

INFORME TÉCNICO

Factibilidad técnica del uso conjunto de tapetes microbianos y bioflóculos en sistemas de recirculación para acuicultura

Por: Ricardo Jiménez-Montealegre, 2017

Resumen

La bioremediación de aguas en sistemas recirculados para el cultivo de organismos acuáticos mediante la utilización de tapetes microbianos construidos es parcialmente efectiva ya que elimina algunos de los productos no deseados (amonio-amoniaco, nitritos), pero no disminuye de manera importante la acumulación de otros productos tales como materia orgánica, nitratos y orto-fosfatos. La incorporación de la tecnología de bioflóculos (BFT) para el tratamiento de aguas y generación de proteína *in situ* en Acuicultura se ha evaluado con bastante éxito en otras partes del mundo y a nivel experimental; sin embargo, no se han realizado intentos para combinar ambas tecnologías. En la presente investigación se evaluó el uso combinado de tapetes microbianos y bioflóculos en sistemas recirculados (RAS) de producción a pequeña escala. La evaluación se hizo mediante la medición de parámetros químicos de la calidad del agua (concentración de las principales formas de nitrógeno inorgánico disuelto, orto-fosfatos, sólidos en suspensión y oxígeno disuelto, entre otros), y mediante la evaluación de parámetros biológicos, tanto sobre los organismos en cultivo (tasa de crecimiento, tasa de mortalidad y conversión alimenticia) como sobre los microorganismos asociados (fitoplancton, zooplancton). Partiendo del hecho de que ambas tecnologías se encargan, de manera diferente, de biorremediar el agua, se esperaba que éstas pudieran ser combinadas. Sin embargo, la presencia de bioflóculos afectó negativamente el mantenimiento y desempeño de los tapetes microbianos; la presencia de bioflóculos causa turbidez y aumenta la cantidad de sólidos suspendidos en el agua, y estos dos factores inciden negativamente en el desempeño de los tapetes microbianos. En un intento de lograr combinar ambas técnicas, se realizaron experimentos variando el flujo de agua empleado, la intensidad de aireación, y se evaluaron diversas modificaciones estructurales del sistema. Ninguna de estas estrategias logró una mejoría importante. Se concluye que el uso conjunto de estas dos tecnologías no parece ser posible en RAS, no se recomienda continuar con la evaluación de esta combinación de técnicas, y en su lugar se recomienda continuar con la optimización de ambas estrategias, pero de manera independiente.

Palabras clave: Acuicultura, Bioflóculos, Tapetes microbianos, Sistemas recirculados, RAS

Nota: El presente informe, y los datos experimentales de la investigación se encuentran a disposición de los interesados en el siguiente repositorio: <https://drive.google.com/drive/folders/0B2aA7ZPZoki9emZnVmR0Qk1peUK>

INTRODUCCIÓN

La acuicultura es el sector de producción de alimentos que más rápidamente ha crecido en el mundo, y en los últimos años esta actividad se ha desarrollado, expandido e intensificado. Al mismo tiempo, la población mundial está aumentando, y con ella también aumenta la demanda de alimentos. Tanto la pesca como la acuicultura desempeñan papeles importantes en el abastecimiento de alimentos e ingresos en muchos países en desarrollo. Sin embargo, el suministro de alimento por la pesca de captura se ha estabilizado, y la mayor parte de las zonas de pesca principales ha alcanzado su máximo potencial (FAO, 2016). Por lo anterior, es poco probable que el suministro de productos acuáticos provenientes de la pesca de captura sea capaz de satisfacer la creciente demanda global de alimentos acuáticos, por lo que la acuicultura se considera una oportunidad para cerrar la brecha de la oferta y la demanda de alimentos acuáticos en muchas regiones del mundo (Allison, 2011).

Para suplir la demanda de productos provenientes de la producción acuática, la acuicultura debe atender diferentes aspectos. Una respuesta a esta demanda ha sido el impulso de actividades que permitan la producción bajo sistemas de alta intensidad; otras estrategias incluyen la diversificación de especies, el mejoramiento genético, y la optimización de los sistemas de producción.

A nivel mundial, la demanda de pescado ha aumentado porque las personas han aprendido que la inclusión de productos marinos en la dieta regular es saludable, y ayuda a la lucha contra diversas enfermedades. Se estima que aproximadamente el 13% (10.2 millones de toneladas) de la producción de pescado mundial proviene de la Acuicultura. Uno de los mayores retos, sin embargo, es lograr que estos productos sean económicamente accesibles.

La acuicultura ha demostrado diversos beneficios económicos al proporcionar oportunidades de trabajo adicionales a diferentes niveles de la cadena de producción, incluyendo investigadores, criadores, fabricantes de equipos y alimentos, instalaciones de almacenamiento y procesamiento de los productos, y comercialización. En la actualidad, se estima que más de 100 millones de personas depende de esta actividad.

Los productos de origen acuático, incluyendo peces y crustáceos, son un elemento importante en la canasta de consumo humano, contribuyendo a 17 por ciento de la oferta global de proteína animal en 2010. Son una fuente de alimento especialmente valioso en los países en desarrollo, donde se da más del 75 por ciento del consumo de pescado del mundo; además de proteína, contienen micronutrientes y ácidos grasos esenciales (Waite et al., 2014). Sin embargo, la oferta mundial de productos provenientes de la pesca ha llegado a un máximo posible y es poco probable que vuelva a subir a menos que se incrementen las poblaciones sobreexplotadas. Aun así, el consumo de pescado a nivel mundial continúa creciendo. Waite et al. (2014) mencionan que poco menos de la mitad de todos los peces que consumen las personas provienen de acuicultura, que es uno de los alimentos del mundo de más rápido crecimiento animal produciendo sectores.

Así, en un mundo con recursos limitados, la acuicultura podría ser una opción atractiva para ampliar el suministro de proteína animal. Los peces cultivados, por ejemplo, son similares en eficiencia de conversión de alimento a las aves de corral y mucho más eficiente que la producción de carne de vacuno. Incluso, los organismos filtradores como las carpas o los moluscos son aún más eficientes productores

de proteína animal, ya que no requieren alimentos administrados por los humanos y pueden mejorar la calidad del agua.

El sector de la acuicultura es relativamente joven en comparación con sectores ganaderos terrestres, y ofrece grandes posibilidades de innovación técnica para aumentar aún más la

eficiencia de producción. Se estima que para que la disponibilidad mundial de pescado satisfaga la demanda proyectada, la producción acuícola necesitará incrementarse en más del doble, de 67 millones de toneladas en 2012 a aproximadamente 140 millones de toneladas en 2050 (Waite et al., 2014).

Sistemas de producción tradicionales

Los sistemas de producción en acuicultura son mucho más diversos y variados en comparación con cultivos agrícolas tradicionales y ganadería. Hay muchas especies, muchas de ellas con requerimientos ecológicos muy diferentes, por lo que requieren diferentes técnicas y calidades de alimentación y cría, así como de la calidad del agua. Dependiendo del nivel previsto de la producción y los recursos disponibles, el productor acuícola debe hacer una selección entre sistema extensivo, semi-intensivo o intensivo.

Los sistemas extensivos se caracterizan por bajas densidades y bajos rendimientos, y suelen realizarse a pequeña escala, como actividad de subsistencia en zonas rurales; la producción de estos sistemas oscila entre los 500 y 1500 kg/ha/año. En los sistemas semi-intensivos se suelen utilizar estanques donde se aprovecha la productividad natural, pero ésta se incrementa

mediante la utilización de fertilizantes (con fertilizantes químicos u orgánicos); la alimentación exógena se realiza para complementar la productividad del estanque, y los rangos de producción suelen oscilar entre 1 y 10 kg/m²/año dependiendo del nivel de intensidad empleado. Finalmente, los sistemas intensivos se caracterizan porque en ellos se da un flujo de agua continuo, lo que permite mayores densidades de siembra; la producción por unidad de área aumenta al sustituirse la alimentación natural por alimentos completos, frecuentemente fabricados específicamente para la especie en cultivo. Estos sistemas requieren de alta inversión de capital inicial y alto costo operacional, y la producción en estos sistemas puede llegar hasta los 100 kg/m²/año dependiendo del grado de intervención empleado por los productores.

Sistemas de cultivo intensivos

Los sistemas de acuicultura pueden ser extensivos, semi-intensivos o intensivos, según el número de organismos cultivados por volumen de agua, y la fuente y suministro del agua utilizada. Entre los sistemas intensivos más utilizados se encuentra los cultivos de flujo abierto, el cultivo en jaulas flotantes, y los sistemas de recirculación.

La técnica de los sistemas de flujo abierto tiene como objetivo producir peces de alto valor económico en altas densidades; en un sistema tradicional de este tipo el agua pasa por el sistema de cultivo una sola vez y luego se

descarga hacia el medio ambiente acuático. El flujo de agua a través del sistema de cultivo suministra oxígeno a los peces y traslada los productos disueltos y residuos suspendidos no deseados hacia fuera del sistema.

El cultivo en jaulas se realiza utilizando una bolsa de red grande, anclada al fondo del sistema y mantenida en la superficie por un marco flotante. Estas jaulas se ubican en el mar (en las zonas costeras o en aguas abiertas) o en lagos, y son ampliamente utilizadas para la cría de peces. La escasez de sitios protegidos y ciertos retrocesos ambientales han contribuido

al desarrollo de programas y estrategias que determinan la capacidad de carga de áreas de acuerdo con sus características geofísicas, oceanográficas, hidrográficas y bio-ecológicas.

Finalmente se encuentran los sistemas recirculados de acuicultura (RAS, por sus siglas en inglés). Estos son sistemas establecidos en tierra, y en los que se reutiliza el agua después del tratamiento mecánico y biológico. Estos

sistemas presentan varias ventajas, tales como: ahorro, un riguroso control de calidad del agua, niveles de bioseguridad alta, y un más fácil control de la producción de residuos en comparación con otros sistemas de producción de agua. Sin embargo, también tienen algunos inconvenientes como el alto capital y altos costos operacionales.

Contaminación y uso del agua

Aunque hay aspectos de la acuicultura que benefician al medio ambiente, como el permitir la recuperación natural de los stocks silvestres de organismos acuáticos, o ayudar en el repoblamiento, también hay varias preocupaciones con respecto a su uso.

Desde el punto de vista ambiental, la actividad acuicultura presenta el mayor problema con el uso del agua. El agua es un recurso que en algunas regiones del mundo es escaso. Aunque la práctica de la acuicultura no es de los sectores primarios que más recursos hídricos utiliza (siempre es mayor los valores del uso del agua en la agricultura), sí es cierto que se deben realizar esfuerzos por implementar sistemas que supongan un ahorro de agua para las empresas, y una disminución del caudal de agua residual generado. La acuicultura utiliza frecuentemente grandes cantidades de agua, lo que ha limitado su expansión en algunas zonas. En EE.UU. durante el año 2005, la tasa estimada de agua dulce usada para la acuicultura fue de 9420 millones galones por día; gran parte del agua superficial se utilizó para fluir por canales y fue devuelta al medio ambiente después de su uso. El uso de agua por actividades de acuicultura representaron el 3% del total nacional de agua dulce (Hutson et al., 2004).

Las empresas de producción deben en mayor o menor grado, renovar el agua que utilizan, y esta suele ser enviada hasta los cuerpos naturales, en una condición muchas veces menor que como fue tomada. Dependiendo

de la configuración del sistema, esto puede resultar en la descarga al medio ambiente de importantes cantidades de aguas residuales que contienen heces, nutrientes y productos químicos. Los nutrientes vertidos pueden causar la eutrofización de los cuerpos de agua receptores; además, los productos químicos que se utilizan en la industria acuícola, como los antibióticos y agentes para el tratamiento del agua, también son vertidos.

Las operaciones acuícolas también pueden transmitir parásitos y enfermedades en la naturaleza. Los organismos en cultivo también podrían estar expuestos a enfermedades con el uso de pescado sin procesar como fuente de alimentación, en lugar del uso de alimentos formulados. Otro problema frecuentemente señalado a la actividad de acuicultura es que ésta es una de las causas más grande en el que se introducen especies en nuevas áreas, creando especies invasoras bajo las condiciones adecuadas; las especies invasoras pueden competir por alimento y hábitat, desplazar a las especies nativas e interferir con la vida de las especies silvestres. Algunos efectos secundarios es el uso desmedido de especies de menor valor comercial para la fabricación de alimentos, o la pérdida de hábitats naturales debido a la construcción de instalaciones de acuicultura a lo largo de la costa.

