

Efecto de la adición de bacterias nitrificantes autóctonas en la formación de bioflocos para la mejoría de la calidad del agua de cultivo de organismos acuáticos

Effect of the addition of native nitrifying bacteria in the formation of bioflocs for the improvement of the quality of the water of culture of aquatic organisms

DOI:10.34117/bjdv6n6-078

Recebimento dos originais:08/05/2020

Aceitação para publicação:04/06/2020

Jéssica Lucinda Saldanha da Silva

Doutora em Engenharia de Pesca pela Universidade Federal do Ceará
Instituição: Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR)- UFC, Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico-FUNCAP.

Endereço: Av. da Abolição, 3207 - Meireles, CEP: 60165-081, Fortaleza-CE, Brasil
E-mail: jessicalucinda@hotmail.com

Marina Teresa Torres Rodríguez

Doutora em Ciências Marinhas Tropicais da Universidade Federal do Ceará
Instituição: Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da UFC, Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico-FUNCAP.

Endereço: Av. da Abolição, 3207 - Meireles, CEP: 60165-081, Fortaleza-CE, Brasil
E-mail: marinatorresrodriguez@gmail.com

Oscarina Viana de Sousa

Doutora em Ciências/ Microbiologia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituição: Docente do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da Universidade Federal do Ceará

Endereço: Av. da Abolição, 3207 - Meireles, CEP: 60165-081, Fortaleza-CE, Brasil
E-mail: oscarinaviana@hotmail.com

RESUMEN

La intensificación de los sistemas de cultivos acuícolas ocasiona el acumulo de materia orgánica y compuestos nitrogenados, conduciendo al deterioro de la calidad del agua y las pérdidas zootécnicas de los animales confinados. Para la solución de estos problemas se ha aplicado la tecnología de bioflocos, proporcionando un entorno bioseguro. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el proceso de formación de flocos a partir de la adición de un consorcio de bacterias nitrificantes autóctonas y su posterior desarrollo en un sistema de cultivo acuícola. El trabajo fue desarrollado en dos etapas: Formación de bioflocos en el laboratorio y posterior aplicación del biofloco domesticado en una granja de cultivo. Se determinaron variables físico-químicas, monitoreo microscópico de los flocos y análisis microbiológico. Se pudo observar un aumento y estabilización en la cantidad de agregados microbianos con la adición de bacterias nitrificantes en relación con el biofloco espontáneo *in*

in vitro. Fue detectado un aumento en la cuantificación de bacterias heterotróficas y sólidos sedimentables en la primera semana de inoculación en la granja de cultivo. Después de 20 días de cultivo, fue posible observar una disminución en el amonio, mientras que las concentraciones de nitrito solo se estabilizaron después de 100 días de cultivo. Las tilapias presentaron una supervivencia mayor del 90% y un incremento de 1.83 g/día. Fue verificada la eficiencia del proceso de formación de bioflocos inducidos con la utilización de un consorcio de bacterias nitrificantes autóctonas en el laboratorio y su aplicación en el cultivo de Tilapia.

Palabras-claves: Variables fisico-químicas, exopolysaccharide, antagonism, enzimas extracelulares.

ABSTRACT

The intensification of aquaculture farming systems causes or accumulates organic matter and nitrogenous composts, leading to deterioration of water quality and zootechnical losses of confined animals. To solve these problems, bioflocs technology has been applied, providing a biosecure environment. The objective of the present work was to evaluate the floc formation process from the addition of a consortium of autochthonous nitrifying bacteria and its subsequent development in an aquaculture system. The work was carried out in two stages: formation of bioflocs in the laboratory and subsequent application of the domesticated biofloc in a cultivation farm. Physico-chemical variables, microscopic monitoring of flocs and microbiological analysis were determined. An increase and stabilization in the amount of microbial aggregates could be observed with the addition of nitrifying bacteria in relation to the spontaneous biofloc *in vitro*. An increase in the quantification of heterotrophic bacteria and sedimentable solids was detected in the first week of inoculation in the culture farm. After 20 days of culture, it was possible to observe a decrease in ammonia, while nitrite concentrations only were stabilized after 100 days of culture. The tilapia showed a survival greater than 90% and an increase of 1.83 g / day. The efficiency of bioflocs formation process induced with the use of a consortium of autochthonous nitrifying bacteria in the laboratory and its application in the culture of Tilapia was verified.

Keywords: Physico-chemical variables, exopolysaccharide, antagonism, extracellular enzymes.

1 INTRODUCCIÓN

La acuicultura es el sector de la producción de alimento que viene creciendo día tras día en todo el mundo, supliendo el déficit causado por la disminución de las poblaciones pesqueras (FAO, 2018). Con el fin de suplir la demanda por pescado, son empleadas altas densidades de almacenamiento y alimentación artificial casi exclusiva, lo que genera una

mayor entrada de compuestos orgánicos y el aumento de nutrientes en el sistema de cultivo comprometiendo así, la calidad del agua (BENTZON-TILIA, 2016).

Una forma potencial de abordar la mejoría de los cultivos de organismos acuáticos, es la aplicación de la tecnología de los llamados "bioflocos", los que se desarrollan en la columna de agua de los viveros utilizando los nutrientes disponibles para el crecimiento y la replicación de los microorganismos participantes del sistema.

La gestión de la calidad del agua en los sistemas de cultivo aplicando la tecnología de "bioflocos" ("Biofloc Technology" – BFT), se basa en el desarrollo y control de la actividad microbiana intrínseca de los viveros, con renovación mínima o cero de agua (Avnimelech, 2007). Esto proporciona un ambiente de cultivo bioseguro, minimizando el intercambio de agua y la entrada de patógenos (AHMAD et al., 2017).

La tecnología de "bioflocos" es una técnica de cultivo ecológica basada en el uso de bacterias autóctonas de los sistemas de cultivo de los organismos acuáticos. Consiste en estimular el desarrollo de una microbiota predominantemente heterotrófica capaz de asimilar y transformar compuestos nitrogenados en proteína microbiana que actuará como suplemento alimentar para esos organismos (CRAB et al., 2012) en tanques de cultivo altamente aireados y fertilizados con fuentes de carbono (AVNIMELECH et al., 1989, AVNIMELECH, 2009, EMERENCIANO et al. 2013, MARTÍNEZ-CÓRDOVA et al., 2016).

Diferentes trabajos citan las ventajas del cultivo de organismos acuáticos con la utilización de la tecnología con bioflocos, la que beneficia el aumento del desempeño zootécnico de los organismos y fortalece el sistema inmunológico de los animales de cría, favorece la mejoría de la calidad del agua, además de disminuir la generación de efluentes una vez que el agua puede ser utilizada en varios ciclos productivos (AVNIMELECH, 2007, CRAB et al., 2012, CORREIA et al., 2014).

