudiciales para su reproducción (Popma y Lovshin 1996). Arias y Collazos (2015) indican que en cultivos de tilapia con tecnología biofloc, mantener la alcalinidad entre 40 – 100 mg.L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub> genera un efecto buffer que disminuye la oscilación del pH, mientras Mejía (2014) necesario mantener una concentración en el rango de 70-150 mg.L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>

Concentraciones de amonio ionizado de 1.5 mg.L<sup>-1</sup> a más pueden resultar perjudiciales para la mayoría de especies incluyendo las especies tropicales como la tilapia; dependiendo de las condiciones de pH y temperatura. Kubitzka (2000) y Pereira y Mercante (2005), indican que niveles controlados de amonio evitaran exponer a especies tropicales a los efectos del amoniaco, estos valores deben ser menores a 2,0 mg.L<sup>-1</sup> cuando el pH se encuentra entre 7,5 y 8,0. Con respecto al amonio no ionizado o amoniaco (tóxico) los valores aceptables en especies tropicales son sólo de 0.025 mg.L<sup>-1</sup> (Neori *et al.* 2004 citado en Crab *et al.* 2007, Chen *et al.* 2006). Por otro lado, Kubitzka (2000) señala que los valores de amoniaco deben ser menores a 2 mg.L<sup>-1</sup> y Dos santos *et al.*, (2009) citado en Zapata (2016), indica rangos de 0.4 mg.L<sup>-1</sup> y 2.0 mg.L<sup>-1</sup>.

En referencia a los compuestos derivados de la nitrificación valores mayores a 5 mg.L<sup>-1</sup> de nitritos (N-NO<sub>2</sub>) provocan mortalidad de tilapia y en el caso de nitratos (N-NO<sub>3</sub>) concentraciones iguales o mayores a 600 a 700 mg.L<sup>-1</sup> generan estrés en esta especie (Rakocy *et al.*, 2000; Liñán 2007).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Lugar y periodo experimental

El presente experimento se llevó a cabo en el Centro de Investigación Piscícola (CINPIS) de la Universidad Nacional Agraria La Molina, Facultad de Pesquería ubicado en el departamento de Lima - Perú y se desarrolló bajo condiciones de invernadero entre los meses de agosto hasta noviembre del 2014. Estuvo dividido en dos etapas, una fase pre-experimental cuyo objetivo fue preparar el agua de biofloc y tuvo una duración de un mes, y la segunda fase fue la experimental propiamente dicha con una duración de dos meses.

#### 3.2. Etapa pre - experimental

Se prepararon dos biorreactores para la formación de biofloc *in situ* (Anexo 1), siguiendo la metodología recomendada por Mejía (2014), empleando una densidad inicial de  $1.6 \text{ kg.m}^{-3}$  de juveniles de tilapia con peso individual promedio de 200 gramos y se suministró alimento balanceado de 35% de proteína a una tasa alimenticia de 4%. La relación carbono: nitrógeno empleada en esta etapa fue de 12.5:1.

Se controló el desempeño del sistema tomando mediciones diarias de temperatura, oxígeno, pH y luminosidad a las 08:00 y 15:00 horas. La alcalinidad se midió a las 08:00 horas y los compuestos nitrogenados disueltos (nitrógeno amoniacal total -TAN, nitritos-  $\text{N-NO}_2$  y nitratos-  $\text{N-NO}_3$ ) se midieron dos veces a la semana a las 13:00 horas, la determinación de sólidos sedimentables (SS) se midieron diariamente a las 07:00 horas con el cono Imhoff y se realizaron pruebas microbiológicas y determinación de sólidos suspendidos totales (SST) dos veces por semana. Las metodologías se detallan en la sección 3.3 del presente capítulo.

Al finalizar la etapa pre-experimental, el nivel de sólidos sedimentables de cada biorreactor se restableció a  $30 \text{ mL.L}^{-1}$  del biofloc y luego el volumen de agua fue distribuido en cantidades iguales a las unidades experimentales

### 3.3. Diseño experimental e instalaciones

Se empleó un diseño completo al azar (DCA) con tres tratamientos usando tres repeticiones para cada uno. Se sorteó la asignación de los tratamientos en tanques de cultivo como unidades experimentales (Figura 3):

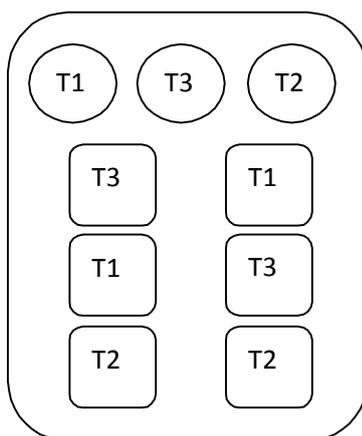


Figura 3. Aleatorización de los tratamientos en las unidades experimentales

Se trabajó con nueve unidades experimentales (seis tanques de concreto con dimensiones de 0.8 m de largo, ancho y alto, y tres tanques circulares de fibra vidrio con 1m de alto y 0.85 m de diámetro), con un volumen efectivo de 350 litros. La aireación se suministró con un *blower* (marca *Sweetwater*) con potencia de 1/3 HP, el aire fue conducido a través de una estructura de tuberías de PVC de 1/2" que desembocó sobre los tanques. Las tuberías se conectaron a manguerillas de silicona y a piedras difusoras de cerámica con 30  $\mu$  de porosidad, con dimensiones de 8 cm de largo y 2 cm de ancho, distribuidas de forma equidistante en el fondo de los tanques, disponiendo tres piedras difusoras en cada uno. La temperatura se reguló empleando termostatos de 300W en cada estante, tres en cada uno, hasta lograr la temperatura de  $27\pm 1^\circ$  C (Baltazar y Palomino 2004, Saavedra 2006). Adicionalmente, se cubrieron las ventanas laterales del invernadero con papel plastificado color negro con la finalidad de evitar el ingreso de luz y así controlar el crecimiento de organismos autótrofos (microalgas), como se observa en la Figura 3.

### 3.4. Mantenimiento de las unidades experimentales

#### a) Manejo de la alimentación

Los tres tipos de alimento formulado (tratamientos), suministrados al cultivo de alevines de tilapia *Oreochromis niloticus*, son detallados en la siguiente tabla:

**Tabla 2: Composición del alimento balanceado**

Composición (%)	T1	T2	T3
a) Humedad	9.20	8.97	7.94
b) Proteína Total (Nx6.25)	<b>30.41</b>	<b>34.78</b>	<b>40.06</b>
c) Grasa	15.43	14.01	12.42
d) Fibra cruda	4.75	3.81	14.11
e) Ceniza	8.33	8.23	8.84
f) Nifex	31.88	30.20	26.63

FUENTE: Laboratorio LENA

La fuente de nitrógeno amoniacal total (NAT) para el desarrollo de bacterias en el biofloc fue producida por la excreción de alevines machos de tilapias (*Oreochromis niloticus*) de peso inicial promedio de  $0.8 \pm 0.05$  gramos, sembrados a una densidad de  $0.35 \text{ kg.m}^{-3}$ , y de los restos de alimento no consumido.

A cada estanque con peces se suministró diariamente alimento balanceado a una ración inicial del 12% de la biomasa de peces de cada unidad de cultivo (Chowdhury, 2011) y semanalmente se realizaron muestreos a la población total de tilapias para ajustar la tasa de alimentación de acuerdo a su crecimiento, para ello se empleó una balanza portátil con capacidad de 600 g (precisión 0.001g).

Los horarios de alimentación fueron a las 08.00 am, 11.00 am, 2:00 pm y 5:00 pm, con suspensión en los días de muestreo biométrico realizado semanalmente (excepto de la ración de las 5:00 pm). En estos días se determinó el incremento de peso de la especie cultivada para ajustar la tasa de alimentación.

**Tabla 3: Tasa de Alimentación empleada durante ocho semanas experimentales.**

<b>Tiempo</b>	<b>TA (%)</b>
Semana 1	12%
Semana 2	12%
Semana 3	8%
Semana 4	8%
Semana 5	7%
Semana 6	7%
Semana 7	6%
Semana 8	6%

FUENTE: Modificado de Chowdhury, 2011.

Se repuso el 10% de agua para compensar las pérdidas de biofloc en las biometrías o por evaporación, para ello se mantuvo un reservorio de agua de 1.6 m<sup>3</sup> con aireación constante y a 27±1°C, para evitar cambios bruscos de temperatura con la reposición de agua nueva.

b) Manejo de la relación carbono y nitrógeno (C:N)

En el presente estudio se empleó la relación C:N de 10:1, dado que existen pocos estudios sobre cuantificación bacteriana en cultivo con tecnología biofloc la relación empleada sirve de base para aportar a un mejor conocimiento sobre el manejo de sólidos considerando los patrones de la comunidad bacteriana heterotrófica en este tipo de sistemas, y bajo similares condiciones.

Debido a que el alimento formulado con 30% de proteína (tratamiento T1) tiene una relación C:N (10.8:1) muy próxima a la relación establecida en este experimento, se estandarizaron todas las unidades a esta relación. En la Tabla 3 se observa las relaciones C:N que presentan los tratamientos en función s los tipos de alimento formulados empleados.

**Tabla 4: Relación C:N del alimento balanceado empleado.**

<b>Concentración proteica de los tratamientos</b>	<b>T1 (30%)</b>	<b>T2 (35%)</b>	<b>T3 (40%)</b>
<b>Relación C:N</b>	10.8	9.4	8.1

FUENTE: Avnimelech (2012)

En los tratamientos T2 y T3 se adicionó melaza como fuente de carbono hasta lograr la misma relación (C:N=10.8), procurando que las comunidades bacterianas heterótrofas crezcan bajo en las mismas condiciones de nutrientes. La cantidad de melaza a emplear en dichos tratamientos se determinó mediante la ecuación siguiente:

$$\Delta CH \text{ (g)} = \frac{[(11 - (\frac{C}{N})) \times F \times \%P \times \%N \times \%E]}{\%C}$$

(Modificado de De Schryver, 2008)

Donde:

- ( $\Delta CH$ ): Dosis de carbono
- C:N: Relación carbono/nitrógeno en el alimento
- F: Cantidad de alimento suministrado diariamente
- %P: Porcentaje de proteína en el alimento
- %N: Porcentaje de Nitrógeno en el alimento (16% de la proteína es nitrógeno según Craig y Helfrich, 2002 citado en De Schryver *et al.*, 2008)
- %E: Porcentaje de nitrógeno en el agua producto de la amonificación (82% de nitrógeno liberado al medio según Green y Boyd, (1998).
- %C: Porcentaje de pureza de la melaza (50% de pureza contiene la melaza, según Fajardo y Sarmiento, 2007; citado en Mejía, 2014)

### c) Manejo de los sólidos

La concentración de sólidos sedimentables se estandarizó a 30 ml.L<sup>-1</sup> en todas las unidades experimentales. Debido a que la acumulación de partículas es constante (Collazos y Arias 2015), se midió a diario con el cono Imhoff y se controlaron quincenalmente para mantener los niveles de partículas por debajo de los 50 ml.L<sup>-1</sup>.

Para el control de sólidos se realizaron filtraciones quincenales, con proporciones matemáticas se determinó el volumen de agua que contenía la cantidad de sólidos superior a 30 ml.L<sup>-1</sup>, para ello se empleó la lectura del cono Imhoff *in situ* y el volumen de agua total de cada estanque. El biofloc retirado se filtró con una malla fina (300  $\mu$ m) y el agua filtrada se retornó a cada estanque, finalmente se volvió a medir la concentración de sólidos con el cono Imhoff para verificar el resultado.

d) Corrección de la alcalinidad

El valor estándar que se empleó en el presente estudio fue de 100 mg.L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub> y la fuente de carbonatos empleado fue bicarbonato de sodio. La corrección de alcalinidad se corrigió en todos los tanques cuando al menos uno presentó niveles inferiores a 75 mg.L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>. La cantidad adicionada según el requerimiento de cada unidad experimental se calculó según la tabla de Loyless y Malone (2011), que se encuentra en el Anexo 2. El bicarbonato fue previamente diluido y adicionado lentamente para evitar cambios bruscos de pH.

e) Control de los parámetros del cultivo

Los parámetros monitoreados en el presente estudio se presentan en la Tabla 5, en la que se especifica la hora de muestreo, frecuencia de medición, método o instrumento empleado, y valores referenciales para su control.

**Tabla 5: Medición de parámetros abióticos y equipos empleados**

Parámetro	Unidad	Hora de maestro	Frecuencia	Rangos	Método/Instrumento
Temperatura	°C	08:00 17:00	diaria	27±1°C (Widarnani <i>et al.</i> 2012)	Oxímetro marca <i>HACH</i>
Oxígeno disuelto	mg.L <sup>-1</sup>			>4mg.L <sup>-1</sup> (Saavedra 2006)	Oxímetro marca <i>HACH</i>
pH	-			7±0.5 (Widarnani <i>et al.</i> 2012)	Potenciómetro de mano marca <i>PHTester20</i>
Luminosidad	Klux			13:00	-
Turbidez	UNF	13:00	3/semana	-	Turbidímetro marca <i>HACH</i>
Alcalinidad	mg CaCO <sub>3</sub>	09:00	diaria	70-100 mg.L <sup>-1</sup> (Mejía, 2014)	Tabla de alcalinidad de Loyless y Malone (2011).

### 3.5. Métodos de muestreo

Para obtener las muestras de agua destinadas al análisis microbiológico de cuantificación de comunidades bacterianas heterótrofas se utilizaron botellas de vidrio estériles de 100 ml de capacidad debidamente rotuladas. Las muestras se colectaron a nivel medio de profundidad y en la parte central de los tanques, los cuales fueron refrigerados inmediatamente después a una temperatura de 5°C en una nevera eléctrica por un tiempo menor a 6 horas (APHA 2012).

La toma de muestras se realizó dos veces a la semana durante ocho semanas, y fueron colectadas entre las 7:00 y 8:00 am, 14 horas después de la última alimentación del día anterior. Durante la experimentación se verificó constantemente que los aireadores estén limpios y dispuestos correctamente para lograr una mezcla homogénea del agua.

La turbidez fue medida tres veces por semana a la 1:00 p.m. empleando un turbidímetro marca *LA MOTTE*. Los volúmenes de las muestras fueron de 10 ml y los valores fueron expresados en UTN (Unidad de Turbidez Nefelométrica).

En el caso del muestreo para el análisis de compuestos nitrogenados y alcalinidad se emplearon envases plásticos de 50 ml tomando las muestras del mismo punto para el muestreo microbiológico. La colecta se realizó tres veces por semana a la 1:00 pm y en el caso del muestreo para la medición de alcalinidad se realizó diariamente a las 09:00 am.

#### **Método de cuantificación de bacterias heterótrofas**

Se empleó la metodología de “Numeración de bacterias heterótrofas en placa” (APHA, 2012), que permitió obtener el número de bacterias en unidades formadoras de colonias (UFC).

Se utilizó 1 mililitro de muestra homogenizada de biofloc de cada unidad experimental y se realizaron diluciones sucesivas a razón de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$  en tubos de ensayo con 9 ml de solución salina peptonada. De cada dilución se tomaron alícuotas de 1 ml las

cuales fueron sembradas en placas Petri con medio de cultivo Plate Count Agar (PCA), utilizando la técnica de vertido en placa y empleando una placa en blanco con el medio de cultivo como testigo. Las placas fueron incubadas a 37°C por 24 horas y se realizó el método de conteo diario de UFC (unidades formadoras de colonias) empleando un contador de colonias manual (Anexo 3).

