

Research Article

Determinación del flujo de agua para la biorremediación en sistemas recirculados acuaculturales utilizando tapetes microbianos construidos

Ricardo Jiménez-Montealegre¹, Jorge Zamora-Castro² & Gerardo Zúñiga-Calero¹

¹Estación de Biología Marina, Escuela de Ciencias Biológicas
Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica

²Universidad Politécnica Metropolitana de Puebla, Calle Popocatepetl s/n
Col. Tres Cerritos, Puebla, México

Corresponding author: Ricardo Jiménez-Montealegre (rjimenez@una.cr)

RESUMEN. Se evaluó el efecto del flujo de agua sobre la eficiencia de tapetes microbianos para remover nitrógeno amoniacal total (NAT, $\text{N-NH}_4^+ + \text{N-NH}_3$), nitritos (N-NO_2^-), nitratos (N-NO_3^-) y ortofosfatos (P-PO_4^{3-}) en un sistema de recirculación piloto para el cultivo de camarón blanco del Pacífico, *Litopenaeus vannamei*. Se evaluaron cuatro flujos de agua durante un período de 40 días: $5,2 \pm 0,3$ (A), $6,6 \pm 1,3$ (B), $8,4 \pm 0,3$ (C) y $12,2 \pm 0,7$ (D) L min^{-1} . Las concentraciones de NAT y nitritos fueron significativamente menores ($P < 0,05$) en los tratamientos de mayor flujo (C y D) con concentraciones menores a $0,6 \text{ mg L}^{-1}$ y $0,7 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. Los nitratos aumentaron en todos los tratamientos a lo largo del experimento y sus concentraciones finales fueron estadísticamente mayores en los tratamientos con mayor flujo ($7,1 \text{ mg L}^{-1}$). No se encontraron diferencias en la remoción de ortofosfatos entre los tratamientos ($P > 0,05$), y su concentración en los sistemas de cultivo alcanzó valores de $4,63 \pm 0,76 \text{ mg L}^{-1}$. La tasa de crecimiento de los camarones se mantuvo cercana al valor esperado de $0,7 \text{ g semana}^{-1}$. En este trabajo se demostró que el flujo de agua posee un efecto importante en la capacidad de los tapetes microbianos para la biorremediación de amonio y nitritos en sistemas recirculados. Se recomienda continuar con la identificación de otras variables que podrían afectar el óptimo funcionamiento de los tapetes microbianos.

Palabras clave: *Litopenaeus vannamei*, tapetes microbianos, biorremediación, Sistemas de Recirculación en Acuicultura (RAS).

Determination of water flow rate for bioremediation in recirculating aquaculture systems using constructed microbial mats

ABSTRACT. The effect of water flow rate was evaluated on the microbial mats efficiency to remove total ammonia nitrogen (TAN, $\text{NH}_4^+ + \text{NH}_3$), nitrite (N-NO_2^-), nitrate (N-NO_3^-) and orthophosphate (P-PO_4^{3-}) in a pilot recirculation system for the culture of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Four water flow rates were evaluated during 40 days: 5.2 ± 0.3 (A), 6.6 ± 1.3 (B), 8.4 ± 0.3 (C), and 12.2 ± 0.7 (D) L min^{-1} . The concentrations of TAN and nitrites were significantly lower ($P < 0.05$) in the higher flow treatments (C and D) and always showed values below 0.6 mg L^{-1} and 0.7 mg L^{-1} , respectively. The concentrations of nitrate increased in all treatments through the experimental period; however, the concentrations were statistically higher in treatments with higher flow rate (7.1 mg L^{-1}). Orthophosphate removal was not significantly different between treatments ($P > 0.05$). No differences in the removal of orthophosphate between treatments ($P > 0.05$) were found, and their concentration in the culture systems reached values of $4.63 \pm 0.76 \text{ mg L}^{-1}$. The growth rate of shrimp remained close to the expected value of 0.7 g week^{-1} . This study showed that the water flow rate has a significant effect on the microbial mats capacity for the bioremediation of ammonium and nitrite in recirculating systems. It is recommended to continue with the identification of other variables that could affect the optimal functioning of microbial mats in RAS.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, microbial mats, bioremediation, Recirculating Aquaculture System (RAS).

INTRODUCCIÓN

La acuicultura se puede desarrollar bajo sistemas de producción extensivos, semi-intensivos o intensivos dependiendo entre otros factores del grado de control de la calidad del agua. En sistemas intensivos el agua puede ser descartada luego de su uso, o ser tratada física, química y/o biológicamente para su reutilización.

La cantidad de agua requerida en los sistemas de producción acuícola aumenta con la intensificación. La disponibilidad de agua para otros fines sociales, y la contaminación asociada al uso desmedido han obligado a los gobiernos a tomar medidas de mitigación tales como el establecimiento de tasas económicas acordes a los volúmenes de uso y a las descargas de nutrientes. Esto a su vez ha obligado a los productores a diseñar sistemas que les permitan seguir operando de manera eficiente, y reducir la cantidad de agua requerida.

Una estrategia importante en la acuicultura, sobre todo en países desarrollados, donde los costos por el uso del agua son elevados, es la implementación de sistemas de tratamiento y recirculación de agua dentro de las unidades productivas (Timmons & Ebeling, 2007). Los sistemas de recirculación en acuicultura (Recirculating Aquaculture System, RAS) se diseñan para producir grandes cantidades de organismos en volúmenes de agua relativamente pequeños. Sin embargo, la acumulación de productos metabólicos o sus derivados, algunos de ellos tóxicos, hace indispensable el tratamiento del agua para su reutilización.

La biofiltración es un proceso oxidativo microbiano que transforma los metabolitos tóxicos como amoníaco (NH_3^+) o nitrito (NO_2^-) en formas químicas menos tóxicas para los organismos de cultivo mediante la intervención de bacterias nitrificantes (Hargreaves, 1998). A pesar que este proceso se utiliza en prácticamente todos los sistemas de recirculación para la producción acuícola, su forma química final es el nitrato (NO_3^-) el cual también debe ser procesado, frecuentemente de manera anaeróbica.

En años recientes, han surgido tecnologías más eficientes para la bioremediación de efluentes acuícolas. Algunas estrategias propuestas en el cultivo de camarón se basan en cultivos integrados mediante el uso de humedales construidos (Lin *et al.*, 2003, 2005), filtración por moluscos (Martínez-Córdova *et al.*, 2011), macroalgas (Sánchez-Romero *et al.*, 2013), sistemas hidropónicos (Martínez-Córdova *et al.*, 2011; Mariscal-Lagarda *et al.*, 2012) y reactores (nitrificantes, denitrificantes y clarificadores) (Boopathy *et al.*, 2005). Sin embargo, la mayoría de estos métodos resultan poco factibles, ya sea, en términos de capital de

inversión, requerimiento energético, infraestructura, área requerida y/o frecuencia de mantenimiento.

Una propuesta práctica, de bajo costo y ambientalmente compatible que empieza a implementarse en la depuración de efluentes camaronícolas, es el uso de tapetes microbianos. La biorremediación de agua la realizan de manera natural comunidades autótrofas y heterótrofas con una diversidad de cianobacterias, bacterias (púrpuras, reductoras y no reductoras de sulfato) y diatomeas entre otros grupos taxonómicos, que forman una biopelícula o tapete microbiano (Bender *et al.*, 2004; Robertson *et al.*, 2009). Estas comunidades actúan simultánea y sinérgicamente sobre cada uno de los contaminantes orgánicos e inorgánicos presentes en el agua.

En los sistemas de cultivo, la comunidad de microorganismos que constituyen el tapete microbiano es inmovilizada sobre una matriz inerte (no tóxica) de polyester de baja densidad (Lezama-Cervantes & Paniagua-Michel, 2010; Lezama-Cervantes *et al.*, 2010). Esta matriz está conformada por una estructura fibrosa de composición ligera y alta porosidad (con una relación superficie:volumen alta), que facilita la fijación estratificada de los microorganismos (principalmente bacterias, cianobacterias y microalgas) y el paso del agua residual a través del tapete microbiano (Zamora-Castro *et al.*, 2008). Esta tecnología, además de evitar el lavado de células del sistema, tiene también gran flexibilidad operacional a la hora de incorporarla al sistema de cultivo.

El uso de tapetes microbianos en la acuicultura es una estrategia complementaria a los tradicionales bioreactores nitrificantes (biofiltros) para el tratamiento de agua en RAS. Además de tratar los efluentes (Goodroad *et al.*, 1995; Bender *et al.*, 2004; Lezama-Cervantes & Paniagua-Michel, 2010), este tratamiento permite reducir el uso de agua con una inversión menor en área y volumen debido a la alta relación área superficial:volumen que tienen (Zamora-Castro *et al.*, 2008). Además, los tapetes pueden ser utilizados como alimento complementario por las especies en cultivo (Phillips *et al.*, 1994; Lopes-Thompson *et al.*, 2002; Al-Maslmani *et al.*, 2009).