De todos los problemas antes mencionados, la producción de desechos y la alta utilización del agua son probablemente los más preocupantes,

y por ello los métodos tradicionales son cada vez menos estimulados. Se piensa que los sistemas de acuicultura deben ser cerrados, y sus aguas residuales deben ser tratadas antes de la descarga. El enriquecimiento orgánico derivado de la deposición de material particulado como alimento sin comer y materia fecal ha sido identificada como una de las principales causas de impacto ambiental de la acuicultura (Gowen, Weston, & Ervik, 1991; Vezzulli, Chelossi, Riccardi, & Fabiano, 2002; Vezzulli, Marrale, Moreno, & Fabiano, 2003; Vezzulli, Pruzzo, & Fabiano, 2004). Esto es principalmente debido a la alta biomasa criada y la alta tasa de conversión de la alimentación.

El aumento y acumulación de materia orgánica en los cuerpos de agua adyacentes a actividades

de producción acuícola depende de varios factores, entre otros de la especie en cultivo, la calidad del alimento, el tipo de manejo, las corrientes y la profundidad. Las heces y restos de alimento tienen mayores contenidos de carbono (C), nitrógeno (N) y fósforo (P) que los sedimentos naturales. La materia orgánica acumulada estimula la producción bacteriana, lo que cambia la composición química, la estructura y las funciones de los sedimentos disminuyendo las concentraciones de oxígeno, y aumentando la demanda biológica de oxígeno; se producen alteraciones en los ciclos normales de nutrientes, e incrementando el ingreso de nitrógeno (N) y fósforo (P) desde los sedimentos hacia la columna de agua (Enell & Lof, 1985).

Sistemas recirculados (RAS) como alternativa para los problemas del uso del agua y la producción de desechos

Para disminuir el impacto ambiental de la acuicultura, las tecnologías y las prácticas de producción se han enfocado en los últimos años a lograr minimizar la producción de residuos, conservar el agua y concentrar los desechos, y es por eso el gran interés de los RAS. Las principales razones por las cuales, a pesar de los posibles inconvenientes mencionados para estos sistemas radican en el hecho de que la recirculación y reutilización del agua vienen a disminuir las demandas de agua requeridas - uno de los principales problemas antes mencionados - y aunado a esto, permiten el tratamiento *in situ* de residuos, lo que disminuye la descarga de éstos hacia el ambiente, precisamente el otro de los principales problemas de la actividad producción acuícola.

Los sistemas tradicionales que utilizan agua que fluye a través del sistema tiene una capacidad de producción estimada de 6 kg de pescado por año por cada litro por minuto de flujo. Mediante la reutilización o reciclaje del 80 al 90% del agua previo a su descarte, en los sistemas RAS se pueden producir hasta 48 kg de pescado anualmente por cada litro por minuto de flujo de agua (Timmons & Ebeling, 2010).

Los RAS son más costosos económicamente que la mayoría de otros tipos de sistemas de acuicultura tradicional, por lo que se debe optimizar la producción económica por unidad de volumen para lograr la rentabilidad de la empresa (Davidson et al., 2016). En los RAS los peces pueden ser sembrados a mayores densidades; además, los individuos pueden ser cultivados en un entorno más seguro ya que los sistemas se suelen ubicar en un edificio cerrado para controlar el medio ambiente aéreo. El agua circula por todo el sistema, y sólo un pequeño porcentaje del agua se descarga diariamente, algo así como un 10% por día o menos de volumen del sistema. La temperatura, la salinidad, el pH, la alcalinidad, la composición química y el oxígeno del agua son todos supervisados y controlados continuamente. Los residuos sólidos son filtrados y eliminados, se agrega oxígeno para mantener niveles adecuados de oxígeno disuelto para la densidad de siembra utilizada, y el agua efluente pasa a través de un biofiltro para la conversión biológica de nitrógeno amoniacal a nitrógeno inocuo para el sistema (Timmons & Ebeling, 2010).

Recientemente, se han descrito a los RAS como una tecnología "madura" (Dalsgaard, Pedersen, & Pedersen, 2015), que es apoyada por el crecimiento en el número de establecimientos

comerciales con RAS en América del norte y en el extranjero (Petersen & Dalsgaard, 2003; Summerfelt & Christianson, 2014).

Equipos tradicionales de remediación in situ en RAS

Con el tratamiento del agua en sistemas recirculados se buscan varios resultados: eliminar gérmenes patógenos, facilitar el intercambio de gas entre la fase líquida y la gaseosa, y eliminar sustancias inertes. La desinfección en sistemas recirculados se utiliza para eliminar selectivamente bacterias y virus, hongos, entre otros organismos no deseados, y puede efectuarse por métodos físicos (UV y calor) o químicos (ozono, cloro).

El intercambio de gas se logra con el uso de aireadores y oxigenadores. Sin duda la aireación es el tratamiento del agua más empleado en acuicultura, y la elección del equipo se hace de acuerdo a varios factores tales como las instalaciones existentes y la eficacia de los instrumentos considerando la cantidad de oxígeno que es disuelto por unidad de tiempo, y el rendimiento energético asociado. Los sistemas de aireación pueden ser clasificados en dos grandes grupos: aireadores mecánicos, que utiliza la energía mecánica para provocar la ruptura de la superficie del agua, y los aireadores por gravedad, los cuales utilizan la energía liberada cuando el agua pierde altitud al aumentar el área superficial aire-agua, con lo que se incrementa la concentración de oxígeno del agua. Otra forma de incrementar el oxígeno disuelto en el agua es mediante la oxigenación usando oxígeno puro.

Con respecto a la eliminación de sustancias y organismos no deseados, en acuicultura se utiliza la filtración. Los filtros mecánicos se utilizan para eliminar partículas en suspensión

basados en las diferencias en el tamaño de la partícula en solución. Los filtros de gravedad, como su nombre lo indica, utilizan la fuerza de gravedad para extraer partículas de un fluido (separación gravitacional) mediante sedimentación, centrifugación o hidroclona (Timmons & Ebeling, 2010). Los filtros químicos son básicamente unidades de adsorción, entre los que se encuentran los filtros de carbón, los fraccionadores de espuma.

Finalmente están los filtros biológicos. Este tipo de filtros se encargan de la conversión de especies químicas tóxicas en especies menos tóxicas mediante el proceso de nitrificación, el cual es realizado principalmente por bacterias autotróficas obligadas. También existe un proceso de reducción anaeróbica de nitrato a nitrógeno molecular gaseoso denominado desnitrificación. En cuanto a su funcionamiento, se pueden identificar biofiltros sumergidos, de goteo, de lecho fluidizado y rotatorios, entre otros. El biofiltro ideal en un sistema RAS es aquel capaz de remover el 100% del amoníaco generado en el sistema por proceso de digestión de proteínas, no acumular nitritos, que posea poca superficie por unidad de volumen, no requerir presión de agua para su funcionamiento, y no acumular sólidos. Estas características no las cumple ningún biofiltro, razón por la cual existe aún mucho interés por el mejoramiento del proceso de biorremediación de agua en sistemas recirculados.

Opciones menos tradicionales

Los sistemas recirculados tienen algunas desventajas entre las que destacan el alto costo de inversión inicial para equipo, el requerimiento de sistemas complejos de

filtración y aireación, el requerimiento de destrezas técnicas especializadas, y el alto costo del tratamiento del agua. Ante esta situación, en las últimas décadas se han venido buscando

alternativas tecnológicas que permitan ya sea disminuir los costos de operación, u optimizar el

funcionamiento de los sistemas desde un punto de vista biológico y energético.

Empleo de bioflóculos

El uso de bioflóculos es una técnica que se desarrolló como una manera de controlar de mejor manera la actividad microbial intrínseca en estanques acuaculturales. La iniciativa de desarrollar esta tecnología se debió a la popularidad que habían alcanzado los estanques de cultivo intensivo en sistema

cerrado, en los cuales la aireación es una parte integral del sistema y la formación de sustratos orgánicos es el resultado directo de ello (Avnimelech, 2015).

Conceptos teóricos

El principio en el que se basa la utilización de bioflóculos en acuicultura es que mientras el nitrógeno y el carbono se encuentren equilibrados en el medio de cultivo, el amonio y el resto de residuos orgánicos nitrogenados se podrán convertir en biomasa bacteriana (Schneider, Sereti, Eding, & Verreth, 2005). Dado que el amonio y los otros productos nitrogenados se generan durante el metabolismo de los organismos cultivados, es necesario aumentar la concentración de carbono para lograr el equilibrio indicado, logrando con ello el crecimiento de bacterias heterotrófica y la absorción de nitrógeno a través de la producción de proteínas microbianas (Avnimelech, 1999). El resultado del crecimiento bacteriano y la consecuente absorción de nitrógeno disminuye la concentración de amonio, incluso de manera

más rápida que el proceso de nitrificación (Hargreaves, 2006). De acuerdo a Eding et al. 2006 (Eding, Kamstra, Verreth, Huisman, & Klapwijk, 2006) la producción de biomasa microbiana por unidad de sustrato de bacterias heterótrofas es de 0.5 g biomasa/g C utilizado.

Los bioflóculos son agregados de protozoos, bacterias, microalgas, y materia orgánica de diferente origen (alimento no consumido, heces) los cuales ser a su vez colonizados por algunos microorganismos del zooplancton, y nematodos, entre otros; suelen ser de forma irregular, muy variables en cuanto a su tamaño, fácilmente compresibles, altamente porosos (hasta más del 99% de porosidad), y muy permeables a los fluidos (Chu & Lee, 2004).

Experiencias en sistemas de cultivo

Una de las principales ventajas del uso de bioflóculos es que esta tecnología permite minimizar el recambio y uso del agua en sistemas de acuicultura, manteniendo la calidad del agua adecuada dentro del sistema (Crab, 2010). De este modo, si se compara esta tecnología con otras de tratamiento de agua convencionales se observa que el uso de bioflóculos proporciona una alternativa más económica (disminución de gastos de tratamiento de agua del orden del 30%), y además la eficiencia de utilización de la proteína es el doble en comparación a los estanques

convencionales, lo que resulta en una disminución de los gastos debidos a la alimentación (Y. Avnimelech, 2015; De Schryver, Crab, Defoirdt, Boon, & Verstraete, 2008). El intercambio de agua se puede disminuir sin deterioro de la calidad del agua y, en consecuencia, la cantidad total de nutrientes descargados a los cuerpos de agua adyacentes puede ser disminuida (Lezama-Cervantes & Paniagua-Michel, 2010).

La tecnología de bioflóculo es económica y de fácil operación. Sin embargo, es de fundamental

importancia tener presente que se debe mantener una alta concentración de sólidos suspendidos totales, por lo que se debe garantizar una adecuada aireación y mezcla para lograr esto (Y. Avnimelech, 2015). Otro aspecto a considerar es que al igual que las técnicas convencionales como los biofiltros, la

comunidad microbiana debe establecerse en el sistema previo a su óptimo funcionamiento (Roselien Crab, Defoirdt, Bossier, & Verstraete, 2012).

Experiencias en RAS

Se ha discutido recientemente cuál es el mejor método para la producción de camarones marinos en sistema cerrado, comparando los sistemas de recirculación con los sistemas de cultivo utilizando bioflóculo. Ray & Lotz (2017) concluyeron que las concentraciones de amoníaco y nitrito fueron más altas, y la supervivencia del camarón fue mucho menor en los sistemas bioflóculo; en estos sistemas también que los sistemas RAS dan una mejor calidad de agua, aunque el potencial de reciclaje de los nutrientes en los sistemas que utilizan bioflóculo es incuestionable.

Básicamente, existen dos tipos básicos de sistemas que utilizan bioflóculos, los que están expuestos a la luz natural y los que no lo están (Hargreaves, 2013). En los sistemas de bioflóculo expuestos a luz natural se da una mezcla compleja de procesos algales y bacterianos que controlan la calidad del agua en esos sistemas. Sin embargo, algunos sistemas de bioflóculo ("raceways" y tanques) se han instalado en edificios cerrados sin exposición a

la luz natural; estos sistemas funcionan como sistemas de "agua marrón" donde sólo los procesos bacterianos controlan de calidad del agua (Hargreaves, 2013).