Las comunidades bacterianas que crecen en los sistemas de cultivo auxilian en la estructuración y formación de partículas resuspendidas (bioflocos) que son compuestos por microalgas, bacterias, agregados de materia orgánica particulada, protozoos y metazoos (CRAB et al., 2007).

Las bacterias constituyen el principal componente de un biofoco, siendo relatados como microorganismos productores de sustancias biopoliméricas y exopolisacáridicas (EPS) que pueden flocular sólidos suspendidos, células y sólidos coloidales, además de ser fuentes de vitaminas y minerales (KAZAN et al., 2017). El conocimiento de la estructura y formación del biofoco tornase importante para la evaluación y manejo de sus efectos beneficiosos

tentando optimizar su función dentro de los sistemas de cultivo, tanto en la remoción de compuestos nitrogenados como en la alimentación del animal en producción (RAY et al., 2010).

Los consorcios bacterianos comerciales (probióticos) en los sistemas BFT han sido utilizados con la finalidad de ayudar en la estabilización de la comunidad heterotrófica y en la competición con microorganismos autótrofos (principalmente en las fases iniciales), además de auxiliar en el reciclaje de la materia orgánica y controlar los sólidos y los niveles de nitrógeno amoniacal total (EMERENCIANO et al., 2017). Sin embargo, esa práctica puede funcionar o no en los cultivos de animales acuáticos, una vez que muchos de esos productos son compuestos por microorganismos alóctonos, o sea, oriundos de otros sistemas o hasta fabricados en otros países. De esta forma, la adición de cepas bacterianas autóctonas con un papel específico reconocido, puede acelerar el proceso de formación, maduración y estabilización del sistema BFT, ocasionando la proliferación de bacterias beneficiosas al ambiente y a los animales cultivados. Tomando en cuenta lo anteriormente expuesto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el proceso de formación de flocos a partir de la adición de un consorcio de bacterias nitrificantes autóctonas y su posterior desarrollo en un sistema de cultivo acuícola.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo fue desarrollado en dos etapas: Formación de bioflocos en el laboratorio (Laboratorio de Microbiología Ambiental y del Pescado-LAMAP), del Laboratorio de Ciencias del Mar-LABOMAR) perteneciente a la Universidad Federal de Ceará-UFC, Brasil y formación del biofoco en una granja de cultivo en la región de Jaguaruana, Ceará.

2.1 LABORATORIO

En el laboratorio fueron evaluados dos grupos experimentales: un control (BFE), formado por un biofoco espontáneo, que consistió de agua de vivero más una relación Carbono:Nitrógeno (C:N) de (20:1); y un tratamiento (BFI), formado por un biofoco inducido, constituido por un consorcio bacteriano más agua de vivero y el ajuste de la relación C:N (20:1). (En ambos tratamientos la relación C: N fue ajustada a 20:1 con melaza líquida).

En el tratamiento BFI fue adicionado un consorcio formado por cuatro estirpes bacterianas nitrificantes heterotróficas autóctonas pertenecientes a la bacterioteca del LAMAP

(LABOMAR) de la Universidad Federal de Ceará-UFC (Tabla 1). Las estirpes fueron aisladas del perifiton presente en un ambiente de cultivo de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*).

Las estirpes seleccionadas no presentaron antagonismo positivo entre sí, y fueron probadas en relación a la producción de exopolisacárido (EPS), por medio del agar rojo congo (AVC) (Freeman *et al.* 1989), agregación en microplacas de poliestireno (TMC) (Christensen *et al.* 1985) y verificada la expresión enzimática extracelular, en relación a la producción de proteasa (Prot), amilasa (Ami), celulasa (Cel), lipasa (Lip) y gelatinasa (Gel) (TEATHER; WOOD, 1982, RODRIGUES *et al.*, 1993, LIU *et al.*, 1996), con algunas modificaciones, además de la actividad hemolítica (Hem) (FURNISS *et al.*, 1979) (Tabla 1).

Las estirpes seleccionadas fueron probadas para las siguientes características fenotípicas: antagonismo cruzado entre estirpes, producción de exopolisacárido (EPS) con la utilización del agar rojo congo (AVC) (FREEMAN *et al.*, 1989), agregación en microplacas de poliestireno (TMC) (CHRISTENSEN *et al.*, 1985) y verificación de la producción de las enzimas: proteasa (Prot), amilasa (Ami), celulasa (Cel), lipasa (Lip) y gelatinasa (Gel) (RODRIGUES *et al.*, 1993, LIU *et al.*, 1996, TEATHER;WOOD, 1982), con algunas modificaciones, además de la actividad hemolítica (Hem) (FURNISS *et al.*, 1979) (Tabla 1).

Tabla 1- Caracterización de las estirpes bacterianas utilizadas en el consorcio aplicado en el BFI

Código	Morfología	Gram	Formación de biofilm		Pruebas enzimáticas					
			ARC	TMC	Prt	Ami	Cel	Lip	Gel	Hem
1	Bastonetes	-	+	++-	+	-	-	+	-	-
2	Bastonetes	-	+	+++	+	+	-	-	-	-
3	Bastonetes	-	+	++-	+	+	-	+	-	-
4	Bastonetes	-	+	+--	+	-	-	+	+	-

ARC (Agar Rojo congo): (+) producción de exopolisacárido; TMC (Prueba de adherencia en microplacas): (+++) Adherencia fuerte: tres tubos positivos; (++) Adherencia media, dos tubos positivos; (+-) Adherencia débil, un tubo positivo; (---): Ausencia de adherencia; Prt: proteasa; Ami: amilasa; Cel: celulolasa; Lip: Lipasa; Gel: gelatinasa; Hem: actividad hemolítica.

Para la formación del consorcio, alícuotas de 2 mL de cada estirpe ajustada a una concentración de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL utilizando la escala de McFarland 0,5 fueron adicionadas

para cada 1000 mL de agua de cultivo, para la formación y agregación de los flocos bacterianos. Las fuentes de carbono (melaza de caña) y nitrógeno (comida para camarón con tenor de proteína bruta de 35%) fueron adicionadas en una relación 20:1 (C: N), para el control de los compuestos nitrogenados. Esta relación fue calculada basándose en la cantidad necesaria para la formación inicial de los bioflocos, siguiendo la metodología sugerida por Avnimelech (1999), llevando en consideración el porcentaje de proteína de la comida y de las tasas de alimentación empleadas. Fue asumido que el tenor de carbono de la melaza líquida fue de 30% (LIMA et al., 2018). Posteriormente fue realizada la construcción del sistema con agua de vivero de camarón climatizado con agua dulce y aireación constante. En el acuario del tratamiento BFI fue adicionado el consorcio bacteriano.