Lopes-Thompson *et al.* (2002) demostraron la efectividad del uso de biofilms para el procesamiento y reducción de las concentraciones de amonio y fosfato en estanques con camarones marinos (*Farfantepenaeus paulensis*). Paniagua-Michel & García (2003) demostraron en condiciones de laboratorio la efectiva capacidad de tapetes microbianos construidos para disminuir la demanda bioquímica de oxígeno (DBO_5) y los compuestos nitrogenados en un efluente de cultivo de camarón. Lezama-Cervantes *et al.* (2010) evaluaron el desempeño de un tapete microbiano sobre el proceso

de biorremediación de un efluente camarónicola provisto de un sistema piloto de recirculación en condiciones de mínimo recambio de agua, y fue capaz de disminuir significativamente la carga orgánica e inorgánica a la vez que propició el crecimiento y supervivencia de los camarones.

Se conoce poco sobre los parámetros físicos, químicos y biológicos que permitirían optimizar el funcionamiento de tapetes microbianos incorporados en un RAS. Uno de estos parámetros es el tiempo de residencia y/o flujo de agua sobre el tapete microbiano para propiciar una acción efectiva del tapete. En esta investigación se evaluaron diferentes tasas de flujo (5,2; 6,6; 8,4 y 12,2 L min⁻¹) para la optimización del funcionamiento de tapetes microbianos incluidos en un sistema de recirculación a nivel piloto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Unidad experimental

Para el experimento se utilizaron 12 sistemas recirculados independientes. Cada sistema consistió de un estanque principal de cultivo de 200 L, circular y de fondo cónico, unido al sistema de tratamiento conformado por dos estanques (A y B) de 80 L cada uno, para un volumen total de 360 L. En cada uno de los estanques de 80 L se colocaron dos tapetes: uno con biomasa predominantemente algal (A) y otro con biomasa predominantemente bacteriana (B). La recirculación del agua en el sistema se mantuvo mediante el uso de una bomba de agua sumergible, modelo Lifetech AP 1600® (capacidad máxima de 900 L h⁻¹), colocada en el estanque principal. El agua fluyó contra gravedad hacia el primer estanque (A), el cual a su vez estuvo comunicado con el otro estanque (B). Finalmente, por gravedad, el agua del estanque B retornaba al estanque principal. A la tubería de conducción se le incorporó un sistema para desviar el agua. Con ello se pudo variar la cantidad de agua (flujo) que podría pasar por el sistema de tapetes. Para evitar el descenso de la concentración de oxígeno, fue necesario colocar un sistema de aireación complementaria durante todo el experimento.

Construcción de los tapetes microbianos

Para la construcción de los tapetes microbianos algales (Tipo A) se colectaron muestras de suelo provenientes de fincas camaróneras alrededor del Golfo de Nicoya (Costa Rica). Las muestras se tomaron con una espátula (primeros 5 mm), se colocaron en bolsas plásticas estériles y se transportaron al laboratorio de acuerdo con la metodología empleada por Paniagua-Michel & García (2003) y Zamora-Castro *et al.* (2008).

Simultáneamente, se colectaron muestras de biomasa algal provenientes de estanques de cultivo cercanos al laboratorio (Puntarenas, Golfo de Nicoya) utilizando una red de 80 µm de luz de malla. Una vez en el laboratorio, las muestras de suelo fueron resuspendidas en agua de mar estéril, filtradas con papel Whatman (G/F 1,2 µm), retrolavadas y nuevamente resuspendidas en cuatro diferentes medios líquidos de cultivo: ASN III (Rippka *et al.*, 1979) para el cultivo de cianobacterias, F/2 (Guillard & Ryther, 1962) para el cultivo de microalgas en general, y QA (Rostron *et al.*, 2001) empleado para estimular el crecimiento de bacterias amonio y nitrito oxidantes, principalmente. También se utilizó un medio de cultivo QA modificado (Zamora-Castro, 2004)

Todos los inóculos se mantuvieron en una incubadora (Precision® 818) con luz fluorescente de intensidad entre 200 y 300 µE m⁻² s⁻¹, a una temperatura constante de 30°C y bajo un régimen lumínico de 12:12 (horas luz: horas oscuridad). Los inóculos se cultivaron por varias generaciones y se replicaron quincenalmente. Cada semana se determinó la densidad y las especies algales presentes en cada uno de los medios de cultivo utilizados. Debido a que dichos medios no resultaron específicos para cada uno de los grupos taxonómicos, se tomaron alícuotas de cada cultivo, se mezclaron, y la biomasa fue cultivada en el medio QA modificado, ya que con éste se obtuvieron los mejores crecimientos algales.

Los inóculos fueron sembrados en estanques de 200 L (al aire libre) en los que se colocaron tiras de poliéster de baja densidad (Dacron®) de 70 cm de largo por 15 cm de ancho (área total efectiva de 1.050 cm²). Se prepararon 12 tapetes que fueron fijados sobre una estructura de PVC en forma de “W”. Cada uno de ellos fue colocado posteriormente en un estanque de 60x40x35 cm (largo x ancho x alto) con flujo de agua constante de 8 L min⁻¹. La salinidad y la temperatura de los cultivos microbianos fueron ajustadas a las condiciones promedio externas antes de su traslado al sistema descrito anteriormente.

Para la preparación de los tapetes microbianos bacteriales (Tipo B), la colecta de los microorganismos del Dominio Bacteria (cianobacterias y bacterias) se realizó mediante el raspado de sedimentos superficiales en los estanques donde se cultivan los camarones. Las muestras fueron homogenizadas y concentradas por filtración al vacío sobre una membrana Whatman (GF/C), y lavadas varias veces con el medio a utilizar para su cultivo. Los filtrados se inocularon en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 50 mL de cultivo, y fueron mantenidos en oscuridad, aireación constante y temperatura de 30°C. El medio de cultivo utilizado fue el descrito por Sánchez (2004) para bacterias nitrí-

ficantes (*Nitrosomonas* sp.). El sistema de cultivo se escaló hasta un volumen final de 50 L. Durante el proceso de cultivo se mantuvo el pH cerca de 7,0, ajustándolo (cada dos días) con una solución NaHCO_3 . Además, se enriqueció regularmente con sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para garantizar la fuente constante de nitrógeno.

Al igual que con los tapetes microbianos algales, antes de trasladar los tapetes bacterianos al sistema, se ajustó lentamente la salinidad y temperatura del cultivo. Las bacterias se sembraron sobre tiras de Dacron® y se colocaron sobre las estructuras de PVC en forma de "W". En este caso, los estanques se mantuvieron protegidos de la luz para favorecer el desarrollo de bacterias nitrificantes y evitar el crecimiento de organismos fotosintéticos.

Una vez inoculados los 24 tapetes (12 Tipo A y 12 Tipo B), se mantuvieron en el sistema de cultivo durante 15 días con un flujo constante de 8 L min^{-1} . El medio fue enriquecido con fósforo y nitrógeno hasta una concentración inicial de $5 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$, $1 \text{ mg N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$ y $3 \text{ mg P-PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$ para garantizar que los tapetes algales continuaran creciendo. Las biopelículas de los tapetes Tipo A alcanzaron en 15 días un grosor de 3 a 5 mm.

Efecto del flujo de agua sobre la eficiencia del tapete para remover metabolitos

Para evaluar el efecto del flujo de agua sobre la eficiencia de remoción de metabolitos de los tapetes microbianos se emplearon cuatro tratamientos con tres repeticiones cada uno: 1,5, 2,0, 2,5 y 3,5 ciclos h^{-1} , equivalentes a $5,2 \pm 0,3$; $6,6 \pm 1,3$; $8,4 \pm 0,3$ y $12,2 \pm 0,7 \text{ L min}^{-1}$, respectivamente.

En cada estanque de cultivo se colocaron alrededor de 20 camarones juveniles de *Litopenaeus vannamei* con un peso promedio inicial de $4,64 \pm 0,75 \text{ g}$ y una biomasa por estanque de $\sim 0,50 \text{ g L}^{-1}$. Los camarones recibieron alimento peletizado formulado (40% de proteína). Se garantizó la presencia de suficiente materia orgánica y generación de metabolitos en el sistema, mediante una tasa de alimentación del 10% del peso corporal por día. La ración se ajustó semanalmente, de acuerdo al peso promedio de los individuos. Cada semana se removían del sistema, mediante una válvula, los sólidos sedimentados en el cono del estanque.