La combinación de ambas tecnologías (RAS y bioflóculos) es difícil cuando se trata de sistemas de recirculación que tienen asociadas otras tecnologías para el tratamiento de aguas, debido a la gran concentración de sólidos en suspensión que debe ser mantenida, y la cual es requerida para que el concepto de biorremediación utilizando bioflóculos funcione. La capacidad para controlar la concentración de sólidos depende de la configuración del sistema, y se debe aumentar la energía necesaria para mantener los sólidos en suspensión, además de suministrar aireación que permita no solo lograr mantener estos sólidos suspendidos, sino que también para satisfacer la demanda de oxígeno de la respiración, la cual es elevada (Emerenciano, Gaxiola, & Cuzon, 2013)

Empleo de tapetes microbianos

Ante esta problemática, se han venido desarrollando en los últimos años sistemas alternativos para el tratamiento de aguas; sin embargo, la mayoría de esos métodos son económicamente costosos, requieren de altos egresos energéticos, y alta frecuencia de mantenimiento, entre otros limitantes.

Una alternativa adicional, es el uso de tapetes microbianos, la cual es una práctica de bajo costo, y ambientalmente amigable, ya que en estos sistemas la biorremediación es realizada

de manera natural por 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 & Phillips, 2004; Jiménez-Montealegre, Zamora-Castro, & Zúñiga-Calero, 2015; Robertson, Spear, Harris, & Pace, 2009).

Conceptos teóricos

Los tapetes microbianos están compuestos por comunidades microbianas complejas que se encuentran en diferentes nichos ecológicos, por ejemplo, en aguas marinas (Kubo et al., 2012), sobre la superficie de sedimentos (Hawes, Jungblut, Obryk, & Doran, 2016), y flotando en masas de aguas dulces (Sanz-Montero & Rodríguez-Aranda, 2013), entre otros.

En la naturaleza, los tapetes microbianos suelen estar firmemente fijados al suelo o a los sedimentos sumergidos, y luego suben a la superficie arrastrados por la flotabilidad de gases que son generados en la misma matriz (Bender & Phillips, 2004). Las comunidades de microorganismos constituyentes son capaces de metabolizar compuestos orgánicos y metales de su entorno, generando subproductos como hidrógeno, metano y sulfuro de hidrógeno (Hoehler, Bebout, & Des Marais, 2001; Taylor, Wirsén, & Gaill, 1999). Una vez establecido, el movimiento rápido de productos metabólicos a lo largo de gradientes de concentraciones redox y nutriente interviene en el intercambio

eficiente de materiales, apoyo a la productividad de toda la comunidad (Bender & Phillips, 2004).

Debido a la amplia gama de actividades microbianas que se realizan en un tapete, estos ecosistemas microbianos pueden ser útiles para la biorremediación de contaminantes ambientales, incluidos los generados en sistemas de producción acuícola. En acuicultura, son relativamente pocos los trabajos que se enfocan directamente en el uso de tapetes microbianos en sistemas recirculados, mientras que la mayor atención ha sido puesta en el funcionamiento de tapetes microbianos en sistemas abiertos (Bender et al., 2004; Martínez-Córdova, L., M. Martínez Porchas, J. López-Elías, A. Miranda Baeza, 2011; Martínez-Córdova, Emerenciano, Miranda-Baeza, & Martínez-Porchas, 2015; Martínez-Córdova, López-Elías, Leyva-Miranda, Armenta-Ayón, & Martínez-Porchas, 2011).

Experiencias en RAS

El uso de tapetes microbianos en sistemas recirculados ha sido poco estudiado (Jiménez-Montealegre, Zamora-Castro, et al., 2015; Lezama-Cervantes, 2008; Lezama-Cervantes & Paniagua-Michel, 2010; Lezama Cervantes, Paniagua Michel, & Zamora Castro, 2010; Paniagua-Michel & Garcia, 2003; Zamora-Castro, Paniagua-Michel, & Lezama-Cervantes, 2008).

En un trabajo anterior (Jiménez-Montealegre, Zamora-Castro, et al., 2015) se evaluó el efecto

del flujo de agua sobre la eficiencia de tapetes microbianos para remover las principales formas de nitrógeno inorgánico y orto-fosfatos en un sistema recirculado, y se demostró el efecto de este parámetro en la eficiencia de biorremediación de nitritos y amonio, aunque la remoción de nitratos u orto-fosfatos no se logró.

JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

La producción de organismos acuáticos parece ser una necesidad inevitable para el futuro inmediato de la humanidad, considerando la sobreexplotación de los bancos naturales de organismos acuáticos y el consecuente

deterioro de las pesquerías. Para ello, es necesario producir de manera no solo efectiva, sino que también de manera que su impacto al medio ambiente sea el mínimo posible.

El uso de sistemas recirculados (RAS) permite la disminución del uso de agua, y reduce la descarga de nutrientes al ambiente. Sin embargo, no existe sistema recirculado completamente cerrado, y siempre es inevitable el recambio de agua (mínimo) y la acumulación de desechos orgánicos que deben ser en algún momento exportados del sistema productivo.

El uso de tapetes microbianos dentro de los RAS ha mostrado ser una alternativa efectiva para la bioremediación de aguas; es una estrategia involucra un mayor egreso económico inicial, y un mayor manejo de la calidad del agua, pero favorece el uso reducido del agua. Lezama Cervantes et al. (2010) evaluaron la biorremediación *in situ* de un efluente camarónico bajo sistema recirculado a nivel piloto utilizando tapetes microbianos construidos; el sistema fue capaz de disminuir significativamente la carga inorgánica a la vez que se mantuvo el buen crecimiento y sobrevivencia de los camarones; la acumulación de materia orgánica si bien es cierto disminuyó, no lo hizo hasta los niveles deseables. Resultados similares se han encontrado utilizando RAS bajo condiciones intensivas de cultivo, y manejo de manera separada dos sistemas biofiltros tradicionales (de bacterias nitrificantes) y tapetes microbianos (Jiménez-Montealegre, Zamora Castro, & Zúñiga-Calero, 2015).

La acuicultura sin recambio de agua, bajo alta densidad de cultivo, con fuerte aireación y biota (predominantemente aeróbica y heterotrófica), formada por flocs microbianos ha sido utilizada ampliamente por empresas comerciales desde el inicio de los 80's (Serfling, 2006). Sin embargo, el conocimiento básico respecto a esta técnica está aún en proceso de desarrollo.

Diversos factores influyen la formación de flocs y su estructura en la BFT, aunque no han sido suficientemente investigados bajo condiciones de sistemas acuiculturales. La intensidad de mezcla impuesta por un sistema de aireación sobre el tamaño del floc (Chaignon, Lartiges, El Samrani, & Mustin, 2002; Garatun-Tjeldstø et al., 2006; Knights, 1983; Spicer &

Pratsinis, 1996), la concentración de oxígeno disuelto (Martins, Heijnen, & van Loosdrecht, 2003), la fuente de carbono orgánico para el metabolismo microbioal aeróbico (Y. Avnimelech, 2015), la tasa de carga orgánica, la temperatura y el pH, entre otros, son algunos ejemplos de vacíos de información para la utilización de BFT en Acuicultura. También, y aunque el bioflóculo provee beneficios, algún nivel de control sobre la concentración de bioflóculo es necesaria para optimizar su efecto ya que una muy alta turbidez y muchos sólidos suspendidos totales (TSS) causados por la acumulación de partículas puede aumentar la demanda bioquímica de oxígeno (BOD), causar oclusión de branquias y promover la aparición de microorganismos potencialmente dañinos (Alonso-Rodríguez, Páez-Osuna, Alonso-Rodríguez, & Páez-Osuna, 2003; Brune, Schwartz, Eversole, Collier, & Schwedler, 2003; Chapman, Popham, Griffin, Leslie, & Michaelson, 1987; Hargreaves, 2006; Liltved & Cripps, 1999).

Está claro que aún se requiere mayor investigación para optimizar los procesos y su aplicación en los sistemas acuícolas. Y el acoplamiento de esta tecnología con el uso de tapetes microbianos en RAS no ha sido hasta ahora propuesta. El fin de la presente investigación es continuar con la evaluación del uso de tapetes microbianos en sistemas intensivos de producción acuática bajo recirculación (RAS) e investigar sobre el posible acoplamiento de la tecnología de bioflóculos (BFT) al sistema de producción propuesto por Jiménez-Montealegre et al. (2015). Lograr con estas técnicas el mejoramiento en la calidad del agua en sistemas recirculados de producción súper-intensiva permitirá la reducción en las demandas de agua marina, y el mejoramiento del ambiente. La transferencia de esta tecnología podrá facilitar el establecimiento de sistemas recirculados intensivos para la producción de larvas de camarón y alevines de peces marinos en el país, una necesidad inminente para Costa Rica.

Objetivos de la investigación

En el presente trabajo se evaluaron diferentes estrategias para el mantenimiento de la calidad del agua en sistemas de recirculación súper-intensivo de agua marina a nivel piloto, mediante el uso combinado de las tecnologías de bioflóculos y de tapetes microbianos. Dentro de las estrategias primeramente se valoró la factibilidad técnica de la utilización conjunta de

tapetes microbianos y bioflóculos; y posteriormente se evaluaron los efectos que tendrían el flujo de agua y la intensidad de aireación en el sistema sobre la concentración y el tamaño de los bioflóculos, y sobre los tapetes microbianos.

DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA

Se utilizaron 12 tanques circulares de fibra de vidrio (75 cm de alto y 70 cm de diámetro) con fondo cónico y un volumen efectivo de 170 litros. Al lado de cada tanque se colocaron dos tanques rectangulares de menor tamaño de 50 litros cada uno, uno de los cuales fue utilizado para colocar el tapete microbiano.

Los tapetes microbianos fueron construidos a partir de biomasa algal obtenida de muestras de sedimentos colectados de una camarónera cercana. Los 5 mm superiores del sedimento fueron resuspendidos en medio de cultivo QA modificado (Rostron, Stuckey, & Young, 2001) y el sobrenadante se filtró al vacío utilizando papel Whatman® GF/C de 47 mm. Las muestras se incubaron a 32°C (Precision® 818) con un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad. El consorcio microbiano y algal se adhirió naturalmente a trozos de un polímero de baja densidad (Dacrón®) de 80 x 20 cm los cuales a su vez se colocaron en estructuras de

PVC en forma de W.

En cada sistema se incorporó un tanque circular adicional de 200 litros, con aireación constante, el cual se utilizó para la generación de bioflóculos a partir de la adición de harina de trigo como fuente de carbono. Cada sistema contó con un flujo de agua independiente generado mediante una bomba de agua sumergible (Lifetech® AP 1600).

Para todos los experimentos se utilizaron camarones juveniles (*Litopenaeus vannamei*) de 4-6 g de peso individual, los cuales fueron colocados en los tanques cónicos a razón de 100 g de biomasa total por sistema. Los camarones fueron alimentados diariamente con alimento peletizado comercial conteniendo 35% de proteína, y utilizando una tasa del 3% del peso corporal por día.

Métodos empleados

A continuación, se brinda una breve información respecto a los métodos empleados, los cuales son comunes para los tres experimentos realizados (Cuadro 1).

Cuadro 1: Parámetros medidos y métodos utilizados durante los experimentos

Parámetro medido	Método utilizado
Alcalinidad	La alcalinidad total del agua fue medida volumétricamente (APHA, 2005). Cuando el valor de pH del agua disminuyó por debajo de 7.0, se agregó NaHCO_3 para aumentarlo a 7.5.
Biomasa sobre los tapetes microbianos	La matriz (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 ($\pm 0,1$ g). Una semana después de la inoculación de la biomasa, tres submuestras del tapete con un área aproximada de 15 cm ² fueron disectadas. 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 m ² de tapete. Todas las mediciones fueron realizadas aleatoriamente por triplicado.
Alimentación, crecimiento y sobrevivencia de camarones	Se asumió una tasa de crecimiento de 0,15 g/d y se diseñó una tasa de alimentación del 1.5% del peso corporal diario. Se ajustó semanalmente la ración alimenticia. Al final de cada experimento se evaluaron los siguientes parámetros: mortalidad (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) = $(\text{Pf}-\text{Pi})/t$ donde Pf y Pi son el peso final e inicial en gramos, y t es el tiempo en días; factor de conversión alimenticia (FCA, g/d) = 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; y tasa específica de crecimiento (SGR, %/d) como $\text{SGR} (\%/d) = (\ln \text{Wf} - \ln \text{Wi})/t * 100$ donde ln = logaritmo natural, Wf = peso final, Wi = peso inicial, y t = tiempo (en días) (Tesch, 1978).
Cociente Carbono/Nitrógeno	El cociente carbono:nitrógeno (C:N) para los bioflóculos fue determinado utilizando un analizador CHNS (Elementar Analysysteme GmbH, Hanau, Alemania).
Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO)	La demanda bioquímica de oxígeno (DBO ₅) fue medida de acuerdo a métodos estándar (APHA, 2005), generalmente al inicio, mitad y final del experimento.
Microorganismos en el tapete microbiano	Al inicio y al final del experimento se identificaron los principales taxones componentes del tapete algal. Un trozo de 1 cm de tapete fue mecánicamente desagregado y homogenizado en agua de mar filtrada. El número de colonias y algas celulares fueron contadas en submuestras de 1 mL producto del raspado de 1 cm ² de tapete, utilizando hematocitómetro y cámara de Sedgewich Rafter bajo microscopia de luz y con una magnificación de 40X (Olympus CH). Los microorganismos fueron identificados con guías (Round, Crawford, & Mann, 1990; Stanier, Deruelles, Rippka, Herdman, & Waterbury, 1979).

