



**ESCUELA SUPERIOR  
POLITECNICA DEL LITORAL**



**FACULTAD DE INGENIERIA MARITIMA  
Y CIENCIAS DEL MAR**

**USO DE FILTROS BIOLÓGICOS EN LA LARVICULTURA  
DEL CAMARON *Penaeus vannamei*.**

**TESIS DE GRADO**

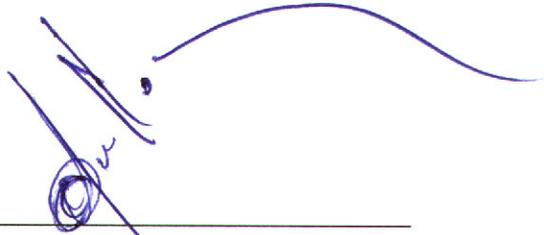
Previa a la obtención del título de:  
**ACUICULTOR**

Presentada por

**Lilia Raquel Prieto Acosta**

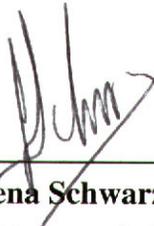
**GUAYAQUIL - ECUADOR**

**2001**



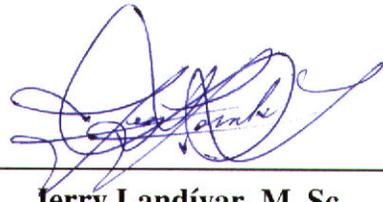
---

**Ing. Ecuador Marcillo**  
**Presidente del Tribunal**



---

**Lorena Schwarz, M. Sc.**  
**Director de Tesis**



---

**Jerry Landívar, M. Sc.**  
**Miembro Principal**

## **DEDICATORIA**

A DIOS, y a mis padres Azucena y Justo por su esfuerzo y dedicación.

## DECLARATORIA EXPRESA



" La responsabilidad por los hechos, ideas y doctrinas expuestos en esta tesis, me corresponden exclusivamente; y, el patrimonio intelectual de la misma, a la ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL".

( Reglamento de Exámenes y Títulos profesionales de la ESPOL ).

---

Lilia Prieto Acosta

## AGRADECIMIENTOS

- A PAPA DIOS pues sin él no estaría aquí y menos cumpliendo con esta meta, pues todo el tiempo que ha pasado no ha sido en vano, tiempo que me he preparado espiritualmente fortaleciéndome y enseñándome que solo perseverando en él, con su amor, paz, paciencia, misericordia, humildad y sobre todo con su palabra, lograré éxitos, espiritualmente y humanamente, gracias PADRE MIO.
- A mis queridos padres y hermana por estar siempre conmigo apoyándome en los buenos y en los malos momentos, por tenerme mucha paciencia y soportarme todos estos años, gracias por su apoyo incondicional.
- Al CENAIM y al Dr. Jorge Calderón por darme la oportunidad de realizar mi tesis de grado.
- Al MSC Lorena Shuarwthz quien decidió arriesgar en esta aventura, gracias por el tiempo valioso que dedicó a esta tesis y por su paciencia.
- Finalmente a todos los que me ayudaron y aportaron en el trabajo de mi tesis y por supuesto brindándome su amistad incondicional en todos los momentos de mi vida, principalmente a los que me dieron las facilidades necesarias en cuanto a equipos y materiales para llevar a cabo este trabajo, especialmente a la familia Calderón gracias de todo corazón.

**TABLA DE CONTENIDO**

Tabla de contenido	I
Indice de figuras	IV
Indice de tablas	V
Indice de gráficos	VI
Indice de fotos	VII
Resumen	VIII
Introducción	1
1. Antecedentes	4
1.1. Filtración	4
1.2. Diferentes sistemas de filtración	4
1.2.1. Filtros mecánicos	4
1.2.2. Filtros químicos	6
1.3. Filtro biológico	7
1.3.1. Configuración de un filtro	7
1.3.2. Ciclo del nitrógeno	8
1.3.2.1. Nitrificación	10
1.3.2.2. Desnitrificación	12
1.3.2.3. Factores que afectan la nitrificación	12
1.3.3. Tipos de biofiltro	15
1.4. Toxicidad del amoníaco, nitrito y nitrato	19
1.4.1. Toxicidad del amoníaco	20
1.4.1.1. En peces	20
1.4.1.2. En camarones	22
1.4.1.3. Factores que afectan la toxicidad del amoníaco	23
1.4.2. Toxicidad del nitrito	24
1.4.2.1. En peces	24
1.4.2.2. En camarones	25
1.4.2.3. Factores que afectan la toxicidad del nitrito	26

1.4.3. Toxicidad del nitrato	26
1.4.3.1. En peces	27
1.4.3.2. En camarones	28
<b>2. MATERIALES Y METODOS</b>	<b>29</b>
2.1 Sistema de circulación	29
2.2. El biofiltro	32
2.2.1. Aclimatación	32
2.2.2. Activación bacteriana nitrificante	32
2.2.3. Funcionamiento de un biofiltro	33
2.2.3.1. Biofiltro con piedras pequeñas ( BF-P )	33
2.2.3.2. Biofiltro con piedras grandes ( BF-G )	33
2.2.3.3. Diferencias entre biofiltros de piedras grandes y pequeñas	34
2.3. Sistema de cultivo	35
2.3.1. Tanques y manejo del cultivo	35
2.3.2. Siembra	36
2.4. Parámetros físicos-químicos	37
2.5. Análisis microbiológico	39
2.6. Alimentación	39
2.7. Parámetros de evaluación	40
2.8. Sala de bioensayo	41
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIONES</b>	<b>42</b>
3.1. Parámetros físicos-químicos	42
3.1.1. pH	43
3.1.2. Oxígeno disuelto	43
3.1.3. Temperatura	43
3.1.4. Salinidad	45

3.1.5. Amoníaco total	45
3.1.6. Nitrito	49
3.1.7. Nitrato	52
3.2. Parámetros biológicos	53
3.2.1. Peso seco	53
3.2.2. Supervivencia	55
3.2.3. Índice de estadio larvario	57
3.2.4. Análisis microbiológico	57
Conclusiones	60
Recomendaciones	61
Referencias bibliográficas	62

**INDICE DE FIGURAS**

Figura 1.	Areas con una base de sedimentación rectangular.	5
Figura 2.	Operación de un hydroclone.	6
Figura 3.	"Downflow" Filtro biológico simple.	8
Figura 4.	Esquema del Ciclo de Nitrógeno y de las conversiones asociadas que ocurren en un filtro.	9
Figura 5.	Esquema de la evolución temporal de eliminación del ión amonio en un filtro biológico comenzando a funcionar.	11
Figura 6.	Filtro nitrificante sumergido, "downflow".	16
Figura 7.	Diagrama esquemático del Biotambor.	17
Figura 8.	Diagrama esquemático del Biodisco.	18
Figura 9.	Filtro Nitrificante "Fluidized Bed".	19
Figura 10.	Sistema de recirculación: (1) Biofiltro (2) Air lift (a) cubierta, (b) tubo reservorio, (c) Tubo de PVC y (d) Línea de aire; (3) Filtro Biológico con piedras pequeñas (BF-P); (4) Filtro Biológico con piedras grandes (BF-G) y (5) Tanque de cultivo.	31
Figura 11.	(1) Sistema de sifón y (2) Manguera para sifonear.	36

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Valores representativos de toxicidad aguda para NH <sub>3</sub> en peces (datos de Russo Thurston, 1991).	21
Tabla 2.	Niveles aceptables (durante un periodo largo de exposición sin afectar el crecimiento y la eficiencia de conversión).	22
Tabla 3.	Valores representativos de toxicidad aguda para nitrito en peces (datos de Russo y Thurston, 1991).	25
Tabla 4.	Valores representativos de toxicidad de nitrato para diferentes especies de peces (datos Russo y Thurston, 1991).	28
Tabla 5.	Alimentación de larvas desde Z3 hasta PL10	40
Tabla 6.	Parámetros físicos determinados para los tres tratamientos.	42
Tabla 7.	Concentración de amonio (mg/l) en los diferentes estadios para el experimento 1 y el experimento 2).	47
Tabla 8.	Concentraciones de nitrito (mg/l) en los diferentes estadios para el experimento 1 y el experimento 2.	50
Tabla 9.	Concentraciones de nitrato (mg/l) en los estadios PL5 y PL10 para el experimento 1 y el experimento 2.	52
Tabla 10.	Peso secto (mg), de larvas en PL10.	53
Tabla 11.	Supervivencia (%) de larvas en PL10.	55
Tabla 12.	Promedio de la cantidad de Bacterias totales en el experimento 1 y el experimento 2.	58

**INDICE DE GRAFICOS**

Gráfico 1.	Fluctuaciones diarias de la temperatura durante el experimento 1 y 2 (A) en la mañana, (B) en la tarde	44
Gráfico 2.	Concentraciones de amonio (mg/l) en los diferentes estadios (A) experimento 1 y (B) experimento 2.	48
Gráfico 3.	Concentraciones de nitrito (mg/l) en los diferentes estadios (A) experimento 1 y (B) experimento 2.	51
Gráfico 4.	Peso Seco (mg.), de larvas en PL10 (A) en el experimento 1 y (B) en el experimento 2.	54
Gráfico 5.	Supervivencia en PL10 (promedio y desviación estandar) (%), (A) experimento 1 y (B) Experimento 2.	56
Gráfico 6.	Carga Bacteriana encontrada en los diferentes estadios durante el ciclo de cultivo (A) Experimento 1 y (B) Experimento 2.	59

**INDICE DE FOTOS**

Foto 1.	Biofiltro con Piedras pequeñas conchillas (BF-P).	29
Foto 2.	Biofiltro con Piedras Grandes (BF-G).	30
Foto 3.	Funcionamiento del Biofiltro.	34
Foto 4.	Siembra en un tanque de 1 Ton.	37

## RESUMEN

Se compararon dos tipos de sistemas de recirculación equipados con biofiltros con diferentes sustratos: (1) piedras grandes (BF-G) y (2) piedras chicas y conchilla (BF-P). El control consistió en el sistema de cultivo abierto convencional con renovación diaria de agua.

Se realizaron dos experimentos cultivando larvas de *P. vannamei* desde Z3 hasta PL10. La unidad experimental consistió en tanques de 50L equipados con biofiltros en el caso de los tratamientos de recirculación: BF-P, BF-G y sin éstos en el caso del control.

Los animales antes de ser colocados en los tanques experimentales fueron mantenidos en un tanque de 1T desde nauplio 5 hasta Z2 con algas a una concentración de 100.000 cél/ml, una vez que alcanzaron el estadio Z3 fueron transferidos a los 12 tanques experimentales. Cada tratamiento se realizó con cuatro réplicas.

El ciclo experimental fue de 16 días en el experimento 1 y 17 días en el experimento 2. Durante este tiempo todas las unidades de cultivo se mantuvieron con aireación y con temperatura constante.

Diariamente se registraron parámetros físicos como temperatura, oxígeno, pH, y salinidad. Para determinar el índice de estadio larvario se colectaron 20 larvas por tanque hasta el estadio PL1, las mismas que fueron observadas al microscopio e identificándolas el estadio.

La supervivencia fue estimada diariamente recolectando dos muestras en puntos distintos de cada tanque desde el estadio Z3 hasta el estadio PL1.

Se determinó el peso seco tomando 3 muestras de 15 larvas, las mismas que fueron lavadas con agua dulce para colocarse inmediatamente en una estufa, pesándolas después de 24 horas. Además, diariamente se sifoneó el fondo de todos los tanques.

La alimentación consistió en algas (*Chaetoceros* sp. ) y *Artemia*. La calidad del agua fue monitoreada mediante un programa de análisis químico (Amonio, Nitrito y Nitrato) en Z3, PL1, PL5 y PL10, al igual que el análisis microbiológico.

En ambos experimentos, los parámetros físicos se mantuvieron dentro del rango óptimo para el desarrollo de larvas de *P. vannamei* en los tres tratamientos durante todo el ciclo de cultivo. Mientras que en los parámetros químicos se obtuvieron niveles superiores a los máximos permisibles para el cultivo de larvas de esta especie en los tratamientos de biofiltros, así, en amonio: 0.21ppm y 0.115ppm y en nitrito 4.575 ppm y 2.696 ppm, en el experimento 1 y 2 respectivamente. Sin embargo la biomasa obtenida al final de los experimentos en cada uno de los tratamientos con biofiltros (BF-P:0.36mg y 0.465mg, BF-G: 0.41mg y 0.545mg para los exp. 1 y 2 respectivamente), no presentó diferencias significativas con los controles (0.36mg exp. 1 y 0.518mg exp. 2), por lo que se puede concluir que las concentraciones de amonio y nitrito alcanzadas no provocaron un efecto negativo en el crecimiento de los animales.

Los resultados de ambos experimentos nos permiten concluir que utilizando un sistema de recirculación con biofiltros ya sea con sustrato de piedras chicas o piedras grandes, se puede obtener la misma producción de larvas que con el sistema convencional de renovación diaria de agua.

## INTRODUCCION

La industria camaronera ecuatoriana fue afectada desde mayo de 1999 por el Virus de la Mancha Blanca, si bien es cierto que los problemas de enfermedades ya vienen cobrando importancia desde hace algunos años, el impacto que ha provocado este nuevo virus es incomparable.

Una vez que el WSSV se convirtió en epidemia, aproximadamente el 80% de las piscinas no se sembraron. Actualmente sólo el 50% del total de las 176.000 hectáreas camaroneras se han sembrado y bajo el esquema actual este porcentaje tiende a disminuir (datos proporcionados por la Cámara Nacional de Acuicultura).

Al tratarse de un virus, no existe un tratamiento que lo pueda erradicar de los sistemas de cultivo, siendo la única opción que le queda a los camaroneros el acostumbrarse a vivir con la enfermedad, manejando las piscinas bajo las mejores normas de bioseguridad que permitan ejecutar mayores controles en cada una de las etapas del ciclo productivo.

Una de las principales medidas de bioseguridad para el WSSV y cualquier otro tipo de virus es el comenzar el ciclo de cultivo con postlarvas libres del patógeno, convirtiéndose en un reto para los productores de larvas el criar animales negativos a enfermedades. Si consideramos que la entrada más fácil de un patógeno y la más difícil de controlar es a través del agua de cultivo, el trabajar con sistemas de circuito cerrado nos da una ventaja en el control de esta gran ventana de entrada.

Adicionalmente, el uso de sistemas cerrados con biofiltros elimina la limitación actual de instalar el laboratorio cerca de una fuente de agua de mar.

Desde el punto de vista ecológico, la cantidad de agua que es descargada en un sistema de cultivo abierto, puede traer como consecuencia un impacto ambiental negativo y si lo vemos desde el punto de vista biológico, el ingreso constante de agua nueva resulta en alteraciones de variables que se encuentran estables en el medio de cultivo, mientras que en sistemas cerrados el ingreso de agua nueva es mínimo haciendo posible mantener un ambiente constante y óptimo para el organismo de interés (Losordo y Timmons, 1994). Además un filtro biológico puede ser útil para controlar parcialmente el medio bacteriano (Person-Le Ruyet, 1989).

Al momento han sido desarrollados varios sistemas de recirculación para larvas de peces y camarón.

Se han reportado experimentos realizados con sistemas de recirculación que permitieron un control continuo para el desarrollo de una prueba en nutrición de postlarvas del camarón blanco *Penaeus stylirostris* (Tabash y Murillo, 1988). Boghen y Castell (1979) probaron dietas para juveniles de langosta (*Homarus americanus*) utilizando un sistema cerrado de recirculación, al igual que Wickins (1985) para la langosta europea (*Homarus gammarus*) y para un cultivo del camarón tropical *Penaeus* sp y Romdhane *et al.* 1979 cultivaron larvas de camarón de agua dulce *Macrobrachium resenbergi*, probando los efectos que se dan alimentándolos con *Artemia* enriquecida en un sistema de recirculación utilizado también por Léger *et. al.* (1989) en pruebas cortas con el camarón *Mysidopsis bahia*. Dhert *et al.* (1991) desarrollaron un sistema operacional para estudios de nutrición larval con varias especies de peces. En Francia se han obtenido resultados aceptables utilizando hasta un 90% de agua recirculada, para larvas de rodaballo (Person-Le Ruyet, 1989).

Menasveta *et al.* (1989) concluyeron que el uso de sistemas de recirculación de agua es apropiado tanto para las hembras grávidas como para la larvicultura de camarón peneidos. Según estos autores con la previsión de ciertas medidas de corrección, los sistemas cerrados pueden producir mejores resultados que los sistemas abiertos, pudiendo ser una alternativa para disminuir la presencia de enfermedades.

Generalmente un sistema cerrado consta de 3 tanques: tanque superior, tanque de cultivo y el sistema de filtración. El tanque superior se usa como reservorio de agua. El tanque de cultivo tiene una entrada y una salida a nivel constante. El filtro recibe el agua del tanque de cultivo, una vez filtrada el agua pasa a una parte del estanque del filtro desde donde se bombea al tanque superior (Morales, 1982).

Uno de los factores limitantes que influyen la operación eficiente, confiable y lucrativa de estos sistemas de recirculación es el sistema de filtración. Los filtros biológicos son la parte más importante en el sistema de filtración, estos usan gran cantidad de microorganismos que metabolizan los productos orgánicos de desecho de los animales, alimento, otros detritos orgánicos, desperdicios inorgánicos y amoníaco.