Determinación de los parámetros físicos y químicos del agua y de las variables de producción

Con un instrumento multiparamétrico (Thermo Electron Corporation, Orion 5 STAR) se midió diariamente durante 40 días, la temperatura, pH y oxígeno disuelto en el agua. La salinidad se midió con

un refractómetro (NEW S-100). Cada 3-4 días se colectaron 500 mL de agua de cada sistema y las muestras fueron preservadas y almacenadas en refrigeración (4°C) para su posterior análisis (APHA, 1995). Las formas de nitrógeno inorgánico disueltas fueron nitritos (N-NO_2^-) (diazotización), nitratos (N-NO_3^-) previa reducción con cadmio y posterior medición en forma de nitritos, y nitrógeno amoniacal total ($\text{N-NH}_4^+ + \text{N-NH}_3$) mediante el método del fenato (Parsons *et al.*, 1984). La suma de las tres especies nitrogenadas fue denotada como Nitrógeno Inorgánico Disuelto (NID). Adicionalmente, se midió la concentración de ortofosfato (P-PO_4^{3-}) con el método del molibdato-ascorbato (Strickland & Parsons, 1972). Las mediciones se hicieron por duplicado con un espectrofotómetro Shimadzu® (UV-1203).

Con el fin de evitar la manipulación de los organismos durante el experimento, se asumió una tasa de crecimiento de $0,15 \text{ g d}^{-1}$ y se diseñó una tasa de alimentación del 10% del peso corporal diario. Con ello, se ajustó semanalmente la ración alimenticia. Al final de experimento (40 días) se evaluaron los siguientes parámetros: mortalidad ($\text{M}\%$) = $((\text{Ni}-\text{Nf}/\text{Ni}) * 100)$ donde Ni y Nf es el número de organismos al inicio y final, respectivamente; tasa de crecimiento (GR , g d^{-1}) = $(\text{Pf}-\text{Pi})/t$ donde Pf y Pi son el peso final e inicial en gramos, y t es el tiempo en días; y factor de conversión alimenticia (FCA , g d^{-1}) = A/B , donde A es el alimento ofrecido (peso húmedo, g) y B es la biomasa ganada (peso fresco, g), ambos en un mismo período de tiempo.

Identificación y cuantificación de los principales grupos asociados a los tapetes microbianos

Al inicio y al final del experimento se identificaron los principales taxones componentes del tapete algal (Tipo A), mediante observación y conteo bajo microscopía de luz. Con ello se describió la composición y concentración inicial y final de los principales grupos de microorganismos asociados a los tapetes y su contribución relativa al total de las especies presentes.

De manera regular se cuantificó la biomasa en los tapetes Tipo A. Para ello se siguieron dos procedimientos. En el primero, la matriz completa (Dacrón®) se lavó inicialmente con ácido clorhídrico al 5% y agua destilada, se secó en una estufa a 60°C y se llevó a peso constante ($\pm 0,1 \text{ g}$). Esa matriz fue inoculada con la biomasa algal tal como se describió anteriormente. Tanto al inicio como al final del experimento, el tapete algal (Dacrón® + biomasa) fue lavado con una solución de formiato de amonio al 3% para eliminar las sales, secado y llevado nuevamente a peso constante ($\pm 0,1 \text{ g}$). En el segundo método se utilizaron trozos de 4 cm^2 en lugar de todo el tapete. Al

inicio y final del experimento los microorganismos fueron disectados de los tapetes y la biomasa fue suspendida en solución de formiato de amonio (3%), separada a través de filtros Whatman GF/C y también llevada a peso constante. En ambos métodos la diferencia de peso entre la matriz y el tapete al inicio y al final del experimento fue expresada como gramos de biomasa seca por m² de tapete. Todas las mediciones fueron realizadas aleatoriamente por triplicado.

En los tapetes Tipo B el cultivo bacterial inicial fue monitoreado indirectamente, asumiendo la existencia de bacterias producto de la dinámica de los compuestos nitrogenados. Para ello, se midió la disminución de la concentración de amonio-amoniaco, así como el aumento en la concentración de nitratos, y el descenso del pH del medio de cultivo. Esto, por cuanto los tres procesos permiten valorar la acción de las bacterias nitrificantes. Para esta estimación se necesitó el suministro diario de amonio (NH₄)₂SO₄, y el pH se mantuvo cerca de 7,0 con NaHCO₃. Durante el experimento se asumió que dicho consorcio bacterial estuvo presente también en los sistemas de cultivo.

Análisis estadístico

A todas las variables físicas y químicas, microorganismos y parámetros zootécnicos del camarón se le realizó un análisis de varianza de una vía para datos uniformes y homoscedásticos o su valor transformado (Zar, 1984; Yamane, 1999). En los casos en que se observaron diferencias significativas, se realizó el análisis *a posteriori* de Student-Newman-Keuls SNK (Zar, 1984) con un nivel de confianza del 95%. Los análisis se realizaron utilizando el software Statistica Ver. 10[®] (StatSoft, Inc. 2011).

RESULTADOS

Los cuatro medios de cultivo utilizados durante la primera fase de acondicionamiento de los microorganismos empleados para la construcción de los tapetes Tipo A (ASN III, F/2, QA y QA modificado) permitieron el desarrollo de biomasa, aunque no fueron selectivos en cuanto al conjunto de especies presentes. El medio de cultivo QA modificado -con niveles de fósforo y nitrógeno similares al medio ASN III- permitió el mejor crecimiento algal. La concentración celular promedio del inóculo antes de adicionarlo a las matrices de Dacrón[®] fue de $11,83 \pm 0,42 \times 10^6$ cel mL⁻¹.

Los valores promedio de los principales parámetros en el agua se indican en la Tabla 1. La salinidad fue el único parámetro que mostró diferencias significativas ($P < 0,05$) entre tratamientos. El pH, oxígeno disuelto

y temperatura tuvieron escasa variación a lo largo del experimento.

La Figura 1 muestra las fluctuaciones de ortofostatos y de las tres especies nitrogenadas estudiadas (nitratos, nitritos y amonio-amoniaco) en los sistemas recirculados. Al inicio del experimento las concentraciones de todos los parámetros fueron similares entre tratamientos y entre repeticiones ($P > 0,05$) (Fig. 1).

Las concentraciones de nitrógeno amoniacal total (NAT) aumentaron hasta casi 7,5 mg L⁻¹ en los tratamientos de menor flujo (A y B), y se mantuvieron con valores bajos (siempre menores a 0,6 mg L⁻¹) en los tratamientos con flujos mayores (C y D). Las concentraciones de NAT en el tratamiento A (1,5 ciclos h⁻¹) fueron significativamente mayores ($P < 0,05$) a las encontradas en el tratamiento B (2,0 ciclos h⁻¹), sobre todo hacia el final del experimento; y a su vez, los tratamientos A y B fueron estadísticamente diferentes a los tratamientos C y D (2,5 y 3,5 ciclos h⁻¹, respectivamente).

De manera similar, las concentraciones de nitritos aumentaron con el tiempo en los tratamientos A y B, llegando a tener valores superiores a 4,0 mg L⁻¹, mientras que en los tratamientos con mayores flujos la concentración final a los 40 días no superó los 0,7 mg L⁻¹. Para los nitritos únicamente el tratamiento A (menor flujo) mostró diferencias significativas ($P < 0,05$) al resto de tratamientos. En todos los tratamientos las concentraciones de nitratos aumentaron a lo largo del experimento. Sus valores finales fueron mayores en los tratamientos con mayor flujo de agua. Los tratamientos A y B fueron similares en cuanto a la concentración final de nitratos y, a su vez, diferentes ($P < 0,05$) de los tratamientos C y D.

Finalmente, no se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los tratamientos con respecto a la concentración de ortofostatos. En todos los tratamientos se evidenció una acumulación de ortofostatos en el sistema, con concentraciones iniciales promedio de $0,31 \pm 0,15$ mg L⁻¹ y finales de $4,63 \pm 0,76$ mg L⁻¹. En la Fig. 2 se presentan en forma resumida las diferentes formas de NID durante tres períodos del experimento (1, 20 y 40 días) y para cada uno de los cuatro tratamientos.

Al inicio del experimento, en los tratamientos de menor flujo (A y B) alrededor del 18% del NID estaba en forma de amonio, 30% como nitrito y 52% como nitrato. Después de 40 días, la proporción relativa de amonio aumentó a 47% (vs 18%), la de nitrito disminuyó levemente (30 a 26%) y la de nitrato disminuyó a 27% (vs 52%). En los tratamientos con mayor flujo (C y D) las proporciones de amonio, nitrito y nitrato estaban al inicio en proporciones del 6, 9 y 85%, respectivamente y al final del experimento las

Tabla 1. Valores promedio (\pm DE) de los principales parámetros del agua en los sistemas de recirculación. A: 1,5 ciclos h^{-1} , B: 2,0 ciclos h^{-1} , C: 2,5 ciclos h^{-1} , D: 3,5 ciclos h^{-1} . *Valores transformados por log (x) antes del análisis estadístico ($P < 0,05$). Las letras diferentes en la misma columna, indican que hay diferencia estadística ($P < 0,05$) ($a > b > c$).