Se registró como resultado el número promedio de UFC presentes en placas sembradas a una dilución determinada que presentó entre 30 y 300 UFC, siendo calculados a través de la siguiente ecuación:

$$UFC/ml = \frac{\text{Número de colonias} \times \text{factor de dilución}}{\text{mililitros de muestra sembrados en placa}} \quad (\text{APHA, 2012})$$

### **Método de cuantificación de sólidos**

Para cuantificar los sólidos suspendidos totales (SST) y sólidos suspendidos volátiles (SSV) se emplearon botellas de vidrio de 500 ml de capacidad debidamente rotuladas, la misma muestra sirvió para realizar las dos pruebas. La toma de muestras se realizó tres veces por semana y fueron colectadas a las 8:00 am, inmediatamente después de la toma de muestras microbiológicas.

Para determinar los sólidos sedimentables se tomó una muestra de 1 litro de cada tanque con ayuda de un recipiente (una jarra), inmediatamente el contenido se vertió en un cono Imhoff dispuesto para cada unidad experimental, y se dejó sedimentar por un periodo de 45 minutos (APHA, 2012) para realizar la lectura de los mililitros de biofloc contenidos en 1 litro.

En el caso de los sólidos suspendidos totales (SST) se tomaron 50 ml de las muestras colectadas. Previamente cada muestra fue agitada y homogenizada e inmediatamente filtrada empleando papel de fibra de vidrio (0,45 µm), un embudo de filtración y una bomba de succión con una potencia de ½ HP. Se empleó agua destilada para retirar los sólidos disueltos en las muestras y obtener el peso exclusivamente de las partículas

suspendidas, el tiempo de succión empleado en cada muestra fue de 3 minutos. Luego de la filtración, el papel de fibra fue retirado y colocado en placas Petri para su secado en estufa, de la marca Memmert, por un lapso de 1 hora a temperaturas de 103°C a 105°C y una vez retirados se dejaron enfriar en un desecador y se pesaron en una balanza electrónica de la marca Sartorius (0.0009).

Los cálculos matemáticos empleados para la determinación de SST, se describe en la siguiente ecuación:

$$SST, mg/L = \frac{(P2 - P1) \times 1000}{V} \quad (\text{APHA, 2012})$$

Donde:

- SST: Son los materiales retenidos por un filtro estándar de fibra de vidrio y secado a 103 - 105°C (APHA 2012).
- P1: Peso inicial del filtro preparado (mg.L<sup>-1</sup>)
- P2: Peso del filtro más el residuo seco a 103-105°C (mg.L<sup>-1</sup>)
- V: Volumen de la muestra

Para realizar la determinación de Sólidos Suspendidos Volátiles (SST) se empleó los sólidos obtenidos en el procedimiento anterior. Los filtros con los sólidos fueron colocados en envases de porcelana y se llevaron a incineración en una mufla a 550°C ± 50°C durante 1 hora. Una vez retirados con ayuda de una pinza, se dejaron enfriar los filtros en un desecador para evitar la ganancia de humedad, una vez enfriadas las muestras se pesaron en una balanza electrónica. La cantidad de cenizas obtenidas en cada papel filtro representan los Sólidos Suspendidos Fijos (SSF) que son las trazas de minerales contenidas en el agua de biofloc. Para la determinación de Sólidos Suspendidos Volátiles se emplea la siguiente ecuación:

$$SSF, mg/L = \frac{(P3 - P1) \times 1000}{V} \quad \dots\dots\dots (\text{Ecuación 1})$$

$$SSV, mg/L = SST - SSF \quad \dots\dots\dots (\text{Ecuación 2})$$

Donde:

- SST: Son los residuos resultantes luego de calcinar a  $550\pm 50^{\circ}\text{C}$  la muestra de sólidos retenida en el filtro (APHA, 2012).
  - SSV: Corresponden a los compuestos perdidos durante la calcinación de la muestra retenida en el filtro. (APHA, 2012)
  - P1: Peso inicial del filtro ( $\text{mg.L}^{-1}$ )
  - P3: Peso del filtro más el residuo calcinado a  $550\pm 50^{\circ}\text{C}$  ( $\text{mg.L}^{-1}$ )
- V: Volumen de la muestra

### **Método para la determinación de compuestos nitrogenados**

Previo al análisis fisicoquímico de Nitrógeno Amoniacal Total se filtraron las muestras de biofloc con papel filtro de  $9\ \mu\text{m}$  y fueron diluidas con agua desionizada al 10 por ciento. La medición se realizó mediante técnicas espectrofotométricas (colorimetría). Adicionalmente se midieron los valores de nitritos y nitratos dos veces por semana, empleando la misma metodología de determinación. Los equipos y reactivos específicos empleados se describen en la Tabla 6.

Para la medición de los compuestos nitrogenados por métodos de colorimetría (ver Tabla 6) se empleó un espectrofotómetro de la marca HACH modelo DR/2500. La alcalinidad se midió usando el método de titulación ácido-base empleando ácido sulfúrico previamente valorizado (0.02 N) e indicador mixto (rojo de metilo y azul de bromocresol), previo a la realización de cada prueba se retiraron las partículas de cada una de las muestras con papel filtro de  $9\ \mu\text{m}$ .

**Tabla 6: Métodos para la determinación de compuestos nitrogenados**

Parámetro	Unidad	Hora de muestreo	Frecuencia	Rangos	Método/Instrumentos
Nitrógeno amoniacal total (TAN)	mg.L <sup>-1</sup>	13:00	3/semana	<1.5 mg.L <sup>-1</sup> (Avnimelech 2011a)	Colorimetría/Método Nessler (absorbancia 655 nm)
Nitrito (N-NO <sub>2</sub> )	mg.L <sup>-1</sup>		2/semana	>5 mg.L <sup>-1</sup> (Liñan 2007)	Colorimetría/Método de Diazonización (absorbancia 507 nm)
Nitrato (N-NO <sub>3</sub> )	mg.L <sup>-1</sup>			600 – 700 mg.L <sup>-1</sup> (Rakocy et al. 2000, Liñan 2007)	Colorimetría/Método de Reducción del Cadmio (absorbancia 500 nm)
Amonio no ionizado (N-NH <sub>3</sub> )	mg.L <sup>-1</sup>	-	-	0.4-2 mg.L <sup>-1</sup> (Dos Santos et al. 2009)	Metodología de Thurston et al. (1979) – ver Anexo 4

### 3.6. Procesamiento de datos

Se empleó el programa *Microsoft Excel* (versión 2010), para clasificar la información por tratamiento y semana de evaluación, y se calculó el promedio, desviación estándar, y valores máximos y mínimos de los parámetros evaluados (población bacteriana, producción de sólidos y producción de compuestos nitrogenados) y de los parámetros ambientales del cultivo (temperatura, oxígeno, pH y alcalinidad).

El Análisis de Varianza de Medidas Repetidas, que permite evaluar el efecto del tratamiento a través del tiempo aplicado a una misma población, se efectuó empleando el paquete estadístico *SPSS Statistics Base (22<sup>nd</sup> Edition)* para evaluar el efecto del por-

centaje de proteína contenida en el alimento (tratamientos) sobre la población de bacterias (variable en estudio) y su efecto en el tiempo. Este análisis fue validado al verificar los supuestos de Normalidad, Homogeneidad de Varianzas y de Autocorrelación en los datos con las pruebas de Anderson Darling, prueba Bartlett y la prueba de Durbin Watson, respectivamente. Finalmente, la comparación entre tratamientos se realizó con la Prueba Tukey y para relacionar las variables en estudio, se aplicó el análisis de Correlación de Pearson, a un nivel de significancia de 0.05.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Control de los parámetros abióticos

#### 4.1.1. Temperatura y oxígeno

Durante ocho semanas los valores promedio de temperatura mínimos y máximos registrados en las unidades experimentales fueron 26.3°C y 30.7°C. Los tratamientos no presentaron diferencias significativas entre ellos y si existió una ligera variabilidad entre la temperatura en la mañana (27±0.45°C) y la tarde (28.47±0.56°C), por efecto de las condiciones ambientales (Tabla 7).

**Tabla 7. Concentración promedio semanal de los parámetros abióticos monitoreados bajo los tratamientos aplicados.**

PARÁMETRO	TURNO	T1 (30% Proteína)	T2 (35% Proteína)	T3 (40% Proteína)
Temperatura (°C)	8:00 a. m.	27.9±0.39 a,b (26.3-29.4)	27.89±0.41 a,b (26.6-29.1)	27.8±0.56 a,b (26.1-30.0)
	5:00 p. m.	28.38±0.56 a,a (26.7-29.8)	28.53±0.53 a,a (27.7-29.8)	28.51±0.57 a,a (26.7-30.7)
OD (mg/L)	8:00 a. m.	6.94±0.21 a,a (6.52-7.33)	6.84±0.24 a,a (6.38-7.16)	6.87±0.31 a,a (6.56-7.26)
	5:00 p. m.	6.71±0.21 a,a (6.33-7.05)	6.53±0.33 b,b (6.26-6.80)	6.56±0.30 ab,b (6.25-6.95)
pH	8:00 a. m.	7.8±0.08 a,a (7.57-7.96)	7.72±0.13 a,a (6.87-7.91)	7.72±0.12 a,a (7.41-7.95)
	5:00 p. m.	7.75±0.12 a,a (7.12-7.94)	7.69±0.09 ab,a (7.39-7.87)	7.66±0.11 b,a (7.33-7.93)
Alcalinidad Total (mg/l CaCO <sub>3</sub> )	9:00 a. m.	87.59±5.57a (73.45- 99.46)	88.61±5.80 ab (76.3-101.7)	85.23±7.49 b (57.91- 105.6)
Luminosidad (Klux)	1:00 p. m.	10.87±2.87a (7.62-16.63)	10.93±2.78a (8.02-16.24)	10.42±2.77a (7.50-15.67)
Turbidez (NTU)	1:00 p. m.	250.49±29.15a (152.5-322.67)	257.16±34.44a (152.0-361.33)	262.83±27.96a (188.0-349.67)

Los valores reportados de temperatura y oxígeno se encuentran dentro de los rangos recomendados por Hargreaves (2006) y Widanarni *et al.* (2012) quienes señalan que estas condiciones favorecen el crecimiento de las comunidades bacterianas heterótrofas. Asimismo, De Schryver *et al.* (2008) recomienda temperaturas entre 20°C a 27°C para mantener el crecimiento bacteriano heterótrofo controlado evitando el exceso de producción de sólidos. Debido a la estabilidad de la temperatura no se presentaron condiciones de defloculación (generado a temperaturas menores a 20°C) o *bulking filamentoso* causado por mantener condiciones mayores a 33°C de temperatura (Krishna y Van Loosdrecht 1999).

Los valores de oxígeno disuelto presentaron un rango de 6.25 mg.L<sup>-1</sup> a 7.33 mg.L<sup>-1</sup>, con un promedio semanal de 6.74±0.3 mg.L<sup>-1</sup>. Se observó que la concentración de oxígeno registrado en la mañana no presentó diferencias significativas entre tratamientos, mientras que en horas de la tarde la concentración de oxígeno disminuyó ligeramente alcanzando los mínimos valores en los tratamientos T2 (35% de proteína) y T3 (40% de proteína). Este comportamiento responde a la demanda de oxígeno de los organismos del cultivo, especialmente en horas de la tarde debido a que su actividad metabólica es mayor por el incremento de la temperatura, (Avnimelech, 2008 y Phulia *et al.* 2012), indican que el consumo de oxígeno disuelto es consecuencia de la oxidación de la materia orgánica en los procesos de degradación de nutrientes, así como de la respiración de los organismos del cultivo.

Avnimelech (2011), Avnimelech *et al.* (2008) y Ulrich (1980) indican que los procesos de remineralización de la materia orgánica consumen oxígeno debido a que la tasa respiratoria de una bacteria se encuentra ligada a su tasa de crecimiento, por ello es necesario que en sistemas con biofloc el suministro de oxígeno sea adecuado para mantener concentraciones mayores a 4 mg.L<sup>-1</sup>.

Cabe señalar que en la fase de alevinaje es conveniente el mantenimiento del oxígeno disuelto cercano a 6 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> con saturaciones mayores del 60%, considerando que existe una relación inversa entre el consumo de oxígeno y el peso corporal, así como un efecto positivo de la temperatura del agua sobre la tasa metabólica para tilapia

(Timmons *et al.*, 2002; Valbuena y Cruz, 2006), lo cual se refleja en los resultados del presente estudio (Figura 4).

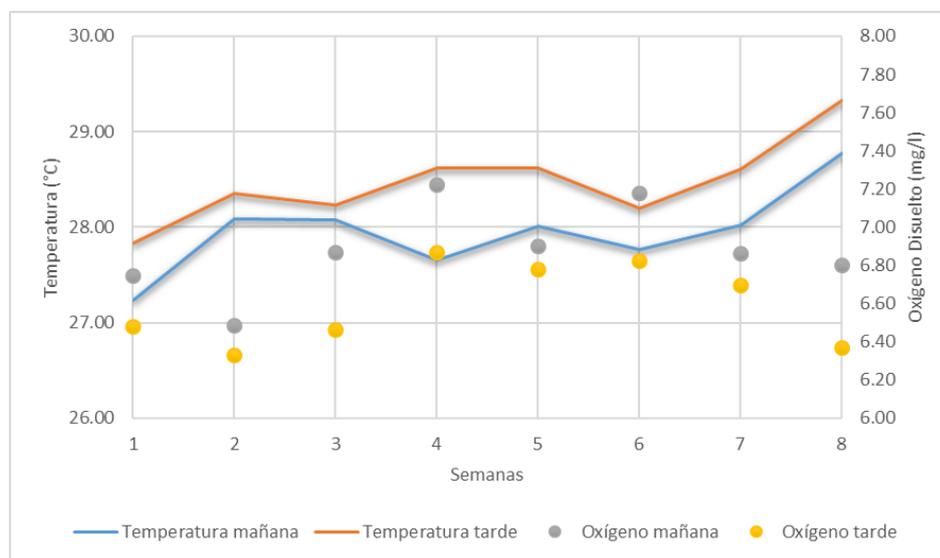


Figura 4. Variación semanal promedio de la temperatura (T) y concentración de oxígeno disuelto ( $\text{mg.L}^{-1}$ )

#### 4.1.2. pH y Alcalinidad Total

Los valores de pH se mantuvieron estables en la mañana y en la tarde con un promedio de  $7.72 \pm 0.12$ , los valores mínimos y máximos registrados fueron entre 7.28 y 7.91. Asimismo, los valores promedios de la alcalinidad fueron  $87.59 \pm 5.57 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$ ,  $88.61 \pm 5.80 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$  y  $85.23 \pm 7.49 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$  en los tratamientos T1 (30% de proteína), T2 (35% de proteína) y T3 (40% de proteína) respectivamente, encontrándose diferencias significativas entre los tres tratamientos aplicados ( $\alpha < 0.05$ ).

El tratamiento que consumió más la fuente de carbonatos fue T3 (40% proteína), llegando a presentar en ocasiones los valores más bajos ( $57.91 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{CaCO}_3$ ), a pesar de ello este valor no fue crítico para el cultivo ya que en sistemas de producción con BFT normalmente se encuentran valores mayores a  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{CaCO}_3$  con pH entre 7 – 9 (Avnimelech 2009).