Cuando los biofiltros están operando de una manera eficaz, el efluente tiene baja concentraciones de amoníaco y nitrito, estos dos compuestos son sumamente tóxicos para los organismos acuáticos (Wheaton *et al.* 1991). Esto quiere decir que la función principal de un biofiltro es la conversión del amonio a nitrito (bacteria autotróficas del género *Nitrosomonas*) y nitrito a nitrato (*Bacteria* autotrófica del género, *Nitrobacter*) (Forster, 1974). El nitrito y nitrato son menos tóxicos que el amonio (Wheaton, 1977).

El propósito de los filtros biológicos es reproducir estos procesos en el sistema de cultivo con el fin de disminuir las cargas tóxicas del mismo.

En el presente trabajo se comparan dos tipos de biofiltro con diferentes sustratos: (1) piedras grandes y (2) conchilla mezclada con piedras pequeñas, con el sistema convencional de ciclo abierto (recambio diario de agua), con el fin de evaluar la factibilidad de un cultivo con recirculación de agua para larvas de *P. vannamei* desde Z3 hasta PL10, utilizando como parámetros de evaluación: (1) el crecimiento de los animales y (2) la estabilidad del medio de cultivo a través de las mediciones de parámetros físicos-químicos, tales como, los niveles de amonio, nitrito, nitrato; temperatura, pH, oxígeno disuelto, salinidad y finalmente la evaluación de la población bacteriana en el agua.

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 FILTRACION

Bajo condiciones en cautiverio, los animales acuáticos producen cambios en el medio de cultivo aumentando las cargas de  $\text{NH}_3$ , compuestos orgánicos, bacterias, etc. Los productos catabólicos se van acumulando en el agua del sistema produciendo efectos tóxicos a los animales. Por esta razón, el agua debe ser renovada, ya sea por medio de sustitución (como se realiza en los cultivos de camarón en el Ecuador), o por medio de filtración con el fin de utilizar esta misma agua mediante la recirculación. (Morales, 1982). Por lo tanto la filtración se la define como la separación de una mezcla solución en sus partes componentes.

#### 1.1. DIFERENTES SISTEMAS DE FILTRACION

Los sistemas de filtración de acuerdo al tipo de filtro se clasifican en (Wheaton, 1977; Morales, 1982):

1. Mecánicos
1. Químicos
1. Biológicos

##### 1.2.1. Filtros mecánicos

Los filtros mecánicos en los sistemas de cultivo acuático se utilizan para eliminar partículas en suspensión (Morales, 1982). Estos filtros extraen todas las partículas que son más grandes que un tamaño específico (Wheaton, 1977).

Existen diferentes tipos de filtros mecánicos, mencionando los más comunes:

- Cribas

Consiste en la colocación de una malla que se encuentra cruzando la trayectoria del flujo de tal forma que el fluido debe pasar a través de ella. Las partículas más grandes que los orificios de la criba no pueden atravesarla acumulándose en ella.



- Filtros de arena

Los filtros de arena consisten en una capa de arena o cualquier otro material particulado a través del cual se fuerza el paso del agua, el filtrado es un proceso mecánico mediante el cual las partículas grandes quedan atrapadas en la arena, en los espacios entre grano y grano. El tamaño máximo de partícula que pasará a través del filtro está determinado por el tamaño del grano de arena (0.02 mm hasta 2.0).

- Filtros de tierra de diatomeas

Son principalmente filtros mecánicos que se utilizan donde la claridad del agua debe ser alta o donde la población de bacterias en el agua se quiere mantener baja, debido al pequeño diámetro de las partículas (mínimo 0.1  $\mu$ m).

- Sedimentadores

La sedimentación por gravedad utiliza la fuerza de la gravedad para extraer partículas de un fluido. Se puede realizar en tanques de sedimentación (figura 1) que tiene un área de influente, efluente, sedimentación y *sludge*.

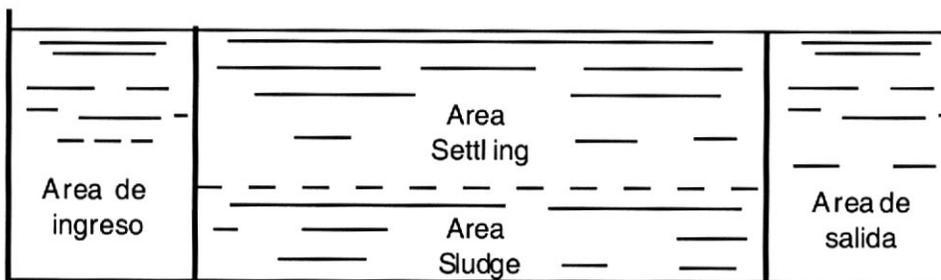


Figura 1. Areas con una base de sedimentación rectangular.

- Centrifugación

Se utiliza para aumentar la fuerza de gravedad experimentada por las partículas durante la sedimentación, en forma de un *Hydroclone* (figura 2).

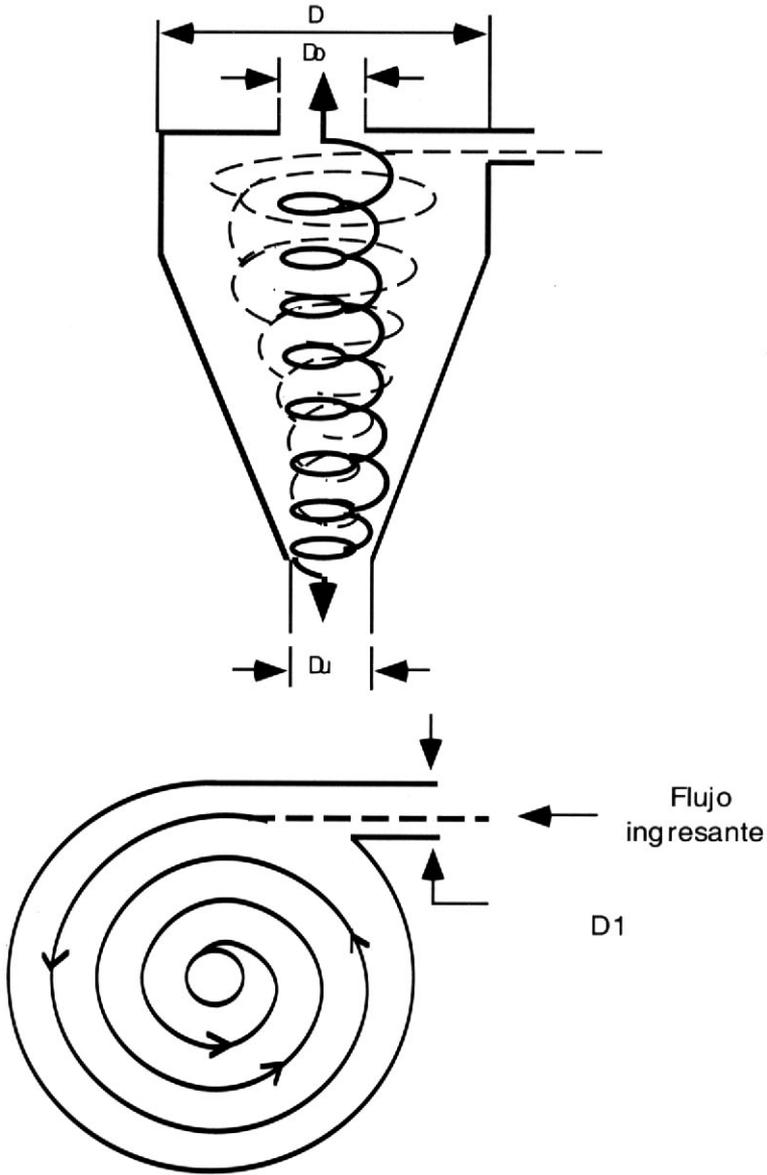


Figura 2. Operación de un hydroclone

### 1.2.2. Filtros químicos

El sistema más conocido es el de carbón activado, que son unidades de adsorción, el cual puede ser un proceso de acumulación o concentración de sustancias en una superficie. Se emplea para eliminar productos orgánicos de excreción (urea,  $\text{NH}_3$ , ácido úrico, aminoácidos, purinas, pirimidinas, creatinina, óxido de trimetilamina, etc.) (Morales, 1982). Debido a su gran superficie y a su propiedad de adsorción, el carbón activo es

capaz de eliminar diferentes compuestos orgánicos con gran eficiencia hasta llegar a la saturación de su superficie. Se puede activar de nuevo mediante lavados con disolventes orgánicos o por calentamiento.

## 1.2. FILTRO BIOLÓGICO

La filtración biológica incluye cualquier tipo de técnica de filtración que utilice organismos vivos para remover impurezas del agua. El propósito principal de un filtro biológico es la conversión de amonio a nitrito y de nitrito a nitrato por bacterias nitrificantes mediante el ciclo del nitrógeno.

Esta conversión es de gran importancia en el cultivo de organismos acuático porque el amonio es un metabolito altamente tóxico descargado directamente por los organismos cultivados y generado como un subproducto por algunas bacterias. El nitrito es menos tóxico que el amonio ( $\text{NH}_3$ ). El nitrato es considerado no tóxico en muchos organismos acuáticos.

### 1.3.1. Configuración de un filtro

Los filtros biológicos consisten de una fase sólida porosa (arena, rocas, ostras, conchas de crustáceos, dolomita, etc.) sobre la cual crecen las bacterias nitrificantes. Las bacterias extraen sus nutrientes, oxígeno y otras necesidades para su vida del agua que pasa por la parte sólida del filtro. Un filtro biológico simple consiste en una caja llena de rocas (figura 3). El agua entra por la parte superior, pasa hacia abajo a través del filtro y sale por un drenaje en la parte inferior de la caja (Wheaton, 1977). Estos filtros pueden estar total o parcialmente sumergidos en el agua.

Se consideran tres funciones para los filtros:

- La Remoción de desperdicios sólidos.  
La conversión biológica de materiales orgánicos.  
Remoción físico-químico de sustancias solubles.

Un filtro puede activarse en uno o en todas las funciones, dependiendo del diseño y operación (Muir *et al.*, 1976), y es empleado para eliminar el amonio y otros productos catabólicos.

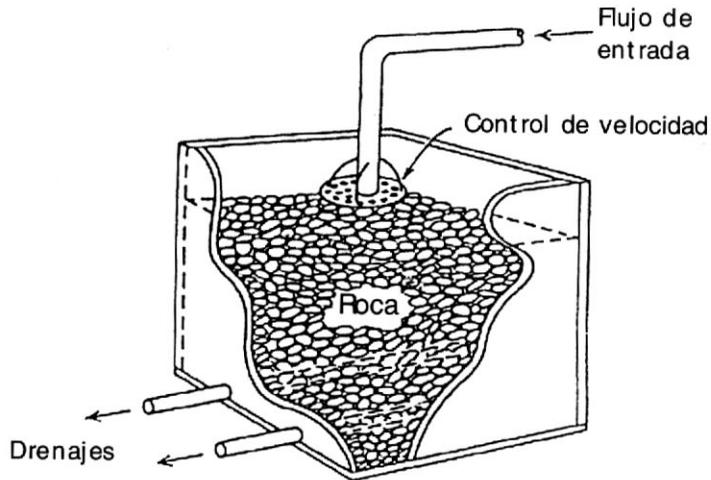


Figura 3. "Downflow" Filtro biológico simple

### 1.3.2. Ciclo del nitrógeno

La descomposición de compuestos orgánicos nitrogenados es muy importante en acuicultura, mediante el ciclo del nitrógeno se realiza la conversión bacteriológica de estos compuestos a nitratos. Esto sucede en un filtro biológico, en el cual se incluye la nitrificación, desnitrificación y los factores que afectan a la nitrificación (Wheaton *et al.*, 1994).

El ciclo del nitrógeno se inicia a partir de la fijación del nitrógeno molecular ( $N_2$ ) que se obtiene a partir de la atmósfera (ocupando el 78.084% de los gases totales en el aire) mediante procesos biológicos, meteorológicos o industriales (Boyd, 1990) (figura 4).

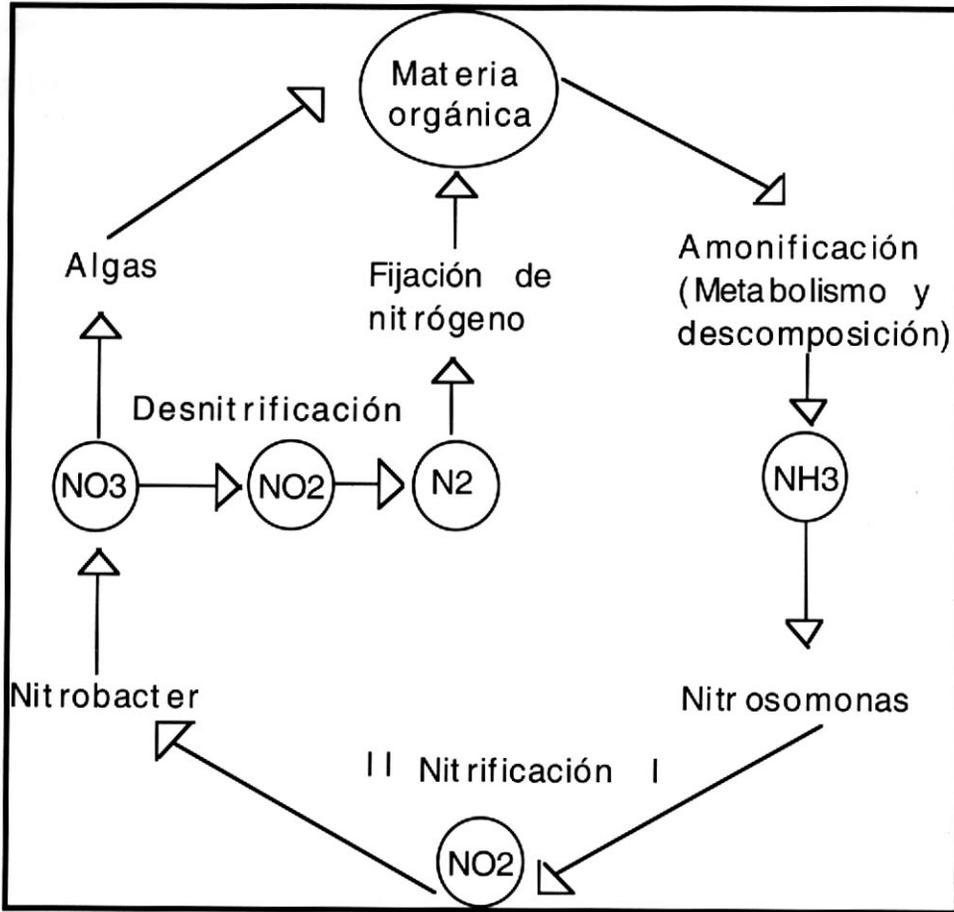
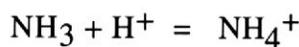


Figura 4. Esquema del Ciclo del Nitrógeno y de las conversiones asociadas que ocurren en un filtro (Morales, 1982)

El Nitrógeno de la atmósfera se incorpora a la materia orgánica (heces, ácido úrico y aminoácidos excretado por los animales) por fijación mediante bacterias. El metabolismo y la descomposición liberan nitrógeno en forma de amoníaco o ion amonio en solución acuosa. Este proceso se denomina **amonificación** (proceso heterotrófico el cual ocurre bajo ciertas condiciones aeróbicas o anaeróbicas) y el amoníaco es liberado al medio. Cualquier amoníaco liberado al medio ambiente establece el siguiente equilibrio con el ion amonio:

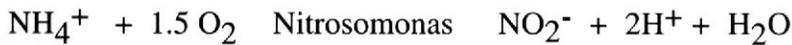


La concentración de amoníaco ionizado y no ionizado está en función del pH, temperatura ( $T^{\circ}\text{C}$ ) y fuerza iónica. Cuando el pH se incrementa, la concentración de amoníaco no

ionizado ( $\text{NH}_3$ ) se incrementa, mientras que el amoníaco ionizado ( $\text{NH}_4^+$ ) decrece (Boyd, 1990).

### 1.3.2.1. Nitrificación

La nitrificación es un proceso de dos pasos llevados a cabo por bacterias autotróficas. En el primer paso el amoníaco es oxidado a Nitrito en presencia de oxígeno por bacterias del grupo *Nitrosomonas* sp. La energía que se produce en este proceso es utilizada por las bacterias para sus procesos biológicos (Wheaton, 1994).



Los factores que afectan el proceso de conversión del nitrito son: pH, temperatura, oxígeno disuelto, número de bacterias nitrificantes y la presencia de compuestos inhibidores (ácido nítrico y  $\text{NH}_3$ ).

El segundo paso es la oxidación de Nitrito a Nitrato. Esta reducción es llevada a cabo por las bacterias *Nitrobacter* sp., las cuales utilizan la energía liberada para sus procesos de vida.



Durante la oxidación microbiana de amoníaco a nitrito, se producen iones de hidrógenos, los mismos que tienden a disminuir el pH durante la nitrificación. En soluciones acuosas, los iones hidrógeno que se producen se neutralizan con los iones bicarbonatos en el agua. Esto da como resultado una pérdida neta del carbón inorgánico al aire como dióxido de carbón a través de la aireación en el agua de mar (Wickins, 1983).

Debido a que el crecimiento de la población bacteriana es lenta (el crecimiento de las bacterias nitrificantes es relativamente lento comparado con el de las bacterias heterotróficas (Wheaton, 1977), la eliminación del amoníaco en un filtro biológico pasa por tres fases hasta que alcanza el equilibrio: ausencia de nitrificación (predominio de  $\text{NH}_3$  o  $\text{NH}_4^+$ ), predominio de *Nitrosomonas* (altas concentraciones de  $\text{NO}_2^-$ ) y equilibrio (acumulación de  $\text{NO}_3^-$ ). Una vez conseguidas las poblaciones bacterianas

*Nitrosomonas* y *Nitrobacter*, el sistema de inmediato convierte el amoníaco en  $\text{NO}_2^-$  y en  $\text{NO}_3^-$  que se acumula en el medio de cultivo sin dar lugar a concentraciones altas de amoníaco y/o nitritos.