(Cont.)

Parámetro medido	Método utilizado
Nutrientes	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. Las formas de nitrógeno inorgánico disueltas fueron nitritos (N-NO ₂), nitratos (N-NO ₃) y nitrógeno amoniacal total (N-NH ₄ ⁺ + N-NH ₃), y fueron determinadas espectrofotométricamente. El nitrógeno amoniacal total fue determinado por el método del fenato, la concentración de nitrito mediante el método de diazotización, y el nitrato también por diazotización luego de su reducción utilizando una columna de cadmio (APHA, 2005; Strickland & Parsons, 1972). La suma de las tres especies nitrogenadas fue denotada como Nitrógeno Inorgánico Disuelto (NID). Adicionalmente, se midió la concentración de orto-fosfato (P-PO ₄ ³⁻) con el método del molibdato-ascorbato (Strickland & Parsons, 1972). Todas las mediciones se hicieron por duplicado con un espectrofotómetro Shimadzu® (UV-1203).
Parámetros físico-químicos	Con un medidor multiparamétrico (Thermo Electron Corporation, Orion 5 STAR) se midió diariamente la temperatura, el pH y el oxígeno disuelto en el agua. La salinidad se midió con un refractómetro (NEW S-100).
Análisis bioquímicos	Al final y en ocasiones a la mitad del experimento, se colectaron muestras de bioflóculos en cada tanque para análisis bioquímicos. Las muestras fueron secadas en un horno a 60°C. Las muestras secas fueron procesadas siguiendo los métodos descritos por la AOAC (2005). La humedad fue determinada por diferencia luego de secar la muestra a 105°C hasta peso constante. La ceniza fue determinada luego de calcinar la muestra a 550°C durante 4 horas. El contenido de proteína cruda fue determinado por el método de Kjeldahl. Los lípidos fueron determinados mediante extracción utilizando Soxhlet y el extracto libre de nitrógeno fue estimado por diferencia (Tacon, 1990).
Sólidos en suspensión	Se colectaron muestras de agua y se filtraron al vacío a través de un filtro pre-pesado y pre-lavado Whatman GF/C. El agua filtrada fue la utilizada para los análisis de nutrientes, y el sólido filtrado fue empleado para el cálculo del total de sólidos suspendidos (SST). La diferencia de peso de la muestra seca antes y después de calcinación en una mufla a 550°C fue utilizada para el cálculo de los sólidos suspendidos volátiles (SSV) (APHA, 2005).
Fitoplancton y Zooplancton	Las muestras de plancton fueron colectadas por triplicado, luego de su filtración a través de una malla de 200 micras de diámetro de poro (para zooplancton) o de 50 micras (para fitoplancton); y fueron fijadas utilizando formalina al 5% (Pennak, 1978) o fijadas con solución de Lugol al 5% y posterior sedimentación. El recuento de plancton se realizó utilizando una celda de Sedgwick-Rafter (APHA, 2005). Los conteos se realizaron por triplicado y fueron expresados en células/L.
Tamaño de los bioflóculos	Los bioflóculos fueron analizados en cuanto a su tamaño, separando los mismos en tres grupos: menores de 48 micras, entre 48 y 100 micras, y mayores a 100 micras de diámetro. Para ello, muestras de agua de volumen conocido fueron pasadas a través de tamices, y los bioflóculos colectados en cada tamiz fueron secados, y se calculó la contribución de cada fracción al total de bioflóculos presentes en las muestras.

(cont.)

Análisis estadísticos	A cada parámetro medido se le realizó un análisis de varianza de una vía para datos uniformes y homoscedásticos o su valor transformado. En los casos en que se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, se realizó el análisis <i>a posteriori</i> de Student-Newman-Keuls SNK con un nivel de confianza del 95% (Zar, 1999) Los análisis se realizaron utilizando el software Statistica Ver. 10® (StatSoft, Inc. 2011).
-----------------------	---

PRIMER EXPERIMENTO (Comparación de técnicas)

El objetivo fue comparar la eficiencia del uso de tapetes microbianos construidos para la bioremediación de aguas en un sistema de recirculación y su efecto en los organismos de cultivo, con un sistema que integre el uso de tapetes y bioflóculos.

Se diseñaron tres tratamientos tres veces repetidos (n=3) y un control (n=3). Los

tratamientos utilizados fueron tanques con tapetes y sin bioflóculos (T), tanques sin tapetes y con bioflóculos (B), y tanques con tapetes y bioflóculos (TyB). Se utilizó un control (O) que consistió de tanques sin tapete ni bioflóculos. Los tratamientos fueron aleatoriamente distribuidos. La cantidad de biomasa de camarones fue similar entre los tratamientos.

Principales hallazgos según parámetro

Cuadro 2. Principales resultados del primer experimento según parámetro de medición

Parámetro	Principales hallazgos
Alcalinidad	La alcalinidad se mantuvo dentro de los rangos esperados en este tipo de sistemas (113.61 +/- 8.94 mg/L CaCO ₃). Sin embargo, se dio una leve disminución en el tratamiento T (solo tapetes) y un aumento en los otros tres tratamientos, mostrando una diferencia significativa con el tratamiento T a partir del día 35 (p < 0.05).
Biomasa sobre los tapetes microbianos	La cantidad de biomasa presente en cada uno de los tapetes al inicio del experimento no fue estadísticamente diferente y fue cercana a 207.75 +/- 16.51 g/m ² . Al final del experimento, dicho valor aumentó levemente (hasta 209.79 +/- 16.63 g/m ²), sin que ello representara diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos T y T+B (p>0.05).
Alimentación, crecimiento y sobrevivencia de camarones	Al cabo de 65 días de experimento, se pudo observar que la incorporación al sistema de un tanque con bioflóculos favoreció significativamente (p<0.05) el crecimiento de los camarones, con un incremento en peso individual de 2.50 +/- 0.31 g/camarón, en comparación con el incremento de 0.85 +/- 0.38 g/camarón en los tanques sin bioflóculos. Sin embargo, la presencia del tapete en adición al uso de bioflóculos desmejoró la eficiencia del crecimiento, alcanzándose un valor promedio de 1.88 g/camarón en los 65 días. Del mismo modo, no se encontraron diferencias significativas (p>0.05) entre los tratamientos con y sin tapetes microbianos.
Cociente Carbono/Nitrógeno	El cociente Carbono:Nitrógeno en los bioflóculos fue de 7.17 +/- 0.05 al inicio del experimento, disminuyendo levemente a 6.82 +/- 0.32 al final del experimento. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos B y TyB (solo con bioflóculos, o con tapetes y bioflóculos). El valor C:N se ajusta bien al valor reportado en la literatura para este tipo de compuestos.

(Cont.)

Parámetro	Principales hallazgos
Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO)	La DBO ₅ está relacionada con la cantidad de sólidos en suspensión, esperándose que a mayor cantidad de sólidos (bioflóculos) mayor será el valor de DBO ₅ . En este experimento el valor de DBO ₅ fue muy alto en el tratamiento de solo bioflóculos (8.80 +/- 0.17 y 9.80 +/- 0.05 mg/L al inicio y al final del experimento, respectivamente), y bajo en los tratamientos con tapetes (valores máximos de 3.19 +/- 0.17 mg/L). El uso de tapete probablemente disminuye la cantidad de bioflóculo en suspensión y con ello la DBO ₅ también disminuyó. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre todos los tratamientos.
Microorganismos en el tapete microbiano	Para todos los tratamientos, el grupo algal de las cianobacterias fue dominante en los tapetes, seguido en importancia por el grupo de las diatomeas. Se encontró que, aparte de los organismos zooplanctónicos asociados a los bioflóculos (tanto a los bioflóculos directamente como los presentes en el agua), también se encontraron microorganismos zooplanctónicos asociados a los tapetes. Las concentraciones de microorganismos no aumentaron significativamente ($p > 0.05$) a lo largo del experimento, ni se encontraron diferencias en cuanto al número de microorganismos entre tratamientos ($p > 0.05$).
Nutrientes	Nitrógeno amoniacal total (NAT): Como era de esperar, los niveles de NAT de mantuvieron altos durante el experimento en los tratamientos que no tuvieron tapetes o bioflóculos, aunque los valores no llegaron a ser tóxicos. En el tratamiento de solo bioflóculos, se aprecia que se logró disminuir la concentración de NAT, aunque el proceso fue lento de iniciar y no fue sino hasta cerca del día 35 en que los niveles fueron cercanos a 0 mg/L. En los tratamientos con tapetes, o tapetes+bioflóculos (T y TyB), la concentración de amonio no aumentó a más de 1 mg/L. Se puede con ello observar que la efectividad de los tapetes es evidente independientemente de la presencia o ausencia de bioflóculos. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos con tapetes y sin tapetes tengan estos o no bioflóculos. NO ₂ ⁻ : Las concentraciones de nitritos aumentaron en todos los tratamientos, pero en los tratamientos en los que se incluyeron los tapetes (independientemente de la presencia o no de bioflóculo) este parámetro se logró disminuir hasta valores inferiores a 0.5 mg/L luego de 30-40 días. En los tratamientos sin tapetes (con bioflóculos o el control) no se lograron reducir las concentraciones de nitritos en los sistemas. NO ₃ ⁻ : Los nitratos se aumentaron de manera sostenida en todos los tratamientos, y no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre tratamientos. Sin embargo, la combinación de tapetes y bioflóculos logró reducir en un mayor porcentaje las concentraciones de nitratos, cuando se comparó con los sistemas con solo tapetes o solo bioflóculos. PO ₄ ³⁻ : Independientemente del uso o no de tapetes o bioflóculos (o ambos), la concentración de orto-fosfatos aumentó durante todo el experimento. Nuevamente se evidencia que los tapetes (y ahora tampoco los bioflóculos) son capaces de procesar de manera eficiente y suficiente los orto-fosfatos, los cuales se acumulan hasta alcanzar niveles muy altos, superiores a 9 mg/L.
Parámetros físico-químicos	Los parámetros físicos del agua se mantuvieron dentro de rangos normales durante todo el experimento (salinidad: 30.5 +/- 1.1 ppM, pH: 8.2 +/- 0.1; Oxígeno disuelto: 5.9 +/- 1.1; Temperatura: 28.0 +/- 1.1 °C). Aunque los valores de oxígeno fueron relativamente bajos, los valores mínimos alcanzados no fueron inferiores a 4.1 mg/L, y estos mínimos no se mantuvieron por más de un día, por lo que se presume que no tuvo efecto negativo en los organismos en cultivo.
Análisis bioquímicos	La composición proximal de los bioflóculos en el tratamiento B (solo bioflóculos) mostró que la concentración de proteína fue de 27.22 +/- 4.6 %, la de carbohidratos fue de 15.93 +/- 0.17 y la de lípidos fue de 12.99 +/- 3.2 % (valores en base seca). No se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) con los bioflóculos provenientes del tratamiento TyB, es decir que la presencia de tapetes no parece afectar la composición proximal de los bioflóculos.

(Cont.)