Este resultado indica que este tratamiento presentó mayor actividad bacteriana, según Ebeling (2006), 3.57 gramos de alcalinidad son consumidos por cada gramo de TAN asimilado dentro de la biomasa bacteriana heterótrofa para producir 8.07 gr de biomasa, mientras que cada gramo de amoníaco oxidado a nitrato consume cerca de 7.07 g de alcalinidad para producir 0.17 g de biomasa bacteriana nitrificante, de acuerdo a Ling & Blancheton (2006).

Hay que considerar en sistemas sin recambio de agua el proceso de nitrificación completo requiere de cinco a siete semanas aproximadamente para su estabilización (Nootong et al. 2011). En la Figura 6 se observa que los tratamientos presentaron el mayor consumo de carbonatos durante las cinco primeras semanas, indicando un mayor consumo de carbonatos por las bacterias heterótrofas que se encontraban de manera predominante, y principalmente del tratamiento T3 cuyos azúcares simples (melaza) fueron fácilmente tomados por la comunidad bacteriana heterótrofa.

El tratamiento T1 (30% de proteína), en comparación al tratamiento T2 y T3, fue el tratamiento que menos alcalinidad consumió, recordemos que este tratamiento no usó melaza en comparación a los otros tratamientos y se empleó el menor nivel de proteína, lo cual pudo afectar negativamente en el crecimiento bacteriano.

Cabe indicar que el consumo de carbonatos fue significativamente mayor en la primera semana, en los tres tratamientos (Figura 5) dado que el periodo de estabilización del biofloc (fase pre experimental) se realizó con un ratio C:N mayor (12,5:1), esto quiere decir que en presencia de más mayor cantidad de azúcares simples, como la melaza empleada, las bacterias usaron constantemente las fuentes de carbonatos.

Desde la quinta semana hasta culminar la experimentación, los niveles de alcalinidad se incrementaron en todos los tratamientos indicando una reducción del consumo de carbonatos, ello debido a la inhibición de las bacterias heterótrofas por parte de la competencia por espacio y alimento por parte de las comunidades de bacterias (autótrofas y heterótrofas). Nootong et al. 2011, indica que a una alta relación C:N las bacterias heterótrofas entran en competencia con las bacterias autótrofas, mientras que a bajas concentraciones de C:N los microorganismos autótrofos o bacterias nitrificantes

son favorecidos (Michaud et al, 2006) y en este caso las fuentes de carbonato fueron usados con predominancia por este tipo de bacterias.

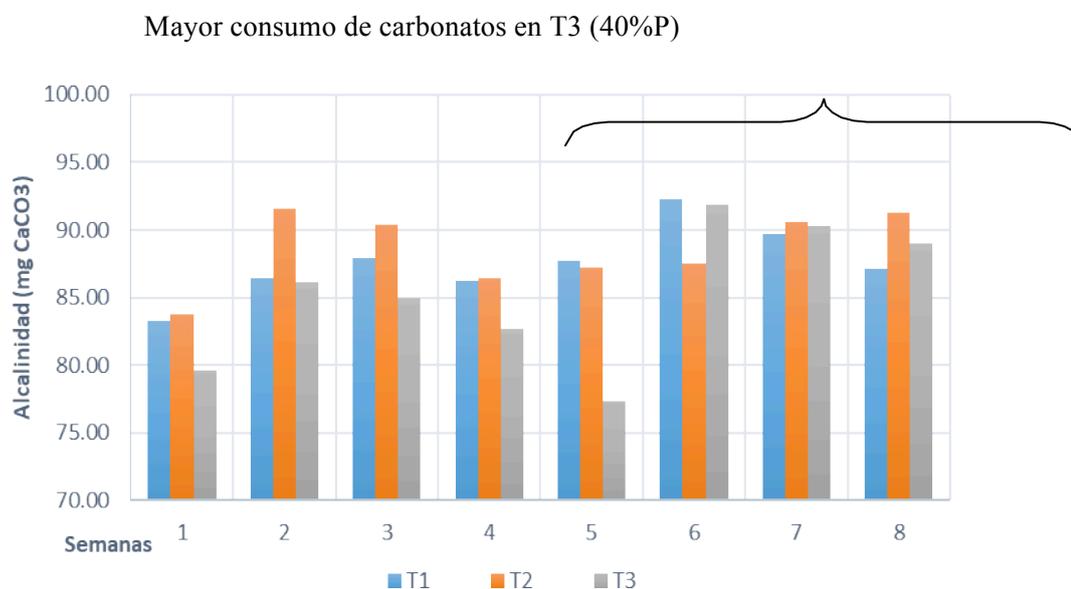


Figura 5. Variación promedio semanal de la alcalinidad ( $\text{mg.L}^{-1} \text{CaCO}_3$ ) en los tres tratamientos aplicados.

#### 4.1.3. Luminosidad y turbidez

El valor promedio de luminosidad fue de 10.74 Klux entre los tratamientos, con valores mínimos y máximos de 7.5 Klux y 16.6 Klux, respectivamente. Los valores de luminosidad mostrados no presentaron diferencias significativas. Sin embargo, la entrada de luz permitió el crecimiento de organismos autótrofos como fitoplancton, observado en el cambio de coloración de agua verde claro a verde durante el transcurso de la experimentación. En la Tabla 7, se muestran los valores de turbidez desde 152.5 NTU hasta 361.33 NTU en los tratamientos T1 y T3 respectivamente. El tratamiento que recibió mayor cantidad de alimento fue el tratamiento T3 presentando un efecto sobre la turbidez ya que aumentó la cantidad de excretas producidas y alimento no consumido, los cuales sirvieron de fuente de alimento (sustrato) para la colonización de bacterias heterotróficas y crecimiento de microorganismos.

En la Figura 6, se observa el comportamiento de la turbidez y la luminosidad, este último factor permite el crecimiento de organismos autótrofos dentro del cultivo como las algas que tienen una capacidad de crecimiento exponencial en presencia de luz, asimismo esta producción se puede relacionar con el incremento de la actividad bacteriana heterótrofa. Larson y Hagstrom (1979) citados en Hernandez (2016) indican que en el medio ambiente las bacterias muestran patrones estacionales en abundancia, en respuesta a la materia orgánica disuelta liberada por el fitoplancton. Adicionalmente señalan que la tasa de crecimiento de las bacterias heterótrofas en la columna de agua incrementa significativamente durante el día y disminuye durante la noche debido a la disponibilidad de nutrientes en el primer caso.

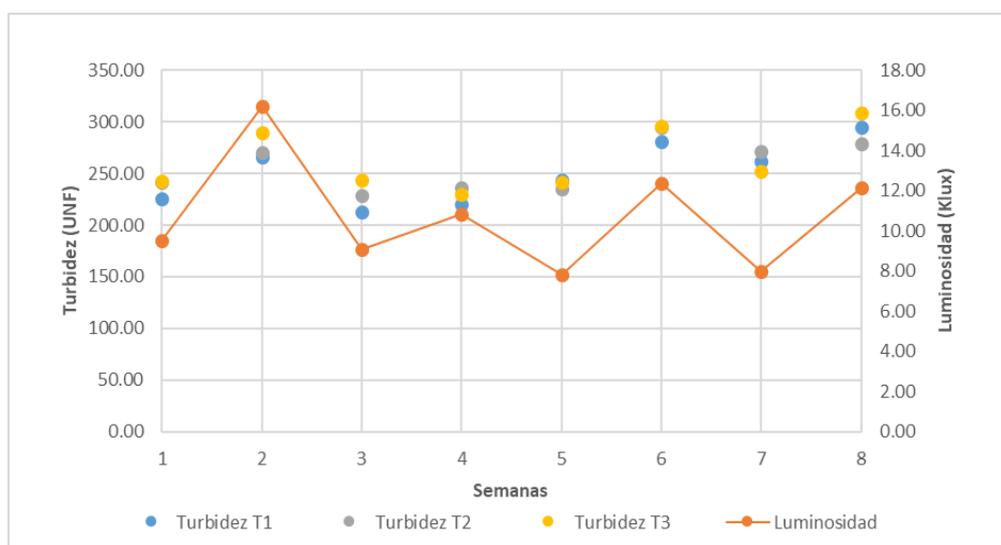


Figura 6. Influencia de la luminosidad sobre la turbidez registrados en los tres tratamientos aplicados.

Por otro lado, Avnimelech (2012) menciona que el buen funcionamiento de un sistema acuícola en referencia a la calidad de agua, depende en gran medida de los procesos metabólicos que realizan las comunidades de fitoplancton, bacterias y demás microorganismos, los cuales presentan una estrecha relación con las características físico – químicas del agua. En el presente experimento, la presencia de microalgas contribuyó a la asimilación de nitrógeno amoniacal; sin embargo, hay que resaltar que estas tienen una capacidad muy limitada para metabolizarlo (Ebeling 2006). Cabe indicar que éstas también generan fuentes de carbono disponibles y cuando mueren sus células sirven de

sustrato para el desarrollo de las bacterias heterótrofas, según Laws (1981) y Vadstein (1989) citados en Miravet (2003).

#### 4.2. Densidad de las colonias bacterianas heterótrofas

Los valores promedio de la concentración de bacterias heterótrofas de los tratamientos fueron de  $5.72 \pm 0.51 \text{ logUFC.ml}^{-1}$ ,  $5.63 \pm 0.52 \text{ logUFC.ml}^{-1}$  y  $5.94 \pm 0.55 \text{ logUFC.ml}^{-1}$  en T1 (30% de proteína), T2 (35% de proteína) y T3 (40% de proteína), respectivamente (Ver Tabla 8). La prueba ANOVA de medidas repetidas (Anexo 5), permite afirmar que hay diferencias en el efecto que genera la concentración de la proteína ( $p < 0.05$ ) contenida en al menos un tipo de alimento balanceado suministrado sobre el crecimiento bacteriano heterótrofo.

**Tabla 8: Concentración promedio semanal de la densidad de bacterias heterótrofas producidas con los tratamientos aplicados**

	TRATAMIENTOS		
Tiempo	T1 (30%)	T2 (35%)	T3 (40%)
semana 1	$5.50 \pm 0.6a$	$6.16 \pm 0.7ab$	$5.97 \pm 0.4b$
semana 2	$6.48 \pm 0.4a$	$6.65 \pm 0.8a$	$6.84 \pm 1.0a$
semana 3	$5.01 \pm 0.4a$	$4.90 \pm 0.7a$	$5.06 \pm 0.2a$
semana 4	$6.27 \pm 1.0a$	$5.75 \pm 0.4a$	$6.11 \pm 0.7a$
semana 5	$5.56 \pm 0.3a$	$5.76 \pm 0.6a$	$5.61 \pm 0.2a$
semana 6	$5.93 \pm 0.7ab$	$5.73 \pm 0.3a$	$6.56 \pm 0.7b$
semana 7	$5.81 \pm 0.4b$	$5.18 \pm 0.5a$	$5.74 \pm 0.4b$
semana 8	$5.17 \pm 0.3a$	$4.89 \pm 0.2a$	$5.61 \pm 0.8a$
<b>Promedio</b>	<b><math>5.72 \pm 0.51a</math></b>	<b><math>5.63 \pm 0.63a</math></b>	<b><math>5.94 \pm 0.56b</math></b>
<b>Mín- Máx</b>	<b>(4.38-7.98)</b>	<b>(4.11-7.85)</b>	<b>(4.70-8.30)</b>

Asimismo, la prueba de comparación Tukey (Anexo 3) indica que la concentración de bacterias heterótrofas que presentó el tratamiento T3 (40% de proteína) con una densidad media  $5.94 \pm 0.56 \text{ Log UFC/ml}$ , fue superior a los tratamientos T2 (35% de

proteína) y T1 (30% de proteína), sin observar diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre estos dos últimos tratamientos (Figura 7).

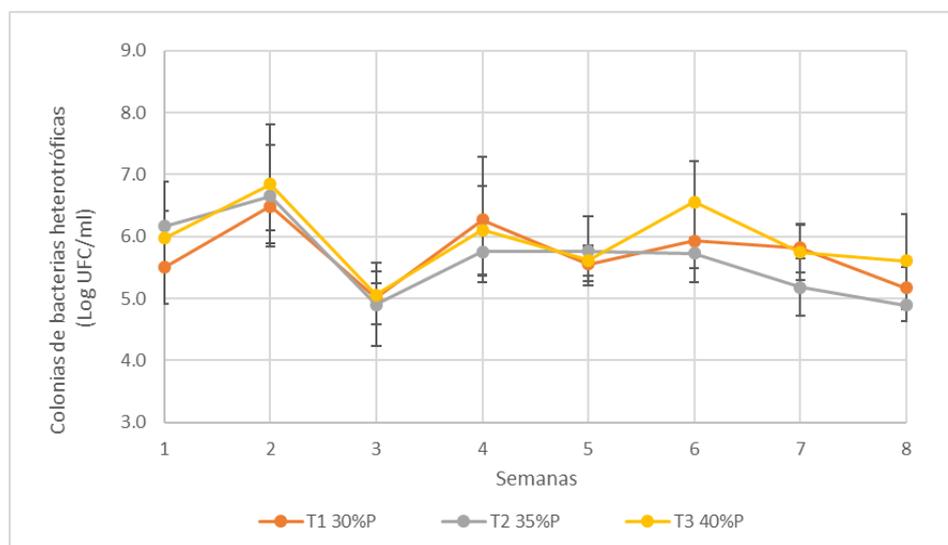


Figura 7. Densidad promedio semanal de bacterias heterótrofas presentes en los cultivos bajo tres tratamientos.

La máxima concentración de colonias bacterianas heterótrofas fue de 8.05 log UFC/ml durante la segunda semana observado en el tratamiento T3, mientras que la mínima concentración se observó en el tratamiento T2 en la tercera semana con una concentración de 4.4 log UFC/ml.

La prueba ANOVA indica que inicialmente se presentó mayor abundancia de colonias en todos los tratamientos (primeras dos semanas), mientras que en la tercera semana los valores se redujeron hasta un valor promedio mínimo de 4.9 LogUFC.ml<sup>-1</sup> sin mostrar diferencias entre tratamientos (Figura 8). Asimismo se evidenció el alto consumo de carbonatos principalmente durante la primera semana, lo cual indicó que el experimento inició con un biofloc establecido.

Durante las dos últimas semanas la densidad bacteriana fue disminuyendo ligeramente en todos los tratamientos (Figura 8), asimismo se observa que los valores de alcalinidad presentaron mayor concentración con respecto a otras semana lo cual indica que las fuentes de carbonato fueron lentamente consumidas, a excepción de la segunda semana que se encontraron concentraciones muy bajas ocurrido principalmente por el retiro de

sólidos, que se explicará más adelante. Se ha indicado que la relación C:N es un indicador de la actividad de las bacterias heterótrofas sobre el ciclado del agua, por lo tanto si en este periodo se observa altos valores de alcalinidad y una disminución de la densidad bacteriana el carbono presente fue una limitante para el crecimiento de bacterias.

Adicionalmente, se debe tener en cuenta que las bacterias no consumen el total de carbono disponible, presentando una eficiencia de conversión del carbono aproximadamente del 50 por ciento (Fuhrman y Azam, 1982).