Durante la puesta a punto del filtro hay un momento denominado "período crítico" durante el que se acumulan cantidades altas de nitritos, por lo que es conveniente empezar el sistema sin animales. Para esto pueden introducirse pequeñas cantidades de  $\text{NH}_3$  y de bacterias en el filtro, lo que disminuye el período hasta que se alcanza la cantidad de bacterias deseadas (figura 5). Esta población bacteriana se encarga no solamente de transformar amoníaco a nitrato en presencia de oxígeno sino también en transformar otros compuestos orgánicos (almidón, urea, celulosa etc.) (Morales, 1982). La estabilidad de un filtro biológico nuevo toma de 20 a 35 días (Wheaton *et al.*, 1991).

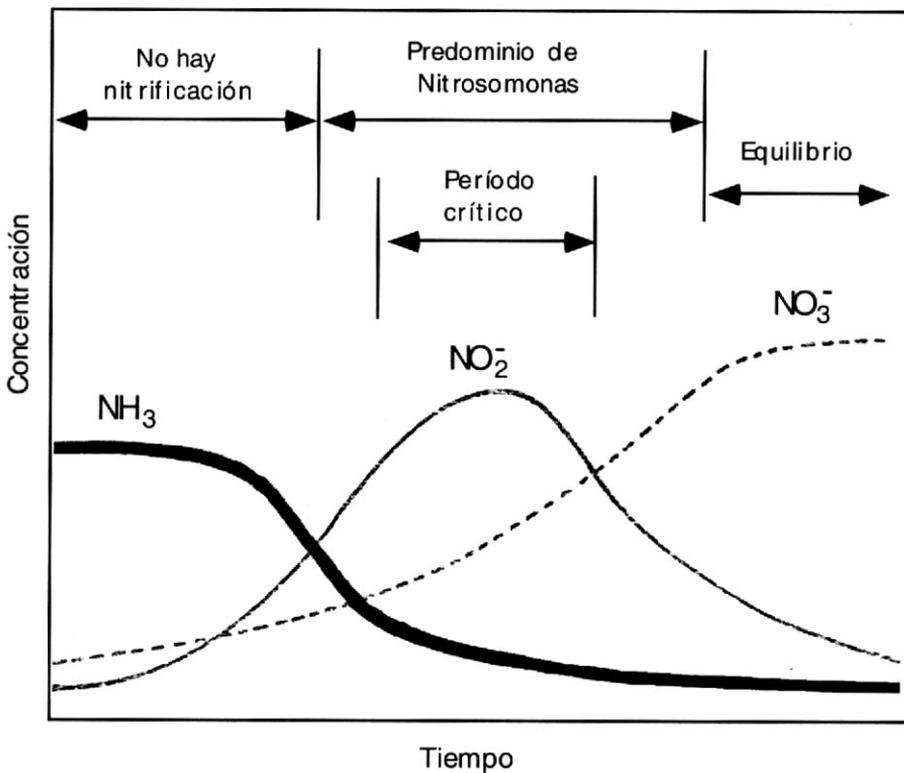


Figura 5. Esquema de la evolución temporal de eliminación del ion amonio en un filtro biológico comenzando a funcionar.

### 1.3.2.2. Desnitrificación

La desnitrificación es un proceso anaeróbico llevado a cabo por bacterias heterotróficas en el cual el nitrato es reducido a nitrito, amoníaco, óxido nitroso ( $N_2O$ ) o Nitrógeno molecular ( $N_2$ ).

En la ausencia del oxígeno molecular, algunos microorganismos pueden usar el nitrato u otras formas oxidadas de nitrógeno en vez de usar el oxígeno como un aceptante en la respiración. Este proceso heterotrófico es llamado reducción del nitrato o respiración del nitrato, que es cuando las formas gaseosas de nitrógeno son liberadas como metabolitos y perdidos del sistema, esto ocurre solo bajo condiciones anaeróbicas, completándose así el ciclo del nitrógeno (Boyd, 1990).

### 1.3.2.3. Factores que afectan la Nitrificación

- Temperatura

Según Morales (1982) la temperatura óptima para el crecimiento de las bacterias nitrificantes es de 30-35°C, a esta temperatura las bacterias se acondicionan rápidamente. Mientras que Wheaton *et al.* (1991) declara que el crecimiento máximo para *Nitrosomonas* está relacionado con una temperatura entre 10 a 30°C. Pero hay que tener en cuenta que muchas bacterias pueden sobrevivir a cambios largos de temperatura, aunque sus actividades pueden afectarse temporalmente (Spotte, 1979).

- Oxígeno Disuelto

El consumo de oxígeno por los microorganismos en sistemas de agua es medido en términos de DBO (demanda biológica de oxígeno) y varía según la especie acuática. Se debe asegurar una buena oxigenación del agua antes y después que pase por el filtro, para evitar toda fermentación anaeróbica, ya que se liberan en el agua productos altamente tóxicos (Morales, 1982).

Tanto las bacterias aeróbicas como anaeróbicas son encontradas en el lecho del filtro, pero son las formas aeróbicas que predominan en las paredes aireadas de los acuarios. El crecimiento y la actividad de las bacterias anaeróbicas son inhibidas en la presencia de oxígeno y la adecuada circulación a través de la capa del filtro la mantienen detenidas y es así que cuando el oxígeno decrece las bacterias anaeróbicas se proliferan (Wheaton *et al.*, 1994).

Algunos autores sugieren, que las concentraciones de oxígeno alrededor de 1mg/l son suficientes, pero 2 mg/l de oxígeno en el filtro es tal vez adecuado para mantener las tasas de nitrificación máxima (Wheaton *et al.*, 1991, 1994). Según Forster (1974), la nitrificación fue inhibida a niveles de oxígeno disuelto por debajo de 0.6-0.7mg/l.

- pH

El pH óptimo para la nitrificación de filtros está en el rango de 6 a 9, aunque para un filtro específico el rango óptimo es estrecho, el rango específico de pH esta en función de la adaptación de la bacteria en el filtro. También pueden operar desde pH tan bajos como 5.0 a pH altos como 10, si ellas se adaptan lentamente fuera de los límites del rango (Wheaton *et al.* 1994). Foster (1974) demostró que un pH alrededor de 5.5 afectó a la nitrificación, deteniéndose completamente. Saeki (1958) consideró el mejor rango del pH para el cultivo en agua dulce de 7.1-7.8 y para agua salada un rango de 7.0-8.2.

Es importante controlar el pH durante un cultivo en un sistema cerrado debido a que el CO<sub>2</sub> producido por los animales cultivados, el ión hidrógeno producido por las bacterias nitrificantes y otros ácidos que se producen bajan el pH en el sistema si la acción compensatoria no es aplicada (Wheaton *et al.*, 1991).

- Salinidad

Los filtros nitrificantes pueden operar en algunas salinidades entre agua dulce y 40 ppt, dando lugar a que la bacteria se adapten a las condiciones de operación. Según Spotte (1979) la nitrificación se produce más rápidamente en acuarios de agua dulce que de agua salada. Wheaton *et al.* (1994) encontraron que cambios rápidos en salinidad mayores a 5ppt disminuirá la tasa de nitrificación.

- Concentraciones Amoníaco/Nitrito

Se ha demostrado que altas concentraciones de amoníaco y nitrito son tóxicos para la operación de los filtros biológicos.

Anthonisen *et al.* (1976) concluyeron que el ácido nitroso y el amoníaco no ionizado son agentes inhibidores. El amoníaco no ionizado inhibe a las bacterias *Nitrosomonas* a concentraciones más altas que las que inhiben a las *Nitrobacter* (10-150 mg/l de amoníaco no ionizado comparado con 0.1 a 1.0 mg/l de amoníaco no ionizado (Wheaton *et al.*, 1994).

- Tipo del medio y area superficial

El medio es un material sólido colocado dentro de un filtro de nitrificación para proveer de una superficie sobre la cual el crecimiento bacteriano puede ocurrir. Hay cientos de tipos de medios que pueden ser usado para los filtros de nitrificación variando desde arena y rocas hasta medios sintéticos. Casi cualquier material sólido no es tóxico para las bacterias nitrificantes y por lo tanto cualquier cultivo bacteriano puede llevarse a cabo. El tipo de medio seleccionado esta en función del diámetro deseado, del área específica y del costo (Wheaton *et al.*, 1994).

El área superficial es la más importante debido a que el 90% de las bacterias se desarrollan casi en los 5 cm externos de la capa superficial del lecho del filtro (Morales, 1982).

El tamaño y forma de la grava es muy importante, las gravas pequeñas tienen mayor área de superficie que le sirve para la adhesión de bacterias, sin embargo los granos finos de grava restringen la circulación del agua (Spotte, 1979).

- Compuestos tóxicos

Muchos compuestos químicos inhiben la nitrificación bajo ciertas condiciones. Cuando se añaden al agua de cultivo, afectan la capa de bacterias del filtro ya sea (1) en el crecimiento y proliferación de las bacterias o (2) por la interrupción del metabolismo de sus células, el cual producirá en ellos que no alcancen su capacidad máxima para oxidar el amoníaco..

En la literatura se menciona como inhibidores: formalina, verde malaquita y nifurpirinol, entre otros. Los efectos de los metales pesados, como el Cr, Cu y Hg en cultivos puros de *Nitrosomonas* fueron mucho más severos que los efectos en lodo. Estos efectos probablemente sea debido a la formación de compuestos químicos entre metales y materia orgánica (Spotte, 1979)

- Flujo de agua

La velocidad a la cual el agua pasa a través del sustrato es importante ya que si el agua fluye muy rápido, el  $\text{NH}_3$  no puede ser procesado y las bacterias no pueden situarse y proliferar (Morales, 1982).

- Antibióticos

Los antibióticos no se deben emplear con el filtro biológico conectado al sistema, porque existe el riesgo de matar las bacterias nitrificantes del biofiltro. (Morales, 1982).

### 1.3.3. Tipos de biofiltros

Existen muchos tipos de filtros biológicos, los más utilizados incluyen a los filtros sumergidos, por goteo, biotambores, biodiscos y lechos fluidos (Wheaton *et al.* 1994).

- Biofiltros sumergidos

La figura 6 muestra un diagrama de biofiltro sumergido, ubicado fuera del tanque, llenado con un sustrato (roca, plástico, etc.) que permite el crecimiento bacteriano, el cual está completamente sumergido. El agua residual corre a través del sustrato donde la bacteria comienza a romper y oxidar los productos de desecho y los convierte en simples productos inorgánicos. Por lo tanto el influjo debe ser lo suficientemente grande para tener un flujo de nutrientes y oxígeno para la bacteria, pero debe ser lo suficientemente lento para que la bacteria tenga el tiempo de completar el proceso de nitrificación. El flujo puede ser desde la superficie al fondo (flujo hacia abajo) o desde el fondo hacia la superficie (flujo hacia arriba), este filtro biológico es el más utilizado.

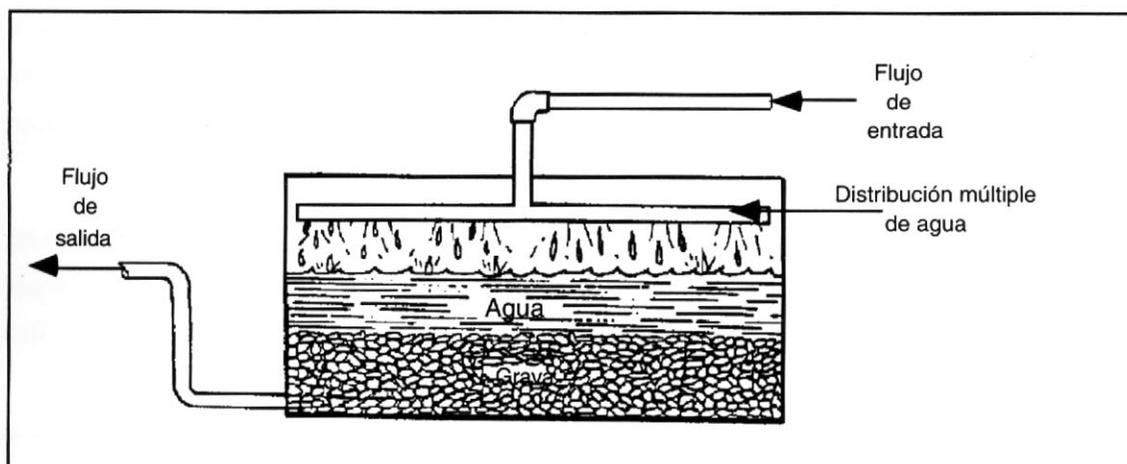


Figura 6. Filtro nitrificante sumergido, "downflow".

- Filtros por goteo

El filtro por goteo opera como un filtro sumergido de flujo hacia abajo excepto que el medio es mantenido húmedo pero no sumergido, debido a que el filtro no es llenado con agua, el aire puede circular a través del filtro, dando oxígeno a las bacterias. Por lo tanto, la circulación del aire a través del filtro provee la mayor parte del oxígeno necesario.

- Bio-tambores

El biotambor consiste en un cuerpo cilíndrico perforado llenado con algún tipo de medio que tiene mucha superficie específica y un gran vacío (figura 7). El cuerpo cilíndrico está montado sobre un eje que pasa por su centro. El ensamblaje es montado en un tanque que posee un eje horizontal. El nivel del agua en el tanque es mantenida de tal manera que por lo menos la mitad del tambor debe estar sumergido.

Un motor conectado en el eje del tambor hace que rote este lentamente de tal manera que el crecimiento bacteriano en el medio este altamente sumergida en el agua y expuesta al aire. El flujo del efluente a través del tanque puede ser en dirección paralela o perpendicular al eje del tambor.

La velocidad de rotación del tambor es seleccionada para prevenir la inmersión de la bacteria demasiado tiempo de tal manera que el oxígeno escasee antes de su retorno al aire o en el caso contrario ellas se sequen antes de su retorno al agua. Por lo tanto el contenido de oxígeno no es tan importante como en los filtros sumergidos.

Los biotambores también tienden a crear una mezcla considerable y una turbulencia en el tanque en los cuales ellos operan, debido al movimiento del agua dentro y fuera del biofiltro durante la rotación. Los biotambores raramente se tapan.

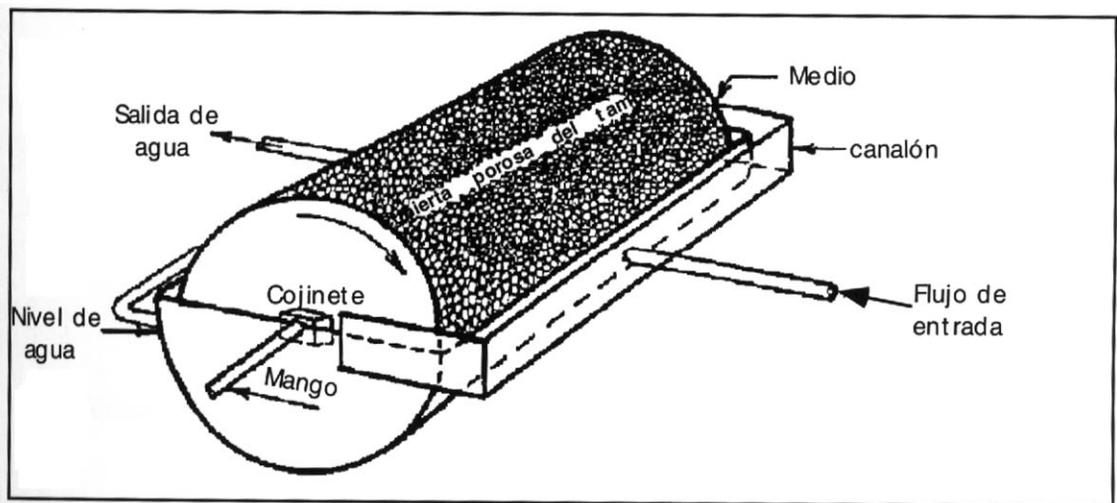


Figura 7. Diagrama esquemático del Biotambor.

- Biodisco

Los biodiscos, son muy similares a los biotambores excepto que en la perforación, los biotambores son reemplazados por discos que están ligeramente separados a lo largo de un eje (figura 8). El espacio entre los discos pueden ser lo más cerrado posible para maximizar el área de superficie específica, permitiendo espacio para una capa de bacteria para que puedan crecer en ambas caras del disco y permitir la circulación del agua entre los discos cubiertos de bacterias. La velocidad de rotación es limitada igual como los biotambores. Aunque los biodiscos crean una turbulencia en el tanque, ésta es menor que en los biotambores.