Fue realizado el acompañamiento de los flocos por microscopia en el quinto y en el décimo octavo día para la observación de los agregados microbianos y su constitución a través del período experimental.

Al inicio y en el 18° día del experimento, fueron cuantificados (en el agua inicial y en los flocos formados) los siguientes grupos microbianos: Bacterias Heterotróficas Cultivables-BHC (Agar BHI); *Pseudomonas* sp. (Agar Cetremide); Enterobacteriaceae (Agar MacConkey); Proteolíticas (Agar Leite); Amilolíticas (Agar amido) y Celulolíticas (Agar CMC).

Muestras de 1L de bioflocos formados en ambos tratamientos fueron colocados en conos *Imhoff* separadamente, y después de la sedimentación de los sólidos suspendidos, fue tomada una alícuota de 1 mL y colocada en 9 mL de salina 0,85%, formando así la primera dilución (10^{-1}), y a partir de ahí fueron realizadas diluciones seriadas hasta 10^{-6} .

Cada dilución (1 mL) fue inoculada dos veces en placas de petri por la técnica de *Pour Plate* con incubación en estufa bacteriológica por 48h a 35°C.

Pasado ese periodo, las placas que presentaron valores de conteos entre 25 y 250 colonias fueron cuantificadas. Para el cálculo de los Conteos Padrón en Placas (CPP) fue utilizada la expresión: UFC (Unidades Formadoras de Colonias) x el inverso del factor de dilución x factor de corrección (10) (DOWNES; ITO, 2001).

Para la cuantificación de la concentración de nitrógeno amoniacal total (NAT) y nitrito fue empleado el método de indofenol y Griess-Ilosva, respectivamente, de acuerdo con Clesceri et al. (1998). La biomasa de los flocos (sólidos sedimentables) fue medida al final de los 18 días de experimentación utilizando el cono *Imhoff*, siguiendo las recomendaciones de Avnimelech (2009).

2.2 GRANJA DE CULTIVO

Los flocos microbianos formados en el laboratorio en el tratamiento BFI, fueron adicionados con un refuerzo de consorcio de las bacterias nitrificantes, antes de ser llevados a la granja. Para el refuerzo del quórum de bacterias nitrificantes fueron utilizadas alícuotas de 2 mL de cada estirpe ajustada a una concentración de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL para cada 1000 mL de flocos formado.

A partir de ese biofoco pre-formado en el laboratorio, una parte de ese flocos fue llevado a la granja para la producción del biofoco en una escala superior (Figura 1).

Figura 1- Fluxograma de formación de biofocos en la granja de cultivo y los análisis realizadas.



Al llegar a la granja, 5L de consorcio bacteriano producido en el laboratorio fueron adicionados en cajas de 1000 L conteniendo agua de vivero. La maduración del biofoco fue realizada en tanques circulares con capacidad de 1000 L, dotados de aireación constante. En ese sistema de maduración fueron adicionados 12 tilapias con peso medio de 61,75g (biomasa total igual a 741 g). la relación C/N fue de 20:1 para el control de los compuestos nitrogenados. Esta relación fue calculada siguiendo la metodología sugerida por Avnimelech (1999).

Fue realizado el acompañamiento diario de los sólidos sedimentables, utilizando el cono *Imhoff* (AVNIMELECH, 2009), análisis del nitrógeno amoniacal total (NAT) y nitrito, siguiendo la misma metodología empleada en el laboratorio. La alcalinidad total, dureza total, concentración de calcio y magnesio y materia orgánica en el agua fueron determinadas semanalmente (APHA, 2000). La biometría de los peces fue realizada semanalmente para el ajuste de la comida y la melaza. Las variables de desempeño zootécnico analizadas fueron: Sobrevivencia (%): [(número final de peces/número inicial de peces) x 100]; ganancia en peso diario – GPD (g): (peso final – peso inicial) días de cultivo); tasa de crecimiento específico – TCE (%): [(ln peso final (g) – ln peso inicial (g))/período experimental) x 100] (MORO et al., 2020); Productividad ($\text{g m}^{-3} \text{dia}^{-1}$): [ganancia de biomasa (g)/volumen del tanque (m^3)/período experimental].

Después de 2 horas de la adición de los flocos (pre-formados en el laboratorio) fue colectada una muestra de agua del tanque de maduración para su posterior análisis en el Laboratorio de Microbiología Ambiental y del Pescado (LAMAP-UFC). Fueron realizadas diluciones seriadas de la muestra de agua de 10^{-1} a 10^{-5} y alícuotas de 1 mL de cada dilución fueron inoculadas en medio de cultivo Plate Count Agar, Kasvi (PCA, sigla en inglés) para su posterior análisis.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 LABORATORIO

Pudo ser verificado un aumento en la cuantificación de los grupos bacterianos analizados al final de los 18 días de formado el biofoco con relación al inicio (Tabla 2).

Tabla 2- Cuantificación de los grupos microbianos en el agua y en el biofoco formado en el tratamiento (BFI) y en el control (BFE) en el laboratorio

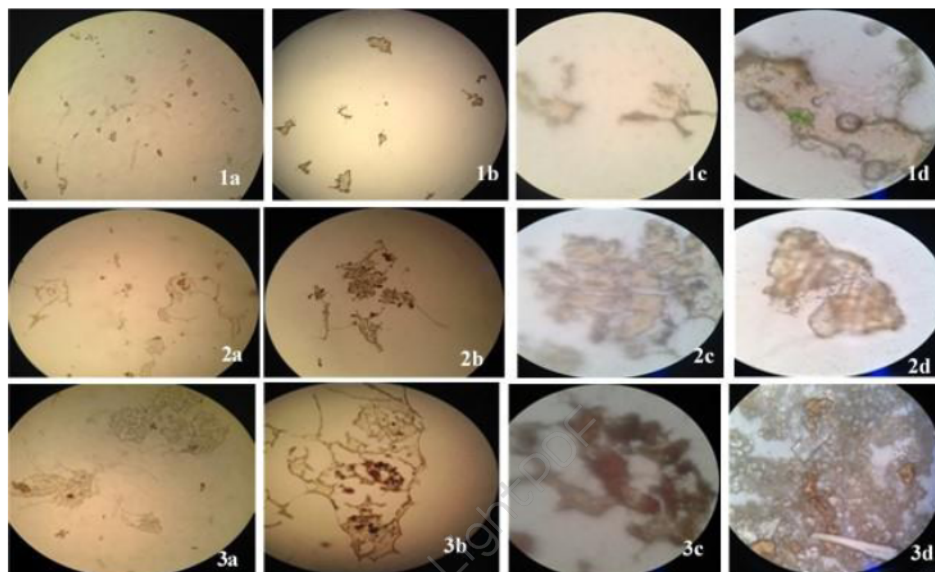
Grupos microbianos	Inicial	BFI	BFE
BHC	510	$143,0 \times 10^5$	260×10^5
<i>Pseudomonas</i> sp.	10 est.	$106,5 \times 10^1$	$159,5 \times 10^1$
Enterobacterias	330	$704,0 \times 10^4$	169×10^4
Proteolíticas	1300	$127,0 \times 10^3$	$191,5 \times 10^5$
Amilolíticos	850	$54,0 \times 10^4$	$44,5 \times 10^5$
Celulolíticos	1445	$198,5 \times 10^3$	$205,5 \times 10^6$