Parámetro	Principales hallazgos
Sólidos en suspensión	Las variaciones en el tiempo de los sólidos suspendidos totales (SST) y los sólidos suspendidos volátiles (SSV) fueron similares. Como era de esperarse, el tratamiento con solo bioflóculos (B) siempre mantuvo una mayor concentración de sólidos suspendidos totales y volátiles, aumentando éstos al inicio y alcanzando valores casi constantes cercanos a los 10 mg/L luego de los primeros 20 días. Al final del experimento, los otros tres tratamientos (sin bioflóculos ni tapete, o con tapete o la combinación de ambos) no presentaron diferencias significativas entre ellos ($p > 0.05$) pero si con el tratamiento de solo bioflóculos ($p < 0.05$), que presentó valores finales de 51.8 +/- 20.7 y 17.6 +/- 7.3 mg/L para los SST y los SSV, respectivamente.
Zooplankton	Cuando se analizan los totales de individuos zooplanctónicos en el sistema, nuevamente se confirma que el tratamiento de Tapetes + Bioflóculo genera mucha mayor cantidad de zooplankton (1192 ind/L) que el resto de tratamientos (784 y 440 ind/L para los tratamientos B y T, respectivamente), aunque cuando es únicamente bioflóculo también se desarrolla una importante biota de zooplankton. Únicamente con tapetes, la cantidad de zooplankton es mucho menor (menos de la mitad) que con bioflóculos, siendo mínima (menor de 225 ind/L) en los tratamientos sin tapetes ni bioflóculo.

Valoración del objetivo y conclusión

El diseño experimental y las actividades propuestas permitieron, para el sistema de recirculación utilizado, comparar la eficiencia del uso de tapetes microbianos construidos y su capacidad de bioremediación del agua. El fin de este objetivo (y de la de investigación en general) fue valorar una opción que parecía muy interesante desde el punto de vista científico: utilizar dos estrategias que mejoran de manera independiente y diferente la calidad del agua en sistemas recirculados, y combinarlas con el fin de valorar si estas estrategias podían trabajar conjuntamente, o incluso sinérgicamente, es decir, logrando un efecto superior a la suma de

los efectos individuales. Los resultados obtenidos mostraron que las dos técnicas son difíciles de combinar, en el tanto que la turbidez (menor luz) y los sólidos suspendidos, ambos aportados por el uso de bioflóculos, tuvieron un efecto negativo sobre el funcionamiento de los tapetes microbianos. Sin embargo, queda probar modificaciones técnicas apoyadas en criterios científicos que pudieran optimizar ambas estrategias, y con ello lograr el objetivo propuesto. Ese fue el principal motivo de los otros dos experimentos planteados en la presente investigación.

SEGUNDO EXPERIMENTO (Efecto del flujo de agua)

El objetivo fue determinar el efecto del flujo de agua sobre la concentración y tamaño de bioflóculos y sobre los organismos de cultivo en un sistema piloto de recirculación de agua marina integrado con tapetes microbianos construidos.

El experimento se fue escalando en cuatro etapas diferentes. Durante la primera etapa los 12 sistemas recirculados se pusieron en funcionamiento utilizando únicamente el

sistema de producción de bioflóculos. Cuando la concentración de bioflóculos en los sistemas fue superior a los 100 mg/L en términos de sólidos suspendidos totales, se incluyeron los camarones. (etapa 2). Posteriormente, se colocaron los tapetes microbianos en los tratamientos que los debían contener (seis sistemas), y finalmente, se ajustaron dos niveles de flujo de agua. Al final, se utilizaron cuatro tratamientos con tres repeticiones cada uno

(n=3). Cada tratamiento poseía la misma biomasa de camarones, y la presencia en el sistema de un tanque generador de bioflóculos. Un tratamiento incluía tapetes y alto flujo de agua (CA), otro incluía tapete y bajo flujo de agua (CB), y los otros dos tratamientos no incluían tapetes, uno con alto flujo de agua (SA)

y el otro con bajo flujo de agua (SB). El flujo de agua alto fue regulado a 3.8 ciclos por hora, y el flujo de agua bajo fue de 1.27 ciclos/hora, representando un flujo real en el sistema recirculado de 648 L/h y 216 L/h, respectivamente.

Principales hallazgos según parámetro

Cuadro 3. Principales resultados del segundo experimento según parámetro de medición

Parámetro	Principales hallazgos
Alcalinidad	La alcalinidad es un parámetro que suele ser afectado producto del proceso de nitrificación y la consecuente acidificación del medio. Sin embargo, y a lo largo del experimento la alcalinidad se mantuvo por encima de los 140 mg/L CaCO ₃ sin necesidad de la adición de NaHCO ₃ , siendo este valor levemente mayor en el tratamiento SB (sin tapete y bajo flujo de agua). Por ello y al final del experimento no se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$) entre los tratamientos.
Biomasa sobre los tapetes microbianos	La cantidad de biomasa adherida a los tapetes microbianos no varió durante el desarrollo del experimento, y tampoco fue significativamente diferente al inicio y final del mismo ($p > 0.05$). Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos CA y CB ($p < 0.05$); la presencia de bioflóculos en los sistemas tiene un efecto directo y evidente con relación a la biomasa presente en los tapetes. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con alto y bajo flujo de agua ($p > 0.05$) en cuanto a la cantidad de biomasa presente en los tapetes, lo que pareciera indicar que no hay un efecto ni positivo ni negativo del flujo de agua en la cantidad de biomasa adherida a los tapetes.
Alimentación, crecimiento y sobrevivencia de camarones	La ración de alimento fue cercana al 1.74 % BW/d en todos los tratamientos. Además, en adición se agregaba al agua el 60% del valor del alimento (en peso seco) de harina de trigo con el fin de brindar la suficiente cantidad de carbono para mantener el cociente C:N en niveles adecuados, y lograr con ello poder procesar el nitrógeno generado producto del metabolismo proteico por parte de los camarones. El crecimiento de los camarones en todos los tratamientos fue limitado (entre 0.22 +/- 0.04 g/semana en el tratamiento CB, hasta 0.30 +/- 0.11 g/semana en el tratamiento CA), sin diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$). A pesar del pobre crecimiento encontrado, no se presentó mortalidad.
Cociente Carbono/Nitrógeno	El cociente Carbono: Nitrógeno (C:N) del alimento fue de 10.66 +/- 0.02, lo que es algo alto y esperable en alimentos de alto porcentaje de proteína. Los valores de C:N en el bioflóculo oscilaron entre 6.78 +/- 0.55 y 7.45 +/- 0.13, con un promedio de 7.16 +/- 0.32 (n=48). No se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en los valores del cociente C:N en el bioflóculo ni entre tratamientos, ni entre períodos (inicio y final). Se logró mantener el cociente C:N cercano a 7 con la adición del 60% del carbono adicionado en forma de harina de trigo, calculado a partir del alimento ofrecido.
Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO)	Los valores promedio de DBO ₅ fueron muy altos en los tratamientos que no incluían los tapetes (entre 8.75 +/- 0.18 y 11.76 +/- 0.41 mg/L), y bajo en los tratamientos con tapete (entre 0.95 +/- 0.37 y 4.94 +/- 0.20 mg/L), siendo estos valores estadísticamente diferentes entre tratamientos ($p < 0.05$) y a lo largo de todo el experimento. Aparentemente la presencia de tapetes disminuye la cantidad de bioflóculos, con ello la DBO ₅ también disminuye. Sin embargo, no se detectaron diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$) entre los tratamientos con alto o bajo flujo de agua, independientemente de la presencia o no de tapetes, por lo que parece que el flujo de agua no tiene efecto en las concentraciones de DBO ₅ en los sistemas.

(Cont.)

Parámetro	Principales hallazgos
Microorganismos en el tapete microbiano	La cantidad de biomasa algal sobre los tapetes fue menor que en el primer experimento, probablemente debido a la acumulación de bioflóculos sobre los tapetes. El flujo de agua no parece acrecentar el problema de la acumulación de bioflóculos sobre los tapetes microbianos. Nuevamente las cianobacterias fueron el grupo algal dominante en los tapetes, y el grupo de las diatomeas también fue importante. Las concentraciones de microorganismos al inicio disminuyeron al final cuando había alto flujo, y aumentaron al final cuando había bajo flujo. Las concentraciones de microorganismos no aumentaron significativamente ($p > 0.05$) a lo largo del experimento en ninguno de los tratamientos, ni se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en cuanto al número de microorganismos entre los tratamientos, independientemente de la utilización de un alto o un bajo flujo de agua.
Nutrientes	Las concentraciones de nutrientes se empezaron a registrar en la etapa 4 del experimento (ver diseño experimental). Al momento de iniciar con el registro de datos, el sistema ya se encontraba suficientemente maduro y estable para la evaluación del parámetro de interés: flujo de agua, y ya había transcurrido 35 días desde el inicio del funcionamiento de los sistemas. NAT: Por la misma razón, las concentraciones iniciales de NAT se encontraron cercanas a cero en todos los sistemas y no se registró ningún aumento significativo hacia el final del experimento, 23 días después. Nitritos: Las concentraciones de nitritos, sin embargo, se encontraron muy altas al inicio del experimento, cercanas a 12 mg/L y tendieron a disminuir en los tratamientos con tapetes (tratamientos CA y CB), manteniéndose siempre altas en los otros tratamientos (sin tapetes, SA, SB). No se encontraron diferencias significativas estadísticamente entre los tratamientos con tapetes, independientemente del flujo de agua empleado, ni tampoco entre los tratamientos que no los poseían ($p > 0.05$). Nitratos: las concentraciones iniciales de nitratos fueron altas (cercanas a los 10 mg/L) y aumentó en todos los tratamientos, de manera continuada y durante todo el experimento, alcanzando valores máximos de 35 mg/L; se pudo notar valores de concentración de nitratos ligeramente menores en los tratamientos sin tapetes, pero las diferencias estadísticas no fueron significativas ($p > 0.05$). Orto-fosfatos: las concentraciones de orto-fosfatos aumentaron a lo largo de todo el experimento, y no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, es decir, que este aumento de orto-fosfatos disueltos en el agua se dio independientemente de la presencia o ausencia de tapetes, y con alto o bajo flujo de agua.
Parámetros físico-químicos	Los parámetros físicos del agua se mantuvieron dentro de rangos normales durante todo el experimento (salinidad: 33.3 +/- 0.9 ppM, pH: 8.2 +/- 0.1; Oxígeno disuelto: 4.9 +/- 1.3; Temperatura: 30.9 +/- 1.2 °C).
Análisis bioquímicos	La composición proximal de los bioflóculos no fue diferente estadísticamente ($p > 0.05$) entre los tratamientos CA, CB y SB con valores que oscilaron entre 28.8 +/- 10.32 y 33.6 +/- 9.59 % de lípidos totales, 26.9 +/- 3.91 y 28.9 +/- 5.08 de proteína bruta, y de 30.91 +/- 7.18 y 35.94 +/- 7.05 de carbohidratos totales. Solamente el tratamiento SA (sin tapete, con alto flujo de agua) se presentaron valores diferentes: 21.3 +/- 10.83 de lípidos, 22.2 +/- 12.19 de proteína bruta y 50.48 +/- 17.34 de carbohidratos totales; estos valores de los tres componentes fueron estadísticamente diferentes a los de los otros tres tratamientos.
Sólidos en suspensión	Como es de suponer, los valores de SST y los de SSV guardan una estrecha relación. La cantidad de sólidos suspendidos fue apreciablemente mayor en los tratamientos sin tapetes (111.8 +/- 4.2 y 112.9 +/- 8.4) que en los tratamientos con tapetes (85.0 +/- 1.7 y 89.6 +/- 4.3), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Además de que los datos lo demuestran, se pudo observar que efectivamente los tapetes microbianos actuaban como sedimentadores de bioflóculos. Adicionalmente, no se encontraron diferencias significativas en cuanto al flujo empleado, es decir que los datos obtenidos no muestran que el flujo de agua tenga algún efecto sobre la concentración de bioflóculos, independientemente de que se posean o no tapetes microbianos.

(Cont.)