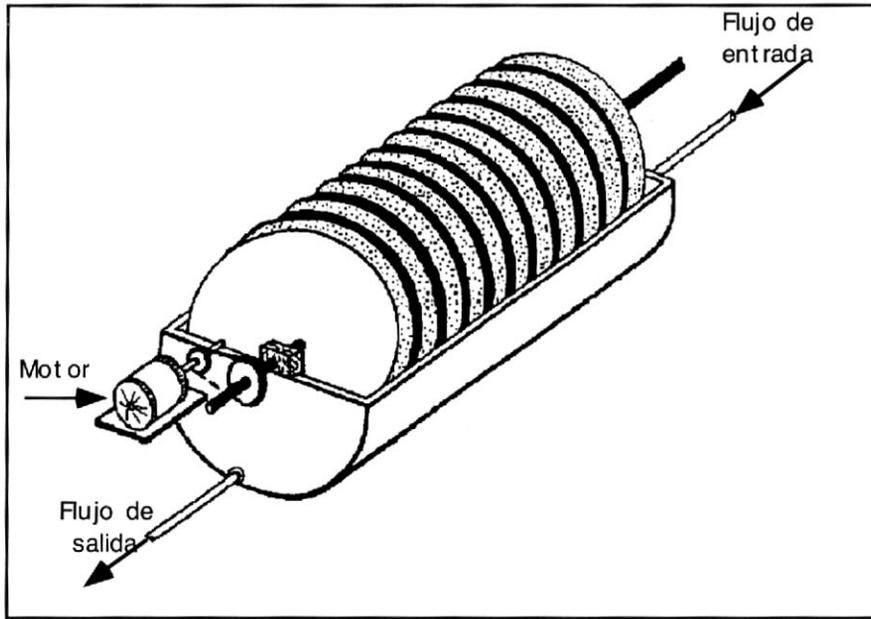


Figura 8. Diagrama esquemático del Biodisco.

- Fluidized Bed

El *Fluidized Bed* consiste de un tubo cilíndrico instalado en un lado para admitir agua y en el otro lado para expulsar agua (figura 9).

El tubo es llenado con el medio particulado (ej. arena) de peso similar, el cual deberá tener un área de superficie altamente específica por unidad de volumen. Un plato perforado localizado por debajo de la entrada del agua soporta el medio cuando el agua no está fluyendo a través del filtro. Este plato previene que el medio se mezcle y tapone el ingreso del agua durante periodos de baja filtración. El agua es bombeada por el fondo del filtro a una tasa de flujo suficiente para suspender el medio. Por lo tanto, el filtro deberá operar con una velocidad de flujo que sea suficiente para permitir dar fluidez al medio pero que sea insuficiente para llevar el medio fuera del filtro.

La bacteria crece en el medio del lecho fluido (piedras o arena) y remueve el amoníaco del agua que fluye a través de ella. El oxígeno proviene del agua pero los rangos y tasas de flujo son usualmente demasiado altas, si el influjo de agua está cerca de la saturación con oxígeno existe suficiente oxígeno para el filtro.

Los *Fluidized Bed* requieren altos rangos de flujo de agua por unidad de área pero son relativamente pequeñas en comparación con la gran cantidad de área disponible. Estos lechos fluidos no se taponan fácilmente y una vez estabilizada operan con total seguridad.

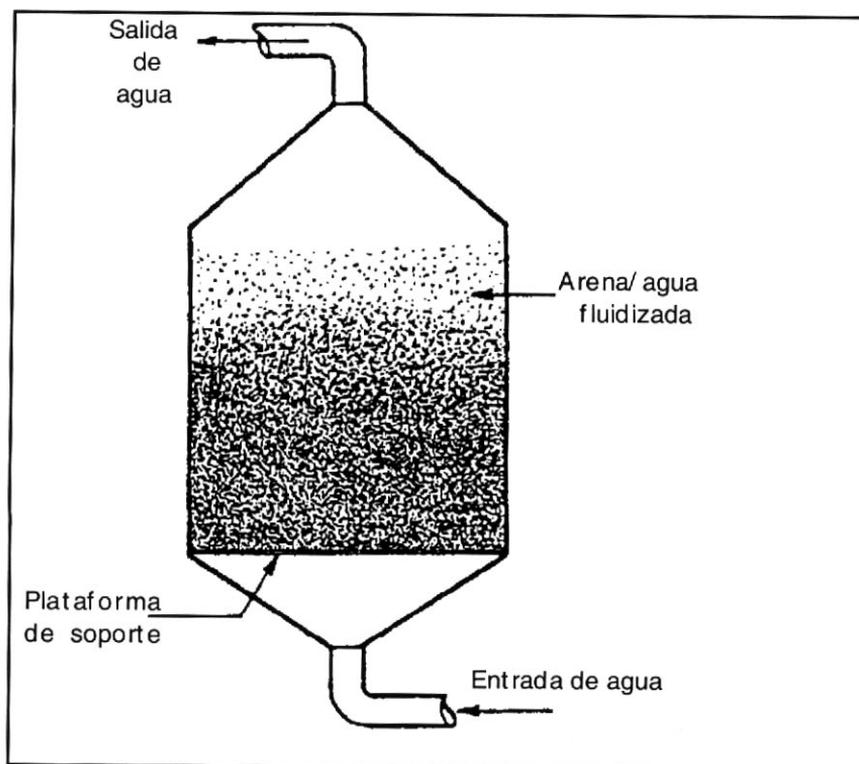


Figura 9. Filtro nitrificante "Fluidized Bed"

#### 1.4. TOXICIDAD DEL AMONIO, NITRITO Y NITRATO

La mayor fuente de amoníaco-amonio en el agua es la excreción directa de los animales acuáticos. Este a ciertos niveles, llega a ser tóxico, así como también el producto intermedio de nitrificación, el nitrito.

En camarones la toxicidad de amonio es más alta que la del nitrito, mientras que el nitrato, el producto final de la nitrificación es mucho menos tóxico.

La toxicidad del amoníaco es afectada por el pH del agua, oxígeno disuelto, temperatura y salinidad. La toxicidad del nitrito se ve afectada por el pH del agua y por la presencia del cloro y calcio.

Existe mucha literatura sobre los niveles aceptables de toxicidad de los compuestos nitrogenados para peces, pero no hay mucha información para los crustáceos.

### 1.3.1. Toxicidad del amoníaco

Meade (1985) sostiene que en el pasado solo la forma de amoníaco no ionizado ( $\text{NH}_3$ ) era considerada tóxica para los animales acuáticos, sin embargo estudios recientes sugieren que ambos, el amonio ( $\text{NH}_3$ ) y el radical amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) pueden ser tóxico, pero que el  $\text{NH}_3$  es mucho más tóxico que el  $\text{NH}_4^+$  (Boyd, 1990).

Los métodos analíticos solo pueden medir el amoníaco total ( $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ ), pero según la temperatura y valores de pH se puede estimar el porcentaje de  $\text{NH}_3$  presente en el tanque de cultivo (Boyd, 1990).

#### 1.4.1.1. En Peces

Hay algunos efectos fisiológicos conocidos de toxicidad de amonio para peces, la incrementarse las concentraciones de amonio en el agua, la excreción de este compuesto por el pez disminuye, y los niveles de amonio en la sangre y otros tejidos se incrementan. Esto trae como resultado una elevación del pH en la sangre y efectos adversos en las reacción enzimática y en la estabilidad de la membrana. El amonio también incrementa el consumo de oxígeno de los tejidos, daña las branquias y reduce la habilidad de la sangre de transportar oxígeno (Boyd, 1990).

La exposición crónica a amonio aumenta la susceptibilidad de los peces a enfermedades y reduce el crecimiento, Russo y Thurston (1991) añadieron que una exposición crónica de amonio incluye también daños a tejidos y la disminución de la capacidad reproductiva. Otros estudios de efectos subletales demostraron alteraciones con concentraciones tan bajas como 0.002-0.15 mg/l  $\text{NH}_3$ , tales como: reducción de la ingestión de alimentos y de su asimilación. También se ha mencionado cambios histológicos (riñones, vaso, tiroides y sangre), a continuas exposiciones de 0.006 hasta 0.34 mg/l de  $\text{NH}_3$  (Boyd, 1990).

Se reportó cambios patológicos en las branquias de trucha arcoiris (*Salmo gairdner*) a concentraciones de 0.015 mg/l de NH<sub>3</sub> (Boyd, 1990). En lo que se refiere a niveles de toxicidad aguda del amoníaco, se ha publicado muchos experimentos con diferentes especies de peces. Un resumen se presenta en la tabla 1.

Tabla 1. Valores representativos de toxicidad aguda para NH<sub>3</sub> en peces (datos de Russo y Thurston, 1991)

Especie	Horas	LC50 (mg/l NH <sub>3</sub> )	Referencia
Bagre de canal ( <i>Ictalurus punctatus</i> )	96-hr	0.5-3.8	Colt y Tchobanoglous(1976) Roseboom y Richey (1977), Arthur <i>et al</i> (1987)
Largemouth bass ( <i>Micropterus salmoides</i> )	96-hr	0.9-1.4	Roseboom y Richey (1977)
Pink salmon ( <i>Oncorhynchus gosbuscha</i> )	96-hr	0.08-0.1	Rice y Bailey (1980)
Bluegill ( <i>Lepomis macrochirus</i> )	96-hr	0.55-3.0	Emery y Welch (1969) Roseboom y Richey (1977)
Trucha arcoiris ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	96-hr	0.16-1.1	Broderius y Smith (1979) DeGraeve et al. (1980) Calamari et al. (1981) Thurston y Russo (1983)
Brown trout ( <i>Salmo trutta</i> )	96-hr	0.50-0.70	Thurston y Meyn (1986a)
Fathead minnow ( <i>Pimephales promelas</i> )	96-hr	0.75-3.4	Thurston et al. (1983)
Smallmouth bass ( <i>Micropterus dolomieu</i> )	96-hr	0.69-1.8	Broderius <i>et. al.</i> (1985)
Carpa común ( <i>Cyprinus carpio</i> )	96-hr	2.2	Hasan y Macintosh (1986a)

Meade (1985) concluye que todos los datos presentados, demuestran que la concentración anteriormente publicada y aceptada por muchos productores de peces como el nivel seguro no es 0.0125 mg/l.

#### 1.4.1.2. En Camarones

No existe mucha información sobre la toxicidad de amonio en crustáceos.

Colt y Armstrong (1979) indicaron que concentraciones de  $\text{NH}_3$  tan bajas como 0.09 mg/litro redujeron el crecimiento del *M. rosenbergii*, y 0.45 mg/litro causó un 50% de reducción en el crecimiento del camarón *penaeus*. Así, Tabash y Murillo (1988) reportaron una dosis media letal de 1.4 mg/l de amonio para el *Penaeus stylirostris*. Chin-Chen (1987) mostró valores de toxicidad aguda para el *P. monodon* a 24 y 96-hr de LC50 a 5.71 mg/l y 1.26 mg/l. Petit (1990) muestra en la tabla 2, niveles aceptables de  $\text{NH}_3$  para ciertos crustáceos.

Tabla 2. Niveles aceptables (durante un período largo de exposición sin afectar el crecimiento y la eficiencia de conversión)

Espece	Nivel de Amoníaco $\text{NH}_3$ (mg/l)	Autores
Camarones	0.09	Wickins (1976)
<i>Penaeus</i> sp.-nauplios	0.01	Chin-Chen (1987)
( <i>Macrobrachium rosenbergii</i> )	0.07-0.18	Aquacop (1977)
Langosta ( <i>Homarus americanus</i> )	0.17	Deslestraty et al. (1977)

Se reportaron 5 pruebas de toxicidad crónica con amonio, cada prueba duró tres semanas dando como resultado una disminución en el crecimiento de 5 especies de peneidos a una concentración de 0.45 mg/l,. El nivel máximo aceptable para no afectar el crecimiento fue estimado en 0.10 mg/l de  $\text{NH}_3$  (Wickins, 1976).

#### 1.4.1.3. Factores que afectan la toxicidad del amoniaco

- O.D.

Existe una relación inversa entre la toxicidad del amonio y la concentración de oxígeno disuelto, es decir que se incrementa cuando las concentraciones de oxígeno disuelto disminuyen (Meade, 1985).

- Temperatura (T°C)

La toxicidad del  $\text{NH}_3$  se incrementa cuando la temperatura disminuye, especialmente bajo los valores óptimos para el crecimiento (Meade, 1985).

- pH

Se observó que la toxicidad en soluciones de  $\text{NH}_3$  fueron grandes con valores de pH altos, debido a que la concentraciones de  $\text{NH}_3$  aumenta cuando el pH aumenta, concluyendo que el  $\text{NH}_3$  fué tóxico en la forma de amoníaco en el agua y que el  $\text{NH}_4^+$  fué menos tóxico (Russo and Thurston, 1991).

- Mezclas de Amonio y otros químicos.

No existe mucha información sobre el incremento o disminución de los efectos tóxicos del amonio como resultado de la exposición en combinación con otros químicos, pero un incremento en la fuerza ionica parece reducir la toxicidad del amonio. Se ha reportado que un aumento en la concentración. de Ca en el agua disminuye la toxicidad del amonio en el bagre de canal y se ha reportado que un incremento en la salinidad del agua reduce la toxicidad del amonio en el salmón del Atlantico (*Salmo salar*) (Russo y Thurston, 1991).

### 1.4.2. Toxicidad del nitrito

Aunque el nitrito se encuentra presente en medios acuáticos naturales en cantidades trazas, el proceso de oxidación en el cual el amonio es convertido en nitrito en las facilidades de tratamientos de aguas servidas y en sistemas de reutilización de aguas en acuicultura es algunas veces impedido, causando la acumulación de cantidades potencialmente tóxicas del  $\text{NO}_2$ . Los factores que afectan el proceso de conversión del nitrito son: pH, temperatura, oxígeno disuelto, el número de bacterias nitrificantes y la presencia de compuestos inhibidores (ácido nitroso y  $\text{NH}_3$ ) (Russo and Thurston, 1991).

#### 1.4.2.1. En Peces

Cuando el nitrito es absorbido por el pez este reacciona con la hemoglobulina para formar metahemoglobina, en esta reacción el hierro de la hemoglobulina es oxidado del estado ferroso al férrico, el cual es incapáz de transportar oxígeno. Por esta razón, la toxicidad del nitrito produce una disminución de la actividad de la hemoglobulina o anemia funcional. La metahemoglobulina en peces puede ser detectado por el color de la sangre y de las branquias, el cual se torna café. Altos niveles de metahemoglobulina en la sangre del pez van a producir una hipóxia causando la muerte (Russo and Thurston, 1991).

Los niveles de salinidad interfieren con la toxicidad del nitrito: para los juveniles de *milkfish* (*Chanos chanos*), las concentraciones de nitrito fueron cerca de 55 veces más tóxicas en agua dulce que en agua de 16 ppt de salinidad (Almendras, 1987). En la tabla 3 se menciona las variaciones en la susceptibilidad de  $\text{NO}_2$  entre diferentes especies de peces. Así mismo se determinó los niveles aceptables de 0.015 de  $\text{NO}_2$  -N mg/l en truchas (Russo and Thurston, 1991).

Tabla 3. Valores representativos de toxicidad aguda para nitrito en peces (datos de Russo y Thurton, 1991)

Especie	Hora	LC50 (mg/INO <sub>2</sub> -N)	Referencias
Smallmouth bass	48-96	160	Tomasso (1986)
Bluegill ( <i>Lepomis macrochirus</i> )	48-96	80	Tomasso (1986)
Largemouth bass ( <i>Micropterus salmoides</i> )	48-96	140	Palacheck y Tomasso (1984 a)
Fathead minnow ( <i>Pimephales promelas</i> )	48-96	2.3-3.0	Russo et al. Thurston (1977)
Common carp ( <i>Cyprinus carpio</i> )	48-96	2.6	Hasan y Macintosh (1986b)
Rainbow trout ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	48-96	0.19-0.39	Russo et al (1974) Brown y McLeay (1975 )
Chinook salmon ( <i>Oncorhynchus tshawytscha</i> )	48-96	0.88	Westin(1974)
Channel catfish (alevines) ( <i>Ictalurus punctatus</i> )	48-96	7.1-13	Konikoff(1975) Colt y Tchobanoglous (1976)

Para peces de agua dulce las concentraciones de nitrito varían desde 0.66 a 200 mg/litro en 96 horas de LC50 (Colt y Armstrong,1979).

#### 1.4.2.2. En Camarones

A diferencia de los peces, los crustáceos en vez de hemoglobina contienen hemocianina, las reacciones de nitrito con la hemocianina es poco entendida, pero el nitrito puede ser tóxico para los crustáceos (Boyd, 1990). Se mencionan niveles de NO<sub>2</sub>-N mg/l que reducen el crecimiento del camarón, como el *P. indicus* y *P. monodon* respectivamente, y con el *M. rosenbergii*, los resultados están sobre 6.4 mg NO<sub>2</sub>-N/l.

Para crustáceos de agua dulce las concentraciones de nitrito varían desde 8.5 a 15.4 mg/litro (Colt y Armstrong, 1979). El crecimiento en el *M. rosenbergii* fue reducido a concentraciones de nitrito de 1.8 y 6.2 mg/l (Colt y Armstrong, 1979). Una concentración segura de 4.5 mg/l fue sugerida para el crecimiento de postlarva.

#### 1.4.2.3. Factores que afectan la toxicidad del Nitrito

- pH

El equilibrio acuoso del nitrito depende del pH, cuando el pH se incrementa, la toxicidad en términos de  $\text{NO}_2\text{-N}$  disminuye y la toxicidad en términos de  $\text{HNO}_2\text{-N}$  aumenta, aunque ninguno de estos químicos es generalmente responsable por la acción tóxica observada (Russo y Thurston, 1991).

- Cloruro y otros iones

La toxicidad del nitrito para la trucha arcoiris disminuye con el incremento de la concentración del ion cloruro ( $\text{Cl}^-$ ). En otros peces, se ha reportado que el sodio o el cloruro de calcio reduce la toxicidad del nitrito y/o la formación de metahemoglobina (Russo y Thurston, 1991).

#### 1.4.3. Toxicidad del nitrato

El nitrato ( $\text{NO}_3$ ) es formado por la completa oxidación de amonio a través de los procesos de nitrificación. El nitrato no es tan tóxico para los animales acuáticos aún en grandes concentraciones, aunque sus efectos a un largo período de tiempo no han sido determinados.

#### 1.4.3.1. En Peces

En la literatura se reportaron algunos test de toxicidad aguda con nitrato para diferentes especies de peces (tabla 4).