BHC: Bacterias Heterotróficas Cultivables; Est: Estimado (no fue posible contar en el intervalo de 25 a 250 Unidades Formadoras de colonias (UFC/mL).

La cuantificación de los grupos microbianos en los flocos formados en el laboratorio fue menor en el BFI comparado con los grupos en BFE, con la excepción de la cuantificación del grupo de las enterobacterias. Cambios en la composición y funcionalidad de la comunidad microbiana pueden ocurrir en ambientes acuáticos naturales o en sistemas acuícolas, pudiendo ocasionar activación o inactivación de ciertas vías metabólicas (BENTZON-TILIA, 2017). De esta forma, en el sistema BFI puede haber ocurrido una competición entre los grupos bacterianos exógenos adicionados y los autóctonos, generando una supresión en los grupos bacterianos cuantificados, indicando una posible estabilidad del ambiente.

Durante el experimento, pudo ser observado un aumento de la cantidad de agregados microbianos en los bioflocos pre-formados en ambos tratamientos (Figura 2) y en la última observación (a los 18 días después del inicio del experimento), fue observado un mayor número de agregados microbianos en el tratamiento BFI donde fue adicionado el consorcio microbiano (subitem 3d Fig. 2).

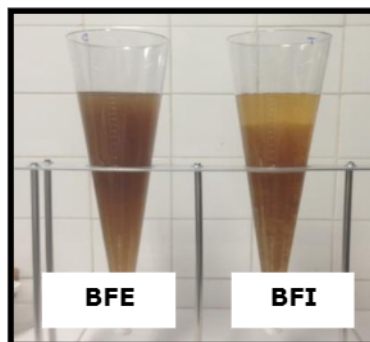
Figura 2- Monitoreo de los agregados microbianos formados en el biofoco del BFE (control) y del BFI (tratamiento), observados por microscopia electrónica, al inicio y con 18 días de experimentación



1a: flocos con 5 días de experimento (BFE y BFI), con aumento de 4x; **1b, 1c y 1d:** aumento de 10x, 40x e 100x, respectivamente; **2a:** flocos con 18 días de experimento (BFE), con aumento de 4x; **2b, 2c y 2d:** aumento de 10x, 40x y 100x, respectivamente; **3a:** flocos con 18 días de experimento (BFI), con aumento de 4x; **3b, 3c y 3d:** aumento de 10x, 40x y 100x, respectivamente.

La cantidad de sólidos sedimentables con 18 días de experimentación, fue medida en el cono del tratamiento (BFI) (600 mL/L), ya los sólidos formados en el control (BFE) no sedimentaron hasta después de los 30 minutos sin agitación (Figura 3).

Figura 3- Sólidos sedimentables, control (BFE) y tratamiento (BFI)

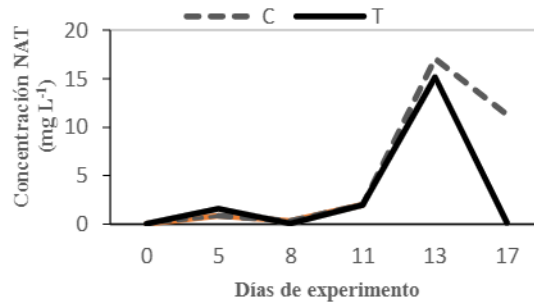


La presencia de los agregados resultó mayor y más compleja con el tiempo de cultivo, lo que podría ser explicado con el aumento de la cantidad de material particulado en el agua proveniente de la comida así como, la introducción de bacterias con mayor capacidad de formación de agregados debido a la producción de exopolisacáridos (EPS). El EPS permite que las bacterias se agreguen posibilitando el aumento del tamaño de los flocos (LARA et al., 2017), además de colonizar las superficies y ofrecer una camada protectora. Los niveles de producción de EPS dependen de las condiciones ambientales y de las bacterias presentes (TANSEL, 2018). De esta forma, se percibe la influencia que ejerce el quórum de bacterias adicionales para iniciar los flocos sobre la estructura y mantenimiento de la red de bioflocos formados. Sousa et al. (2019) comprobaron que la estructura del floco afecta la distribución y la interacción de las bacterias nitrificantes interactuando directamente en los procesos de retirada de compuestos nitrogenados de los sistemas de cultivo.

De esta forma, cuanto más estructurado y formado esté el floco, mayor será la contribución del mismo a la mejoría de la calidad del agua además de contribuir en la nutrición de los organismos cultivados ya que la abundancia de otros grupos de microorganismos como flagelados, ciliados o micro crustáceos, tienden a aumentar porque la mayoría de ellos pastan las bacterias presentes en los flocos (BINDDANDA; POMEROY, 1988, LARA et al., 2017).

En el gráfico 1, puede ser observado el comportamiento de la concentración de nitrógeno amoniacal total (NAT) durante el período de formación del biofoco espontaneo (BFE-control) e inducido (BFI-tratamiento).