Flujo (Tratamiento)	Salinidad ($g L^{-1}$)	pH*	Oxígeno disuelto ($mg L^{-1}$)	Temperatura ($^{\circ}C$)
A	$28,25 \pm 4,02^a$	$7,33 \pm 0,16^a$	$4,98 \pm 1,45^a$	$29,9 \pm 1,8^a$
B	$24,22 \pm 4,73^c$	$7,44 \pm 0,23^a$	$5,70 \pm 1,52^a$	$29,5 \pm 1,9^a$
C	$31,53 \pm 1,65^a$	$7,32 \pm 0,16^a$	$5,16 \pm 1,17^a$	$29,6 \pm 1,8^a$
D	$27,69 \pm 5,83^b$	$7,32 \pm 0,17^a$	$5,42 \pm 1,02^a$	$29,6 \pm 1,8^a$

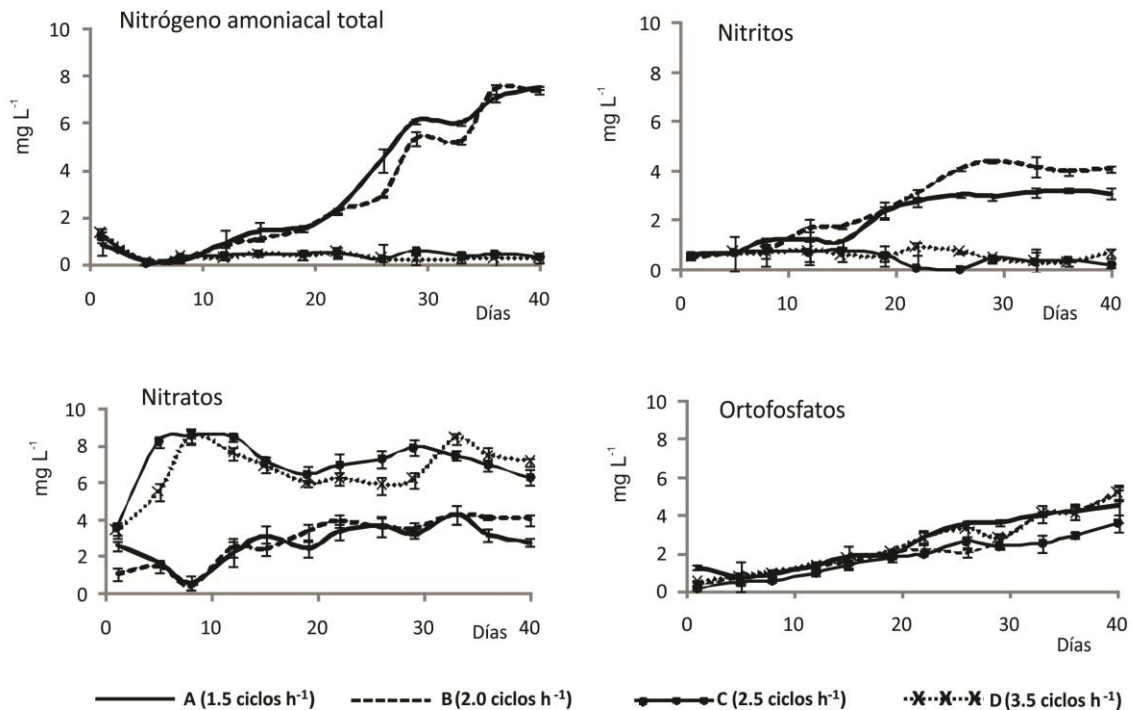


Figura 1. Fluctuación promedio ($n = 3$; \pm DE) de las concentraciones de nitrógeno amoniacal total, nitritos, nitratos y ortofosfatos en sistemas de recirculación integrados con tapetes microbianos utilizando cuatro flujos de agua diferentes.

concentraciones relativas disminuyeron levemente para el amonio (4%) y nitrito (5%), mientras que para el nitrato aumentó en la misma magnitud (91%) (Fig. 2).

Para la medición de biomasa algal en los tapetes, se utilizaron dos procedimientos: la diferencia de peso entre la matriz completa y el tapete microbiano al inicio y final del experimento; y el análisis de biomasa mediante la utilización de trozos del tapete. En el primer procedimiento la biomasa fijada a la matriz alcanzó $235,6 \pm 75,0 g m^{-2}$ (materia seca) de tapete y en el segundo caso fue de $253,4 \pm 52,6 g m^{-2}$. No se determinaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los métodos utilizados.

En la Tabla 2 se muestran las concentraciones algales y los principales taxones presentes en los tapetes microbianos al inicio y al final del experimento.

La estructura de la comunidad microbiana incluyó los microorganismos fotoautótrofos y heterótrofos (obligados y facultativos), así como una comunidad bacteriana de quimioautótrofos no cuantificada en este estudio. Los tapetes estuvieron dominados principalmente por cianobacterias de los géneros *Lyngbya* sp., *Trichodesmium* sp. y *Anabaena* sp. Las diatomeas de los géneros *Navicula* sp., *Pleurosigma* sp., *Skeletonema* sp., *Coscinodiscus* sp., *Thalassionema* sp., *Pseudo-nitzschia* sp., *Cylindrotheca* sp., *Thalassio-*

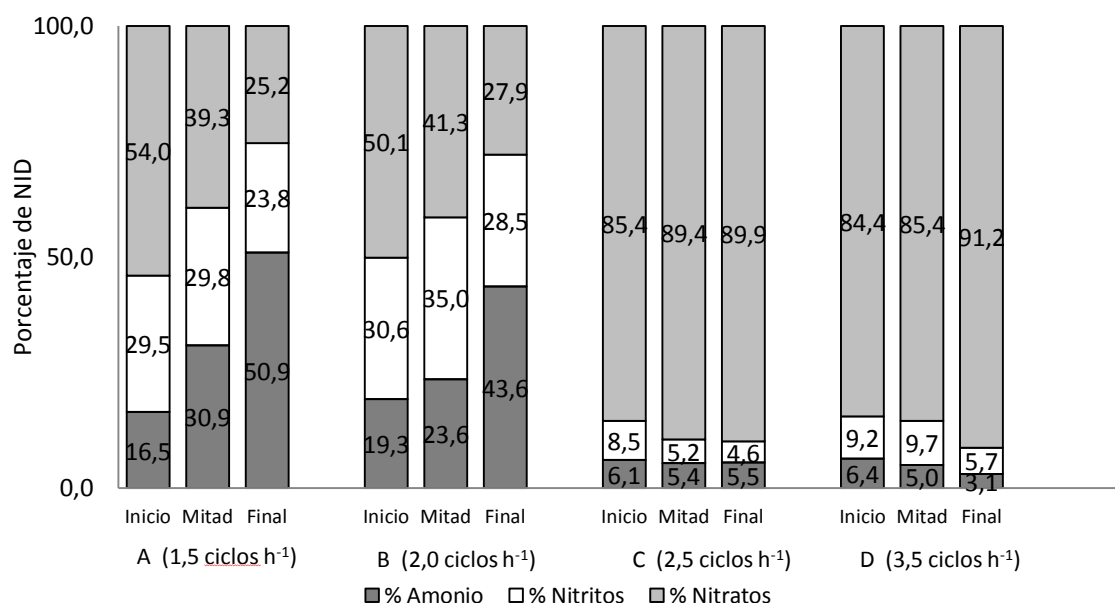


Figura 2. Porcentaje de las principales formas de nitrógeno inorgánico disuelto (NID) al inicio (día 1 al 12), mitad (día 13 al 26) y final del experimento (día 27 a 40) en sistemas de recirculación integrados con tapetes microbianos utilizando cuatro flujos de agua diferentes.

Tabla 2. Concentración inicial, final (\pm DE) y contribución relativa de los principales grupos de microorganismos asociados a los tapetes en un período de 40 días de cultivo.

Grupo	Concentración inicial (x 10 ⁶ ind cm ⁻²)	Frecuencia relativa de individuos (%)	Concentración final (x 10 ⁶ ind cm ⁻²)	Frecuencia relativa de individuos (%)
Cianobacterias	0,38 \pm 0,09	76	0,42 \pm 0,07	79
Diatomeas	0,06 \pm 0,02	14	0,11 \pm 0,02	13
Clorófitas	0,02 \pm 0,01	5	0,01 \pm 0,01	4
Nemátodos	0,01 \pm 0,01	3	0,03 \pm 0,01	3
Otros	0,11 \pm 0,02	2	0,09 \pm 0,02	1

sira sp. y *Chaetoceros* sp., fueron el segundo grupo en importancia tanto en cantidad, número de especies, como porcentaje relativo de células presentes en el tapete. Otros grupos como algunas clorófitas, nemátodos, ciliados y euglenoides también estuvieron presentes durante todo el experimento.