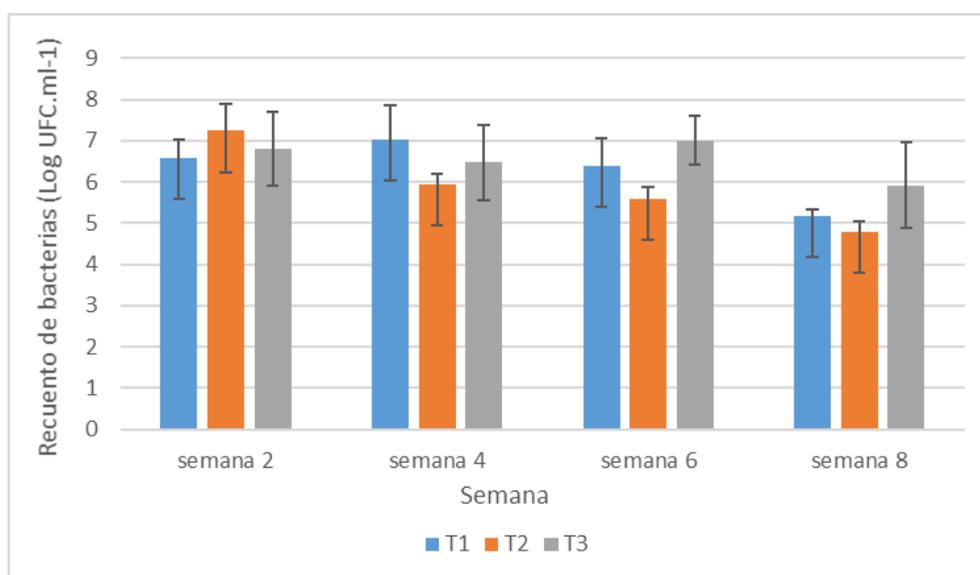


Figura 8. Abundancia promedio de bacterias heterótrofas momentos previos a las filtraciones de sólidos de las unidades experimentales.

Para conocer mejor sobre la densidad bacteriana en respuesta a cada tratamiento, en la Figura 8 se muestran los datos de la abundancia de bacterias horas previas a las filtraciones, cabe recordar que durante periodos de quince días se permitió el crecimiento continuo de las poblaciones bacterianas, la gráfica muestra el desempeño del crecimiento bacteriano en cada tratamiento sin considerar las filtraciones.

Existe un decremento en el crecimiento especialmente en T2 (35% de proteína), mientras que finalizando la experimentación se observa un descenso de la concentración en todos los tratamientos lo cual indica la reducción en la capacidad de crecimiento en

la última fase experimental (semanas 7 y 8). Lee (1993) indica que la habilidad de las células bacterianas para multiplicarse en un corto tiempo es considerable, especialmente en aguas ricas en nutrientes, sin embargo, pueden sufrir cambios en respuesta a estresores ambientales que resulta en la disminución de la diversidad de la comunidad microbiana (Hung-Hung, 2001).

El análisis estadístico indica que no existe diferencias significativas entre tratamientos (Figura 10) por semana, excepto en la cuarta semana donde la densidad promedio de bacterias del tratamiento T2 (35% de proteína) es significativamente menor que T1 (30% de proteína) y T3 (45% proteína). Burford *et al.* (2004) y Avnimelech (2007) recomiendan controlar y mantener una comunidad heterótrofa con densidades de  $10^7$  UFC.ml<sup>-1</sup>. En la presente experimentación el promedio de la concentración de bacterias en los tres tratamientos fue de  $10^5$  UFC.ml<sup>-1</sup> y ligeramente con mayor predominancia en el tratamiento T3.

Browdy *et al.* 2012 indica que para que las bacterias puedan asimilar eficazmente el amoníaco deben expandirse en biomasa a través de fuente de carbono disponible en la columna de agua (Avnimelech, 2009; Crab *et al.*, 2007; De Schryver *et al.*, 2008), en otras palabras, la proporción C:N presenta una relación directa con la velocidad de descomposición de la materia orgánica (Hari *et al.*, 2004).

Diversos estudios han trabajado a diferentes niveles en la proporción C:N; por ejemplo, Verstraete (2009) señala que una relación de 15:1 da mayor eficiencia de remoción del nitrógeno, Scheneider *et al.* (2006) señalan que relaciones de 12:1 a 13:1 son favorables, Hargreaves (2006) de 10:1. Zapata (2016) y Magondu *et al.*, (2015) encontraron disminución gradual de los niveles de NAT a medida que aumentaba la relación C:N de 10:1 a 20:1 en el sistema. Estos resultados indicarían que una baja relación C:N puede conllevar el riesgo de no lograr la depuración efectiva en el agua de cultivo; y contrario a ello, altas cantidades de dosificación de carbono induce una disminución en los niveles de oxígeno disuelto (Ebeling *et al.*, 2006).

Por ello es importante considerar el manejo de la etapa pre – experimental, en el presente caso se empleó una relación C:N de 12.5/1, lo que pudo ayudar en gran medida a mantener el sistema durante las primeras semanas, con ello se comprueba la

importancia de trabajar con bioreactores en sistemas de biofloc que puedan promover la eficiencia en la depuración del agua (Avnimelech2012).

Luo *et al.*, 2012, Widanarni *et al.*, 2012, Hargreaves, 2013, Mejía, 2004). Otros factores como cambios en el metabolismo debido al crecimiento de los peces pueden contribuir a cambiar la cantidad de nitrógeno teórico estimado y por tanto la relación C:N podría alterarse.

#### 4.3. Nivel de sólidos en los medios de cultivo

Los valores máximos y mínimos de la concentración de Sólidos Sedimentables (SS) se observaron en los tratamientos T3 (40%) con 60 ml.L<sup>-1</sup> y T1 (30%) con 22 ml.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Los valores promedio de los tratamientos T1 (30%) y T2 (35%) fueron 33.24±6.02 ml.L<sup>-1</sup> y 32.83±4.30 ml.L<sup>-1</sup>, respectivamente resultando significativamente menores al tratamiento T3 (40%) con 37.54±5.59 ml.L<sup>-1</sup>. Con respecto a los niveles de Sólidos Suspendidos Totales (SST) la máxima concentración fue de 760 mg.L<sup>-1</sup>, observado en el tratamiento T3, mientras que el menor valor se presentó en T1 con 284 mg.L<sup>-1</sup>. Asimismo, el valor máximo y mínimo en la concentración de Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV) fue de 582 mg.L<sup>-1</sup> y 216 mg.L<sup>-1</sup>, observados en los tratamientos T3 y T2, respectivamente. Los niveles de SST y SSV, en el tratamiento T3 fueron significativamente mayores que los demás tratamientos y mantuvieron una tendencia de crecimiento durante el tiempo. A diferencia de los SS, SST y SSV, la turbidez no presentó diferencias significativas entre los tres tratamientos ( $p > 0.05$ ) durante la fase experimental.

**Tabla 9: Concentración de sólidos sedimentables (SS), sólidos suspendidos totales (SST), sólidos suspendidos volátiles (SSV) y turbidez**

PARÁMETRO	TRATAMIENTOS		
	T1 (30% de proteína)	T2 (35% Proteína)	T3 (40% de proteína)
SS (ml.L <sup>-1</sup> )	33.24±6.02 b (22.0-52.0)	32.83±4.30 b (25.0-48.0)	37.54±5.59 a (26.0-60.0)
SST (mg.L <sup>-1</sup> )	480.27±50.43 b (284-648)	492.22±68.57 ab (320-752)	525.45±50.31 a (378-760)
SSV (mg.L <sup>-1</sup> )	370.68±43.14 b (254.0-484.0)	389.40±52.51 b (216.0-552.0)	426.54±39.77 a (317.0-582.0)
Turbidez (NTU)	250.49±29.15 a (152-322)	257.16±34.44 a (152-361)	262.83±27.96 a (188-349)

En la Figura 9, se observa que durante las dos primeras semanas los sólidos aumentaron significativamente, cabe recordar que precisamente en este periodo la densidad bacteriana fue mayor, a ello se suma la acumulación de alimento no consumido que se presentó en los estanques probablemente a causa de la adaptación que sufrieron los peces (cambio de agua clara a agua turbia) que generó estrés e influyó en su apetito. Este hecho se pudo comprobar en los conos Imhoff, en los que se observó la acumulación de alimento en la base de los mismos.

En la misma gráfica (Figura 9), se representa con líneas verticales los días en los que se filtró el biofloc para mantener los niveles de SS por debajo de los 50 ml.L<sup>-1</sup>, debido a ello se observa incrementos y decrementos en su concentración debido al restablecimiento de sólidos a niveles de 30 ml.L<sup>-1</sup>. La prueba estadística indica que los valores promedio semanales de SS en el tratamiento T1 (30%) no muestran diferencias significativas manteniéndose incluso estables durante algunas semanas y sin necesidad de realizar filtrados, mientras el tratamiento T2 (35%) y T3 (40%) si presentaron mayor variabilidad estadística ( $p > 0.05$ ), ver Anexo 5.

Perez-Fuentes *et al.*, (2016) y Magondu *et al.* (2013) indican que la adición de una fuente extra de carbono tiene una relación directa con el incremento de sólidos, lo cual se comprueba en el presente experimento ya que los tratamientos T2 y T3 recibieron mayores cantidades de alimento y melaza a medida que transcurrieron las semanas (ver

Anexo 6), lo cual generó mayor cantidad de alimento no consumido y excretas, sirviendo de sustrato para la colonización de bacterias (De Schryver *et al.*, 2008).

Los valores promedio semanales de la concentración de SST fueron de 452.3 mg.L-1, 489.0 mg.L-1 y 486.9 mg.L-1 en los tratamientos T1, T2 y T3; respectivamente, y a partir de la sexta semana superaron los valores promedio de 500 mg.L-1 (513.3 mg.L-1 en T1, 535.0 mg.L-1 en T2 y 520.0 mg.L-1 en T3) incrementándose hasta finalizar la experimentación en el tratamiento T3. Azim y Little (2008) y Little *et al.* (2008) trabajaron con valores de SST por encima de 1,000 mg.L-1 y recomiendan trabajar con valores que fluctúen entre 200 a 500 mg.L-1. Asimismo, Avnimelech (2006), Avnimelech y Kochba (2009) y Hargreaves (2019) indican que concentraciones hasta 500 mg.L-1 de SST resultan adecuados para el funcionamiento del sistema y control del amoníaco, evitando situaciones de estrés en el cultivo por saturación de sólidos. Asimismo, McMillan *et al.* (2003) señalan que la remoción de los residuos sólidos debe igualar a la velocidad de su producción, ya que pueden acumularse a niveles excesivos generando un deterioro de la calidad del agua y estrés en el cultivo.

El incremento de sólidos suspendidos a concentraciones superiores a los valores recomendados a partir de la sexta semana hasta culminar el experimento, influyó en el crecimiento de las bacterias heterótrofas, como se observa en la Figura 7. Asimismo, este hecho se demuestra a través de la reducción en las concentraciones de carbonatos, mostrado en la Figura 5. Este resultado indica que la cantidad de melaza en los sistemas no fue debidamente aprovechada por las bacterias heterótrofas, asimismo influyó la alta concentración de sedimentos debido a la falta de una remoción efectiva que sumado a la estabilización y competencia de las bacterias nitrificantes, inhibieron el crecimiento de la comunidad bacteriana heterótrofa.

De Schryver *et al.*, (2008) indican que un factor importante para permitir la renovación celular de las comunidades bacterianas es el adecuado manejo de los sólidos, ya que con la acumulación de materia orgánica la aireación se reduce y aumenta la presencia de zonas anóxicas cambiando las condiciones en los tanques de cultivo y afectando el desempeño de las bacterias aerobias.

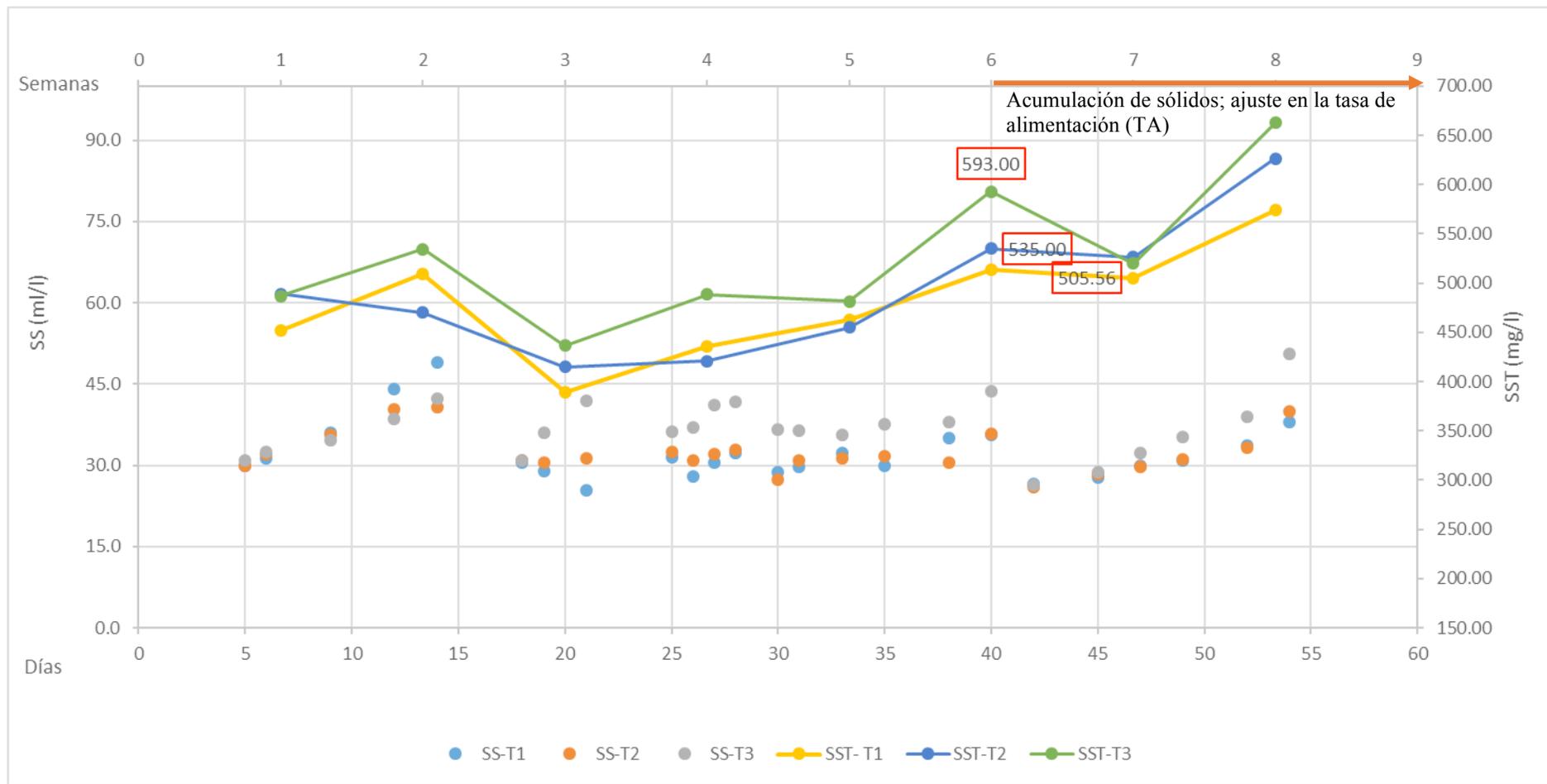


Figura 9. Comportamiento de los sólidos sedimentables (SS) y sólidos suspendidos totales (SST) sometidos a filtraciones.