Parámetro	Principales hallazgos
Tamaño de los bioflóculos	Los bioflóculos fueron analizados en cuanto a su tamaño, separando los mismos en tres grupos: menores de 48 micras, entre 48 y 100 micras, y mayores a 100 micras de diámetro. Las mediciones se hicieron una vez a la semana durante tres semanas. En ninguno de los cuatro tratamientos se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en relación al diámetro de los bioflóculos y la semana de muestreo. Tampoco se encontraron diferencias entre tratamientos, es decir que la proporción de diámetros de los bioflóculos se mantuvo relativamente constante, sin importar el flujo de agua utilizado, o la presencia o no de tapetes microbianos en el sistema. Finalmente, la contribución de cada fracción al total de bioflóculos presentes en las muestras fue similar, cercana al 33%, con una leve diferencia mayor en las fracciones inferiores a las 48 micras, sin que estas resultaran significativamente diferentes ($p > 0.05$).
Zooplancton	Nuevamente, está claro que los tratamientos con Tapetes (CA, CB) generan mucha mayor cantidad de zooplancton que los tratamientos sin tapete (SA, SB) ($p < 0.05$). Las concentraciones de microorganismos zooplanctónicos en el agua y asociados a los bioflóculos oscilaron, al inicio del experimento, entre 232.4 y 274.3 ind/L para los tratamientos SA y SB, y entre 1089.5 y 569.5 ind/L para los tratamientos CA y CB, respectivamente; dichas concentraciones no variaron significativamente al cabo de 4 semanas. Los copépodos harpacticoideos dominaron en todos los tratamientos, siendo particularmente importantes en el tratamiento CA (847 ind/L al inicio, 716.2 ind/L al final del experimento). No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en relación al flujo de agua utilizado.

Valoración del objetivo y conclusión

Un factor que puede tener efecto en la capacidad de bioremediación de bioflóculos en sistemas de recirculación para acuicultura es la cantidad y el tamaño de los bioflóculos presentes, y el flujo de agua que se utilice en el sistema. Una de las estrategias que se propuso para mejorar el funcionamiento conjunto de las dos técnicas (uso de bioflóculos y uso de tapetes microbianos), fue evaluar la influencia que el flujo de agua empleado tuviese sobre el sistema y su funcionamiento. Lo anterior se planteaba ahora desde dos perspectivas diferentes. La primera (la original) era evaluar la importancia del tiempo de interacción del agua con los tapetes microbianos, y su efecto en el proceso de bioremediación, y la otra, proveniente de los hallazgos del primer experimento, fue valorar si el aumentar el flujo de agua podría disminuir la deposición de bioflóculos sobre los tapetes microbianos sin efectos negativos.

Los resultados de los experimentos no permitieron identificar un flujo de agua más adecuado y que se diferenciara en cuanto al poder biorremediador de los tapetes y los bioflóculos. Sin embargo, quedaba el otro enfoque, el de minimizar la acumulación de bioflóculos sobre los tapetes microbianos. Se hicieron algunas adaptaciones menores en el sistema, que no arrojaron resultados concluyentes. Sin embargo, se pudo apreciar que el incremento en el flujo de agua del sistema recirculado no lograba disminuir de manera apreciable la acumulación de bioflóculos, sin afectar negativamente la capacidad biorremediadora de ambas técnicas.

Se concluyó, a pesar de los resultados anteriores, que se podrían todavía hacer cambios en el diseño del sistema para lograr evaluar la factibilidad del uso conjunto de ambas estrategias.

TERCER EXPERIMENTO (Efecto de la aireación)

El fin fue determinar el efecto de la intensidad de aireación y mezcla de agua sobre el tamaño del bioflóculo, y su utilización por parte de los organismos de cultivo en un sistema piloto de recirculación de agua marina integrado con tapetes microbianos construidos.

El experimento se realizó durante 50 días, empleando doce sistemas independientes de recirculación. Se diseñaron los siguientes tratamientos: tanques con tapetes, bioflóculos y alta aireación (CBA, n=3), tanques con tapetes, bioflóculos y baja aireación (CBB, n=3), tanques sin tapetes, con bioflóculos y alta aireación (SBA, n=2), tanques sin tapetes, con bioflóculos y baja aireación (SBB, n=2), y dos tanques adicionales, uno con tapetes, sin bioflóculos y alta aireación (CSA) y otro sin tapetes ni bioflóculos, con alta aireación (SSA). Los

tratamientos fueron asignados a los sistemas recirculados independientes de manera aleatoria. El nivel de aireación (alta o baja) fue definida como un porcentaje por encima y por debajo del valor utilizado en otros experimentos, resultando el valor de alta aireación de 13 L aire/segundo, y el de baja aireación de 5 L aire/segundo. El flujo de agua se mantuvo constante y similar en todos los tratamientos (180 L/h). Una diferencia importante con el diseño de los otros experimentos es que los tapetes se colocaron de manera vertical y en el mismo tanque utilizado como generador de bioflóculos, con el fin de minimizar la deposición de éstos sobre los tapetes.

Principales hallazgos según parámetro

Cuadro 4. Principales resultados del tercer experimento según parámetro de medición

Parámetro	Principales hallazgos
Alcalinidad	Los valores de alcalinidad se pudieron mantener constantes, aunque relativamente bajos en todos los tratamientos, con valores que oscilaron entre 61.8 y 127.1 mg/L CaCO ₃ . Considerando que la alcalinidad se ve afectada por procesos de acidificación del agua, como lo es la nitrificación (entre otros) es posible que todos los tratamientos tuvieran una nitrificación activa. Esto se puede evidenciar además por el aumento continuado de nitratos a lo largo del experimento (ver más adelante). No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ni al inicio, ni durante ni al final del experimento (p>0.05).
Biomasa sobre los tapetes microbianos	La cantidad de biomasa en los tapetes fue menor que la utilizada en otros experimentos, debido a que los mismos fueron colocados de manera vertical en lugar de horizontal. La cantidad de biomasa al inicio del experimento fue similar en todos los tratamientos (p>0.05) y cercana al valor de 153 g/m ² , lo que se consideró aún un valor de biomasa adecuado para su función en la biorremediación de aguas en estos sistemas. Sin embargo, la cantidad de biomasa en los tapetes disminuyó sustancialmente hacia el final del experimento, probablemente debido a la aireación utilizada, la cual pudo haber desprendido del sustrato (Dacrón) la biomasa. En los dos tratamientos con alta aireación (CBA y CSA) la disminución fue del orden del 43.6 % (CBA) y del 51.8% (CSA) de la cantidad inicial, mientras que la disminución en el tratamiento de baja aireación (CBB) fue únicamente del 19.1%. La presencia o ausencia de bioflóculos también determinó la cantidad de biomasa que poseían los tapetes al final del experimento debido al posible efecto de sombreo (p<0.05).

(Cont.)

Parámetro	Principales hallazgos
Alimentación, crecimiento y sobrevivencia de camarones	La sobrevivencia en todos los tratamientos fue igual o superior al 98%. La ración aplicada (real) fue del 4% del peso corporal por día, y similar en todos los tratamientos. Al igual que en los otros experimentos, se agregó el 60% del valor del alimento en forma de azúcar de caña, con el fin de brindar carbono que garantizara el procesamiento del nitrógeno generado durante el proceso de digestión del alimento. El crecimiento de los organismos fue mayor en los tratamientos que no poseían tapetes (SBA y SBB) en comparación con los que sí lo poseían (CBA, CBB). El mayor crecimiento se obtuvo en el tratamiento SBB (0.58 g/semana) y el menor en el tratamiento CSA (0.44 g/semana). Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el crecimiento de los camarones sometidos a un régimen de alta aireación (SBA y CBA) en comparación con los tratamientos en los que se utilizó baja aireación (SBB y CBB).
Cociente Carbono/Nitrógeno	El cociente carbono:nitrógeno (C:N) al inicio del experimento fue de 6.92 +/- 0.18 y disminuyó muy levemente (hasta 6.86 +/- 0.11) al final de los 50 días de experimento. No se detectaron diferencias significativas de este parámetro ni entre tratamientos ni entre el inicio y final del experimento ($p > 0.05$). El cociente C:N de los bioflóculos se logró mantener cercano a 7 con la adición del 60% de carbono calculado a partir del alimento ofrecido y de su porcentaje de proteína; de hecho, el C:N del alimento fue de 10.43 +/- 0.04, relativamente alto, algo que era de esperar con alimentos de alto contenido de proteína.
Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO)	En este experimento, la determinación de DBO ₅ se realizó una única vez (semana 4, el día 22, cerca de la mitad del experimento). El valor de DBO en los sistemas que utilizaron bioflóculos (tratamientos CBA, CBB, SBA y SBB) fue considerablemente mayor que en los sistemas que no los poseían (CSA y SSA). A su vez, el valor de DBO ₅ fue mayor en los sistemas que poseían tapetes (CBA 5.31 +/- 0.37 y CBB 6.52 +/- 0.25) en comparación con los que no lo tenían (SBA 2.90 +/- 0.22 y 3,17 +/- 0.17). Finalmente, se encontró que el valor de DBO ₅ fue mayor cuando el flujo de agua en el sistema fue bajo, en comparación de cuando éste fue alto ($p < 0.05$), contrastando los valores de CBA y SBA con los de CBB y SBB. El DBO ₅ en sistemas con únicamente tapetes fue muy bajo (CSA 0.21 +/- 0.01), y cercano a cero en sistemas sin bioflóculos ni tapetes (SSA 0.08 +/- 0.01).
Microorganismos en el tapete microbiano	Debido a la colocación vertical de los tapetes en el sistema, no se apreció la acumulación de bioflóculos sobre los tapetes. Sin embargo, la cantidad de biomasa inicialmente fijada sobre los tapetes era parcialmente desprendida debido a la aireación y al movimiento del agua; adicionalmente, esta biomasa se ubicó mayormente en los primeros 50 centímetros del tapete probablemente por efecto del sombreado que provocaban los bioflóculos en suspensión. Tanto las cianobacterias como el grupo de las diatomeas estuvieron mucho más representados (en términos de millones de individuos por centímetro cuadrado) que los otros grupos de microorganismos ($p < 0.05$), y no se encontraron diferencias entre estos dos grupos ($p > 0.05$) en cuanto a su número. En general, las concentraciones de microorganismos adheridos en los tapetes disminuyeron apreciablemente durante el experimento.
Sólidos en suspensión	Para ninguno de los tratamientos se encontró que las cantidades de sólidos variaran a lo largo del experimento, siendo los valores promedios de SST para cada tratamiento: CBA 44.9 +/- 5.7, CBB 44.9 +/- 2.2, SBA 70.0 +/- 18.3, SBB 86.7 +/- 45.6, CSA 44.7 y SSA 43.2 mg/L. Las cantidades de sólidos suspendidos totales guardaron una estrecha relación con la de los sólidos suspendidos volátiles (SSV), representando estos últimos entre un 21.2% y un 48.9 % de los SST (en peso seco), con una media de 29.5% para todas las repeticiones y tratamientos. La cantidad de sólidos suspendidos fue mayor en los tratamientos sin tapetes que en los tratamientos con tapetes, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), lo que indica que, a pesar de la colocación vertical de los tapetes, éstos también acumularon bioflóculos en sus superficies. A pesar de esto último, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de diferente intensidad de flujo de aire empleado ($p > 0.05$), mostrando que el flujo de aire, a pesar de provocar turbulencia sobre los tapetes no parece tener un efecto sobre las concentraciones de sólidos suspendidos.

(Cont.)