En la Tabla 3 se muestran los parámetros de alimentación y crecimiento de los camarones al final del experimento. La mortalidad promedio (M) fue alta en todos los tratamientos, y también el factor de conversión alimenticia (FCA). La tasa de crecimiento asumida (0,15 g d⁻¹) coincidió con la tasa de crecimiento real GR (0,11-0,15 g d⁻¹). No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, para ninguna de las variables analizadas ($P > 0,05$).

DISCUSIÓN

El cultivo de biomasa algal utilizando medios líquidos específicos favorece el desarrollo de las especies microalgales de interés (Guillard, 2005; Harrison & Berges, 2005). De acuerdo con las condiciones del medio y la composición de especies de la biomasa inicial inoculada, es de esperar que en cada medio de cultivo crezcan las especies de microorganismos que mejor se ajusten a la formulación del medio de cultivo, lo que puede significar que en cada medio, la contribución relativa de las diferentes especies es diferente. Algo similar ocurre en el medio natural donde, en condiciones de equilibrio, el número de especies coexistentes no puede superar la cantidad de recur-

Tabla 3. Parámetros de crecimiento y alimentación de los camarones utilizados en el experimento (n = 3). A: 1,5 ciclos h⁻¹, B: 2,0 ciclos h⁻¹, C: 2,5 ciclos h⁻¹, D: 3,5 ciclos h⁻¹. Pi: peso inicial, Pf: peso final, M: mortalidad, GR: tasa de crecimiento, TEC: tasa específica de crecimiento, FCA: factor de conversión alimenticia. Las letras iguales en la misma fila, indican que no hay diferencia estadística ($P > 0,05$).

Parámetro	Tratamiento			
	A	B	C	D
Pi (g)	4,75 ± 0,73 ^a	4,57 ± 0,75 ^a	4,57 ± 0,69 ^a	4,67 ± 0,84 ^a
Pf (g)	9,96 ± 1,51 ^a	10,65 ± 1,85 ^a	9,63 ± 1,57 ^a	9,20 ± 1,71 ^a
M (%)	32,2 ± 16,5 ^a	29,2 ± 18,7 ^a	32,0 ± 9,7 ^a	36,8 ± 19,0 ^a
GR(g d ⁻¹)	0,13 ± 0,01 ^a	0,15 ± 0,03 ^a	0,12 ± 0,01 ^a	0,11 ± 0,06 ^a
TEC (% peso d ⁻¹)	1,81 ± 0,15 ^a	2,09 ± 0,24 ^a	1,83 ± 0,06 ^a	1,66 ± 0,19 ^a
FCA (g g ⁻¹)	5,60 ± 0,6 ^a	4,70 ± 0,8 ^a	5,60 ± 0,3 ^a	6,50 ± 0,3 ^a

limitantes (Hardin, 1960; Phillips, 1973; Armstrong & McGehee, 1980; Grover, 1997; Shi *et al.*, 2009). En el caso del fitoplancton, son numerosos los recursos potencialmente limitantes, entre ellos nitrógeno, fósforo, sílice, hierro, luz, carbón inorgánico y algunas veces, metales traza o vitaminas (Huisman & Weissing, 1999).

En este trabajo se utilizaron cuatro medios líquidos para el cultivo de biomasa algal: ASN III para el cultivo de cianobacterias, QA para estimular el crecimiento de bacterias amonio y nitrito oxidantes, F/2 (un medio de cultivo menos específico que los anteriores), y una modificación del medio QA propuesta por Zamora-Castro (2004). Se obtuvo un mejor crecimiento con éste último medio de cultivo, que tiene niveles de fósforo y nitrógeno mayor al medio original, y similares al medio ASN III. Bajo condiciones poco controladas en cuanto a la composición inicial de especie, es poco probable que se logre una clara diferenciación algal en un tiempo de cultivo relativamente corto.

Una vez seleccionado el medio con la mayor biomasa algal, se logró una concentración celular de $11,83 \pm 0,42 \times 10^6$ cel mL⁻¹ y una composición de especies diversa. Esta concentración inicial, utilizada como inóculo para la formación y establecimiento de los tapetes verdes (algales) fue mucho mayor que la utilizada por Zamora-Castro *et al.* (2008), $1,5 \times 10^6$ cel mL⁻¹, y permitió la diversidad de especies deseada (Tabla 2). Según Shankar & Mohan (2001) en condiciones naturales la densidad de las células de la biopelícula después de su maduración suele ser 100-1000 veces mayor que la densidad de células planctónicas libres. En este trabajo, la densidad de los cultivos algales iniciales fue muy superior a la usualmente encontrada en el medio natural, y la densidad algal en los tapetes fue menor que la de los cultivos utilizados.

El proceso de nitrificación es la transformación de nitrógeno amoniacal en nitrato por la acción de bacterias autótrofas, las cuales utilizan además carbono inorgánico (CO₂ o HCO₃⁻) como fuente de carbono, y obtienen la energía para su crecimiento a partir de la oxidación de nitrógeno amoniacal. Este proceso se realiza en dos etapas y por dos grupos diferentes de microorganismos (bacterias amonio-oxidantes y nitrito-oxidantes). El proceso global consume una gran cantidad de alcalinidad, y cada mg L⁻¹ de amonio oxidado provoca una disminución de 7,14 mg L⁻¹ de alcalinidad expresada como CaCO₃, provocando un importante descenso del pH del medio (Jiménez-Douglas, 2010). En este trabajo no se realizó la caracterización y cuantificación directa de biomasa bacterial pero se pudo evaluar su presencia y efecto a través de tres parámetros: disminución global (entendiendo con esto una mayor tasa de consumo con respecto a la tasa de producción) de la concentración de amonio-amoniaco en el medio de cultivo, aumento de la concentración de nitratos y descenso del pH del medio de cultivo. Esta forma permite valorar, aunque de manera indirecta, la acción en las bacterias nitrificantes presentes en los tapetes utilizados para este efecto, en forma análoga a la cuantificación de la biomasa bacterial.

Los parámetros físicos del agua se mantuvieron, la mayor parte del tiempo, dentro del intervalo adecuado para el cultivo de *L. vannamei* (Broom, 1970; Mackay, 1974; Lucien-Brun, 1989; Chien, 1992). Esto fue importante, sobre todo ante un eventual aumento del pH y consecuente desplazamiento del equilibrio amonio-amoniaco hacia su forma tóxica (N-NH₃). La alta mortalidad observada durante el experimento fue asociada a cortos períodos de baja concentración de oxígeno disuelto (<1,5 mg L⁻¹) hacia la mitad del experimento y no a factores químicos del agua como la acumulación de amonio-amoniaco en el sistema ya que

el pH se mantuvo siempre por debajo de 7,5. Estos períodos de baja concentración de oxígeno fueron menores a 6 h y fueron provocados por fallas en el sistema de aireación utilizado.

Con respecto a los parámetros químicos, los tratamientos con bajo flujo (A y B) permitieron el aumento y acumulación de NAT en el sistema, alcanzando valores $>7,0 \text{ mg L}^{-1}$ NAT; el pH se mantuvo siempre bajo 7,5 (Tabla 1) lo que impidió el desplazamiento del equilibrio amonio-amoniaco hacia su forma tóxica. Por el contrario, la concentración de NAT en los tratamientos con flujos de 2,5 y 3,5 ciclos h^{-1} (C y D, respectivamente) se mantuvo siempre bajo $0,6 \text{ mg L}^{-1}$, y no se encontraron diferencias significativas entre estos dos tratamientos. De esta manera se evidencia que el flujo de agua en el sistema estudiado es muy importante para mantener bajas las concentraciones de especies eventualmente tóxicas como el amoniaco.

Los tapetes contruidos para este experimento tienen la capacidad de nitrificar el NAT, y esta capacidad puede verse mal aprovechada si el abastecimiento de NAT desde la unidad productiva es bajo; es decir, si el flujo de agua es bajo. Sin embargo, un flujo de agua mayor al necesario para lograr la efectiva eliminación de NAT implicaría un incremento en el gasto energético que debería ser evaluado consecuentemente.