En la Figura 10(a) se observa los conos de sedimentación en los tratamientos aplicados y en la Figura 10(b), se muestra el proceso de sedimentación con el tratamiento T3 (40% de proteína) que recibió melaza, la coloración del biofloc en los tratamientos se encuentra influenciados por el tipo de carbono y la cantidad empleada (Emerenciano *et al.*, 2012)

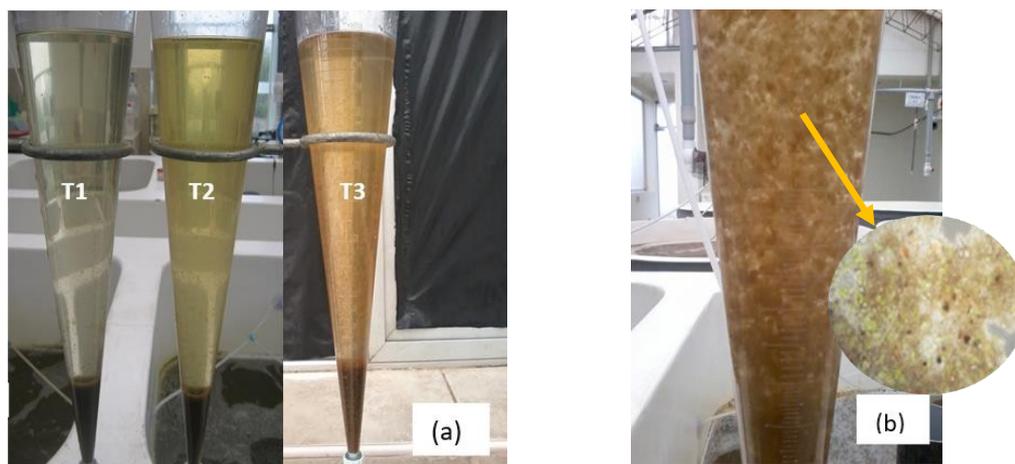


Figura 10. (a) Coloración del biofloc en los tratamientos durante la tercera semana; (b) proceso de sedimentación y visualización del biofloc del tratamiento T3 (que presenta 40 por ciento de proteína en la dieta).

Crab *et al.*, (2007), De Schryver *et al.* (2008) y Avnimelech (2009) indican que para estimular el rápido crecimiento de las bacterias heterotróficas se debe emplear una fuente de carbono lábil o disponible que puedan tomar del medio. Ello indica que si bien todos los tratamientos tuvieron la misma relación C:N, no necesariamente pudieron tomar el carbono rápidamente en el tratamiento T1 (30% de proteína), porque este tratamiento no recibió un tipo de azúcar simple como la melaza (Fajardo y Sarmiento, 2007). Por otro lado, Ariza y Gonzales (1997), citados en Fajardo y Sarmiento (2007), señalan que mediante ensayos con soluciones diluidas de melazas se ha demostrado que, a pesar de su bajo contenido de fósforo, constituyen un buen medio nutritivo para muchos microorganismos tales como bacterias y levaduras, los cuales se desarrollan bien durante la dilución de esta miel, este hecho pudo haber influido en el crecimiento microbiano en los tratamientos que recibieron melaza (T2 y T3).

Durante experimento los niveles de sólidos sedimentables promedio de los tratamientos permanecieron debajo de 50 mg.L<sup>-1</sup> mientras los niveles de sólidos suspendidos totales se mantuvieron en valores promedio de 480 mg.L<sup>-1</sup> (en T1) hasta 525 mg.L<sup>-1</sup> (en T3), Hargreaves (2013) indica una equivalencia de 25 a 50 mg.L<sup>-1</sup> de SS con 300 a 500 mg.L<sup>-1</sup> de SST, los cuales fueron valores muy cercanos a los reportados en el presente experimento.

Los valores de correlación entre los niveles de SST y la abundancia de bacterias heterótrofas (ver Anexo 7) resultaron negativos con coeficientes de correlación significativos en el tratamiento T1 (30%) sólo durante durante la octava semana (-0.86, p valor = 0.028), en el tratamiento T2 (35%) durante la primera semana (-0.80, p valor = 0.056) y tercera semana con un coeficiente de correlación de -0.90 (p valor = 0.0138). Schneider *et al.* (2006) indica que el incremento de sólidos no está necesariamente asociado con el crecimiento bacteriano, existiendo factores como la acumulación de alimento no consumido que repercuten en ello.

En referencia a los valores promedio de los niveles de Sólidos Suspendidos Volátiles (ver Tabla 9), el tratamiento T3 presenta 420.94 ± 50.82 mg.L<sup>-1</sup> mientras los tratamientos T1 y T2 presentaron 370.68±43.14 mg.L<sup>-1</sup> y 389.40±52.51 mg.L<sup>-1</sup> de SSV, respectivamente; siendo estos dos últimos tratamientos significativamente menores (p<0.05) al primer tratamiento. Las concentraciones semanales de SSV del tratamiento T1 no presentan variaciones significativas (p>0.05), en cambio los tratamientos T2 y T3 sí presentaron un incremento desde la quinta semana y lograron sus máximos valores en la última semana de experimentación. Como se ha descrito, este comportamiento fue similar en las concentraciones de SS y SST (Ver Figura 9).

Se debe recordar que los sólidos suspendidos volátiles (SSV) son una fracción de los sólidos totales, asimismo son una medida indirecta para cuantificar la población bacteriana, como indican De Schryver *et al.* (2008); Schneider *et al.* (2006) y Vinatea *et al.* (2009). Por lo expuesto, se observa en la Figura 11 que los SSV siempre presentan valores menores a SST y guardan relación en sus concentraciones; sin embargo, no sucede lo mismo con la producción bacteriana heterotrófica. Esto podría deberse a que en tanto la metodología de determinación de SSV cuantifica todo el material orgánico

presente en la muestra (bacterias, algas, fitoplancton, material celular muerto, etc), el análisis microbiológico cuantifica sólo las células viables (vivas); por ello estos dos parámetros no necesariamente deben mostrar una tendencia similar.

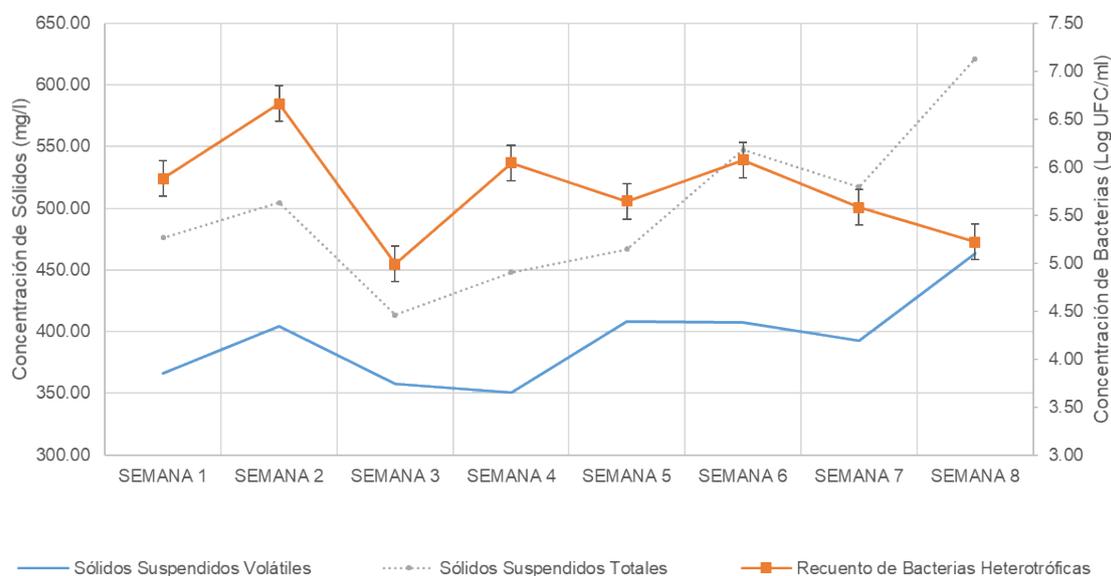


Figura 11. Comparación de las concentraciones promedio semanales de Sólidos Suspendedos Volátiles (SSV) y la densidad promedio de bacterias heterótrofas.

#### 4.4 Asimilación biológica del nitrógeno amoniacal total (NAT) y amoniaco (N-HN<sub>3</sub>)

Las concentraciones mínimas y máximas de Nitrógeno Amoniacal Total (NAT) observados en todos los tratamientos fluctuaron entre 1.2 mg.L<sup>-1</sup> y 3.3 mg.L<sup>-1</sup> en valores promedio por semana. El tratamiento T3 (40%) obtuvo una concentración media mayor con un valor de 2.23±0.11 mg.L<sup>-1</sup> (p<0.05), en comparación de los tratamientos T1 (30%) y T2 (35%), ver Tabla 10.

**Tabla 10: Concentración promedio de nitrógeno amoniacal total NAT (mg.L<sup>-1</sup>), amoniaco NH<sub>3</sub>-N (mg.L<sup>-1</sup>), nitritos NO<sub>2</sub>-N (mg.L<sup>-1</sup>) y nitratos NO<sub>3</sub>-N (mg.L<sup>-1</sup>)**

<b>PARÁMETRO</b>	<b>T1 (30% de proteína)</b>	<b>T2 (35% Proteína)</b>	<b>T3 (40% de proteína)</b>
<b>Nitrógeno Amoniacal Total (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	1.79±0.16 a (1.1-3.3)	1.95±0.10 b (1.2-3.1)	2.23±0.11 c (1.3-3.4)
<b>Amoniaco NH<sub>3</sub>-N (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	0.08± 0.011 a (0.090-0.096)	0.08± 0.012 a (0.054-0.080)	0.07± 1.012 a (0.090-0.093)
<b>Nitritos NO<sub>2</sub>-N (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	0.09±0.01 a (0.05-0.14)	0.09±0.02 a (0.04-0.23)	0.09±0.01 a (0.05-0.19)
<b>Nitratos NO<sub>3</sub>-N (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	86.35±23.25 a (39-209)	88.38±20.22 a (33-173)	95.82±27.35 a (41-212)

\*Valores con una misma letra no presentan diferencias significativas

Ray *et al.* (2011) indican que los valores de NAT deben ser menores o iguales a 1 mg.L<sup>-1</sup> para mantener los niveles de amoniaco en concentraciones inocuas para las tilapias, valor sugerido para a un pH neutro y valores de temperatura entre 27°C y 29°C (Liñan, 2007). Los valores promedio de NAT en los tratamientos, fueron desde 1.79 mg.L<sup>-1</sup> hasta 2.23 mg.L<sup>-1</sup>, y presentaron las concentraciones máximas de amoniaco de 0.096 mg.L<sup>-1</sup> en el tratamiento T1 (30% proteína).

Neori *et al.* 2004 indican que los valores aceptables de amoniaco deben mantenerse por debajo de los 0.025 mg.L<sup>-1</sup>, otros estudios indican que las concentraciones limites deben ser de 2 mg.L<sup>-1</sup> (Kubitza, 2000 y Merkante *et al.* 2007). Dos santos *et al.* (2009) citado en Zapata (2016), indica que rangos de 0.4 mg.L<sup>-1</sup> y 2.0 mg.L<sup>-1</sup> de amoniaco (NH<sub>3</sub>) pueden presentarse sin afectar el crecimiento de las tilapias.

Con referencia a la asimilación de nitrógeno, a pesar que el tratamiento T3 presentó significativamente una densidad bacteriana heterótrofa mayor también presentó la concentración promedio mayor de NAT (Tabla 10). Sin embargo, sus niveles de amoniaco permanecieron estables y por debajo del límite crítico, al igual que en los demás tratamientos. En la tabla también se observa que existe una relación entre el nivel del proteína empleado y la concentración promedio de NAT de los tratamientos, observándose que la concentración de nitrógeno presente está principalmente

influenciado por el porcentaje de proteína de los tratamientos, y en menor grado por la velocidad de asimilación de las bacterias heterótrofas.

Los productos de la nitrificación por tratamiento se presentan en la Tabla 11, en el caso de los valores promedio semanales de nitritos no presentaron variabilidad en los tratamientos T1 y T3, y fueron máximos en la tercera semana en todos los tratamientos (ver Figura 13). Con respecto a las concentraciones promedio de nitratos, no presentaron diferencias significativas entre tratamientos, al igual que en los nitritos; sin embargo, durante la semana siete se presentaron valores significativamente más altos de 151.3 mg.L<sup>-1</sup>, 146.2 mg.L<sup>-1</sup> y 137 mg.L<sup>-1</sup> en T1, T2 y T3, respectivamente; estos valores no resultaron peligrosos para el cultivo, mientras que concentraciones cercanas a 600 mg.L<sup>-1</sup> ya pueden resultar nocivas.

En referencia a los niveles tóxicos de nitritos Rakocy (1989) y Losordo (1997) citados en Bernuy (2016) indican que concentraciones superiores a 5 mg.L<sup>-1</sup> son críticos para tilapia, en tanto que Hari *et al.* (2006) indican que desde concentraciones superiores a 2 mg.L<sup>-1</sup> ya afectan su bienestar.

**Tabla 11: Concentración promedio semanal de Nitrógeno Amoniacal Total (mg.L<sup>-1</sup>), nitritos NO<sub>2</sub>-N (mg.L<sup>-1</sup>) y nitratos NO<sub>3</sub>-N (mg.L<sup>-1</sup>).**

	TAN (mg.L <sup>-1</sup> )			NITRITOS NO <sub>2</sub> -N (mg.L <sup>-1</sup> )			NITRATOS NO <sub>3</sub> -N (mg.L <sup>-1</sup> )		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3
<b>1</b>	2.01 a	1.94 ab	2.16 ab	0.095 a	0.070 b	0.083 a	73.0 b	75.8 b	83.2 bc
<b>2</b>	2.07 a	2.06 a	2.24 ab	0.093 a	0.103 ab	0.087 a	73.5 b	80.3 b	79.0 c
<b>3</b>	1.81 a	2.13 a	2.3 ab	0.108 a	0.112 a	0.127 a	68.7 b	73.8 b	76.0 c
<b>4</b>	1.92 a	1.99 ab	2.11 ab	0.095 a	0.082 a	0.086 a	60.7 b	63.2 b	68.8 c
<b>5</b>	1.57 a	1.53 b	1.86 b	0.080 a	0.090 a	0.092 a	64.8 b	62.0 b	67.3 c
<b>6</b>	1.57 a	1.8 ab	2.22 ab	0.073 a	0.067 b	0.082 a	98.7 b	101.2 b	133.8 ab
<b>7</b>	1.77 a	1.9 ab	2.38 ab	0.080 a	0.092 a	0.088 a	151.3 a	146.2 a	137.0 a
<b>8</b>	1.63 a	2.25 a	2.58 a	0.085 a	0.075 a	0.100 a	86.8 b	92.0 b	108.8 ab

\*Valores con una misma letra no presentan diferencias significativas

Hasta la quinta semana se observa una moderada acumulación de TAN y nitritos (Figura 12) siendo máxima en la tercera semana, Ebeling *et al.* (2006) indican que el

aumento de la concentración de NAT y nitritos es el producto de la excreción de peces dentro del sistema y de la colonización de bacterias nitrificantes (Timmons *et al.*, 2002, Hargreaves 2013), tal como se observa en el presente experimento. Asimismo, Hargrove *et al.* (1996) en Zapata (2006) indican que a un pH neutro y ligeramente alcalino (6.5 – 8.5) se asegura el crecimiento de las bacterias Nitrosomonas que toman amoníaco y lo oxidan a nitritos, mientras que en las Nitrobacter, que oxidan los nitritos a nitratos, crecen a un pH de 7 a 7.5 (Ray *et al.* 2011). Allen *et al.* (2002) indican que las bacterias heterotróficas también realizan un consumo significativo del nitrato en el agua en presencia de oxígeno (alrededor del 16% en aguas saladas según Spotte y Adams 1983) y en zonas eufóticas (en presencia de luz), esto pudo contribuir en la asimilación de nitrato reduciendo su concentración.