La presencia de branquias pálidas observadas en peces capturados durante varios meses es el resultado de una elevación del nitrato. Además existen indicaciones de niveles de tolerancia para algunas especies.

Para el *largemouth bass* (*Micropterus salmoides* ) y para el bagre de canal (*Ictalurus punctatus* ), a una concentración de 400 mg/l de nitrato no afectó su supervivencia ni crecimiento.

Para el *chinook salmon* (*Oncorhynchus tshawytscha* ) y la trucha arco iris, no se presentó ningún signo de trauma durante 5 y 8 días cuando las concentraciones de nitrato fueron de 1000 mg/l (Russo and Thurston, 1991).

Tabla 4. Valores representativos de toxicidad de nitrato para diferentes especies de peces (datos de Russo y Thurston, 1991)

ESPECIE	Hora	LC50 (mg/INO <sub>3</sub> -N)	REFERENCIAS
Guppy ( <i>Poecilia reticulata</i> )	96	180-200	Rubin y Elmaraghy (1977)
Bluegill ( <i>Lepomis macrochirus</i> )	96	420-2000	Trama (1954)
Guadalupe bass ( <i>Micropterus treculi</i> )	96	1260	Tomasso y Carmichael (1986)
Rainbow trout ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	96	1360	Westin(1974)
Chinook salmon ( <i>Oncorhynchus tshawytscha</i> )	96	1310	Westin(1974)
Channel catfish ( <i>Ictalurus punctatus</i> )	96	1400	Colt y Tchobanoglous (1976)

#### 1.4.3.2. En camarones

El NO<sub>3</sub> es la forma menos tóxica comparado con el NH<sub>3</sub> y el NO<sub>2</sub>. Así, pruebas realizadas con el *P. aztecus*, *P. japonicus*, *P. occidentalis*, *P. orientalis* y *P. setiferus*, mostraron que los animales sobrevivieron a exposiciones de 2000 mg/l de nitrato por 48 h. En 48h el LC50 fue establecido en 3400 mg/l de nitrato.

Se reportaron dos pruebas de toxicidad aguda con nitrato demostrando que el crecimiento de *P. monodon* no fue afectado por concentraciones de 200 mg/L de nitrato, después de 3-5 semanas de exposición. *M. rosenbergii* fue más susceptible al nitrato, en 3-4 semanas el LC50 fue 160 mg/l (Wickins, 1976).



## 2. MATERIALES Y METODOS

### 2.1. SISTEMA DE RECIRCULACION

El sistema de recirculación (figura 10) consta de varias partes, de las cuales la más importante es el biofiltro.

Los biofiltros utilizados para este bioensayo estuvieron constituidos por dos tipos de piedras: (1) piedras pequeñas y conchillas (BF-P) con un diámetro promedio 5 mm y (2) piedras grandes (BF-G) con un diámetro promedio de 3 cm (Foto 1 y 2).

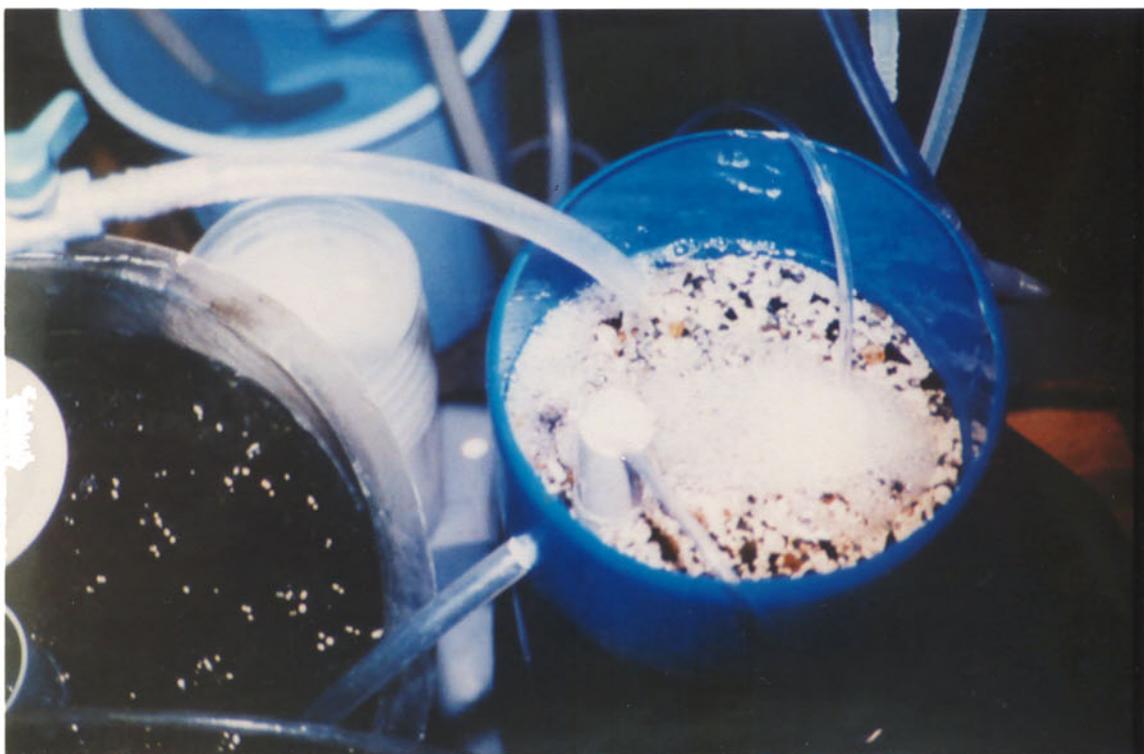


Foto 1. Biofiltro con Piedras pequeñas conchillas (BF-P)



Foto 2. Biofiltro con Piedras Grandes (BF-G)

Empleando como referencia el esquema utilizado por Dhert *et al.* (1991), la cantidad de piedras que contenían los biofiltros mantenían una relación de 100:15 (volumen del tanque de cultivo: volumen de piedras sumergidas en el biofiltro). Se utilizaron tanques de cultivo de 50 L y por lo tanto el volumen de piedras sumergidas del biofiltro fue de 7.5 L.

Otra parte importante del sistema es el “air-water-lift” (figura 10), cuya función es elevar el agua del tanque de cultivo hasta el biofiltro. El “air-water-lift” consta de dos partes: la primera (figura 10, 2b) consiste en un tubo reservorio de PVC de 8 cm de diámetro y 22 cm de largo. En esta parte se encuentra conectada una válvula que permite controlar el flujo del agua de cultivo al biofiltro. El extremo inferior del tubo presenta una abertura que sirve para acoplar la segunda parte (figura 10, 2c) que consiste en un tubo de PVC de 2 cm diámetro y 69 cm de largo, dentro del cual se coloca una manguera de aire de 6mm de diámetro (figura 10, 2d) que hace funcionar al “air-water-lift.”

El sistema de recirculación funciona de la siguiente manera: dependiendo del tipo de biofiltro (BF-P o BF-G), se utiliza un “air-water-lift” para elevar el agua de cultivo hacia el biofiltro y homogenizarla en su interior mediante 1 o 2 mangueras provistas de piedras difusoras, para finalmente regresar al tanque de cultivo por efecto de la gravedad.

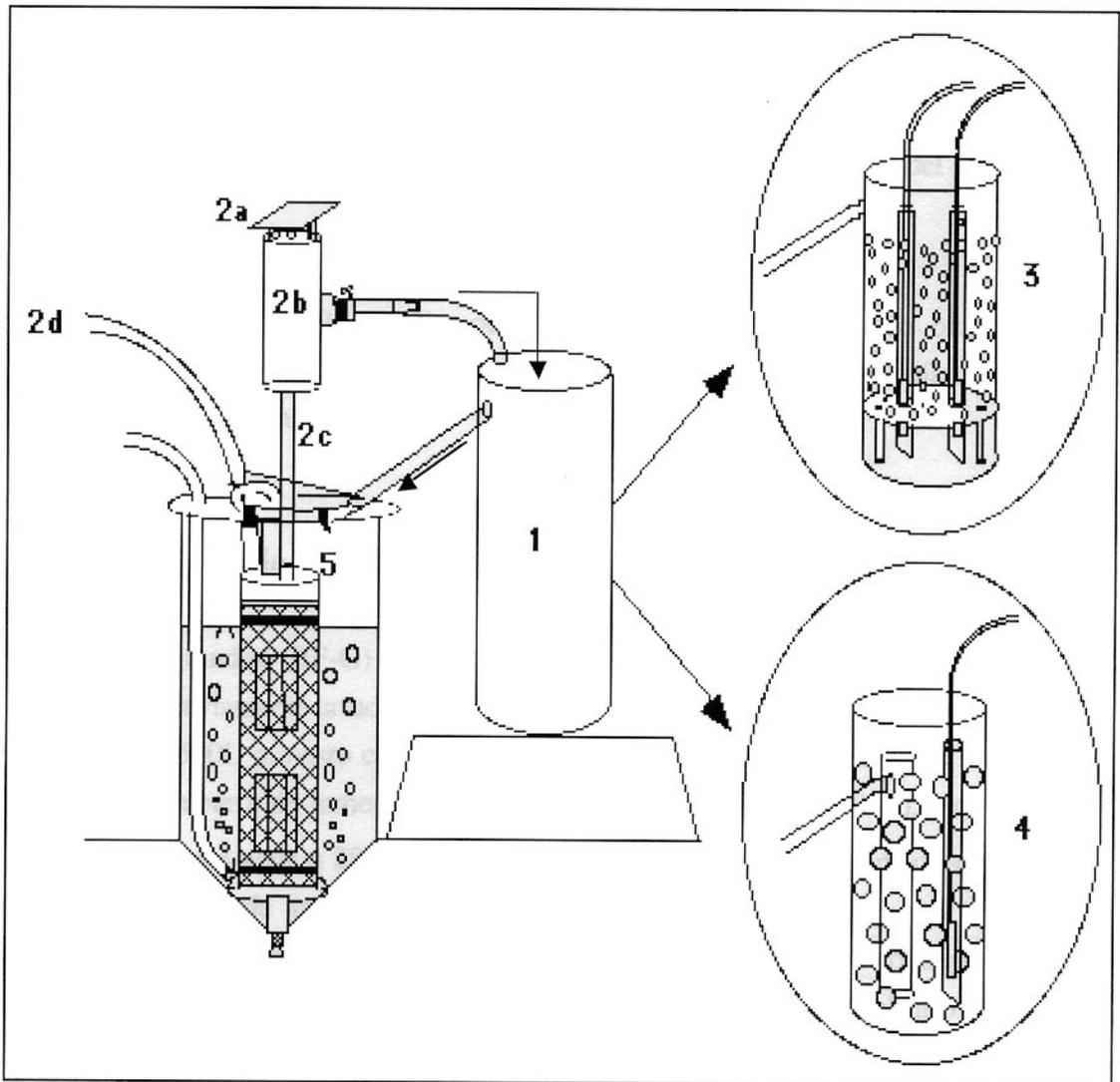


Figura 10. Sistema de recirculación: (1) Biofiltro; (2) Air-lift (a) cubierta, (b) tubo reservorio, (c) Tubo de PVC y (d) Línea de aire; (3) Biofiltro con piedras pequeñas (BF-P); (4) Biofiltro con piedras grandes (BF-G) y (5) Tanque de cultivo.

## 2.2. EL BIOFILTRO

### 2.2.1. Aclimatación

Antes de activar un biofiltro que nunca se ha utilizado, se debe aclimatar (tiempo que le toma a la bacteria adaptarse al medio) y acondicionar (el medio ideal para las bacterias nitrificantes), para que empiece a funcionar. Para colonizar las piedras con las bacterias nitrificantes, es posible inocular el biofiltro con el 10% del volumen total de piedras tomadas de un filtro en operación (Dhert *et al.*,1991). El acondicionamiento de las bacterias es necesario para que crezcan hasta concentraciones en las que puedan aprovechar en buena medida los productos de desecho que provienen del sistema de cultivo.

Según Van Gorder (1994), el tiempo aconsejable para que el nuevo biofiltro sea aclimatado y alcance los niveles requeridos de nitrificación de amoníaco a nitrito fluctúa entre 4 y 6 semanas.

### 2.2.2. Activación de bacterias nitrificantes

Las piedras grandes (BF-G) fueron recolectadas en Olón y colocadas en baldes de 10L, siendo previamente lavadas y desinfectadas. Estos baldes se colocaron dentro de un tanque de 500L provisto con un sistema de recirculación para cada biofiltro y un termostato con barra de inmersión de titanio (Jakko, modelo RL-100 N), manteniendo la temperatura del agua a 28°C. A cada balde se le aplicaron 10 ppm de cloruro de amonio; después de tres semanas se tomaron muestras de agua para medir la concentración de amonio, obteniendo 0.2 mg/l, esta disminución de la concentración de amonio es el resultado de la presencia de bacterias nitrificantes en el biofiltro.

Las poblaciones bacterianas de los biofiltros se mantuvieron añadiendo 0.1g de cloruro de amonio (Dhert *et al.* 1991), considerando que el amonio es convertido en nitrito por las bacterias *Nitrosomonas*. Luego de 24 horas, se añadió 0.1 g de nitrito de sodio para estimular el crecimiento de las bacterias *Nitrobacter* que convierten el nitrito en nitrato. Esta rutina se efectuaba cada semana.

Las piedras pequeñas de los biofiltros (BF-P), se tomaron de un filtro en funcionamiento, siguiendo la misma rutina de mantenimiento que en los BF-G. Las unidades de cultivo estuvieron listas para ser utilizadas una vez que el amonio y el nitrito estuvieron completamente procesados (Dhert, 1991).

### 2.2.3. Funcionamiento del biofiltro

#### 2.2.3.1. Biofiltro con piedras pequeñas (BF-P)

Para el diseño del biofiltro BF-P se tomó como referencia el modelo explicado por Léger *et al.* (1987) para *Mysidopsis bahia*. Este consistió en un balde de 10L que contenía las piedras pequeñas (figura 10). En el interior del balde se colocaron dos tubos de PVC de 2 cm de diámetro y 27 cm de largo que atravesaban un trasfondo de 18 cm de diámetro, el cual sostenía las piedras. En el interior de estos tubos se colocaron dos mangueras provistas con piedras difusoras, las mismas que funcionan como “air-water-lift” para que el agua se homogenice dentro del biofiltro y después regrese al tanque de cultivo por gravedad (foto 3).

#### 2.2.3.2. Biofiltro con piedras grandes (BF-G)

El diseño para el biofiltro de BF-G fue adaptado del sistema descrito por Dhert *et al.* (1991), para rodaballo, utilizando tanques cónicos oscuros de polietileno de 100L de capacidad.

En el diseño ya adaptado (figura 10), el agua se eleva desde el tanque a cada una de las unidades del biofiltro mediante un “air-water-lift”. El biofiltro está constituido por un balde de 10L que contenía las piedras grandes. En el interior del balde se colocó un tubo de PVC, de 2.5cm de diámetro y 32cm de largo con una manguera provista de una piedra difusora para homogenizar el agua en el biofiltro. Adicionalmente se colocó otro tubo de 5 cm de diámetro y 27cm de largo, con un orificio en la parte superior conectado a una manguera corta por la cual se evacuaba el agua filtrada recolectada desde la parte inferior del biofiltro y por gravedad, regresaba al tanque de cultivo ( foto 3).

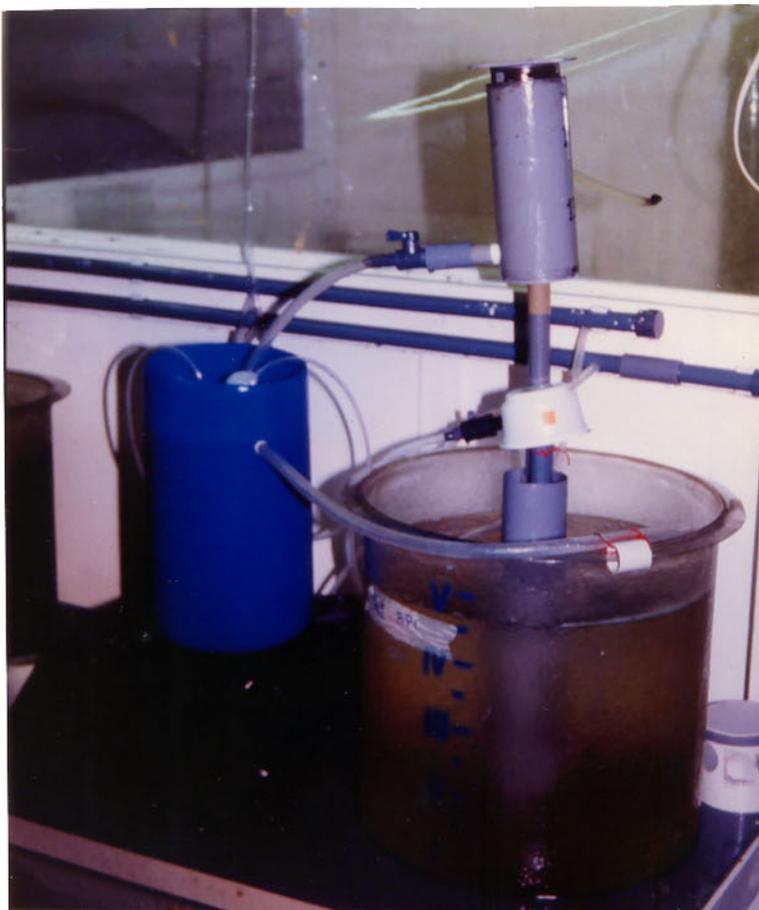


Foto 3. Funcionamiento del Biofiltro

#### 2.2.3.3. Diferencias entre los biofiltros de piedras grandes y pequeñas

El área de fijación de las bacterias en las piedras pequeñas es mayor que el de las piedras grandes, debido a la mayor superficie disponible en las piedras pequeñas.