Situación similar al NAT se encontró en las concentraciones de nitritos. Esta especie química aumentó en los tratamientos de bajo flujo (A y B) hasta valores de $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ y no superó la concentración de $0,7 \text{ mg L}^{-1}$ en los de mayor flujo (C y D). La interpretación de datos sobre toxicidad en acuicultura es compleja (Boyd & Tucker, 1998). Chen & Chin (1988) reportaron un LC_{50} a las 96 h para nitritos de $13,6 \text{ mg L}^{-1}$ y recomiendan un valor de $1,36 \text{ mg L}^{-1}$ como concentración segura para larvas de *P. monodon*. Por su parte Gross *et al.* (2004) reportaron mortalidad para *L. vannamei* en concentraciones de nitrito iguales o superiores a 10 mg L^{-1} en sistemas de baja salinidad, y signos de letargia en concentraciones de $5,0 \text{ mg L}^{-1}$. Schuler (2008) y Schuler *et al.* (2010) estudiaron el efecto tóxico de las concentraciones de amoniaco y nitritos en postlarvas de *Litopenaeus vannamei*, encontrando un LC_{50} para nitritos de $153,75 \text{ mg L}^{-1}$ en salinidades de 10 g L^{-1} , y demostraron los efectos tóxicos combinados de estas especies químicas. Aunque en el presente estudio la concentración de nitritos en los sistemas de bajo flujo no parece haber llegado a valores tóxicos para los organismos, su acumulación no es conveniente.

Con respecto al nitrato las concentraciones en todos los tratamientos aumentaron. Sus valores finales fueron

mayores en los tratamientos de mayor flujo (C y D, $P < 0,05$). El nitrato es el producto final de la oxidación bacteriana del amonio-amoniaco. La oxidación de amonio a nitrito, y posteriormente a nitrato en el tapete B (microbiano bacterial) estuvo probablemente relacionada con el proceso de nitrificación realizado por bacterias quimiolitotróficas de los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* (Hovanec & DeLong, 1996; Paniagua-Michel & García, 2003). En este sistema de cultivo, los nitratos debieron ser utilizados por los organismos fotosintéticos fijados en el tapete; sin embargo, la reducción de sus concentraciones no fue suficiente como para provocar una disminución en su concentración. En este sentido, se ha encontrado que algunas especies de cianobacterias y microalgas como *Synechococcus*, *Anabaena* y *Chlorella* utilizan el amonio primero que los nitratos, debido a la inhibición de la actividad de la enzima nitrito reductasa (Hattori, 1962; Dortch, 1990; Hyenstrand *et al.*, 2000; Miller & Castenholz, 2001).

Bajo condiciones de anoxia, el proceso de desnitrificación podría convertir el nitrato en nitrógeno gaseoso (N_2) el cual escaparía del sistema. Debido a que se trata de un proceso anaeróbico, es poco probable que el nitrato disminuya en los sistemas de producción acuícola donde la concentración de oxígeno disuelto debe mantenerse alta. Sin embargo, en el microambiente del tapete microbiano, es posible que los microorganismos nitrato-reductores utilicen el nitrato. La acumulación de nitrato durante el experimento (la cual además fue independiente del flujo de agua empleado) mostró que este mecanismo de desnitrificación también fue insuficiente para mantener baja la concentración de nitratos.

Las altas concentraciones de nitratos en los sistemas de recirculación marinos de hasta $300\text{-}400 \text{ mg L}^{-1}$ son frecuentes (Van Rijn, 1996). Khun *et al.* (2010) evaluaron el efecto de altas concentraciones de nitrato en juveniles de *Penaeus vannamei* por períodos prolongados (5-6 semanas) encontrando que concentraciones de $435\text{-}440 \text{ mg L}^{-1}$ tienen un efecto negativo en diversos parámetros, como la supervivencia y el crecimiento, y que este efecto es mayor con bajas salinidades. Además, altas concentraciones de nitratos en el sistema de cultivo constituyen una significativa carga ambiental de nitrógeno (Van Rijn, 1996). Por lo anterior, se debe buscar mecanismos que permitan eliminar o al menos mantener su concentración baja. El uso de tapetes microbianos -como los utilizados en esta investigación- no parece ser una solución adecuada al problema de la eliminación de nitratos. Deberán investigarse alternativas complementarias. La incorporación de sistemas de desnitrificación es común en RAS, aunque suelen ser complejos (Lekang, 2013).

La acumulación de ortofosfatos se dio en todos los tratamientos. Los ortofosfatos provienen fundamentalmente del alimento y el incremento de su concentración es resultado de la baja asimilación por parte de los organismos (McIntosh *et al.*, 2001). En diversos trabajos se ha descrito una tendencia similar (*e.g.*, Thakur & Lin, 2003; Lezama-Cervantes *et al.*, 2010). El uso de este tapete microbiano tampoco parece ser una solución para el procesamiento de fósforo. Ray *et al.* (2010a) incorporaron cámaras de sedimentación a estanques circulares bajo un sistema de cultivo superintensivo con mínimo recambio de agua y lograron disminuir las concentraciones de fósforo en un 61%, a la vez que disminuían la concentración de partículas floculadas (biofloc), algo que podría ser evaluado en el sistema de cultivo utilizado.

El total de las diferentes formas de nitrógeno inorgánico disuelto (NID), así como las proporciones de amonio, nitrito y nitratos se mantuvieron similares en los tratamientos con mayor flujo de agua (C y D, Fig. 2) evitando la acumulación de especies tóxicas en el sistema. Por el contrario, los tratamientos de menor flujo de agua no propiciaron la eliminación de los compuestos nitrogenados, lo que propició un incremento considerable en la concentración de NID.

A pesar que la tasa de alimentación ofrecida en este trabajo (10% peso corporal d^{-1}) fue muy superior a la empleada frecuentemente para el cultivo de camarón (3-4% peso corporal d^{-1}), las concentraciones de NID en los sistemas con mayor flujo de agua se mantuvieron en niveles inferiores a las alcanzadas en otros estudios que proponen como alternativas de biorremediación el uso de biofloc (Ray *et al.*, 2010b), filtración por moluscos (Martínez-Córdova *et al.*, 2011) y/o integración de sistemas hidropónicos (Mariscal-Lagarda *et al.*, 2012).

Los tapetes microbianos construidos constituyen comunidades biológicas que se desarrollan en un microgradiente ambiental, que se modifica conforme se establecen los microorganismos constituyentes de la biopelícula. Durante la maduración del tapete es de esperar que se produzca de manera natural, una sucesión y estratificación de microorganismos. Los aerobios obligados fotosintéticos han de establecerse en la superficie (primeros mm); y un conjunto de organismos diferentes, fundamentalmente en cuanto a sus requerimientos de energía metabólica y de oxígeno, han de formar un gradiente que finalizaría con organismos anaeróbicos reductores de sulfato, en las capas inferiores (Davey & O'Toole, 2000).

La biomasa microbiana del tapete crece, muere y resurge. Así se renueva. La cantidad de biomasa tiende a mantenerse relativamente constante una vez que se alcanza el equilibrio en cuanto a número y composición

de especies. La medición de la cantidad de biomasa fijada en la matriz, ya sea utilizando parte o la totalidad del sustrato, fue similar ($235,6 \pm 75,0 \text{ g m}^{-2}$ y $253,4 \pm 52,6 \text{ g m}^{-2}$) y no se encontraron diferencias significativas entre los métodos ($P > 0,05$). La conveniencia de realizar las mediciones siguiendo el procedimiento de disección de solo una parte del tapete radica en que facilita el análisis, al proveer información sobre la evolución de la comunidad microbiana durante el crecimiento de la biopelícula. La cantidad de biomasa alcanzada expresada en forma de materia seca coincide con los resultados de Lezama-Cervantes *et al.* (2010). Sin embargo, el valor máximo alcanzado al final del experimento, fue menor al observado para tapetes microbianos naturales (Urmeneta *et al.*, 1998).

Adicionalmente, la composición de los tapetes microbianos construidos en este trabajo puede haber diferido en cuanto a las poblaciones fotosintéticas fijadas en la matriz ya que no se controló la composición de los inóculos. Sin embargo, eso suele permitir la presencia de procesos de mixotrofia o heterotrofia de manera simultánea y conlleva un eficiente reciclaje y utilización de nutrientes (Lavrentyev *et al.*, 1997; Allen *et al.*, 2001). En la Tabla 2 se presentan los principales taxa aeróbicos obligados autotróficos asociados a los tapetes microbianos algales, su concentración y proporción relativa. Los microorganismos sometidos al experimento son frecuentes en la zona de colecta (Viquez & Hargraves, 2009) y siguen el mismo patrón de dominancia (cianobacterias, diatomeas y clorofitas) encontrado por Zamora-Castro *et al.* (2008) y Lezama-Cervantes *et al.* (2010). Sin embargo, en este trabajo la contribución relativa de microorganismos fotoautótrofos se mantuvo en una proporción 1,5 veces mayor a la señalada por Lezama-Cervantes *et al.* (2010), y cuatro veces menor en relación a las poblaciones de nemátodos.