Según lo observado, durante las primeras cinco semanas las bacterias nitrificantes aún se encontraron en proceso de establecimiento, se podría atribuir que la asimilación biológica del nitrógeno en este periodo de tiempo fue principalmente llevada a cabo por bacterias heterótrofas y también gracias al mantenimiento de la alcalinidad en el sistema. La literatura indica que las bacterias heterótrofas consumen directamente el nitrógeno amoniacal presente (Fuhrman y Azam 1982, Burford 2004, Ebeling 2006, Hargreaves 2006, Azim y Little 2008, Avnimelech 2009); esto quiere decir que a medida que la cantidad de colonias bacterianas predomine existirá un buen ciclado del nitrógeno amoniacal total (TAN).

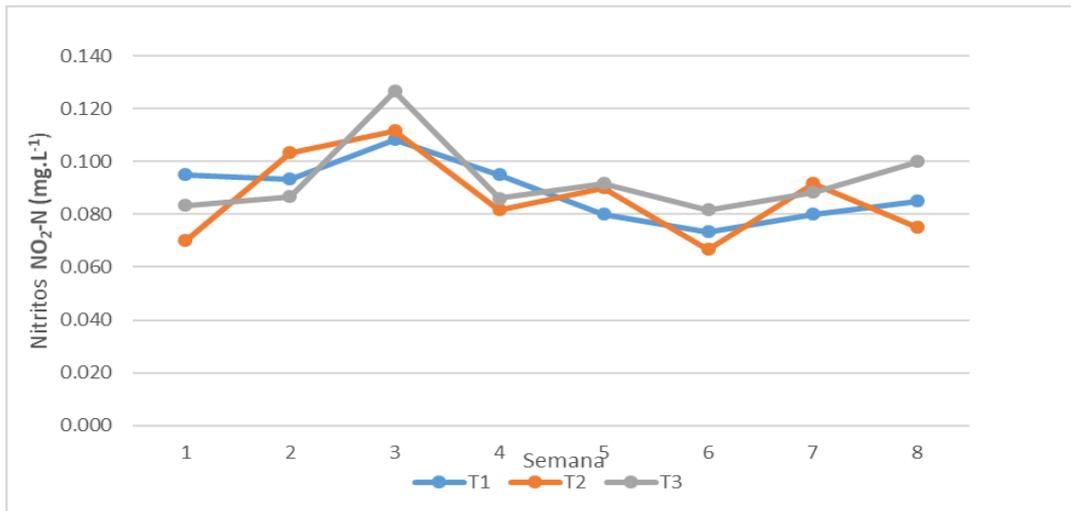


Figura 12. Comportamiento de los niveles promedio semanal de nitratos presentes en los tres tratamientos aplicados.

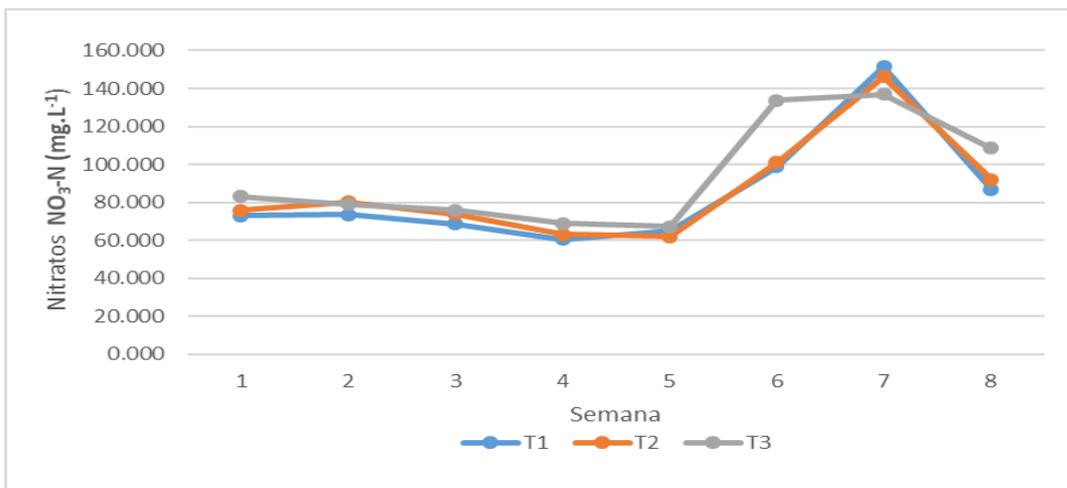


Figura 13. Comportamiento de los niveles promedio semanal de nitritos presentes en los tres tratamientos aplicados.

Se puede afirmar que existió competencia por alimento y espacio entre las comunidades bacterianas nitrificantes y heterótrofas. En los tratamientos T1 y T2 que existió poca disponibilidad de carbono simple, en comparación al tratamiento T3, la depuración del amoníaco fue realizada predominantemente por bacterias nitrificantes, mientras que en el tratamiento T3 se estableció una densidad de bacterias gracias a la constante adición de carbono simple, como la melaza.

Para evaluar la relación existente entre la concentración de NAT y la concentración de bacterias heterótrofas, se aplicó la prueba de Correlación de Pearson (Ver Anexo 9), los resultados indican que los valores fueron significativos ( $p < 0.05$ ) en la quinta semana del tratamiento T1 (30% de proteína) con un índice de -0.90, asimismo durante la primera semana del tratamiento T2 (35% de proteína) con un índice de -0.86, mientras el tratamiento T3 (40% de proteína) en la séptima semana presentó con un índice de -0.94. Como se ha descrito, la remoción de nitrógeno amoniacal total no fue el resultado exclusivamente de la presencia de bacterias heterótrofas, la presencia bacterias autótrofas y el establecimiento de microalgas que también asimilan compuestos nitrogenados influyen en los resultados obtenidos, a pesar de haber tratado de mantener un sistema heterótrofo.

Asimismo, se debe considerar que un alto grado de remoción de sólidos podría también afectar la comunidad de bacterias generando un problema en el mantenimiento de calidad de agua (Ebeling 2006 citado por Schweitzer *et al.*, 2013). Schweitzer *et al.* (2013) indica que a niveles de sólidos de 400 y 800 mg.L<sup>-1</sup> ha sido encontrado que el amoníaco y el nitrito fueron controlados principalmente por bacterias nitrificantes lo cual permitió una mayor estabilidad de estos compuestos.

En la Tabla 11, se observa que los niveles de NAT se incrementaron en la última semana experimental, especialmente en los tratamientos T2 y T3. Se ha detallado que estos dos tratamientos tuvieron altos niveles de sólidos, sobrepasando los rangos adecuados, en referencia a ello Hargreaves (2006) menciona que las bacterias nitrificantes son afectadas por el aumento de la carga de materia orgánica en el sistema, ello pudo tener un efecto negativo en el proceso de nitrificación. Asimismo la prueba de correlación de Pearson entre las concentraciones de NAT y SST indica que en la séptima semana se presentó una relación significativa en los tratamientos T1 y T3 con un índice positivo de 0.91, respectivamente.

En sistemas con tecnología biofloc no existe un cultivo cien por ciento heterótrofo pero se debe procurar una predominancia de comunidades bacterianas heterótrofas para reducir los riesgos que generará la formación de nitritos, producidos por bacterias autótrofas (Azim y Little, 2008). Asimismo, Hernandez (2016) señala que el sistema se

basa en el cuidadoso balance entre los organismos autótrofos y heterótrofos en el estanque, el cual debe ser en el orden de 30-40% autótrofos y 60-70% heterótrofos siendo importante para el cultivo mantener la diversidad de organismos que permitan mantener la calidad de agua (Ju *et al.* 2009, Wasielesky *et al.* 2006).

El presente estudio buscó determinar la calidad del biofloc midiendo la producción bacteriana y su eficiencia en la asimilación los compuestos nitrógenados. Asimismo, a pesar que la relación C:N no fue una variable entre los tratamientos parece estar relacionada con el nivel de proteína presente en el alimento ya que la concentración bacteriana promedio durante toda la experimentación fue mayor en el tratamiento con mayor porcentaje de proteína (40%), sin existir diferencias significativas en los tratamientos con menores porcentajes proteicos en el alimento. Por lo tanto, no es recomendable emplear bajos niveles de proteína con una baja relación C:N en el manejo del cultivo con BFT.

Por otro lado, el sistema de mantenimiento de sólidos juega un papel importante en el mantenimiento de la comunidad bacteriana ya que filtraciones periódicas conllevan a desestabilizar la concentración no sólo de bacterias heterótrofas, sino también autótrofas y demás organismos que conforman el conglomerado del biofloc, lo cual se vió reflejado en el incremento de los niveles de nitrógeno amoniacal total (NAT), durante las últimas semanas de experimentación. Por ello, es recomendable adoptar una estrategia de mantenimiento de sólidos a través de la adición del carbono (De Schryver *et al.*, 2008; Mejia, 2014); es decir una vez controlados y estabilizados los niveles de nitrógeno emplear la dosis de carbono esporádicamente para mantener la comunidad bacteriana sin incidir en la producción excesiva de sólidos en cortos tiempos y en consecuencia realizar mayores esfuerzos en el manejo de sólidos del sistema (Ray *et al.*, 2011).

#### 4.5 Producción del cultivo: crecimiento y sobrevivencia

Los resultados del crecimiento de los peces cultivados se observan en la Tabla 12, donde se muestra la biomasa inicial por tratamiento, la biomasa final, el incremento de

la biomasa como resultado luego de ocho semanas experimentales así como la tasa de conversión alimenticia. Los tratamientos T2 y T3 obtuvieron una biomasa final significativamente superior (686,87 y 778,06 gramos, respectivamente) al tratamiento T1 (507,83 gramos) y en términos de incremento de biomasa ( $\Delta B$ ) el tratamiento T3 fue significativamente mayor a todos los tratamientos con una ganancia de 656,56 gramos, en tanto T1 fue significativamente menor sólo con 384,22 gramos ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 12: Valores de los parámetros de crecimiento y sobrevivencia de alevines de tilapia macho (*O. niloticus*), sometidos a los tres tratamientos aplicados**

Parámetros de Crecimiento	TRATAMIENTOS		
	T1 (30%Proteína)	T2 (35%Proteína)	T3 (40%Proteína)
<b>Biomasa inicial - Bi (g)</b>	123.61±4.88 a (118.34-128.34)	127.60±0.68 a (127.15-128.38)	121.51±6.24 a (114.98-127.41)
<b>Incremento de Biomasa -<math>\Delta B</math> (g)</b>	384.22±23.02 a (364.26-409.41)	559.27±28.61 b (529.82-586.95)	656.56±64.51 c (599.69-726.66)
<b>Biomasa Final- Bf (g)</b>	507.83±18.20 a (492.6-538)	686.87±27.98 b (658.2-714.1)	778.06±63.21 b (727.1-848.8)
<b>TCA</b>	2.37±	1.95±	1.85±
<b>Supervivencia (%)</b>	81.3±2.0 a	80.7±0.7 a	81.1±0.4 a

El progreso del crecimiento semanal se presenta en la Figura 15, en el cual se observa que el tratamiento T3 fue superior en todas las semanas, con significancia en la quinta y sexta semana logrando incrementos de 88.96 gramos y 93.30 gramos, respectivamente; en comparación al tratamiento T2 que incrementó en 69.11 g y 57.41 g y al tratamiento T1 que sólo incrementó 57.41 g y 49.64 g. Adicionalmente, durante las dos últimas semanas T2 y T3 no presentaron diferencias significativas entre sí ( $p > 0.05$ ), y fueron superiores al tratamiento T1 con valores de 119.48 g y 120.14 g en T2, 123.56 g y 138.47 g en T3, y tan sólo 52.69 g y 68.70 g en T1.

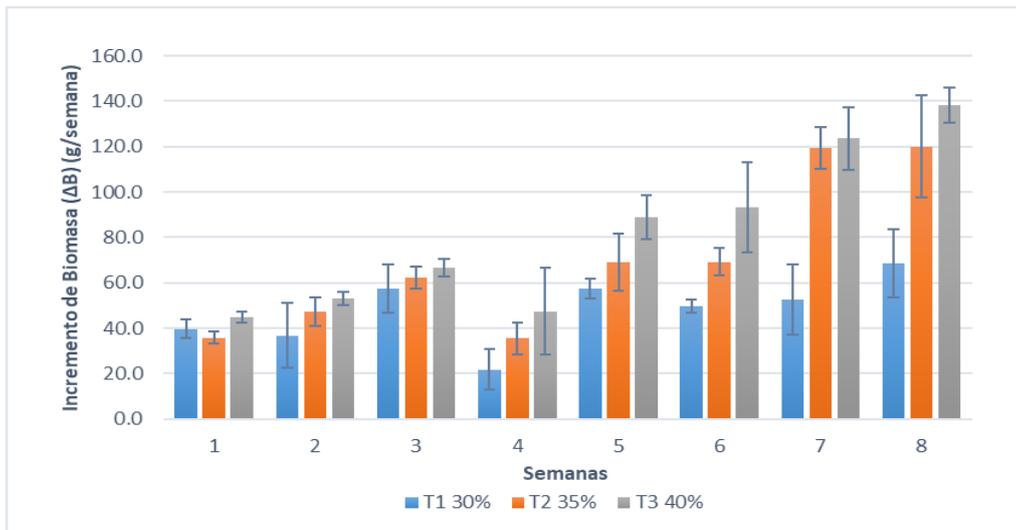


Figura 14. Incremento semanal de la biomasa de alevines de tilapia (*O. niloticus*), sometidos a tres tratamientos durante ocho semanas.

Ekasari et al. 2010, Avnimelech 2012, De Schryver et al., 2008, Ekasari et al., 2014; Emerenciano, 2013; Monroy-Dosta et al., 2013; Craig et al., 2012; Kubitza, 2011; Avnimelech, 2009; De Schryver et al., 2008; Azim et al., 2008; Hari et al., 2004, Schneider et al. 2005 entre otros autores indican que la utilización de proteína es significativamente mayor en sistemas con BFT, gracias a la adición de carbono que promueve la producción de proteína microbiana reusando el nitrógeno no consumido del alimento, y que luego alimento disponible para los peces. En el presente estudio, el incremento de la biomasa de las tilapias estuvo influenciada principalmente por la cantidad de proteína del alimento suministrado y en menor medida por el aporte nutricional de la proteína microbiana, considerando que las biomásas obtenidas guardan estrecha relación con el porcentaje de proteína de los tratamientos.