En cuanto al alimento (algas y *Artemia*), en las piedras pequeñas éste quedaba retenido en la superficie de las mismas debido a que los espacios intersticiales de este sustrato son de menor tamaño que la partícula alimenticia, condición contraria a la presentada en los biofiltros de piedras grandes, donde el agua con el alimento circulaba dentro del biofiltro antes de regresar al tanque de cultivo. Según Dhert *et al.* (1991) no es recomendable utilizar rotíferos (*Brachionus plicatilis*) como alimento en sistemas de recirculación, debido a que los rotíferos forman una masa o se agrupan después de pasar por la bomba y el biofiltro y por consiguiente no están disponibles para ser consumidos.

## 2.3. SISTEMA DE CULTIVO

### 2.3.1. Tanques y manejo del cultivo

El sistema de cultivo constó de 12 tanques cónicos de 50L de fibra de vidrio. Se trabajó con un volúmen de agua de mar de 45L.

De éstos, cuatro funcionaron como controles, donde se realizó la cría normal sin biofiltros, solamente con alimentación y recambio de agua diario. Para el recambio de agua se utilizaba agua proveniente de un tanque reservorio de PVC de 1Ton, con una temperatura constante de 28°C mantenida por dos termostatos con barras de inmersión de titanio (Jakko, modelo RL-100 N). Para suministrar oxígeno al tanque reservorio se utilizó un sistema de aereación con piedras difusoras. En los controles la renovación de agua se realizó bajando el nivel hasta 10L por medio de un tubo sifón de PVC de 7cm de diámetro con cuatro aberturas de 10cm de largo x 6cm de ancho, cubierto con malla nitex de diferente diámetro, dependiendo del estadio larvario del camarón, así, desde Zoea 3 hasta Mysis 1 se utilizó una malla de 200  $\mu\text{m}$ ; para Post-larva 1,2,3,4, una malla de 300  $\mu\text{m}$  y de 600  $\mu\text{m}$  para Post-larva 5. En el interior del sifón se colocó una manguera plástica de 1 cm de diámetro a través de la cual se succionaba el agua del tanque de cultivo (figura 11). Luego del recambio se llenaban los tanques con agua nueva utilizando una red de distribución interna instalada en la sala del bioensayo. Finalmente, se controlaba el flujo de entrada de agua a cada tanque con válvulas plásticas de medio giro (9/12”).

En los ocho tanques restantes se instalaron los sistemas de recirculación experimentales, cuatro tanques con los biofiltros BF-P y cuatro con los biofiltros BF-G. Se colocó en los tanques un tubo de PVC con medidas similares a las del sifón anteriormente descrito, con malla nitex para evitar que se succione las larvas cuando el “air-water-lift” empiece a funcionar (figura 10). En la parte inferior de este tubo y alrededor del mismo, se colocó una manguera con pequeños agujeros para suplir de oxígeno al tanque de cultivo.

En los controles el porcentaje de renovación de agua fue del 80% una vez al día, mientras que en los biofiltros se mantuvo un flujo continuo de 448% diario.

Tanto en los tanques con biofiltros como en los controles se sifonó diariamente el

fondo después de haber detenido la aereación durante 20 minutos. El sifoneo se efectuaba utilizando una varilla de vidrio de 4mm de diámetro conectada con una manguera de 6mm de diámetro (figura 11), recolectando el material de desecho en un beaker de 2L, para poder separar las larvas que pasaban en el momento del sifoneo y devolverlas al tanque cultivo.

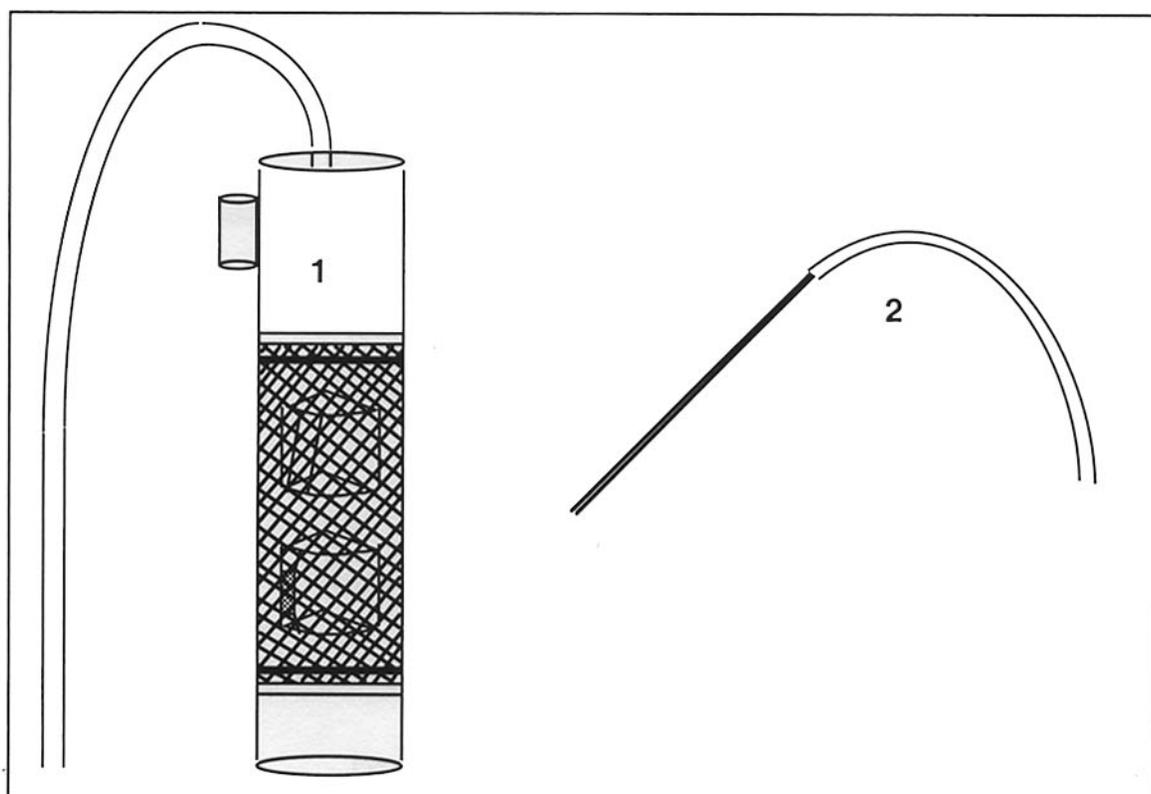


Figura 11. (1) Sistema de sifón y (2) Manguera para sifonear.

### 2.3.2. Siembra

Antes del arribo de las larvas para el experimento, se procedió a la desinfección de todos los materiales.

Para la primera prueba, los animales fueron obtenidos de un laboratorio y, para la segunda, de un desovadero de Esmeraldas. Se transportaron 100.000 nauplios (N5) de *Penaeus vannamei* hasta los laboratorios del CENAIM.

La recepción y tratamiento de los nauplios hasta el momento de la siembra, consistió en el siguiente esquema de trabajo: los nauplios se aclimataron por 4 horas en la caja de transporte, luego fueron sembrados en un tanque de 1Ton, a 28°C y 32 ppt de salinidad, alimentándolos con algas (*Chaetoceros* sp.) a una concentración de 100.000 cel/ml, controlando diariamente la temperatura en el tanque de cultivo (foto 4).



Foto 4. Siembra en un tanque de 1 Ton.

Después de 5 días de mantenimiento en el sistema antes descrito, se cosecharon y se procedió a sembrar las larvas en cada uno de los 12 tanques de cultivo a una densidad de 100 larvas/L (4500/tanque). La prueba se desarrolló durante 16 días a partir de Z2-Z3 hasta PL10 para el experimento 1 y para el experimento 2 duró 17 días.

#### 2.4. PARAMETROS FISICOS-QUIMICOS

Diariamente se registraron parámetros físicos como temperatura (T°C) (dos veces al día), oxígeno disuelto (O.D.), pH (una vez al día) y salinidad(una vez por semana).

Los instrumentos y equipos empleados para registrar dichos parámetros fueron:

- Termómetro de mercurio.
- Oxigenómetro, KAGAKU, modelo UC12.
- pHmetro, KAGAKU, modelo UC23.
- Refractómetro, ATAGO, modelo S-100

La calidad del agua fue monitoreada mediante un programa de análisis químicos, específicamente niveles de compuestos nitrogenados (Amoníaco total, Nitrito y Nitrato). Se tomaron las muestras para medición de amoníaco total en los siguientes estadíos larvarios: Z3-M1, M3-PL1, PL5 y PL10; de nitrito: Z3-M1, M3-PL1, PL5 y PL10 y nitrato en: PL5 y PL10, siempre antes de efectuar el recambio de agua, por la tarde. Las muestras tomadas se filtraron utilizando una bomba de filtración al vacío con una membrana Millipore de 25  $\mu\text{m}$  de porosidad, para posteriormente ser analizadas en el espectrofotómetro (DR-2000, modelo HACH): método de silicato para medir nitrógeno como amoníaco, método de reducción de cadmio para evaluar nitrato y el método de disociación utilizando almohadillas para evaluar nitrito (*Hanch Water Analysis Hand book, 2da. edición*).

El espectrofotómetro mide  $\text{NH}_3\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2\text{-N}$  y  $\text{NO}_3\text{-N}$ . Para determinar la cantidad de amoníaco no ionizado en la muestra una vez tomada la lectura como  $\text{NH}_3\text{-N}$  y medido temperatura ( $T^\circ\text{C}$ ) y el pH de la muestra, utilizamos la tabla de referencia y la siguiente ecuación para calcular el amoníaco no ionizado:

$$\frac{(\text{mg/l NH}_3\text{-N como N}) * (\text{valores de la tabla de referencia}) * 1.2}{100} = \text{mg/l NH}_3$$

Para obtener las concentraciones de  $\text{NO}_2^-$  multiplicamos por la constante 3.3 y para  $\text{NO}_3^-$  por 4.4.

## 2.5. ANALISIS MICROBIOLÓGICO

Se realizó un control de las poblaciones de bacterias, en especial aquellas que son frecuentes en los cultivos de larvas de camarón. Se tomaron las muestras en los estadios Z3-M1, M3-PL1, PL5 y PL10, siempre antes de efectuar el recambio de agua por la tarde. Las muestras tomadas se sembraron en agar, TCBS (THIOFULPHATE-CITRATE-BILESALTS-SUBCROSE AGAR) y agar TSA (TRIPRYPTICSOY-AGAR), para luego de 24 horas proceder al conteo de las colonias bacterianas.

## 2.6. ALIMENTACION

La alimentación consistió en algas (*Chaetoceros* sp.) en los estadios Z2 y Z3, y algas y *Artemia* desde M1 en adelante. La cantidad de algas disponibles en el sistema se reajustaba de acuerdo a los conteos diarios realizados tanto en la mañana como en la tarde, ambos experimentos se basaron en la tabla de alimentación adjunta (Tabla 5).

Debido a la pérdida de agua por evaporación en los sistemas con biofiltros fue necesario completar los niveles de agua en los tanques ya sea adicionando algas o agua filtrada, según sea el caso. La cantidad máxima que se adicionó diariamente fue de 2 litros.

Tabla 5. Alimentación de larvas desde Z3 hasta PL10

Estadio	Algas (cél/ml)	Artemia (nauplios/ml)
Z2-Z3	150.000	
Z3	150.000	
Z3-M1	75.000	0.1
M1	75.000	0.25
M1-M2	50.000	0.5
M2	50.000	0.75
M2-M3	25.000	1
M3	25.000	1.25
M3-PL1	10.000	1.5
PL1	10.000	2.5
PL2	10.000	3.75
PL3-PL10	10.000	5

## 2.7. PARAMETROS DE EVALUACION DEL CULTIVO

Para determinar el índice de estadio larvario se colectaron 20 larvas por tanque hasta el estadio PL1, las mismas que fueron observadas al microscopio e identificandolas el estadio. A cada estadio se le asignó un número referencial: Z3=3, M1=4, M2=5, M3=6 y PL1=7, los cuales se multiplicaba por el número de larvas de acuerdo al estadio que presentaban en el tanque de cultivo y finalmente se dividió para el número total de larvas del tanque.

La supervivencia fue estimada diariamente recolectando dos muestras en puntos distintos de cada tanque utilizando un vaso de precipitación plástico de 250 ml desde el estadio Z3 hasta el estadio PL1.

Para determinar el peso seco se tomaron 3 muestras de 15 larvas, las mismas que fueron lavadas con agua dulce para colocarse inmediatamente en una estufa (ISUZU, modelo 2-2097) a una temperatura de 60°C, pesándolas después de 24 horas en una balanza analítica (METTLER, modelo CAE240).

Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA), se tomó un nivel de significancia del 95% ( $P < 0.05$ ) para la aceptación o rechazo de la hipótesis nula.

## 2.8. SALA DE BIOENSAYO

La sala de bioensayo fue construida con paredes de cemento, sellando puertas y ventanas para impedir el ingreso del aire del exterior, la sala estaba equipada con un calentador eléctrico (TIBIN modelo 1200 W) que permitió regular la temperatura del ambiente, además de un sistema autónomo de distribución de agua con un intercambiador de temperatura que permitió ajustar la misma según los requerimientos del bioensayo. El agua que ingresaba al sistema era previamente filtrada con una batería de tres filtros de cartucho (piola de algodón) ADVANTEC de  $5 \mu\text{m}$  el primero,  $3 \mu\text{m}$  el segundo y  $0.5 \mu\text{m}$  el tercero, para pasar posteriormente a través de lámparas ultravioleta (ACUANETICS modelo 60IL) para su desinfección. El área física de la sala es de 6.5 X 6.7m.

El sistema de distribución de aire estaba conectado al sistema principal de aereación del CENAIM.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### 3.1. PARAMETROS FISICOS-QUIMICOS

La tabla 6 muestra los valores promedio de T°C, pH y O.D. durante la fase experimental de cada experimento.

Tabla 6. Parámetros físicos determinados para los tres tratamientos

<b>EXPERIMENTO 1</b>				
	<b>T°(C)</b>		<b>pH</b>	<b>OD (mg/l)</b>
	<b>8h:00</b>	<b>14h:00</b>		
BF-P	28.22 <sup>a</sup> ±0.46	28.31 <sup>a</sup> ±0.37	8.15 <sup>a</sup> ±0.34	7.32 <sup>a</sup> ±0.36
BF-G	28.44 <sup>a</sup> ±0.45	28.44 <sup>a</sup> ±0.38	8.16 <sup>a</sup> ±0.26	7.39 <sup>a</sup> ±0.38
CON	28.99 <sup>b</sup> ±0.26	28.94 <sup>b</sup> ±0.22	8.15 <sup>a</sup> ±0.35	7.44 <sup>a</sup> ±0.34
<b>EXPERIMENTO 2</b>				
	<b>T°(C)</b>		<b>pH</b>	<b>OD (mg/l)</b>
	<b>8h:00</b>	<b>14h:00</b>		
BF-P	25.68 <sup>a</sup> ±0.41	26.26 <sup>a</sup> ±0.18	8.01 <sup>ab</sup> ±0.03	6.98 <sup>a</sup> ±0.16
BF-G	26.06 <sup>b</sup> ±0.14	26.32 <sup>a</sup> ±0.11	7.97 <sup>a</sup> ±0.01	6.81 <sup>a</sup> ±0.15
CON	26.50 <sup>c</sup> ±0.15	26.80 <sup>b</sup> ±0.12	8.04 <sup>b</sup> ±0.05	6.85 <sup>a</sup> ±0.19

Valores en la misma columna con igual superíndice no son significativamente diferente (Scheffe,  $p > 0.05$ ).

### 3.1.1. **pH**

Los valores diarios de pH obtenidos durante el primer experimento no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos. En el experimento 2, el tratamiento BF-G presentó valores de pH significativamente menores a los del tratamiento BF-P y control (tabla 6).

Sin embargo en ambos experimentos los valores de pH fluctuaron entre 7.97-8.16, rango aceptable para el cultivo de larvas de *P. vannamei*, según Arellano (1990) entre 7.5-8.2 y dentro del rango óptimo para el proceso de nitrificación del biofiltro, según Wheaton *et al.* (1991) entre 7.0-9.0.

### 3.1.2 **Oxígeno disuelto (OD)**

Los valores de oxígeno disuelto no muestran diferencias significativas entre los tres tratamientos manteniéndose en ambos experimentos sobre los 6.81 mg/l (tabla 6), valor superior al mínimo aceptable para el cultivo de larvas de *P. vannamei*, 5.0 mg/l (Arellano, 1990). El agua en el interior del biofiltro se encontraba en continua recirculación con la ayuda de piedras difusoras, suministrando suficiente oxígeno a las bacterias nitrificantes, por lo que se puede asumir que el oxígeno no fue un factor limitante para el proceso de la nitrificación.

### 3.1.3. **Temperatura (T°C)**

En el experimento 1, los valores de temperatura registrados para los tratamientos de biofiltros eran significativamente menores a los del control (gráfico 1 y tabla 6). En el experimento 2, los valores de temperatura presentaron diferencias significativas entre los tratamientos resultando más alto en el control (tabla 6).