La biomasa cultivada que se utilizó como inóculo permitió la formación del tapete mediante el establecimiento de diversas especies de microalgas (Tabla 2). Las condiciones ambientales que prevalecieron durante el cultivo permitieron su permanencia y desarrollo. La estructura del tapete fue similar a la encontrada en otros trabajos (*e.g.*, Bachar *et al.*, 2007; Lezama-Cervantes *et al.*, 2010).

De los grupos algales, el 76-79% del número de células presentes fueron cianobacterias filamentosas (Tabla 2). Este grupo, o en sinergia con otros organismos, tiene la capacidad de degradar un alto número de compuestos orgánicos xenobióticos, y se ha puesto de manifiesto su eficacia en la regeneración de aguas residuales o eutrofizadas (Hall *et al.*, 1995; Duvey *et al.*, 2011; Kannan *et al.*, 2011; Amin *et al.*, 2013).

En todos los tratamientos la mortalidad de los camarones fue alta (29,2-36,8%) y se atribuye a la disminución de oxígeno disuelto en el sistema hasta niveles no deseados, provocado a su vez por el exceso de alimento ofrecido; este exceso de alimento resultó en un alto factor de conversión alimenticia (FCA). A partir del día 21 se corrigió la concentración de oxígeno disuelto y la mortalidad se redujo significativamente. La tasa de crecimiento obtenida (0,11-0,15 g d⁻¹) coincidió muy bien con el crecimiento esperado para esta especie en diferentes condiciones de cultivo, cercano a 0,7 g semana⁻¹ (Carvajal-Valdés *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2013). Para ninguna de las variables de crecimiento y aprovechamiento de alimento que fueron analizadas se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($P > 0,05$).

El uso de tapetes microbianos para la eliminación de metabolitos en sistemas recirculados de acuicultura es una técnica novedosa y poco estudiada. La optimización de estos sistemas se podría lograr mediante la adaptación de condiciones físicas, químicas y biológicas que favorezcan a los microorganismos asociados.

En este trabajo se demostró que el flujo de agua posee un efecto importante en la capacidad de transformación y asimilación de amonio y nitrito; no así en la disminución de las concentraciones de nitrato o fosfato. Es necesario cuantificar otras variables que podrían afectar el óptimo funcionamiento de los tapetes microbianos, tales como el tipo de organismos/especies presentes en el tapete, o la cantidad de biomasa microbiana requerida para eliminar una cantidad determinada de desechos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue posible gracias al apoyo económico brindado por la Universidad Nacional (Heredia, Costa Rica). Agradecemos al Dr. Carlos Lezama-Cervantes (Departamento de Ciencias Marinas, Universidad de Colima, México) por la ayuda prestada en el análisis estadístico y por sus comentarios.

REFERENCIAS

- Al-Maslamani, I., L. Le-Vay & H. Kennedy. 2009. Feeding on intertidal microbial mats by postlarval tiger shrimp, *Penaeus semisulcatus* De Haan. *Mar. Biol.*, 156: 2001-2009.
- Allen, A., M.G. Booth, M. Frischer, P. Verity, J. Zehr & S. Zani. 2001. Diversity and detection of nitrate assimilation genes in marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 5343-5348.
- American Public Health Association (APHA). 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater. APHA-AWWA-WPCF. Washington D.C., 1108 pp.
- Amin, A., A.T. Ramchandra-Naik, M. Azhar & H. Nayak. 2013. Bioremediation of different waste waters -a review. *Cont. J. Fish. Aquat. Sci.*, 7(2): 7-17.
- Armstrong, R.A. & R. McGehee. 1980. Competitive exclusion. *Am. Nat.*, 115(2): 151-170.
- Bachar, A., E. Omoregie, R. de Wit & H.M. Jonkers. 2007. Diversity and function of chloroflexus-like bacteria in a hypersaline microbial mat: phylogenetic characterization and impact on aerobic respiration. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73: 3975-3983.
- Bender, J., R. Lee, M. Sheppard, K. Brinkley, P. Phillips, Y. Yeboah & R. Chee-Wah. 2004. A waste effluent treatment system based on microbial mats for black sea bass *Centropomus striata* recycled-water mariculture. *Aquacult. Eng.*, 31: 73-82.
- Boopathy, R., Q. Fontenet & M. Kilgen. 2005. Biological treatment of sludge from a recirculating aquaculture system using a sequencing batch reactor. *J. World Aquacult. Soc.*, 36: 542-545.
- Boyd, C.E. & C.S. Tucker. 1998. Pond aquaculture water quality management. Kluwer Academic Publishers, Boston, 700 pp.
- Broom, J.G. 1970. Shrimp culture. *Proceedings of the Annual Workshop-World Mariculture Society*, 1: 60-68.
- Carvajal-Valdés, R., E. Arjona & G. Bueno. 2012. Feeding rate and stocking density in semi-intensive *Litopenaeus vannamei* culture with moderate periodic fertilization. *J. Agric. Biol. Sci.*, 7(11): 899-904.
- Chen, J.C. & T.S. Chin. 1988. Acute toxicity of nitrite to tiger prawn, *Penaeus monodon* larvae. *Aquaculture*, 69: 253-262.
- Chien, Y.H. 1992. Water quality requirements and management for marine shrimp culture. In: G. Chamberlain, J. Villalón & J. Wyban (eds.). *Proceedings of the special session on shrimp farming*. World Aquaculture Society, Florida, pp. 22-25.
- Davey, M.E. & G.A. O'Toole. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. R.*, 64(4): 847-867.
- Dortch, Q. 1990. The interaction between ammonium and nitrate uptake in phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 61: 183-201.
- Dubey, S.K., J. Dubey, S. Mehra, P. Tiwari & A.J. Bishwas. 2011. Potential use of cyanobacterial species in bioremediation of industrial effluents. *Afr. J. Biotechnol.*, 10(7): 1125-1132.
- Goodroad, L., J. Bender, P. Phillips, J. Gould, G. Hater & B. Burrow. 1995. Use of constructed mixed microbial mats