Parámetro	Principales hallazgos
Nutrientes	<p>NAT: Las concentraciones de nitrógeno amoniacal total se mantuvieron siempre y en todos los tratamientos por debajo de 1 mg/L; las concentraciones iniciales disminuyeron en todos los tratamientos durante los primeros 15 días de experimento, y aumentaron levemente después del día 21; no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$).</p> <p>Nitritos: las concentraciones de nitritos al inicio del experimento fueron cercanas a cero, pero conforme transcurrió el experimento estos valores aumentaron hasta niveles peligrosos de hasta 15 mg/L, disminuyendo posteriormente hasta valores cercanos a cero. Con excepción de los tratamientos SSA y CBA, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos. Precisamente, y a partir del día 21, los tratamientos SSA y CBA mostraron diferencias significativas con los otros tratamientos ($p < 0.05$) y únicamente el tratamiento SSA (sin tapete, sin bioflóculos y con alta aireación) se mantuvo diferente al resto al final del experimento.</p> <p>Nitratos: las concentraciones de nitratos aumentaron levemente en todos los tratamientos hasta valores máximos cercanos a 20 mg/L, sin diferencias estadísticas detectadas entre tratamientos ($p > 0.05$), con excepción del tratamiento CSA (con tapete, sin bioflóculo y alta aireación) cuyos valores de nitratos sí fueron diferentes al resto de tratamientos ($p < 0.05$) a partir del día 35, y alcanzando un valor máximo de 46.3 mg/L el día 43.</p> <p>Orto-fosfatos: las concentraciones de orto-fosfatos aumentaron levemente (hasta alrededor de los 2 mg/L) en todos los tratamientos, encontrándose al final del experimento una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre dos grupos de tratamientos: CSA, SSA y CBB, en contraste con SBB, SBA y CBA. Las concentraciones alcanzadas de orto-fosfatos fueron menores que las encontradas en experimentos anteriores, aunque en general se apreció el mismo aumento continuado de esta especie química a lo largo del experimento.</p>
Parámetros físico-químicos	<p>Los parámetros físicos del agua se mantuvieron dentro de rangos normales durante todo el experimento en todos los tratamientos, sin diferencias significativas ($p > 0.05$) (salinidad: 35.5 +/- 2.4 ppM, Temperatura: 30.7 +/- 0.9 °C, pH: 7.9 +/- 0.2). El oxígeno disuelto fue determinado de manera regular, manteniéndose siempre en valores de concentración por encima de los 5 mg/L.</p>
Tamaño de los bioflóculos	<p>Los bioflóculos fueron analizados en cuanto a su tamaño, separando los mismos en tres grupos: menores de 48 micras, entre 48 y 100 micras, y mayores a 100 micras de diámetro. Las mediciones se hicieron una vez a la semana durante ocho semanas. Los valores porcentuales de cada fracción mostraron que ninguna de ellas fuera mayor que las otras de manera evidente, es decir que cada tercera parte del total de bioflóculos poseía un diámetro perteneciente a una de las tres fracciones definidas inicialmente. No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$) independientemente de la intensidad de aireación que se empleara, es decir que las intensidades de aireación utilizadas no tuvieron un efecto diferenciador en el diámetro de los bioflóculos presentes en el sistema.</p>
Zooplancton	<p>Los tratamientos con tapetes (CBA, CBB, CSA), en coincidencia con experimentos anteriores, presentan mucha mayor cantidad de zooplancton que los tratamientos sin tapete (SBA, SBB, SSA) ($p < 0.05$). Las concentraciones de microorganismos zooplanctónicos, tanto los encontrados en el agua como los asociados a los bioflóculos, oscilaron al inicio del experimento entre 397.3 y 2330.7 ind/L, con excepción del tratamiento SSA (sin tapetes ni bioflóculos), cuya concentración fue de 98.7 ind/L. En todos los tratamientos las concentraciones de microorganismos (tanto los asociados a los tapetes como los de vida libre) aumentaron en promedio en un 30 % en todos los tratamientos. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en relación al efecto que pudiera haber tenido la intensidad de aireación ni en la composición ni en el número de microorganismos zooplanctónicos.</p>

Valoración del objetivo y conclusión

Se evaluó el efecto de la intensidad de aireación sobre el tamaño del bioflóculo, así como sobre el crecimiento de los organismos en cultivo.

Para este set de experimentos, y producto de los problemas técnicos identificados en los experimentos anteriores, se varió el diseño del

sistema de recirculación colocando los tapetes microbianos (una vez que estuvieran correctamente colonizados) colocándolos de forma vertical y no de forma inclinada (ángulo de 45° empleado en experimentos anteriores). Con esa modificación, se procedió a realizar los experimentos con un diseño experimental que incluía dos flujos de agua diferentes. En general, se logró minimizar la acumulación de bioflóculos en los tapetes. Sin embargo, la turbulencia generada por la aireación, y el sombreado provocado por los bioflóculos causaron que parte de la biomasa microbiana se desprendiera, manteniéndose únicamente los 50 centímetros superiores del tapete,

perdiéndose casi el 50% de su área total, y disminuyendo así, en términos absolutos, su capacidad de bioremediación.

Por otra parte, las intensidades de aireación empleadas no mostraron diferencias evidentes en cuanto al tamaño del bioflóculo, o en cuanto a su aprovechamiento por parte de los organismos en cultivo. Tampoco se encontraron mejoras sobre la capacidad de bioremediación en el sistema en su conjunto. El aparente poco efecto de la aireación podría estar “enmascarado” por la menor efectividad de los tapetes microbianos al contarse con menor biomasa activa.

CONSIDERACIONES FINALES

La bioremediación de aguas en sistemas recirculados para el cultivo de organismos acuáticos mediante la utilización de tapetes microbianos construidos se ha venido estudiando por varios años. Los resultados hasta ahora alcanzados muestran que esta estrategia de bioremediación es parcialmente efectiva, ya que elimina algunos de los productos no deseados (amonio-amoniaco, nitritos), pero no disminuye de manera importante la acumulación de otros productos tales como materia orgánica, nitratos y orto-fosfatos. La incorporación de la tecnología de bioflóculos (BFT) o bioflóculos para el tratamiento de aguas y generación de proteína *in situ* en Acuicultura se ha evaluado con bastante éxito en otras partes del mundo y a nivel experimental; sin embargo, no se han realizado intentos para combinar ambas tecnologías.

En la presente investigación se evaluó el uso combinado de tapetes microbianos y bioflóculos en sistemas recirculados de producción a pequeña escala; el fin fue evaluar la posibilidad y conveniencia del uso conjunto de ambas tecnologías de manera que se lograra una remediación efectiva del agua utilizada a la vez que se alcanzara un crecimiento y sobrevivencia óptimos de los organismos de cultivo.

Para todos los experimentos se utilizó un conjunto de 12 tanques de 200 litros cada uno conteniendo camarones marinos en alta densidad (50 ind/m³), y se evaluaron tres aspectos: 1. La conveniencia del uso conjunto de tapetes microbianos y bioflóculos para la bioremediación de aguas en este sistema; 2. El efecto del flujo de agua sobre la estabilidad de los bioflóculos en este tipo de sistemas; y 3. el efecto de la intensidad de aireación y mezcla de agua sobre los bioflóculos. La evaluación se hizo mediante la medición de parámetros químicos de la calidad del agua (concentración de las principales formas de nitrógeno inorgánico disuelto, orto-fosfatos, sólidos en suspensión y oxígeno disuelto, entre otros), y mediante la evaluación de parámetros biológicos, tanto sobre los organismos en cultivo (tasa de crecimiento, tasa de mortalidad y conversión alimenticia) como sobre los microorganismos asociados (fitoplancton, zooplancton).

Los diseños experimentales y las actividades propuestas permitieron, para el sistema de recirculación utilizado, comparar la eficiencia del uso de tapetes microbianos construidos y su capacidad de biorremediación del agua. El fin del proyecto de investigación fue valorar una opción que parecía muy interesante desde el punto de vista científico: utilizar simultáneamente dos estrategias de bioremediación que mejoran de manera

independiente y diferente la calidad del agua en sistemas recirculados; se consideró que ambas técnicas podían trabajar sinérgicamente, es decir, logrando un efecto superior a la suma de los efectos individuales.

Sin embargo, los resultados obtenidos mostraron que las dos técnicas son difíciles de combinar, en el tanto que la turbidez provocada por la gran cantidad de sólidos en suspensión cuando se utilizan bioflóculos disminuye la luz disponible para los tapetes, causando un efecto negativo sobre el mantenimiento de los tapetes microbianos. Se plantearon algunas modificaciones técnicas que podrían favorecer el uso conjunto de ambas estrategias. Se consideró que dos factores que podrían haber tenido un efecto en la capacidad de bioremediación en el sistema fueron la cantidad y el tamaño de los bioflóculos presentes, y el flujo de agua que se utilizara.

Así, una de las estrategias que se propuso para mejorar el funcionamiento conjunto de las dos técnicas fue evaluar la influencia que el flujo de agua empleado tuviese sobre el sistema y su funcionamiento. Lo anterior se planteaba ahora desde dos perspectivas diferentes. La primera era evaluar la importancia del tiempo de interacción del agua con los tapetes microbianos, y su efecto en el proceso de bioremediación, y la otra, proveniente de los hallazgos del primer experimento, fue valorar si el aumentar el flujo de agua podría disminuir la deposición de bioflóculos sobre los tapetes microbianos sin efectos negativos. Los resultados de los experimentos no permitieron identificar un flujo de agua más adecuado y que se diferenciara en cuanto al poder biorremediador de los tapetes y los bioflóculos. Un último cambio a evaluar fue el tratar de minimizar la acumulación de bioflóculos sobre

los tapetes microbianos. Se hicieron algunas adaptaciones menores en el sistema, que no arrojaron resultados concluyentes. Se pudo apreciar que el incremento en el flujo de agua del sistema recirculado no lograba disminuir significativamente la acumulación de bioflóculos.

Finalmente, se varió el diseño del sistema de recirculación colocando los tapetes microbianos (una vez que estuvieran correctamente colonizados) colocándolos de forma vertical y no de forma inclinada. En general, se logró minimizar la acumulación de bioflóculos en los tapetes. Sin embargo, el sombreado provocado por los bioflóculos causó que parte de la biomasa microbiana muriera y se desprendiera.

En resumen, se logró valorar la conveniencia del uso combinado de tapetes microbianos y bioflóculos en sistemas recirculados de acuicultura. Partiendo del hecho de que ambas tecnologías se encargan, de manera diferente, de biorremediar el agua, se esperaba que éstas pudieran ser combinadas. Sin embargo, considerando que la presencia de bioflóculos afectó negativamente el mantenimiento y desempeño de los tapetes microbianos, se concluyó que técnicamente es poco factible combinar ambas técnicas. La presencia de bioflóculos causa turbidez y aumenta la cantidad de sólidos suspendidos en el agua, y estos dos factores inciden negativamente en el desempeño de los tapetes microbianos. Se concluyó que el uso conjunto de estas dos tecnologías no parece ser posible; no se recomienda continuar con la evaluación de esta combinación de técnicas, y en su lugar, se recomienda continuar con la optimización de ambas estrategias, pero de manera independiente.

REFERENCIAS

- Allison, E. H. (2011). Global aquaculture and its role in sustainable development. *World Fish Center*, 65.
<https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2008.01002.x>
- Alonso-Rodríguez, R., Páez-Osuna, F., Alonso-Rodríguez, R., & Páez-Osuna, F. (2003). Nutrients, phytoplankton and harmful algal blooms in shrimp ponds: a review with special reference to the situation in the Gulf of California. *Aquaculture*, 219(1), 317–336. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00509-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00509-4)
- AOAC. (2005). *Official methods of analysis* (18th ed.). Gaithersburg Md.: AOAC International. Retrieved from <http://www.worldcat.org/title/official-methods-of-analysis-of-aoac-international/oclc/62751475>
- APHA. (2005). *Standard methods for the examination of water & wastewater*. (Andrew D. Eaton [and others], Ed.) (21st ed.). American Public Health Association.
- Avnimelech, Y. (1999). Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture*, 176(3–4), 227–235. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00085-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00085-X)
- Avnimelech, Y. (2015). *Biofloc technology – A practical guide book*. <https://doi.org/10.13140/2.1.4575.0402>
- Bender, J., Lee, R., Sheppard, M., Brinkley, K., Phillips, P., Yeboah, Y., ... Wah, R. C. (2004). A waste effluent treatment system based on microbial mats for black sea bass *Centropomus striata* recycled-water mariculture. *Aquacultural Engineering*, 31(1–2), 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2004.02.001>
- Bender, J., & Phillips, P. (2004). Microbial mats for multiple applications in aquaculture and bioremediation. *Bioresource Technology*, 94(3), 229–238. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.12.016>
- Brune, D. E. E., Schwartz, G., Eversole, A. G. G., Collier, J. A. A., & Schwedler, T. E. E. (2003). Intensification of pond aquaculture and high rate photosynthetic systems. *Aquacultural Engineering*, 28(1), 65–86.
[https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(03\)00025-6](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(03)00025-6)
- Chaignon, V., Lartiges, B. S., El Samrani, A., & Mustin, C. (2002). Evolution of size distribution and transfer of mineral particles between flocs in activated sludges: an insight into floc exchange dynamics. *Water Research*, 36(3), 676–684. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00266-4](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00266-4)
- Chapman, P. M., Popham, J. D., Griffin, J., Leslie, D., & Michaelson, J. (1987). Differentiation of physical from chemical toxicity in solid waste fish bioassays. *Water, Air, and Soil Pollution*, 33(3–4), 295–308.
<https://doi.org/10.1007/BF00294198>
- Chu, C. P., & Lee, D. J. (2004). Multiscale structures of biological flocs. *Chemical Engineering Science*, 59(8–9).
<https://doi.org/10.1016/j.ces.2004.01.040>
- Crab, R. (2010). *Bioflocs technology: an integrated system for the removal of nutrients and simultaneous production of feed in aquaculture*.
- Crab, R., Defoirdt, T., Bossier, P., & Verstraete, W. (2012). Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges. *Aquaculture*, 356–357, 351–356. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.04.046>
- Dalsgaard, J., Pedersen, L.-F., & Pedersen, P. B. (2015). Recirculation technology getting mature. *Aquacultural Engineering*, 65, 1. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2014.12.003>
- Davidson, J., May, T., Good, C., Waldrop, T., Kenney, B., Terjesen, B. F., & Summerfelt, S. (2016). Production of market-size North American strain Atlantic salmon *Salmo salar* in a land-based recirculation aquaculture system using freshwater. *Aquacultural Engineering*, 74, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2016.04.007>
- De Schryver, P., Crab, R., Defoirdt, T., Boon, N., & Verstraete, W. (2008). The basics of bio-flocs technology: The added value for aquaculture. *Aquaculture*, 277(3–4), 125–137. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.02.019>
- Eding, E. H., Kamstra, A., Verreth, J. A. J., Huisman, E. A., & Klapwijk, A. (2006). Design and operation of nitrifying trickling filters in recirculating aquaculture: A review. *Aquacultural Engineering*, 34(3).
<https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2005.09.007>
- Emerenciano, M., Gaxiola, G., & Cuzon, G. (2013). Biofloc Technology (BFT): A Review for Aquaculture Application and Animal Food Industry. *Intech*, (i), 301–328. <https://doi.org/10.5772/53902>
- Enell, M., & Lof, J. (1985). Changes in sediment phosphorus, iron and manganese dynamics caused by fish farming impact. In T. Gulderbrandsen & S. Samin (Eds.), *11th Nordic Symposium on Sediments* (pp. 80–89).
- FAO. (2016). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos*. Roma. <https://doi.org/978-92-5-306675-9>
- Garatun-Tjeldstø, O., Otterå, H., Julshamn, K., Austreng, E., Garatun-Tjeldstø, I., Austreng, K., & Garatun-Tjeldstø, O. (2006). Food ingestion in juvenile cod estimated by inert lanthanide markers e effects of food particle size. *ICES Journal of Marine Science*, 63, 311–319. <https://doi.org/10.1016/j.icesjms.2005.11.008>
- Gowen, R. J., Weston, D. P., & Ervik, A. (1991). Aquaculture and benthic environment: a review. *Nutritional Strategies And Aquaculture Waste*. C.B. Cowey & C.Y. Cho, 14, 187–205.
- Hargreaves, J. A. (2006). Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. *Aquacultural Engineering*, 34(3),