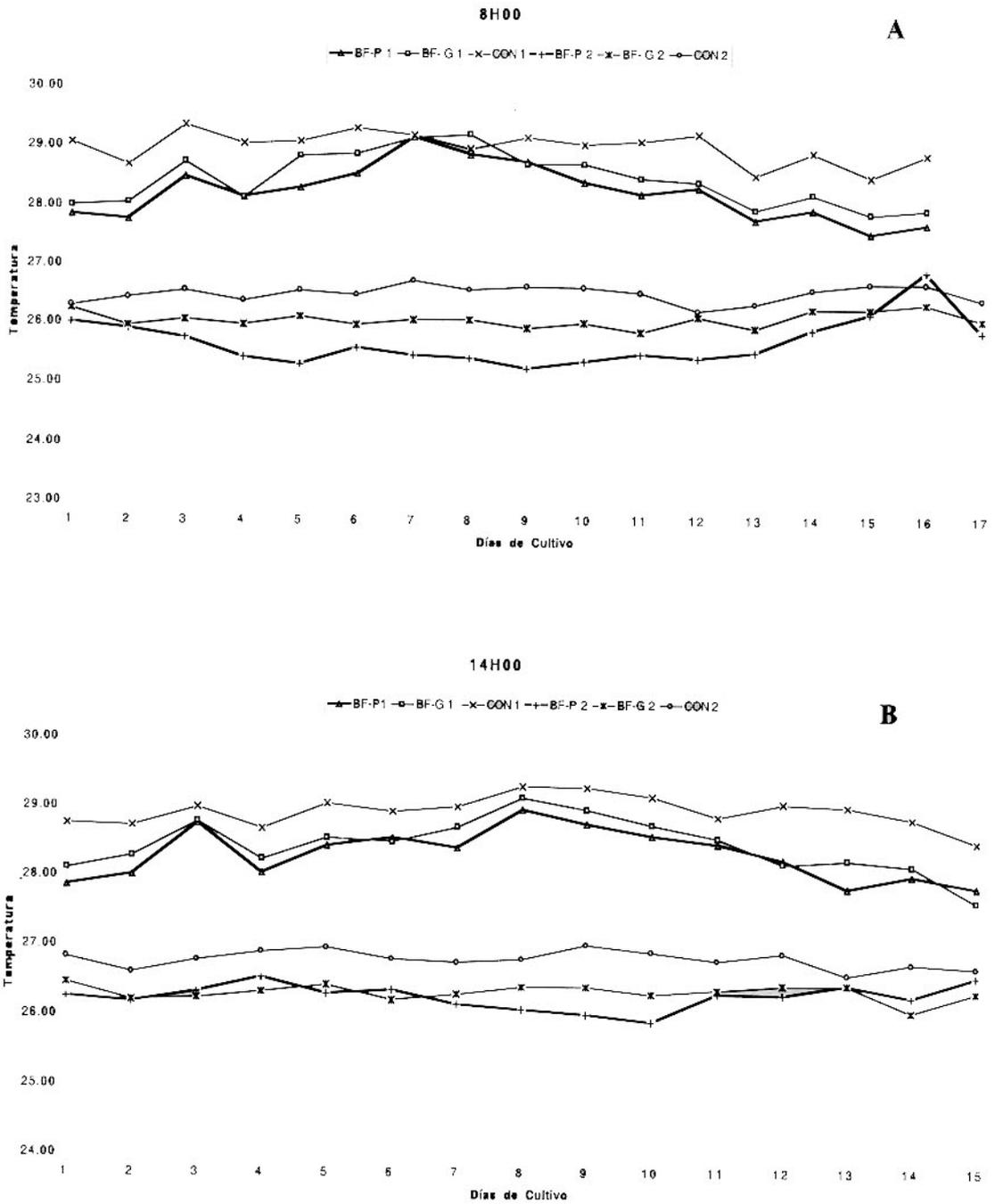


Gráfico 1. Fluctuaciones diarias de la temperatura durante el experimento 1 y 2 (A) en la mañana (B) en la tarde.

A pesar de las diferencias arriba mencionadas, todos los tratamientos se mantuvieron dentro del rango aceptable para la cría de larvas de camarón, 23<sup>o</sup>-30<sup>o</sup>C (Wyban y Sweeney, 1991). Los datos del primer experimento fluctúan alrededor de 28.99<sup>o</sup>C. En cambio, en el segundo experimento el valor máximo es de 26.80<sup>o</sup>C, debido a que la temperatura ambiental fue más baja durante la ejecución del segundo experimento.

En ambos experimentos la T<sup>o</sup>C fluctuó dentro del rango óptimo para las bacterias nitrificantes, esto es 10<sup>o</sup>C - 30<sup>o</sup>C Wheaton *et al.* (1991). Wheaton *et al.* (1994) afirman que las bacterias nitrificantes se adaptan a una temperatura variada si se les da el tiempo necesario.

#### 3.1.4. **Salinidad**

La salinidad en los tres tratamientos se mantuvo en el rango de 33-34 ppt. En el control la salinidad permaneció constante, mientras que en los tanques con biofiltros hubo una variación aproximada de 1ppt, debido principalmente a la evaporación, porque en sistema cerrado no hay renovación del agua. Sin embargo la adición diaria de dos litros de algas, compensó las pérdidas por evaporación.

La salinidad óptima para la cría de larvas se encuentra entre 28 y 35 ppt Arellano (1990), es decir que la salinidad obtenida en los tanques de cultivo de todos los tratamientos se encuentra en los rangos adecuados según la literatura.

Los filtros nitrificantes pueden operar en un amplio rango de salinidades, desde 0 ppt hasta 40 ppt, siempre y cuando se trabaje con bacterias adaptadas a las condiciones del sistema (Wheaton *et al.*, 1994).

#### 3.1.5. **Amoníaco total**

El gráfico 2 muestra que los niveles de amonio aumentan paulatinamente a medida que las larvas crecen, debido al aumento de la materia orgánica en el tanque de cultivo.

Los controles presentaron niveles de amoníaco total significativamente mayores que los otros dos tratamientos, en el primer experimento en el estadio PL1 y en el segundo experimento en PL10, (tabla 7). Esto nos garantizó el buen funcionamiento de los biofiltros.

Los biofiltros BF-P funcionaron mejor que los BF-G, en ciertos estadios larvales, manteniendo más baja las concentraciones de amonio.

El nivel máximo de amoníaco total obtenido en los biofiltros en el experimento 1 es 0.21 ppm, mientras que en el segundo experimento es 0.115ppm. La literatura menciona un nivel máximo aceptable de 0.10ppm para postlarvas de *Peneidos*, (Wickins, 1976), concentraciones mayores originan una reducción del crecimiento del 1-2% para 5 especies de *Penaeus*. Sin embargo, podemos concluir que los niveles de 0.21 y 0.115 ppm alcanzados en el primer y segundo no afectaron a la supervivencia ni al crecimiento de las post-larvas.

Tabla 7. Concentración de amonio (mg/l) en los diferentes estadíos para el experimento 1 y el experimento 2

<b>EXPERIMENTO 1</b>			
	<b>BF-P</b>	<b>BF-G</b>	<b>CON</b>
Z3	0.145 <sup>a</sup> ± 0.055	0.150 <sup>a</sup> ±0.02	0.118 <sup>a</sup> ±0.030
PL1	0.038 <sup>a</sup> ± 0.010	0.115 <sup>b</sup> ±0.006	0.198 <sup>c</sup> ±0.022
PL5	0.143 <sup>a</sup> ± 0.013	0.163 <sup>a</sup> ±0.015	0.163 <sup>a</sup> ±0.026
PL10	0.210 <sup>ab</sup> ± 0.029	0.205 <sup>b</sup> ±0.013	0.250 <sup>a</sup> ±0.018
<b>EXPERIMENTO 2</b>			
	<b>BF-P</b>	<b>BF-G</b>	<b>CON</b>
Z3	0.009 <sup>a</sup> ±0	0.005 <sup>a</sup> ±0.007	0.005 <sup>a</sup> ±0.007
PL1	0 <sup>a</sup>	0.045 <sup>b</sup> ±0.007	0.020 <sup>ab</sup> ±0.014
PL5	0.055 <sup>a</sup> ±0.049	0.115 <sup>a</sup> ±0.007	0.215 <sup>a</sup> ±0.02
PL10	0.090 <sup>ab</sup> ±0.014	0.215 <sup>a</sup> ±0.02	0.200 <sup>b</sup> ±0.04

Valores en la misma fila con igual superíndice no son significativamente diferente (Scheffe,  $p>0.05$ ).

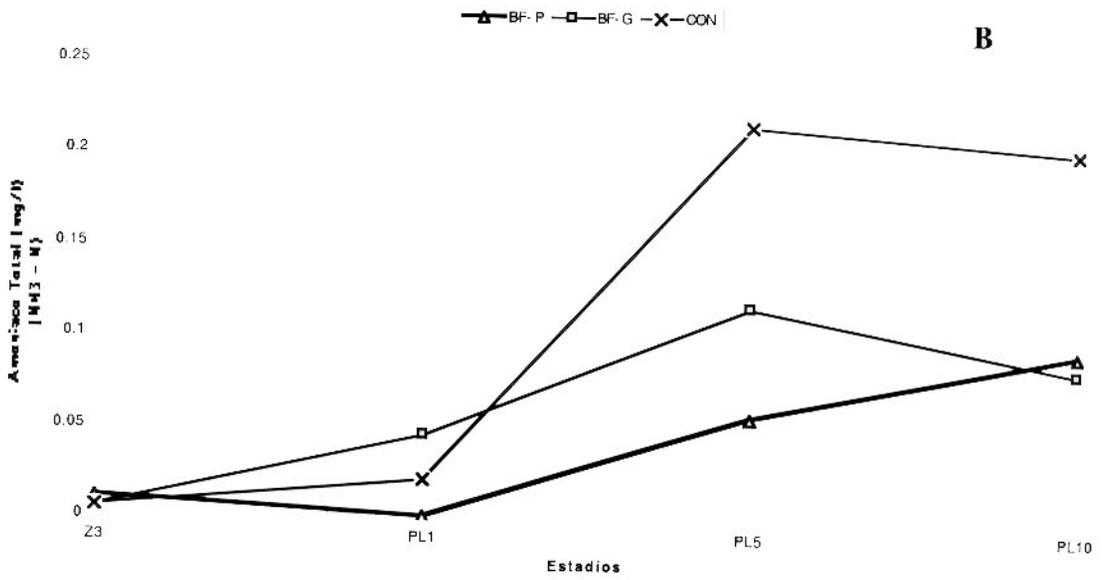
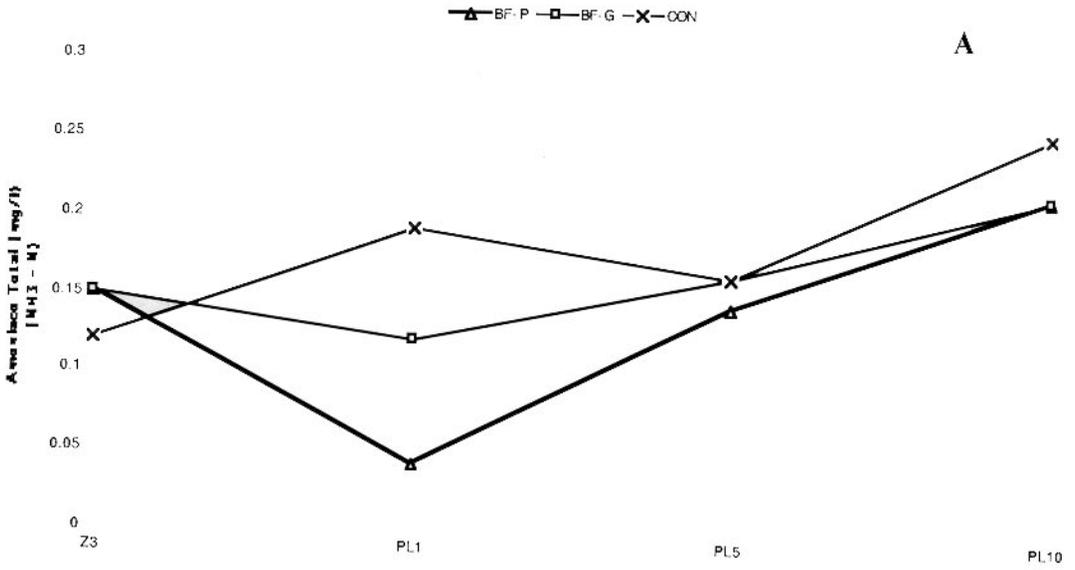


Gráfico 2. Concentraciones de amonio (mg/l) en los diferentes estadios.  
(A) experimento 1 y (B) experimento 2

### 3.1.6. Nitrito

Ambos tratamientos presentaron niveles de nitrito altos (gráfico 3 y tabla 8). Esto indica una falla del proceso de conversión de  $\text{NO}_2$  a  $\text{NO}_3$  debido, posiblemente a una cantidad insuficiente de bacterias *Nitrobacter*.

Sin embargo al final de los experimentos no se encontraron diferencias en el crecimiento de los animales, lo cual indican que los niveles de  $\text{NO}_2$  no causaron un efecto negativo en las larvas, aunque la literatura (Colt *et al.*,1992) muestra que una concentración de Nitrito de 1.36ppm causa una reducción del 1% en el crecimiento de postlarvas de peneidos, en ambos experimentos se superó este nivel (en el primer experimento se llegó a un máximo de 4.575 ppm y en el segundo experimento un máximo de 2.696 ppm).

Tabla 8. Concentraciones de nitrito (mg/l) en los diferentes estadios para el experimento 1 y el experimento 2

<b>EXPPERIMENTO 1</b>			
	<b>BF-P</b>	<b>BF-G</b>	<b>CON</b>
Z3	0.008 <sup>a</sup> ±0.002	0.026 <sup>b</sup> ±0.011	0.028 <sup>b</sup> ±0.009
PL1	0.009 <sup>a</sup> ±0.005	0.166 <sup>b</sup> ±0.056	0.010 <sup>a</sup> ±0.001
PL5	0.038 <sup>a</sup> ±0.032	0.840 <sup>b</sup> ±0.099	0.005 <sup>a</sup> ±0.005
PL10	1.188 <sup>a</sup> ±0.676	4.575 <sup>b</sup> ±0.601	0.113 <sup>a</sup> ±0.025
<b>EXPERIMENTO 2</b>			
	<b>BF-P</b>	<b>BF-G</b>	<b>CON</b>
Z3	0 <sup>a</sup> ±0	0 <sup>a</sup> ±0	0 <sup>a</sup> ±0
PL1	0.008 <sup>a</sup> ±0.001	0.957 <sup>a</sup> ±0.009	0.003 <sup>a</sup> ±0
PL5	0.361 <sup>a</sup> ±0.120	1.085 <sup>b</sup> ±0.446	0.005 <sup>b</sup> ±0,0014
PL10	0.514 <sup>a</sup> ±0.609	2.696 <sup>a</sup> ±2.495	0.005 <sup>a</sup> ±0.001

Valores en la misma fila con igual: superíndice no son significativamente diferente (Scheffe, P>0.05).

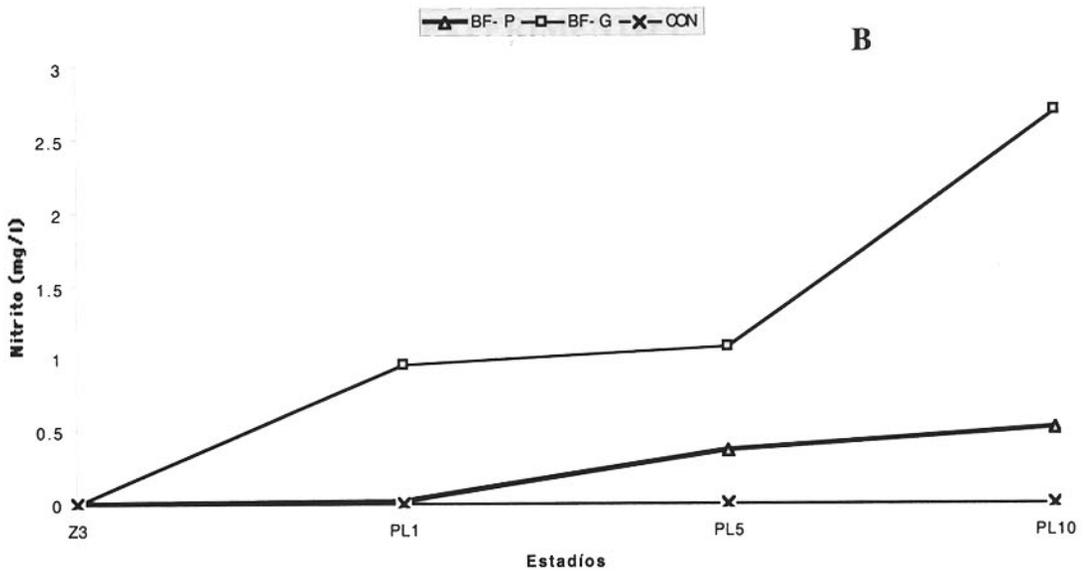
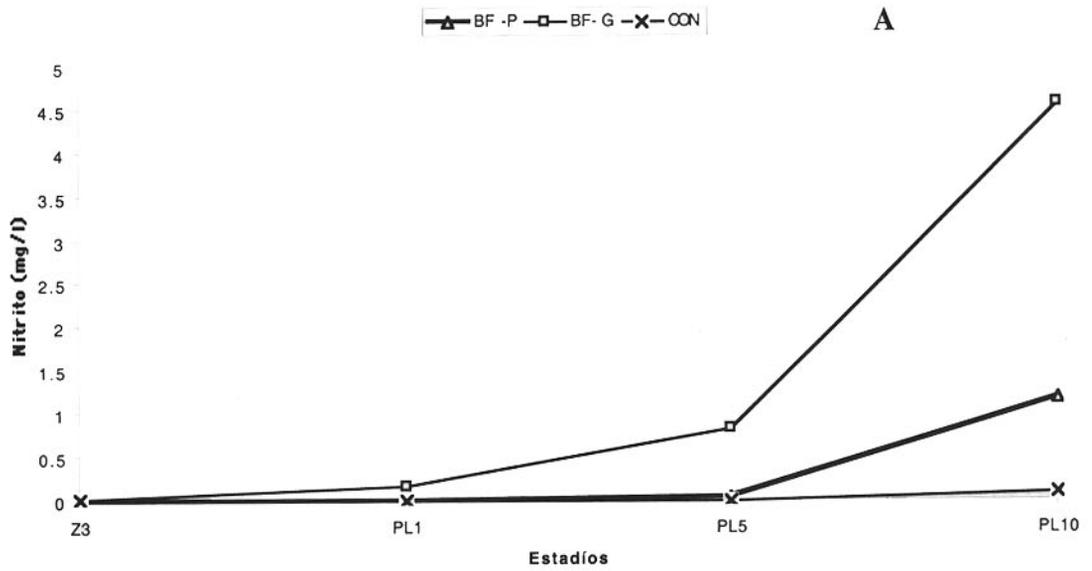


Gráfico 3. Concentraciones de nitrito (mg/l) en los diferentes estadíos (A) experimento 1 y (B) experimento 2.