- for landfill leachate treatment. 18th Madison Waste Conference. Department of Engineering Professional Development, University of Wisconsin, Madison, pp. 203-218.
- Gross, A., S. Abutbul & D. Zilberc. 2004. Acute and chronic effects of nitrite on white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, cultured in low-salinity brackish water. *J. World Aquacult. Soc.*, 35(3): 315-321.
- Grover, J.P. 1997. Resource competition. Population and community biology series, 19. Chapman & Hall, London, 342 pp.
- Guillard, R.L. & J.H. Ryther. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.*, 8: 229-239.
- Guillard, R.L. 2005. Purification methods for microalgae. In: R.A. Andersen (ed.). *Algal culturing techniques*. Elsevier, New York, pp. 117-132.
- Hall, D.O., S.A. Markov, Y. Watanabe & K.K. Rao. 1995. The potential applications of cyanobacterial photosynthesis for clean technologies. *Photosynth. Res.*, 46: 159-167.
- Hardin, G. 1960. The competitive exclusion principle. *Science*, 131(3409): 1292-1297.
- Hargreaves, J.A. 1998. Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds. *Aquaculture*, 166: 181-212.
- Harrison, P.J. & J.A. Berges. 2005. Marine culture media. In: R.A. Andersen (ed.). *Algal culturing techniques*. Elsevier, New York, pp. 21-34.
- Hattori, A. 1962. Adaptative formation of nitrate reducing system in *Anabaena cylindrical*. *Plant Cell. Physiol.*, 3: 371-377.
- Hovanec, T. & E. DeLong. 1996. Comparative analysis of nitrifying bacteria associated with freshwater and marine aquaria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 2888-2896.
- Huisman, J. & F.J. Weissing. 1999. Biodiversity of plankton by species oscillations and chaos. *Nature*, 402: 407-410.
- Hyenstrand, P., U. Burkert, A. Pettersson & P. Blomqvist. 2000. Competition between the green alga *Scenedesmus* and the cyanobacterium *Synechococcus* under different modes of organic nitrogen supply. *Hydrobiologia*, 435: 91-98.
- Jiménez-Douglas, E. 2010. Modelación matemática del proceso de nitrificación en dos etapas. Desarrollo de metodologías de calibración del modelo para un reactor Sharon y un proceso de fangos activados. Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, 301 pp.
- Kannan, V., M. Vijayasanthi & N. Rajmohan. 2011. Bioremediation of tannery effluents by filamentous cyanobacteria *Anabaena flos-Aquae* West. *Hydrol. Curr. Res.*, 2: 122. doi: 10.4172/2157-7587.1000122.
- Kuhn, D.D., S.A. Smith, G.D. Boardman, M.W. Angier, L. Marsh & G.J. Flick Jr. 2010. Chronic toxicity of nitrate to Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: impacts on survival, growth, antennae length, and pathology. *Aquaculture*, 309(1-4): 109-114.
- Lavrentyev, P., W. Gardner & J.R. Johnson. 1997. Cascading trophic effects on aquatic nitrification: experimental evidence and potential implications. *Aquat. Microbiol. Ecol.*, 13: 161-175.
- Lekang, O.I. 2013. *Aquaculture engineering*. Wiley-Blackwell Publishing, London, 2: 432 pp.
- Lezama-Cervantes, C. & J. Paniagua-Michel. 2010. Effects of constructed microbial mats on water quality and performance of *Litopenaeus vannamei* post-larvae. *Aquacult. Eng.*, 42: 75-81.
- Lezama-Cervantes, C., J. Paniagua-Michel & J. Zamora-Castro. 2010. Biorremediación de los efluentes de cultivo del camarón *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) utilizando tapetes microbianos en sistemas de recirculación. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 38(1): 129-142.
- Lin, Y.F., S.R. Jing & D.Y. Lee. 2003. The potential use of constructed wetlands in a recirculating aquaculture system for shrimp culture. *Environ. Pollut.*, 123(1): 107-113.
- Lin, Y.F., S.R. Jing, D.Y. Lee, Y.F. Chang, Y.M. Chen & K.C. Shih. 2005. Performance of a constructed wetland treating intensive shrimp aquaculture wastewater under high hydraulic loading rate. *Environ. Pollut.*, 134(3): 411-421.
- Lopes-Thompson, F., P.C. Abreu & W. Wasielesky. 2002. Importance of biofilm for water quality and nourishment in intensive shrimp culture. *Aquaculture*, 203: 263-278.
- Lucien-Brun, H. 1989. Guía para la producción de camarón en el Ecuador. Escuela Superior del Litoral, Guayaquil, 58 pp.
- Ma, Z., R. Wan, X. Song & L. Gao. 2013. The effect of three culture methods on intensive culture system of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *J. Ocean Univ. China*, 12(3): 434-440.
- Mackay, R.D. 1974. A note on minimal levels of oxygen required to maintain life in *Penaeus schmitti*. *Proc. World Maricult. Soc.*, 5: 451-452.
- Mariscal-Lagarda, M.M., F. Páez-Osuna, J.L. Esquer-Méndez, I. Guerrero-Monroy, A. Romo del Vivar & R. Félix-Gastelum. 2012. Integrated culture of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) with low salinity groundwater: Management and production. *Aquaculture*, 366-367: 76-84.
- Martínez-Córdova, L.R., J.A. López-Elías, M. Martínez-Porchas, T. Bernal-Jaspeado & A. Miranda-Baeza.

2011. Studies on the bioremediation capacity of the adult black clam, *Chione flucitifraga*, of shrimp culture effluents. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.*, 46(1): 105-113.
- McIntosh, D., T.M. Samocha, E.R. Jones, A.L. Lawrence, D.A. McKee, S. Horowitz & A. Horowitz. 2001. The effect of a commercial bacterial supplement on the high-density culturing of *Litopenaeus vannamei* with a low-protein diet in an outdoor tank system and no water exchange. *Aquacult. Eng.*, 21: 215-227.
- Miller, S.R. & W.R. Castenholz. 2001. Ecological physiology of *Synechococcus* sp. Strain SH-94-5, a naturally occurring cyanobacterium deficient in nitrate assimilation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(7): 3002-3009.
- Paniagua-Michel, J. & O. García. 2003. *Ex-situ* bioremediation of shrimp culture effluent using constructed microbial mats. *Aquacult. Eng.*, 28: 131-139.
- Parsons, T.R., Y. Maita & C.M. Lilly. 1984. A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. Pergamon Press, London, 173 pp.
- Phillips, O.M. 1973. The equilibrium and stability of simple marine biological systems. *Am. Nat.*, 107(953): 73-93.
- Phillips, P., A. Russell, J. Bender & J. Muñoz. 1994. Management plan for utilization of a floating microbial mat with its associated detrital gelatinous layer as a complete tilapia *Oreochromis niloticus* feed system. *Bioresource Technol.*, 47: 233-245.
- Ray, A.J., B.L. Lewisa, C.L. Browdy & J.W. Leffler. 2010a. Suspended solids removal to improve shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and an evaluation of a plant-based feed in minimal-exchange, superintensive culture systems. *Aquaculture*, 299(1-4): 89-98.
- Ray, A.J., G. Seaborn, J.W. Leffler, S.B. Wilde, A. Lawson & C.L. Browdy. 2010b. Characterization of microbial communities in minimal-exchange, intensive aquaculture systems and the effects of suspended solids management. *Aquaculture*, 310: 130-138.
- Rippka R., J. Deruelles, J.B. Waterbury, M. Herdman & R.Y. Stanier. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 111: 1-61.
- Robertson, C.E., J.R. Spear, J. Kirk-Harris & N.R. Pace. 2009. Diversity and stratification of archaea in a hypersaline microbial mat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(7): 1801-1810.
- Rostron, W.M., D.C. Stuckey & A.A. Young. 2001. Nitrification of high strength ammonia wastewater: comparative study of immobilization media. *Water Res.*, 35(5): 1169-1178.
- Sánchez, M. 2004. Microbiología de suelos. Técnicas, métodos y medios de cultivo. Universidad Nacional Autónoma de México, México, 47 pp.
- Sánchez-Romero, A., A. Miranda-Baeza, J.A. López-Elías, L.R. Martínez-Córdova, A. Tejada-Mansir & E. Márquez-Ríos. 2013. Efecto del fotoperiodo y la razón camarón: macroalga en la remoción de nitrógeno amoniacal total por *Gracilaria vermiculophylla*, en cultivo con *Litopenaeus vannamei*, sin recambio de agua. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 41(5): 888-897.
- Schuler, D.J. 2008. Acute toxicity of ammonia and nitrite to white shrimp (*L. vannamei*) at low salinities. Tesis de Maestría. Virginia Polytechnic Institute and State University, Backburn, 69 pp.
- Schuler, D.J., G.D. Boardman, D.D. Kuhn & G.J. Flick. 2010. Acute toxicity of ammonia and nitrite to Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at low salinities. *J. World Aquacult. Soc.*, 41(3): 438-446.
- Shankar, K.M. & C.V. Mohan. 2001. The potential of biofilm in aquaculture. *J. World Aquacult. Soc.*, 32: 62-63.
- Shi, D., Y. Xu & F.M.M. More. 2009. Effects of the pH/pCO₂ control method on medium chemistry and phytoplankton growth. *Biogeosciences*, 6(7): 1199-1207.
- Strickland, J.D.H. & T.R. Parsons. 1972. A practical handbook of seawater analysis. *Fish. Res. Bd. Can. Bull.*, 167(2): 1-310 pp.
- Thakur, D.P. & C.K. Lin. 2003. Water quality and nutrient budget in closed shrimp (*Penaeus monodon*) culture systems. *Aquacult. Eng.*, 27: 159-176.
- Timmons, M.B. & J.M. Ebeling. 2007. Recirculating aquaculture. Cayuga Aqua Ventures, New York, 1: 948 pp.
- Urmeneta, J., O. Alcoba, E. Razquín, E. Tarroja, A. Navarrete & R. Guerrero. 1998. Oxygenic photosynthesis and respiratory activity in microbial mats of the Ebro Delta, Spain, by oxygen exchange method. *Curr. Microbiol.*, 37: 151-155.
- Van Rijn, J. 1996. The potential for integrated biological treatment systems in recirculating fish culture a review. *Aquaculture*, 139: 181-201.
- Viquez, R. & P.E. Hargraves. 2009. Phytoplankton. In: I. Wehrmann & J. Cortés (eds.). *Marine biodiversity of Costa Rica, Central America. Monographiae Biologicae* 86, Springer, 538 pp.
- Yamane, T. 1999. *Estadística*. Oxford University Press, Harla-México, 771 pp.
- Zamora-Castro, J. 2004. Sistema de bio-remediación de aguas residuales de un efluente costero-marino, mediante tapetes microbianos construidos. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de

Educación Superior de Ensenada (CICESE), México, 152 pp.

Zamora-Castro, J., J. Paniagua-Michel & C. Lezama-Cervantes. 2008. A novel approach for bioremediation of a coastal marine wastewater effluent based on artificial microbial mats. *Mar. Biotechnol.*, 10: 181-189.

Zar, J.H. 1984. *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall, New York, 718 pp.

Received: 2 June 2014; Accepted: 24 November 2014