En la Tabla 12, también se presentan los porcentajes de supervivencia cuyos valores no presentan diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ). Popma y Green (1990), indican sobrevivencias alrededor de 90 por ciento en alevines de tilapia, en el presente estudio se reportaron porcentajes de supervivencia de 80 por ciento, un factor que pudo conducir al bajo rendimiento fue la concentración de Sólidos Suspendidos Totales que se mantuvieron por encima de los valores recomendados.

Cabe mencionar que los tratamientos estuvieron constantemente manipulados por las filtraciones de sólidos, la adición de melaza, la adición de carbonatos y biometrías, lo cual pudo haber generado condiciones de estrés en los peces, considerando que en la etapa de alevinaje, los peces son más susceptibles a los cambios del medio.

## V. CONCLUSIONES

- Se logró la cuantificación de la comunidad bacteriana heterótrofa en las unidades experimentales, donde el tratamiento con 40% de proteína en el alimento permitió un crecimiento promedio de  $5.72 \pm 0.51$  UFC/ml, superior significativamente a las concentraciones obtenidas en los tratamientos T2 y T3, con valores de  $5.63 \pm 0.63$  UFC/ml y  $5.94 \pm 0.56$  UFC/ml; respectivamente, siendo la bio disponibilidad del carbono en los tratamientos un factor que influyó en el crecimiento bacteriano.
- La concentración de proteína en el alimento balanceado presentan una relación directa con el incremento de los niveles de sólidos sedimentables (SS) , Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV) y sólidos suspendidos totales (SST), siendo el tratamiento T3 (40% de proteína) el que presentó mayor incremento de materia orgánica en suspensión.
- La prueba de correlación de Pearson indica que, con respecto a los valores promedio semanal de la concentración de bacterias heterótrofas (UFC/ml) resultó inversamente proporcional a los niveles de Nitrogeno Amoniacal y Sólidos Suspendidos Totales; asimismo, estos dos últimos resultaron directamente proporcionales entre si ( $\alpha < 0.05$ ).
- La presencia de bacterias heterótrofas y conformación de bacterias nitrificantes permitieron mantener la concentración de amoniaco ( $\text{NH}_3$ ) en un valor promedio de  $0.08 \text{ mg.L}^{-1}$  en todos los tratamientos, estos valores resultaron adecuados en cultivos de tilapia.

## VI. RECOMENDACIONES

- Para un mejor control y mantenimiento de los niveles de sólidos en los sistemas con biofloc, se recomienda realizar pruebas con uso de alimento peletizado que permita mejorar la captación del alimento por parte de los peces en cultivo, y consecuentemente ayudando a reducir su acumulación como sólidos suspendidos.
- Durante el alevinaje es recomendable adoptar una estrategia de adición de carbono con periodos menos frecuentes y de mayor cantidad. Asimismo, es recomendable trabajar con un bioreactor mantenido con una alta relación C:N (mayor o igual a 12.5:1) y en la fase de cultivo, durante la fase de alevinaje, emplear bajas relaciones C:N contenidas en el alimento.
- En un cultivo con BFT, se recomienda eventualmente cuantificar el biofloc en términos de sólidos suspendidos totales (SST/ml), para complementar las mediciones del volumen de sólidos y obtener datos más confiables.
- En etapa de alevinaje, se recomienda usar un clarificador adecuado y eficiente que permita la remoción de sólidos a niveles controlados evitando el estrés en los peces.
- En estudios posteriores, se recomienda obtener un análisis del coeficiente de digestibilidad del alimento empleado lo cual permitirá entender mejor las variables que afectan el crecimiento de peces en un sistema con alimento complementario, como el del sistema biofloc.

## VII. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

- ABDON, AC. 2012. Perú ¿Acuicultura Sostenible? Revista de Desarrollo Local Sostenible (DELOS). Vol 5. N°13
- ALBERTI, M; MARZLUFF, JM; SHULENBERGER, E; BRADLEY, G; RYAN, C; ZUMBRUNNEN, C. 2003. Integrating humans into ecology: opportunities and challenges for studying urban ecosystems. *Bioscience*. 53 (12): 1169-1179.
- ANTHONISEN, AC; LOEHR, RC; PRAKASAM T. Inhibition of Nitrification by Ammonia and Nitrous-Acid. *Journal Water Pollution Control Federation* 48(5) Pp. 835-852 (1976).
- APHA, 2012. Standard methods for the examination of the water and wastewater. 22 nd. American Public Health Association, Washington, EU.
- ARELLANO R. 2005. “Evaluación de la proliferación de bulking en sistemas de tratamiento de lodos activos” Tesis para obtener el Título de Ingeniero Civil. Concepción, Chile. Universidad del Bío-Bío, Facultad de Ingeniería. 117 pp.
- ATLAS RM; BARTHE R. 2002. Ecología Microbiana y Mibrobiología ambiental. Pearson Education S.A. Madrid.
- AVNIMELECH Y. 1999 Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture*. 176:227-35.
- AVNIMELECH, Y; RITVO, G. 2003. Shrimp and fish pond soils: Processes and management. *Aquaculture*. 220: 549-567.
- 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., 2009. *Biofloc Technology - A Practical Guide Book*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United States. 182 pp.

- AVNIMELECH, Y; KOCHBA, M. 2009. Evaluation of Nitrogen uptake and excretion by Tilapia in bio floc tanks, using  $^{15}\text{N}$  tracing. *Aquaculture*. 287: 163-168.
- AVNIMELECH, Y. 2011. Tilapia Production Using Biofloc Technology (BFT). Better Science, Better fish, better live: Proceedings of the ninth international symposium on tilapia in aquaculture. (6) 362.
- AVNIMELECH, Y. 2012. Biofloc Technology – A Practical Guide Book, 2<sup>d</sup> Edition. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United States.
- AZIM M y LITTLE AD. 2008. The Biofloc Technology (BFT) indoor tanks: Water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*. 283(1-4):29-35.
- BALTAZAR P; PALOMINO A. 2004. Manual de Cultivo de Tilapia. Publicación del Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero (Fondepes)-Agencia de Cooperación Española (AECI), Perú, 111 pp.
- BOYD, CE. 1990. Water quality in ponds for aquaculture. International Center for Aquaculture, Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, AL, USA.
- BURFORD, MA; THOMPSON, PJ; MCINTOSH, RP; BAUMAN, RH; PEARSON DC. 2004. The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high intensity, zero exchange system. *Aquaculture* 232, 525 - 537.
- CHEN, S; LING, J; BLANCHETON, JP. 2006. Nitrification kinetics of biofilm as affected by water quality factors. *Aquacultural Engineering*. 34, 179–197.
- CHOWDHURY, D. 2011. Optimal feeding rate for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Master Thesis. Norwegian University of Life Sciences. 76 p.
- COLT, J; 2006. Water quality requirements for reuse systems. *Aquacultural Engineering*. 34(3), 143 -156.
- 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. 2010. Bioflocs technology: An integrated system for the removal of nutrients and simultaneous production of feed in aquaculture. PhD Thesis, Ghent University. 178 p.
- CRAB R; DEFOIRDT T; BOSSIER P; VERSTRAETE W. 2012. Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges. *Aquaculture*, 356–357: 351–356.
- CULLIS-SUZUKI, S; PAULY, D. 2010. Marine protected area costs as “beneficial” fisheries subsidies: A global evaluation. *Coastal Management*, 38(2), 113-121.
- DE SCHRYVER P; CRAB R; DEFOIRDT, T; BOON, N; VERSTRAET, W. 2008. The basics of bio-flocs technology: The added value for aquaculture. *Aquaculture* 277:125–137.
- EBELING, JM; TIMMONS, MB; BISOGNI, JJ. 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia - nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture* 257; 346–358.
- EMERENCIANO, E; BALLESTER, ELC; CAVALLI, RO; WASIELESKY, W. 2012. Biofloc technology application as a food source in a limited water exchange nursery system for pink shrimp *Farfantopenaeus brasiliensi*. *Aquaculture Research* (43) 3, 447–457.
- FAO, 2009. Use of fishery resources as feed inputs to aquaculture development: trends and policy implications. FAO Fisheries Circular No. 1018. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- 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.
- GROSS, A; BOYD, C; WOOD, W. 2000. Nitrogen transformations and balance in channel catfish ponds. *Aquaculture Engineering*. 24: 1-14.
- GUTIERREZ-WING MT; MALONE RF. 2006. Biological filters in aquaculture: Trends and research directions for freshwater and marine applications. *Aquacultural Engineering*. 34 (3): 166 – 171.
- HARGREAVES, JA. 2006. Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. *Aquacultural Engineering* 34, 344–363.
- HARGREAVES, JA. 2013. Biofloc Production System for Aquaculture. Southern Regional Aquaculture Center (SRAC). No 4503.

HILLABY, BA; RANDALL, DJ. 1979. Acute ammonia toxicity and ammonia excretion in Rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. Fish. Res. Bd. Can. 36, 621–629.

HUNTINGFORD, FA; ADAMS, C; BRAITHWAITE, VA; KADRI, S; POTTINGER, TG; SANDOE, P; TURNBULL, JF. 2006. Current issues in fish welfare. Fish Biology. 68(2), 332 – 372.

JORAND, F; ZARTARIAN, F; THOMAS, F; BLOCK, JC; BOTTERO, JY; VILLEMIN, G; URBAIN, V; MANEM, J. 1995. Chemical and structural (2D) linkage between bacteria within activated-sludge flocs. Water Res. 29 (7), 1639–1647.

KÖRNER S; DAS SK; VEENSTRA S; VERMAAT JE. 2001. The effect of pH variation at the ammonium/ammonia equilibrium in wastewater and its toxicity to *Lemna gibba*. Aquatic Botany 71, 71-78.

KRISHNA, C; VAN LOOSDRECHT, MCM. 1999. Effect of temperature on storage polymers and settle ability of activated sludge. Water Research. 33(10), 2374 -2382.

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

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.

LIU, Y; FANG, HHP. 2003. Influences of extracellular polymeric substances (EPS) on flocculation, settling, and dewatering of activated sludge. Critical Reviews in Environmental Science and Technology. 33(3), 237 - 273.

MEJÍA, C; 2013. Dinámica del nitrógeno en bioreactores de un sistema de producción de alevinos machos de tilapia (*Oreochromis niloticus*) con Tecnología Biofloc. Tesis para obtener el Título de Ingeniero Pesquero. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina, Facultad de Pesquería. 90 pp.

METCALF, L; EDDY, HP. 1991. Wastewater Engineering: Treatment, Disposal, Reuse. McGraw Hill. 3rd Edition. New York. 929 pp.

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.

PIEDRAHITA, R.H., 2003. Reducing the potential environmental impact of tank aquaculture effluents through intensification and recirculation. *Aquaculture* 226, 35–44.

POPMA, TJ; LOVSHIN L. 1996. Worldwide prospects for commercial production of tilapia. Research and Development Series 41. International Center for Aquaculture and Aquatic Environments, Auburn University, Alabama, 23 pp.

PRODUCE (Ministerio de la Producción). 2011. Panorama de la Acuicultura Mundial, América Latina y el Caribe y en el Perú. (En línea). Consultado 13 abril. 2014. Disponible en: [http://www.racua.org/uploads/media/informe\\_acuicultura\\_mundo\\_al\\_peru.pdf](http://www.racua.org/uploads/media/informe_acuicultura_mundo_al_peru.pdf).

SAAVEDRA, MA. 2006. Manejo del Cultivo de Tilapia. Managua, NI. (En línea). Consultado 10 mayo. 2014. Disponible en: <http://www.crc.uri.edu/download/MANEJO-DEL-CULTIVO-DE-TILAPIA-CIDEA.pdf>

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

SCHVEITZER, R; ARANTES, R; FÓES, P; ESPÍRITO SANTO, CM; VINATEA, L; QUADROS, W; ANDREATTA, ER. 2013. Effect of different biofloc levels on microbial activity, water quality and performance of *Litopenaeus vannamei* in a tank system operated with no water exchange. *Aquacultural Engineering* 56, 59-70.

TACON, AGJ; CODY, JJ; CONQUEST, LD, DIVAKARAN, S; FOSTER IP; DECAMP OE. 2002. Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* fed different diets. *Aquaculture Nutrition* 8, 121 -137.

THURSTON, RV; RC RUSSO; K EMERSON. 1979. Aqueous ammonia equilibrium - tabulation of percent un-ionized ammonia. EPA Ecol. Res. Ser. EPA-600/3-79-091. Environmental Research Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN: 427 p.

TIMMONS, MB; EBELING, JM; WHEATON, FW; SUMMERFELT, ST; VINCI, BJ. 2002. Recirculating Aquaculture Systems, 2nd ed., vol. 01-002. NRAC Publication.

VAN WYK P. 2006. Production of *Litopenaeus vannamei* in recirculating aquaculture systems: management and design considerations. Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Conference on Recirculation Aquaculture. Virginia, EU. pp 38 – 47.

VAN DAM, AA; BEVERIDGE, MCM; AZIM, ME; VERDEGEM, MCJ. 2002. The potential of fish production based on periphyton. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 12(1), 1-31.

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.

WILEN, BM; NIELSEN, JL; KEIDING, K; NIELSEN, PH. 2000. Influence of microbial activity on the stability of activated sludge flocs. *Colloid and Interface Science*. 18(2), 145-156.

ZITA, A; HERMANSSON, M. 1994. Effects of ionic – strength on bacterial adhesion and stability of flocs in a waste-water activated-sludge system. *Applied and Environmental Microbiology*. 60(9), 3041 – 3048.

## VIII. ANEXOS

Anexo 1. Tabla de valores de corrección de 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, 2011

Anexo 2. Porcentaje de concentración de amonio no ionizado (H-NH<sub>3</sub>).

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: Thurston *et al.*, (1979).

Anexo 3. Resultados de la prueba ANOVA MR y comparación Tukey para evaluar la población de bacterias heterotróficas

Pruebas de efectos inter-sujetos (tratamientos)

Medida: Cantidad Bacterias

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Intersección	4778,266	1	4778,266	20550,452	,000
Tratamientos	2,450	2	1,225	5,269	,018
Error	3,488	15	,233		

a. Se ha calculado utilizando alpha = .05

Pruebas de efectos intra sujetos (semanas)

Medida: Cantidad Bacterias

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Eta parcial al cuadrado
Semanas Esfericidad asumida	34,609	7	4,944	14,309	,000	,488
Greenhouse-Geisser	34,609	4,041	8,565	14,309	,000	,488
Huynh-Feldt	34,609	6,454	5,362	14,309	,000	,488
Límite inferior	34,609	1,000	34,609	14,309	,002	,488

a. Se ha calculado utilizando alpha = .05

Resultados de la prueba de comparación Tukey para la población de bacterias

Medida: Cantidad\_Bacterias - HSD Tukey

\*, La diferencia de medias es significativa en el nivel = .05.

(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
T1	T2	,0896	,09843	,642	-,1661	,3452
	T3	-,2208	,09843	,096	-,4765	,0348
T2	T1	-,0896	,09843	,642	-,3452	,1661
	T3	-,3104*	,09843	,017	-,5661	-,0548
T3	T1	,2208	,09843	,096	-,0348	,4765
	T2	,3104*	,09843	,017	,0548	,5661

Anexo 4. Abundancia máxima de bacterias heterotróficas previo a la filtración.