Gráfico 1- Concentración de nitrógeno amoniacal total en el agua del control y del tratamiento durante el período de experimentación



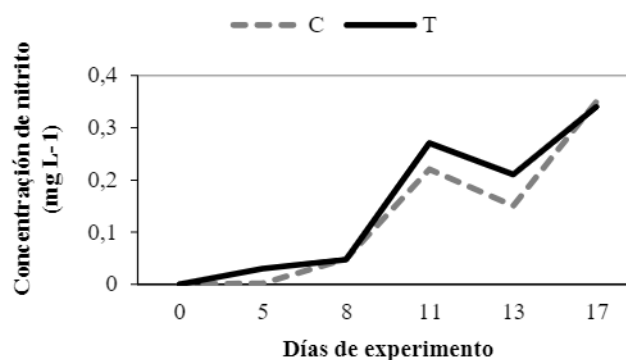
La concentración de NAT osciló durante los días del experimento presentando valores más elevados en el décimo tercer día, con valores de 17,05 y 15,15 mg/L, para el control (BFE) y el tratamiento (BFI) respectivamente. En el agua del tratamiento, en el décimo séptimo día pudo ser observado una disminución acentuada de la concentración de NAT (0,11 mg/L), diferente del que ocurrió en el control BFE (12 mg/L).

Las concentraciones de los compuestos nitrogenados del agua en ambos tratamientos solo fueron analizadas hasta el 17° día en el laboratorio. Mediante el análisis de estos datos en el laboratorio se puede inferir que se hace necesario mayor tiempo de maduración para que el sistema BFT, el bioflocos total (BFT) sea capaz de retirar los compuestos nitrogenados del agua. Por otra parte, es importante destacar que la capacidad de soporte del sistema montado en el laboratorio fue pequeña lo que probablemente no dejó visualizar la remoción eficiente de los compuestos nitrogenados.

A pesar del corto periodo de experimento *in vitro*, fue posible visualizar que el tratamiento (BFI) en el que fue utilizado el consorcio de bacterias nitrificantes como formadoras del flocos presentó los niveles de amonio con disminuciones acentuadas, llegando a presentar valor cero en el último dato analizado (Gráfico 1).

Con relación a la concentración de nitrito fue observada una disminución después del período del experimento, llegando a alcanzar un valor de 0,34 mg/L en el agua al décimo séptimo día en el BFI (Gráfico 2).

Gráfico 2- Concentración de nitrito en el agua (control y tratamiento) durante el período del experimento



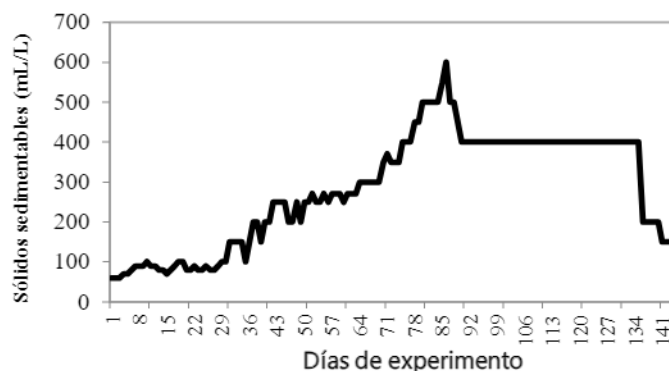
El paso de amonio para nitrito fue rápido evidenciado por las elevadas concentraciones de nitrito en el tratamiento (Gráfico 2), además puede ser observado que el valor de nitrito fue ligeramente inferior y en declive en comparación con el control (BFE). Otro punto a destacar fue la rápida y eficiente formación de los flocos observados bajo microscopia y a través del volumen de sólidos sedimentables en el cono *Imhoff*.

3.2 GRANJA DE CULTIVO

Los flocos adicionados al sistema de maduración presentaron una cuantificación de bacterias heterotróficas cultivables (BHC, sigla en inglés) igual a 163×10^5 UFC/mL, después de 2 horas de inoculación de las bacterias en el sistema. Estudios previos informan que la producción de bioflocos ocurre cuando la concentración microbiana alcanza valores de 10^7 UFC/mL (BURFORD et al., 2003, DANIEL; NAGESWARI, 2017). El uso de inóculo de bioflocos de cultivos anteriores posibilitaron mayores retiradas de compuestos nitrogenados en el sistema de producción de camarón *Litopenaeus vannamei*, según Santos et al. (2019). Los autores atribuyeron ese resultado con la presencia de bacterias nitrificantes y heterotróficas que se establecieron y permanecieron activas en el nuevo sistema en que fue realizada la adición del inóculo del biofoco. De esta forma, la adición de bioflocos pre-formados auxilia en el mantenimiento de niveles aceptables de los compuestos nitrogenados tóxicos. En el presente trabajo, los bioflocos fueron pre-formados en el laboratorio con la adición del consorcio de bacterias nitrificantes lo que posibilitó un rápido crecimiento y el establecimiento de una comunidad microbiana estable, teniendo en cuenta la elevada cuantificación de bacterias heterotróficas en el sistema después de la adición del consorcio y la rápida formación de los sólidos sedimentables.

El comportamiento (semanal) de los sólidos sedimentables a lo largo del experimento queda expresado en el gráfico 3.

Gráfico 3- Comportamiento semanal de los sólidos sedimentables en el tanque de maduración del biofoco en la granja



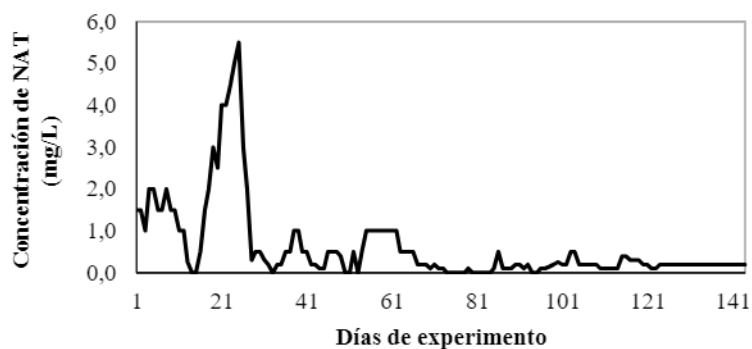
Después de una semana de inicio de la maduración del biofoco, 60 mL de flocos fue verificado en el cono *Imhoff*, alcanzó 600 mL/L con 85 días y posteriormente presentó un declive y estabilizó entorno a los 400 mL/L. Con 133 días de cultivo, los sólidos declinaron y quedaron entorno a los 150 mL/L hasta el período final del cultivo. Este resultado demuestra la eficiente formación de los flocos en el sistema de cultivo cuando fue adicionado el consorcio de bacterias nitrificantes probadas en el laboratorio.

Fue observado un aumento gradual de las concentraciones de los sólidos totales re suspendidos en el sistema de cultivo después de la adición del biofoco pre formado. Concentraciones totales de sólidos suspendidos de 100-300 mg/L (equivalente aproximadamente a 15 mL/L de sólidos sedimentables) durante la formación de biofocos son importantes para mantener la calidad del agua, especialmente cuando el proceso de nitrificación no está bien establecido, según lo sugerido por Gaona et al. (2018) para cultivos de camarones. Al final del experimento fue realizada una nueva clarificación, y los sólidos sedimentables quedaron con volúmenes de 150 mL/L, valor ese considerado mayor que el ideal para el cultivo de camarones, según Avnimelech (2009) los valores deben encontrarse entre 2 y 40 mL L⁻¹.