- 344–363. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2005.08.009>
- Hargreaves, J. A. (2013). Biofloc Production Systems for Aquaculture. *SRAC Publication*, (4503), 1–12. Retrieved from <https://srac.tamu.edu/>
- Hawes, I., Jungblut, A. D., Obryk, M. K., & Doran, P. T. (2016). Growth dynamics of a laminated microbial mat in response to variable irradiance in an Antarctic lake. *Freshwater Biology*, 61(4), 396–410. <https://doi.org/10.1111/fwb.12715>
- Hoehler, T. M., Bebout, B. M., & Des Marais, D. J. (2001). The role of microbial mats in the production of reduced gases on the early Earth. *Nature*, 412(6844), 324–327. <https://doi.org/10.1038/35085554>
- Hutson, S. S., Barber, N. L., Kenny, J. F., Linsey, K. S., Lumia, D. S., & Maupin, M. A., (2004). (2004). Estimated use of water in the United States in 2000. *U.S. Geological Survey Circular*, 1268, 1–46.
- Jiménez-Montealegre, R., Zamora-Castro, J., & Zúñiga-Calero, G. (2015). Determination of water flow rate for bioremediation in recirculating aquaculture systems using constructed microbial mats | Determinación del flujo de agua para la biorremediación en sistemas recirculados acuaculturales utilizando tapetes microbianos cons. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 43(1). <https://doi.org/10.3856/vol43-issue1-fulltext-20>
- Jiménez-Montealegre, R., Zamora Castro, J., & Zúñiga-Calero, G. (2015). Determinación del flujo de agua para la biorremediación en sistemas recirculados acuaculturales utilizando tapetes microbianos construidos. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 43(1), 234–247. <https://doi.org/10.3856/vol43-issue1-fulltext-20>
- Knights, B. (1983). Food particle-size preferences and feeding behaviour in warmwater aquaculture of European eel, *Anguilla anguilla* (L.). *Aquaculture*, 30(1–4), 173–190. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(83\)90160-6](https://doi.org/10.1016/0044-8486(83)90160-6)
- Kubo, K., Lloyd, K. G., F Biddle, J., Amann, R., Teske, A., & Knittel, K. (2012). Archaea of the Miscellaneous Crenarchaeotal Group are abundant, diverse and widespread in marine sediments. *The ISME Journal*, 6(10), 1949–1965. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.37>
- Lezama-Cervantes, C. (2008). *Proceso de bioremediación mediante tapetes microbianos artificiales aplicado para intensificar el cultivo del camarón blanco en un esquema de recambio mínimo de agua.*
- Lezama-Cervantes, C., & Paniagua-Michel, J. (2010). Effects of constructed microbial mats on water quality and performance of *Litopenaeus vannamei* post-larvae. *Aquacultural Engineering*, 42(2), 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2009.12.002>
- Lezama Cervantes, C., Paniagua Michel, J. D. J., & Zamora Castro, J. (2010). Biorremediación de los efluentes de cultivo del camarón *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) utilizando tapetes microbianos en un sistema de recirculación. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 38(1), 129–142. <https://doi.org/10.3856/vol38-issue1-fulltext-12>
- Liltved, H., & Cripps, S. J. (1999). Removal of particle-associated bacteria by prefiltration and ultraviolet irradiation. *Aquaculture Research*, 30(6), 445–450. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1999.00349.x>
- Martínez-Córdova, L., M. Martínez Porchas, J. López-Elías, A. Miranda Baeza, E. B. (2011). Estado Actual del Uso de Biopelículas y Bioflóculos en el Cultivo de Camarón. *Avances En Nutrición Acuicola XI*, 393–423.
- Martínez-Córdova, L. R., Emerenciano, M., Miranda-Baeza, A., & Martínez-Porchas, M. (2015). Microbial-based systems for aquaculture of fish and shrimp: An updated review. *Reviews in Aquaculture*, 7(2), 131–148. <https://doi.org/10.1111/raq.12058>
- Martínez-Córdova, L. R., López-Elías, J. A., Leyva-Miranda, G., Armenta-Ayón, L., & Martínez-Porchas, M. (2011). Bioremediation and reuse of shrimp aquaculture effluents to farm whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*: A first approach. *Aquaculture Research*, 42(10), 1415–1423. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02730.x>
- Martins, A. M. P., Heijnen, J. J., & van Loosdrecht, M. C. M. (2003). Effect of dissolved oxygen concentration on sludge settleability. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62(5–6), 586–593. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1384-6>
- Paniagua-Michel, J., & Garcia, O. (2003). Ex-situ bioremediation of shrimp culture effluent using constructed microbial mats. *Aquacultural Engineering*, 28(3–4), 131–139. [https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(03\)00011-6](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(03)00011-6)
- Pennak, R. W. (1978). *Fresh-Water Invertebrates of the United States* (2nd ed.). John Wiley. Retrieved from <http://doi.wiley.com/10.1002/iroh.19800650309>
- Petersen, A., & Dalsgaard, A. (2003). Antimicrobial resistance of intestinal *Aeromonas* spp. and *Enterococcus* spp. in fish cultured in integrated broiler-fish farms in Thailand. *Aquaculture*, 219(1–4), 71–82.
- Ray, A. J., & Lotz, J. M. (2017). Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and stable isotope dynamics in clear-water recirculating aquaculture systems versus biofloc systems. *Aquaculture Research*. <https://doi.org/10.1111/are.13262>
- Robertson, C. E., Spear, J. R., Harris, J. K., & Pace, N. R. (2009). Diversity and stratification of archaea in a hypersaline microbial Mat. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(7), 1801–1810. <https://doi.org/10.1128/AEM.01811-08>
- Rostron, W. M., Stuckey, D. C., & Young, A. A. (2001). Nitrification of high strength ammonia wastewaters: comparative study of immobilisation media. *Water Research*, 35(5), 1169–1178. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00365-1](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00365-1)

- Round, F. E. (Frank E., Crawford, R. M., & Mann, D. G. (1990). *The Diatoms : biology & morphology of the genera*. Cambridge University Press.
- Sanz-Montero, M. E., & Rodríguez-Aranda, J. P. (2013). The role of microbial mats in the movement of stones on playa lake surfaces. *Sedimentary Geology*, 298, 53–64. <https://doi.org/10.1016/j.sedgeo.2013.10.006>
- Schneider, O., Sereti, V., Eding, E. H. H., & Verreth, J. A. J. A. J. (2005). Analysis of nutrient flows in integrated intensive aquaculture systems. *Aquacultural Engineering*, 32(3–4), 379–401. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2004.09.001>
- Serfling, S. A. (2006). Microbial flocs. Natural treatment method supports freshwater, marine species in recirculating systems. *Global Aquaculture Advocate*, 34–36.
- Spicer, P. T., & Pratsinis, S. E. (1996). Shear-induced flocculation: The evolution of floc structure and the shape of the size distribution at steady state. *Water Research*, 30(5), 1049–1056. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(95\)00253-7](https://doi.org/10.1016/0043-1354(95)00253-7)
- Stanier, R. Y., Deruelles, J., Rippka, R., Herdman, M., & Waterbury, J. B. (1979). Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Microbiology*, 111(1), 1–61. <https://doi.org/10.1099/00221287-111-1-1>
- Strickland, J. D. H., & Parsons, T. R. (1972). A Practical Handbook of Seawater Analysis. *A Practical Handbook of Seawater Analysis*, 167, 185. <https://doi.org/10.1002/iroh.19700550118>
- Summerfelt, S., & Christianson, L. (2014). Fish farming in land-based closed containment systems. *World Aquaculture Magazine*, 18–21.
- Tacon, A. (1990). *Standard methods for the nutrition and feeding of farmed fish and shrimp*. Redmond Wash.: Argent Laboratories Press. Retrieved from <http://www.worldcat.org/title/standard-methods-for-the-nutrition-and-feeding-of-farmed-fish-and-shrimp/oclc/22288525>
- Taylor, C. D., Wirsén, C. O., & Gaill, F. (1999). Rapid microbial production of filamentous sulfur mats at hydrothermal vents. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(5), 2253–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10224031>
- Tesch, F. W. (1978). Age and growth. In W. E. Ricker (Ed.), *Methods for assessment of fish production in freshwater* (3th ed., pp. 93–123). Blackwell Scientific Publication, Oxford, UK.
- Timmons, M. B., & Ebeling, J. M. (2010). *Recirculating Aquaculture*. *Aquaculture*.
- Vezzulli, L., Chelossi, E., Riccardi, G., & Fabiano, M. (2002). Bacterial community structure and activity in fish farm sediments of the Ligurian Sea (Western Mediterranean). *Aquaculture International*, 10, 123–141.
- Vezzulli, L., Marrale, D., Moreno, M., & Fabiano, M. (2003). Sediment organic matter and meiofauna community response to long-term fish-farm impact in the Ligurian Sea (Western Mediterranean). *Chemistry and Ecology*, 19, 431–440.
- Vezzulli, L., Pruzzo, C., & Fabiano, M. (2004). Response of the bacterial community to in-situ bioremediation of organic-rich sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 49, 740–751.
- Waite, R., Beveridge, M., Brummett, R., Castine, S., Chaiyawanakarn, N., Kaushik, S., ... Phillips, M. (2014). Improving productivity and environmental performance of aquaculture. *World Resources Institute*, 1–60. Retrieved from https://www.wri.org/sites/default/files/wrr_installment_5_improving_productivity_environmental_performance_aquaculture.pdf
- Zamora-Castro, J., Paniagua-Michel, J., & Lezama-Cervantes, C. (2008). A novel approach for bioremediation of a coastal marine wastewater effluent based on artificial microbial mats. *Marine Biotechnology*, 10(2), 181–189. <https://doi.org/10.1007/s10126-007-9050-0>
- Zar, J. H. (1999). *Biostatistical analysis*. Prentice Hall.