	Tratamientos		
Tiempo	t1 (30%)	t2 (35%)	t3 (40%)
semana 2	6.57 ± 0.47 a	7.24 ± 0.64 a	6.81 ± 0.89 a
semana 4	7.04 ± 0.81 a	5.95 ± 0.25 a	6.47 ± 0.92 a
semana 6	6.39 ± 0.67 ab	5.60 ± 0.26 a	7.00 ± 0.59 b
semana 8	5.18 ± 0.16 a	4.78 ± 0.26 a	5.91 ± 1.04 a

Anexo 5. Valores promedio semanales de sólidos sedimentables (SS), sólidos suspendidos totales (SST) y sólidos suspendidos volátiles (SSV)

SEMANAS	SÓLIDOS SEDIMENTABLES			S. SUSPENDIDOS TOTALES			S. SUSPENDIDOS VOLÁTILES		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3
1	30.13 a	30.37 ab	30.87 ab	452.3 ab	489.0 a	486.9 a	346.07 a	365.78 a	385.87 a
2	41.56 b	37.89 c	37.29 bc	509.0 bc	470.3 a	534.7 ab	390.78 a	405.33 ab	416.00 ab
3	27.47 a	30.60 ab	37.33 bc	389.0 a	415.0 a	436.3 a	332.00 a	359.33 a	380.67 a
4	29.14 a	30.72 ab	35.94 abc	435.7 a	420.7 a	488.3 a	343.33 a	320.67 a	387.67 a
5	28.62 a	28.62 ab	34.71 abc	463.3 a	455.0 a	481.3 a	399.13 a	395.90 ab	428.67 ab
6	32.64 a	33.33 bc	39.06 bc	513.3 a	535.0 ab	593.0 bc	377.67 a	401.33 ab	444.00 ab
7	28.10 a	27.83 a	28.80 a	505.6 a	526.4 ab	520.0 ab	373.11 a	395.22 ab	409.00 a
8	33.69 a	33.67 bc	39.81c	574.0 b	626.9 b	663.0 c	403.33	471.67 b	515.67 b

Anexo 6. Ración diaria de alimento y melaza suministrados a los tratamientos, durante ocho semanas

TRATAMIENTO	CANTIDAD DE ALIMENTO							
	SEMANA 1	SEMANA 2	SEMANA 3	SEMANA 4	SEMANA 5	SEMANA 6	SEMANA 7	SEMANA 8
T1	103.83 g.	137.25 g.	168.17 g.	144.22 g.	136.91 g.	165.04 g.	162.31 g.	184.44 g.
T2	107.18 g.	137.29 g.	177.13 g.	153.02 g.	151.34 g.	185.20 g.	187.84 g.	238.03 g.
T3	102.07 g.	139.82 g.	184.42 g.	160.31 g.	163.55 g.	207.14 g.	216.74 g.	268.63 g.
TRATAMIENTO	CANTIDAD DE MELAZA							
	SEMANA 1	SEMANA 2	SEMANA 3	SEMANA 4	SEMANA 5	SEMANA 6	SEMANA 7	SEMANA 8
T1	0 g.	0 g.	0 g.	0 g.	0 g.	0 g.	0 g.	0 g.
T2	1.46 g.	1.87 g.	2.42 g.	2.09 g.	2.06 g.	2.53 g.	2.56 g.	3.25 g.
T3	3.67 g.	5.03 g.	6.64 g.	5.77 g.	5.89 g.	7.45 g.	7.80 g.	9.67 g.

Anexo 7. Resultados de la prueba de Correlación de Pearson entre las colonias de bacterias (log UFC.ml<sup>-1</sup>), SST (sólidos suspendidos totales) y NAT (Nitrógeno Amoniacal Total).

TRATAMIENTO = 1.00 /SEMANA = 1.00					TRATAMIENTO = 1.00 /SEMANA = 5.00				
Variable(1) Variable(2) n Pearson p-valor					Variable(1) Variable(2) n Pearson p-valor				
UFC	SST	6	-0.06	0.9066	UFC	SST	6	0.28	0.5891
UFC	TAN	6	-0.01	0.9924	UFC	TAN	6	-0.90	0.0143
SST	TAN	6	0.83	0.0394	SST	TAN	6	-0.31	0.5516
TRATAMIENTO = 1.00 /SEMANA = 2.00					TRATAMIENTO = 1.00 /SEMANA = 6.00				
Variable(1) Variable(2) n Pearson p-valor					Variable(1) Variable(2) n Pearson p-valor				
UFC	SST	6	-0.45	0.3658	UFC	SST	6	-0.08	0.8816
UFC	TAN	6	0.28	0.5911	UFC	TAN	6	0.24	0.6416
SST	TAN	6	-0.37	0.4754	SST	TAN	6	-0.37	0.4763
TRATAMIENTO = 1.00 /SEMANA = 3.00					TRATAMIENTO = 1.00 /SEMANA = 7.00				
Variable(1) Variable(2) n Pearson p-valor					Variable(1) Variable(2) n Pearson p-valor				
UFC	SST	6	-0.32	0.5379	UFC	SST	6	-0.18	0.7380
UFC	TAN	6	-0.27	0.6066	UFC	TAN	6	-0.50	0.3146
SST	TAN	6	-0.51	0.3038	SST	TAN	6	0.49	0.3239
TRATAMIENTO = 1.00 /SEMANA = 4.00					TRATAMIENTO = 1.00 /SEMANA = 8.00				
Variable(1) Variable(2) n Pearson p-valor					Variable(1) Variable(2) n Pearson p-valor				
UFC	SST	6	0.26	0.6192	UFC	SST	6	-0.86	0.0279
UFC	TAN	6	0.05	0.9241	UFC	TAN	6	0.42	0.4080
SST	TAN	6	0.14	0.7872	SST	TAN	6	-0.65	0.1626

<i>TRATAMIENTO*SEMANA = 2.00:1.00</i>					<i>TRATAMIENTO*SEMANA = 2.00:5.00</i>				
Variable(1)	Variable(2)	n	Pearson	p-valor	Variable(1)	Variable(2)	n	Pearson	p-valor
UFC	SST	6	-0.80	0.0561	UFC	SST	6	0.32	0.5299
UFC	TAN	6	-0.86	0.0265	UFC	TAN	6	0.50	0.3086
SST	TAN	6	0.61	0.1974	SST	TAN	6	0.51	0.3026
<i>TRATAMIENTO*SEMANA = 2.00:2.00</i>					<i>TRATAMIENTO*SEMANA = 2.00:6.00</i>				
Variable(1)	Variable(2)	n	Pearson	p-valor	Variable(1)	Variable(2)	n	Pearson	p-valor
UFC	SST	6	-0.13	0.8027	UFC	SST	6	0.43	0.3966
UFC	TAN	6	0.28	0.5894	UFC	TAN	6	0.15	0.7761
SST	TAN	6	-0.03	0.9620	SST	TAN	6	0.49	0.3278
<i>TRATAMIENTO*SEMANA = 2.00:3.00</i>					<i>TRATAMIENTO*SEMANA = 2.00:7.00</i>				
Variable(1)	Variable(2)	n	Pearson	p-valor	Variable(1)	Variable(2)	n	Pearson	p-valor
UFC	SST	6	-0.90	0.0138	UFC	SST	6	0.04	0.9369
UFC	TAN	6	-0.71	0.1173	UFC	TAN	6	-0.45	0.3681
SST	TAN	6	0.58	0.2238	SST	TAN	6	0.16	0.7569
<i>TRATAMIENTO*SEMANA = 2.00:4.00</i>					<i>TRATAMIENTO*SEMANA = 2.00:8.00</i>				
Variable(1)	Variable(2)	n	Pearson	p-valor	Variable(1)	Variable(2)	n	Pearson	p-valor
UFC	SST	6	0.64	0.1667	UFC	SST	6	-0.21	0.6889
UFC	TAN	6	-0.23	0.6567	UFC	TAN	6	0.39	0.4429
SST	TAN	6	-0.30	0.5593	SST	TAN	6	-0.71	0.1131

<i>TRATAMIENTO*SEMANA = 3.00:1.00</i>					<i>TRATAMIENTO*SEMANA = 3.00:5.00</i>				
Variable(1)	Variable(2)	n	Pearson	p-valor	Variable(1)	Variable(2)	n	Pearson	p-valor
UFC	SST	6	-0.73	0.0971	UFC	SST	6	0.33	0.5240
UFC	TAN	6	-0.18	0.7295	UFC	TAN	6	0.05	0.9221
SST	TAN	6	0.40	0.4368	SST	TAN	6	-0.27	0.5983
<i>TRATAMIENTO*SEMANA = 3.00:2.00</i>					<i>TRATAMIENTO*SEMANA = 3.00:6.00</i>				
Variable(1)	Variable(2)	n	Pearson	p-valor	Variable(1)	Variable(2)	n	Pearson	p-valor
UFC	SST	6	-0.29	0.5803	UFC	SST	6	0.34	0.5136
UFC	TAN	6	0.42	0.4013	UFC	TAN	6	0.67	0.1477
SST	TAN	6	0.21	0.6845	SST	TAN	6	0.74	0.0945
<i>TRATAMIENTO*SEMANA = 3.00:3.00</i>					<i>TRATAMIENTO*SEMANA = 3.00:7.00</i>				
Variable(1)	Variable(2)	n	Pearson	p-valor	Variable(1)	Variable(2)	n	Pearson	p-valor
UFC	SST	6	-0.39	0.4384	UFC	SST	6	-0.76	0.0785
UFC	TAN	6	-0.64	0.1680	UFC	TAN	6	-0.94	0.0060
SST	TAN	6	0.57	0.2367	SST	TAN	6	0.91	0.0124
<i>TRATAMIENTO*SEMANA = 3.00:4.00</i>					<i>TRATAMIENTO*SEMANA = 3.00:8.00</i>				
Variable(1)	Variable(2)	n	Pearson	p-valor	Variable(1)	Variable(2)	n	Pearson	p-valor
UFC	SST	6	0.18	0.7290	UFC	SST	6	0.19	0.7216
UFC	TAN	6	-0.30	0.5660	UFC	TAN	6	0.13	0.7989
SST	TAN	6	-0.27	0.6050	SST	TAN	6	0.10	0.8491

Criterio de prueba:

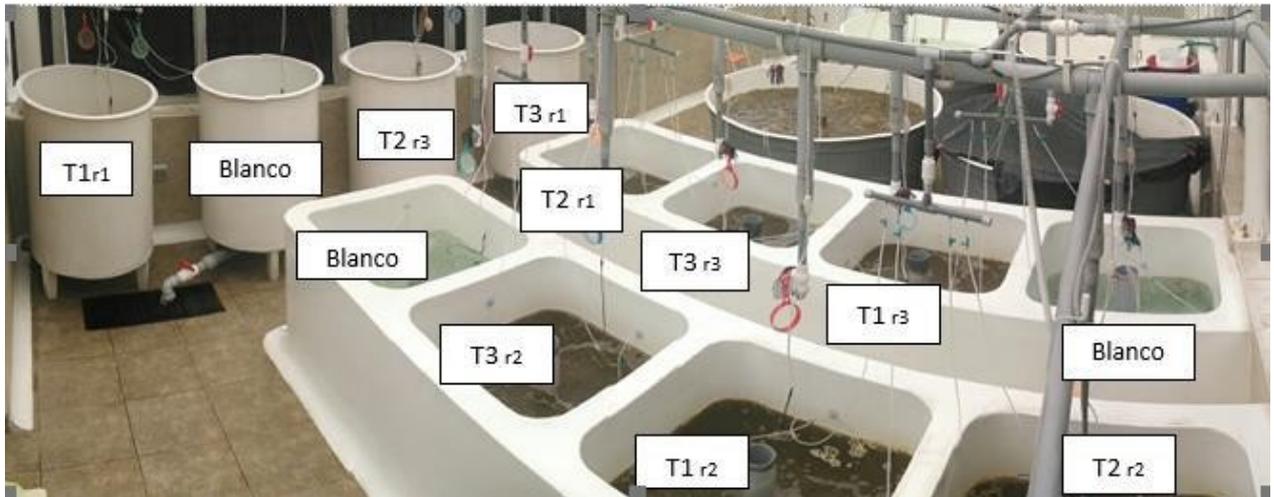
Es significativo cuando el pvalor  $< 0.05$  (Se rechaza  $H_0$ , existe correlación)

Índices	Interpretación
0.00 – 0.2	Ínfima correlación
0.2 – 0.4	Escasa Correlación
0.4 – 0.6	Moderada correlación
0.6 – 0.8	Buena correlación
0.8 – 1	Muy buena correlación

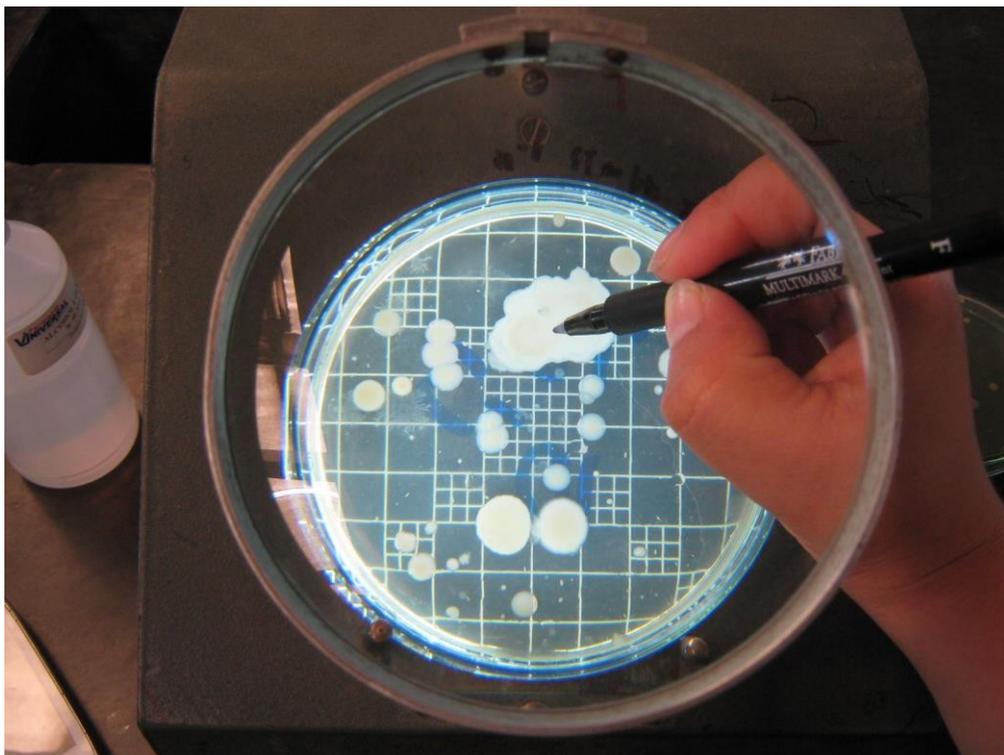
## Anexo 8. Fotografías complementarias



Ilustración N° 1. Bioreactor de biofloc (C:N igual a 12.5:1)



Fotografía N°2. Unidades de cultivo instalados



Fotografía N°3. Contaje de colonias bacterianas



Fotografía N°4. Instrumentos de medición