Después de 90 días de maduración del flocos en los sistemas de cultivo, fue realizada la clarificación del agua por el método propuesto por Gaona et al. (2018), a fin de disminuir la concentración de los sólidos sedimentables que estaban en torno a 600 mL/L. Después del proceso de retirada, el volumen de los sólidos quedó entorno a 400 mL/L.

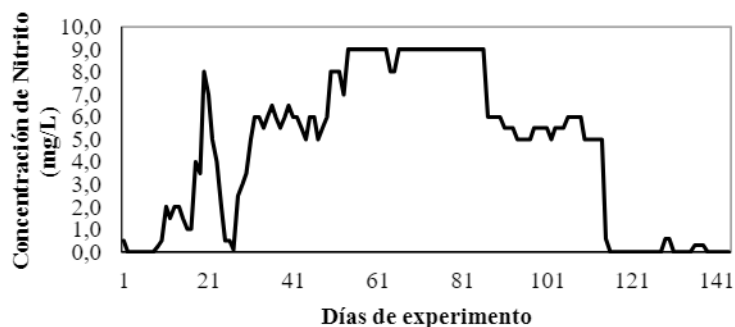
Las concentraciones de nitrógeno amoniacal total (NAT) durante el periodo experimental son representadas en el gráfico 4. Los mayores valores de NAT fueron observados en el vigésimo quinto día de maduración, alcanzando 5,5 mg/L. Después de ese valor pico fue posible detectar la disminución de la concentración de ese compuesto en el agua, con una tendencia a la estabilización quedando entorno a 1,0 mg/L y reduciendo a valores cercanos a cero en los últimos días del experimento.

Gráfico 4- Concentración de nitrógeno amoniacal total (NAT) durante el periodo de maduración del biofoco



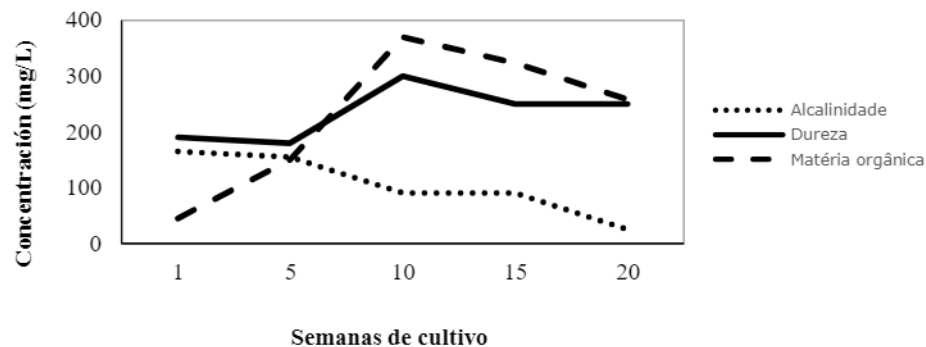
En el gráfico 5 pueden ser observadas las concentraciones de nitrito durante el periodo de maduración del biofoco. El primer valor pico de nitrito ocurrió en el día 21, con valor aproximado de 8,0 mg/L, valor alcanzado en el mismo periodo en que ocurrió el máximo valor de NAT, de esta forma indicando la acción de las bacterias nitrificantes, grupo de las oxidadoras de amonio, convirtiendo amonio en nitrito. Posteriormente, fueron registrados declives y elevaciones de las concentraciones de nitrito, las cuales permanecieron con valores por encima de 5,5 mg/L por un largo periodo de tiempo. En el día 116, fue posible detectar valores cero o próximos a cero indicando la total maduración del sistema.

Gráfico 5- Concentración de nitrito en el tanque de maduración del biofoco en la granja de cultivo.



La alcalinidad total analizada semanalmente presentó un declive con el pasar de los días de maduración del biofloc, como puede ser observado en el gráfico 6. Inicialmente presentó valor de 170 mg de CaCO_3/L y con el pasar de las semanas del experimento, las reservas alcalinas disminuyen, alcanzando valores de 20 a 25 mg de CaCO_3/L .

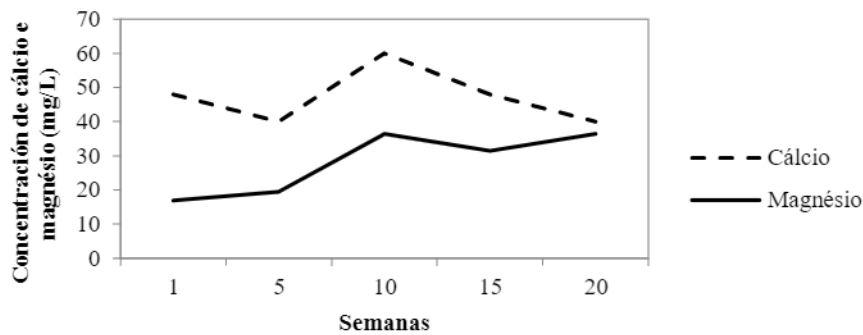
Gráfico 6- Concentración de la alcalinidad total, dureza total y materia orgánica en el tanque de formación del biofloc en la granja de cultivo.



Durante los días de cultivo fue observada una reducción de la alcalinidad lo que probablemente pueda ser explicada debido a un aumento de la materia orgánica, como puede ser observado en el gráfico 6, la que al ser descompuesta libera entre otros compuestos, gas carbónico para el agua que en conjunto con la respiración de los microorganismos hacen con que haya una reducción en las reservas alcalinas del sistema (GAONA et al., 2017). Son recomendados valores de alcalinidad mayores de 30 mg de CaCO_3/L para el cultivo de animales acuáticos. En sistemas BFT lo ideal es mantener valores por encima de 100 mg/L, una vez que valores más elevados de alcalinidad ayudan en la asimilación del nitrógeno por bacterias heterotróficas y la nitrificación por las bacterias quimio autotróficas (EMERENCIANO et al., 2017).

En el gráfico 7 se presentan las concentraciones de calcio y magnesio durante el periodo de maduración de los flocos.

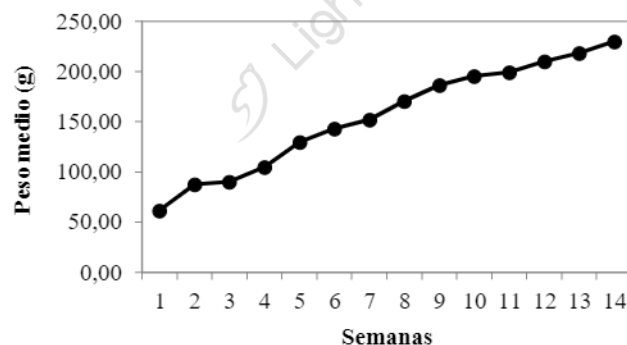
Gráfico 7- Concentración de calcio y magnesio en el tanque de formación de los bioflocos.



Los minerales calcio y magnesio son esenciales para el perfecto desarrollo de los animales cultivados. Hubo oscilaciones de esos iones en el agua de cultivo, sin embargo, no perjudicó el desarrollo de los peces, una vez que los valores permanecieron dentro de la faja recomendada para el agua de cultivo en ambientes de baja salinidad que es de 5-100 mg/L (SÁ, 2012).

Las tilapias tuvieron un aumento de peso durante el período del experimento, iniciando con 61,75 g y llegando a 230 g, durante 92 días (gráfico 8).

Gráfico 8- Peso medio de las tilapias durante los 92 días de cultivo con adición del consorcio microbiano.



En la tabla 3 se expresan los valores del desempeño zootécnico de las tilapias durante el periodo de 92 días que pasaron en el sistema de cultivo con bioflocos domesticados.

Tabla 3- Desempeño del crecimiento de las tilapias en el sistema de maduración de los bioflocos domesticados durante 92 días de experimento.

VARIABLES	BFT TILAPIA
Sobrevivencia (%)	91.7
Peso medio inicial (g)	61.75

Peso medio final (g)	230.0
GPD (g/día⁻¹)	1.83
Biomasa final (g)	2.530,0
Ganancia en Biomasa (g)	1.789,0
TCE (% día⁻¹)	1.43
Productividad (g m⁻³día⁻¹)	27.5

GPD: Ganancia en peso medio diario (g/día);

TCE: Tasa de crecimiento específico (% día⁻¹).

El aumento en peso de las tilapias concuerda con los valores reportados por Silva et al. (2017) los que constataron un aumento de peso en tilapias cultivadas en sistemas BFT con el empleo de dos relaciones C: N (10:1 y 20:1) y tres fuentes de carbono (melaza de caña, azúcar y salvado de arroz). La sobrevivencia fue mayor de 90%, tasa semejante a la encontrada en otros trabajos con aplicación del sistema BFT en cultivos de tilapia (LIMA et al., 2018).

La ganancia en peso medio diario de las tilapias fue de 1,83 g, resultado del consumo de comida ofertada asociada a la ingestión de los flocos microbianos formados en el sistema. Lima et al. (2018) al realizar el cultivo de tilapia del Nilo (72,6 g) por 145 días en el sistema BFT manteniendo una relación C:N de 6:1 con adición de melaza líquida obtuvieron resultados de crecimiento semejantes a los encontrados en nuestro trabajo (1,84 ± 0,12 g). Por otra parte, Pérez-Fuentes et al. (2016), obtuvieron el valor de 0,95g, valor ese 2,63 veces menor que el obtenido por nosotros mediante la aplicación de los bioflocos domesticados, de esta forma, validando el procedimiento desarrollado por medio del uso de bacterias iniciadoras de los flocos en el laboratorio en comparación con los bioflocos espontáneos aplicados por los otros autores.

4 CONCLUSIONES

Fue verificada la eficiencia del proceso de formación de bioflocos inducidos con la utilización de un consorcio de bacterias nitrificantes autóctonas en el laboratorio y su aplicación en el cultivo de Tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*).

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico-FUNCAP por el apoyo financiero em el otorgamiento de bolsas de Innovación Tecnológicas para el desarrollo de este trabajo y en especial al Prof. Dr. Raúl Cruz Izquierdo, Cientista Chefe do Programa de Políticas Públicas em Pesca e Aquicultura- FUNCAP.

Al Laboratorio de Microbiología Ambiental y del Pescado (LAMAP) de la Universidade Federal do Ceará (UFC).

REFERENCIAS

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

AVNIMELECH, Y.; MOKADY, S.; SCHROEDER, G.L. Circulated ponds as efficient bioreactors for single-cell protein production. *Israeli Journal Aquaculture Bamidgeh*, v. 41, n. 2, p. 58–66, 1989.

AVNIMELECH, Y. *Biofloc Technology: A Practical Guide Book*. 2nd: 50-67., World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA, 2009.

AHMAD, I.; RANI, A. M.B.; VERMA, A. K.; MAQSOOD, M. Biofloc technology: an emerging avenue in aquatic animal healthcare and nutrition. *Aquaculture International*, v. 25, p. 1215–1226, 2017.

APHA. American Public Health Association. 2000. *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water*. 19th ed. Washington, DC. American Public Health Association, 1-10 p.

BENTZON-TILIA, M.; SONNENSCHNEIN, E. C.; GRAM, L. Monitoring and managing microbes in aquaculture – Towards a sustainable industry. *Biotechnology*, v. 9, p. 576–584, 2016.

BURFORD, M. A.; THOMPSON, P. J.; MCINTOSH, R. P.; BAUMAN, R. H.; PEARSO, D. C. Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize. *Aquaculture*, v.219, n. 1, p. 393-411, 2003.

BIDDANDA, B.A.; POMEROY, L.R. Microbial aggregation and degradation of phytoplankton-derived detritus in seawater. I. Microbial succession. *Marine Ecology – Progress Series*, v. 42, p. 79-88, 1988.

CRAB, R.; AVNIMELECH, Y.; DEFOIRDT, T.; BOSSIER, P.; VERSTRAETE, W. Nitrogen removal in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture*, v. 270. n. 1–4, p. 1-14, 2007.

CRAB, R.; DEFOIRDT, T.; BOSSIER, P.; VERSTRAETE, W. Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges. *Aquaculture*, 356-357: 351-356, 2012.

CHRISTENSEN, G. D.; SIMPSON, W. A.; YOUNGER, J. J.; BADDOUR, L. M.; BARRETT, F.F.; MELTON, D. M. Adherence of coagulase- negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 22, p. 996-1006, 1985.

CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A. E.; EATON, A. D. Standard methods for the examination of water and wastewater (20thed.). Washington, DC: American Public Health Association, 1998.

CORREIA, E. S.; WILKENFELD, J. S.; MORRIS, T. C.; PRANGNELL, E. L.; & D.I. SAMOCHA, T.M. Intensive nursery production of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* using two commercial feeds with high and low protein content in a biofloc-dominated system. *Aquacultural Engineering*, v. 59, p. 48-54, 2014.

DANIEL, N.; NAGESWARI, P. Exogenous Probiotics on Biofloc Based Aquaculture: A Review. *Current Agriculture Research Journal*, v. 5, n. 1, p. 88-107, 2017.

DOWNES, M. P.; ITO, K. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. APHA. 4th ed. Washington, DC, 2001.

EMERENCIANO, M.; GAXIOLA, G.; CUZON, G. Biofloc Technology (BFT): A Review for Aquaculture Application and Animal Food Industry. In: Biomass Now: Cultivation and Utilization, Matovic, M.D. (Ed.). Chapter 12, InTech, Rijeka, Croatia, pp: 302-328, 2013.

EMERENCIANO, M. G. C.; MARTÍNEZ-CÓRDOVA, L. R.; MARTÍNEZ-PORCHAS, M.; MIRANDA-BAEZA, A. Biofloc Technology (BFT): A Tool for Water Quality Management in Aquaculture. In: H. Tutu (Ed.). Water Quality. InTech, doi: 10.5772/66416, 2017.

FREEMAN, D. J.; FALKINER, F. R.; KEANE, C. T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*, v. 42, p. 872-874, 1989.

FURNISS, A. L.; LEE, J. V.; DONOVAN, T. J. The *Vibrio*. Monograph Series, London: Public Health Laboratory Service, p. 58, 1979.

GAONA, C. A. P.; POERSCH, L. H.; KRUMMENAUER, D.; FOES, G. K.; WASIELESKY JUNIOR, W. 2011. The effect of solids removal on water quality, growth and survival of *Litopenaeus vannamei* in a biofloc technology culture system. *International Journal of Recirculating Aquaculture*, 12:54-73.

GAONA, C. A. P.; ALMEIDA, M. S.; VIAU, V.; POERSCH, L. H.; WASIELESKY JUNIOR, W. Effect of different total suspended solids levels on a *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) BFT culture system during biofloc formation. *Aquaculture Research*, v. 48, p. 1070–1079, 2017.

KASAN, N.A.; GHAZALI, N. A.; IKHWANUDDIN, M. H. D.; IBRAHIM, Z. Isolation of Potential Bacteria as Inoculum for Biofloc Formation in Pacific Whiteleg Shrimp, *Litopenaeus vannamei* Culture Ponds. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, v. 20, n. 6, p. 306-313, 2017.

LARA, G.; KRUMMENAUER, D.; ABREU, P. C.; POERSCH, L. H.; WASIELESKY JR, W. The use of different aerators on *Litopenaeus vannamei* biofloc culture system: effects on

water quality, shrimp growth and biofloc composition. *Aquaculture International*, v. 25, p. 147–162, 2017.

LIMA, E. C.R.; SOUZA, R. L.; GIRAO, P. J. M.; BRAGA, I. F. M.; CORREIA, E. S. Culture of Nile tilapia in a biofloc system with different sources of Carbono. *Revista Ciência Agronômica*, v. 4, n. 3, p. 458-466, 2018.

LIU, P. C.; LEE, K. K.; CHEN, S. N. Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn, *Penaeus monodon*. Letter in *Applied Microbiology*, v. 22, p. 413-416, 1996.

MARTÍNEZ-PORCHAS, M.; EZQUERRA-BRAUER, M.; MENDOZA-CANO, F.; CHAN-HIGUERA, J. E.; VARGAS-ALBORES, F.; MARTÍNEZ-CORDOVA, L. R. Effect of supplementing heterotrophic and photoautotrophic biofloc, on the production response, physiological condition and post-harvest quality of the whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Reports*, v. 16, 2020.

MARTINEZ-CORDOVA, L. R.; MARTINEZ-PORCHAS, M.; EMERENCIANO, M.; MIRANDA-BAEZA, A.; GOLLAS, T. From microbes to fish the next revolution in food production. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 37, p. 287-295, 2016.

MORO, E. B.; PESSINI, J. E.; YAMASHIRO, D.; NEU, D. H.; BITTENCOURT, F.; BOSCOLO, W. R.; SIGNOR, A. Fenilalanina em dietas para juvenis de tilápia do Nilo. *Brazilian Journal of Development*, v. 6, n.5, p. 29340-29353, 2020.

PÉREZ-FUENTES, J. A.; HERNÁNDEZ-VERGARA, M. P.; PÉREZ-ROSTRO, C. I.; FOGEL. I. C: N ratios affect nitrogen removal and production of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* raised in a biofloc system under high density cultivation. *Aquaculture*, v. 425, p. 247–251, 2016.

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

RODRIGUES D. P.; RIBEIRO, R. V.; ALVES, R. M.; HOFER, E. Evaluation of virulence factors in environmental isolates of *Vibrio* species. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 88, n. 4, p. 589-592, 1993.

SÁ, M. V. C. 2012. Limnocultura: Limnologia para aquicultura. Fortaleza: Edições UFC. 218 pp.

SANTOS, N. B. V.; FURTADO, P. S.; CÉSAR, D. E.; WASIELESKY JÚNIOR, W. Assessment of the nitrification process in a culture of pacific White shrimp, using artificial substrate and bacterial inoculum in a biofloc technology system (BFT). Ciência Rural, v. 49, n. 6, p.1-10, 2019.

SILVA, L.; ESCALANTE, E.; VALDÉS-LOZANO, D.; HERNÁNDEZ, M.; GASCALEYVA, E. Evaluation of a Semi-Intensive Aquaponics System, with and without Bacterial Biofilter in a Tropical Location. Sustainability, v. 9, p. 592-604, 2017.

SILVA, L.; FALCON, D.R. PESSÔA, M.N.C.; CORREIA, E.S. Carbon sources and C:N ratios on water quality for Nile tilapia farming in biofloc system. Revista Caatinga, Mossoró, v. 30, n. 4, p. 1017-1027, 2017.

SOUZA, J.; ALESSANDRO, C.; WASIELESKY JR , W.; PAULO, A. C. Does the biofloc size matter to the nitrification process in Biofloc Technology (BFT) systems? Aquaculture, v. 500, p. 443–450, 2019.

TANSEL, B. Morphology, composition and aggregation mechanisms of soft bioflocs in marine snow and activated sludge: A comparative review. Journal of Environmental Management, v. 205, p. 231-243, 2018.

TEATHER, R. M.; WOOD, P. J. Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rument. Applied and Environmental Microbiology, v. 43, n. 40, p.777-780, 1982.