### 3.1.7. **Nitrato**

Se realizaron mediciones de nitrato en los estadios finales del ciclo de cultivo para determinar la cantidad que se acumulaba en el sistema y poder realizar una renovación total del agua del filtro, en caso que se llegue a niveles muy altos.

En ambos experimentos el nivel de nitrato no superó los 200ppm, valor considerado como el nivel máximo aceptable para *P. monodon* Wickins (1976) En el primer experimento el nivel máximo fue de 20mg/l y en el segundo experimento 12.5 mg/l (tabla 11). No se observaron diferencias entre los dos biofiltros, sin embargo el control presentó concentraciones significativamente menores en los estadios PL5 y PL10 (tabla 9).

Tabla 9. Concentraciones de nitrato (mg/l) en los estadios PL5 y PL10, para el experimento 1 y el experimento 2

<b>EXPERIMENTO 1</b>			
	<b>BF-P</b>	<b>BF-G</b>	<b>CON</b>
PL5	10.625 <sup>a</sup> ± 4.608	13.375 <sup>a</sup> ± 6.210	6.400 <sup>b</sup> ± 0.868
PL10	20 <sup>a</sup> ± 0	19.370 <sup>a</sup> ± 1.250	2.750 <sup>b</sup> ± 0.646
<b>EXPERIMENTO 2</b>			
	<b>BF-P</b>	<b>BF-G</b>	<b>CON</b>
PL5	6.0 <sup>a</sup> ± 0	6 <sup>a</sup> ± 0	1.350 <sup>b</sup> ± 0.212
PL10	11.700 <sup>a</sup> ± 7.49	12.5 <sup>a</sup> ± 0.707	1.1 <sup>b</sup> ± 0.707

Valores en la misma fila con igual superíndice no son significativamente diferente (Scheffe, p>0.05).

### 3.2. PARAMETROS BIOLOGICOS

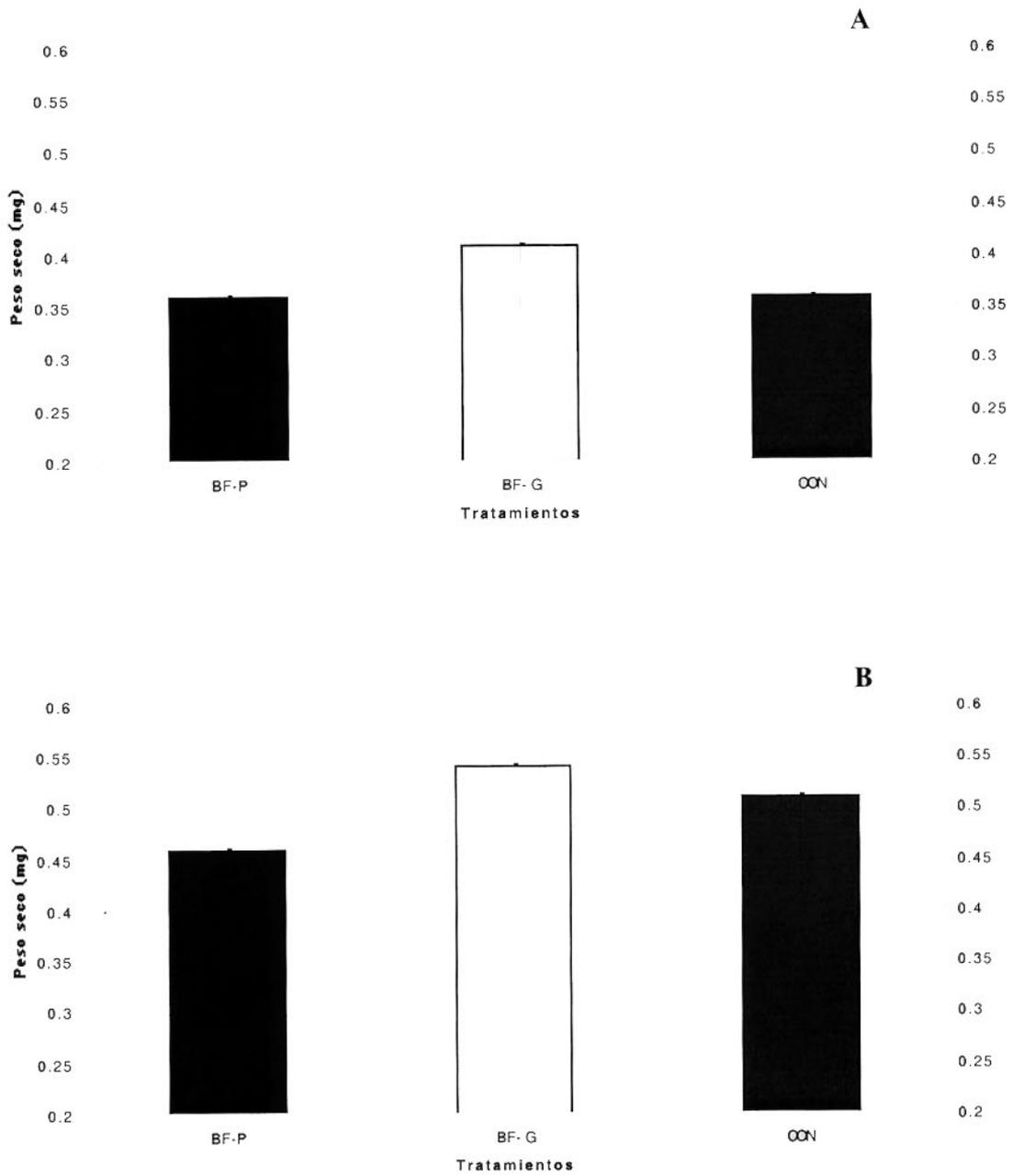
#### 3.2.1. Peso seco

Se determinó el peso seco de los animales sobrevivientes en el estadio PL10. En ambos experimentos la mayor biomasa se obtuvo en el tratamiento BF-G, sin embargo, no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos y el control (gráfico 4, tabla 10).

Tabla 10. Peso seco (mg), de larvas en PL10

	<b>EXPERIMENTO 1</b>	<b>EXPERIMENTO 2</b>
	<b>Peso seco (mg)</b>	<b>Peso seco (mg)</b>
BF-P	0.36 <sup>a</sup> ± 0.035	0.465 <sup>a</sup> ± 0.06
BF-G	0.41 <sup>a</sup> ± 0.061	0.545 <sup>a</sup> ± 0.03
CON	0.36 <sup>a</sup> ± 0.045	0.518 <sup>a</sup> ± 0.06

Valores en la misma columna con igual superíndice significativamente diferente (Scheffe, P>0.05).



### 3.2.2. Supervivencia

Para calcular la supervivencia al final del experimento (PL10) se contó exactamente cuantas larvas todavía sobraron.

En los 2 experimentos no hubo diferencias significativas entre el control con los tratamientos (gráfico 5, tabla 11). En el primer experimento se observó una supervivencia  $\pm 35$ . Un factor dominante para la baja supervivencia fue la presencia durante el experimento de bolitas.

En el segundo experimento la supervivencia fue más alta que el experimento anterior, porque no hubo presencia de bolitas. Solo se observó luminiscencia en los controles en poca cantidad de larvas.

Tabla 11. Supervivencia (%) de larvas en PL10

Tratamientos	Supervivencia (%)	
	Exp. 1	Exp. 2
BF-P	35.34 <sup>a</sup> $\pm$ 4.90	49.76 <sup>a</sup> $\pm$ 6.59
BF-G	35.64 <sup>a</sup> $\pm$ 5.28	52.16 <sup>a</sup> $\pm$ 5.58
CON	37.48 <sup>a</sup> $\pm$ 3.04	52.22 <sup>a</sup> $\pm$ 3.98

Valores en la misma columna con igual superíndice significativamente diferente (Scheffe,  $P > 0.05$ ).

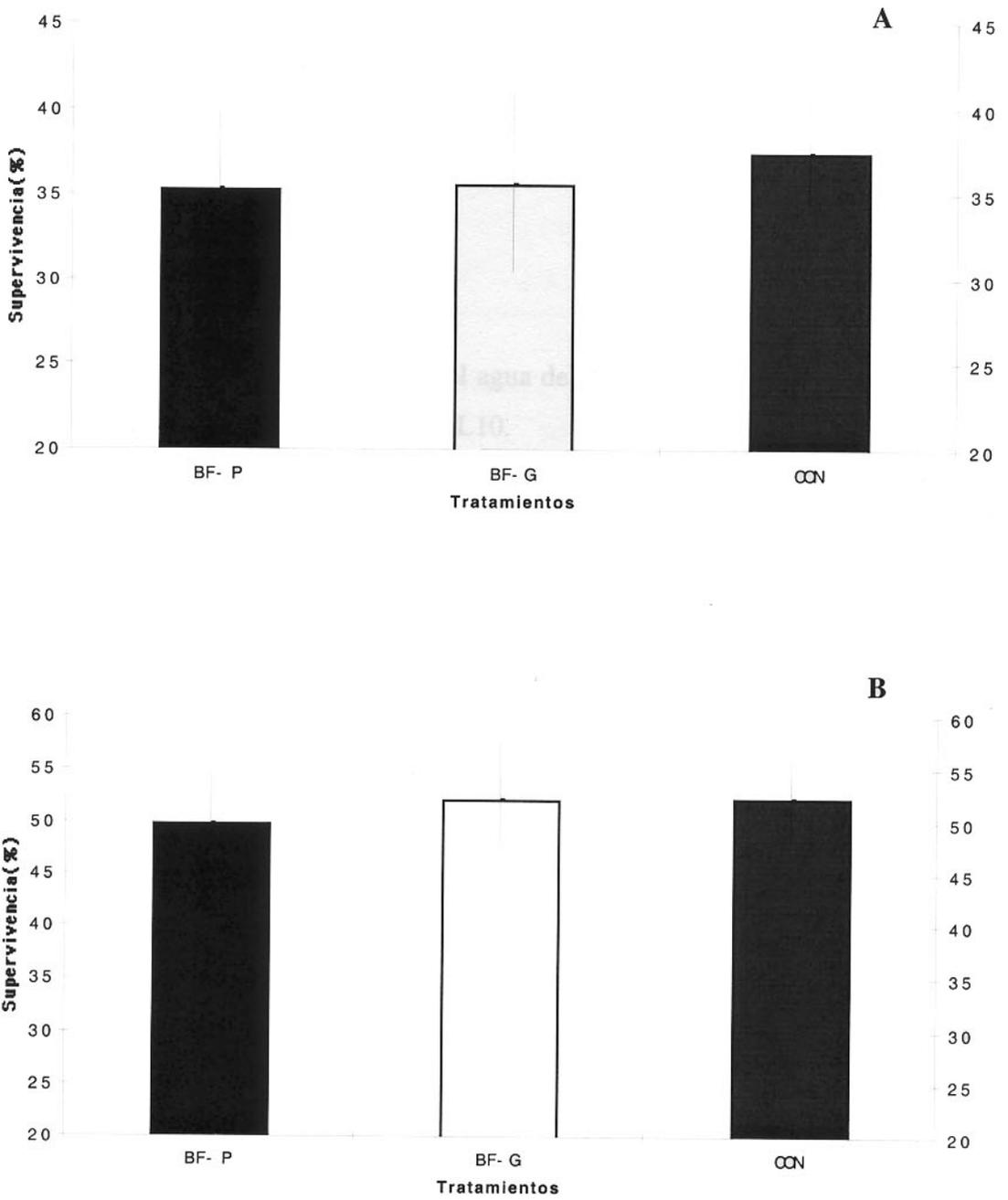


Gráfico 5. Supervivencia en PL10 (promedio y desviación estandar)(%). (A) experimento 1 y (B) experimento 2.

### 3.2.3. Índice de estadio larvario (IEL)

El IEL no presentó diferencias entre los tratamientos en cada uno de los experimentos. Sin embargo en el experimento 2 se pudo observar que el desarrollo de las larvas es menor en comparación con el anterior experimento probablemente a causa de la baja temperatura ambiental dando como resultado el aumento un día más en el cultivo.

### 3.2.4. Análisis microbiológico

Se realizaron análisis microbiológico del agua de los tanques, cuatro veces durante la corrida en los estadios Z3, PL1, PL5, y PL10.

Como se puede observar en el gráfico 6A, hay un aumento en los niveles bacterianos a medida que el cultivo avanza, siendo éste más relevante en el segundo experimento. Se observó la misma tendencia en los controles a excepción del estadio PL1 en el primer experimento, en donde se pudo apreciar una gran diferencia entre el tratamiento BF-G y el control, debido a la presencia de bacterias luminiscentes en el BF-G. En el estadio PL10 la cantidad de bacterias totales disminuyó para los tres tratamientos.

En el experimento 2, el tratamiento BF-G estadio PL1 presentó una menor cantidad de bacterias totales en comparación con el control y el tratamiento BF-P, nivelándose después con los demás tratamientos. Aunque aumentó la cantidad de bacterias totales, esto no afectó la salud de las larvas, observando poca cantidad de luminiscencia en los controles.

La cantidad de bacterias totales obtenidas en los dos experimentos (tabla 12), se encuentra en el rango normal encontrado en diferentes laboratorios comerciales ( $10^4$  –  $10^5$  promedio durante el ciclo de cultivo, comunicación personales, 1995).

Tabla 12. Promedio de la cantidad de bacterias totales en el experimento 1 y el experimento 2

<b>EXPERIMENTO 1</b>			
	<b>BF-P</b>	<b>BF-G</b>	<b>CON</b>
Z3	1.65E+01	4.20E+01	2.00E+02
PL1	1.73E+02	1.00E+03	7.00E+01
PL5	2.24E+03	1.09E+03	9.67E+02
PL10	2.80E+02	1.80E+02	4.03E+02

<b>EXPERIMENTO 2</b>			
	<b>BF-P</b>	<b>BF-G</b>	<b>CON</b>
Z3	2.53E+02	2.58E+02	3.35E+02
PL1	4.00E+02	6.05E+01	2.45E+02
PL5	1.13E+03	2.90E+02	4.88E+02
PL10	2.37E+03	4.68E+03	1.47E+03

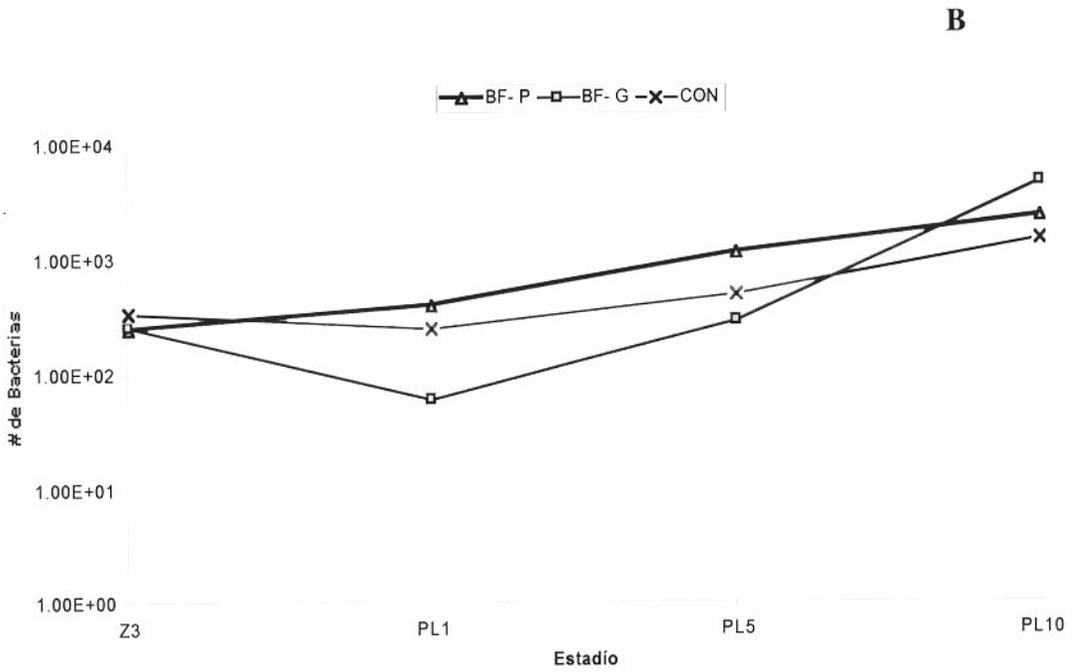
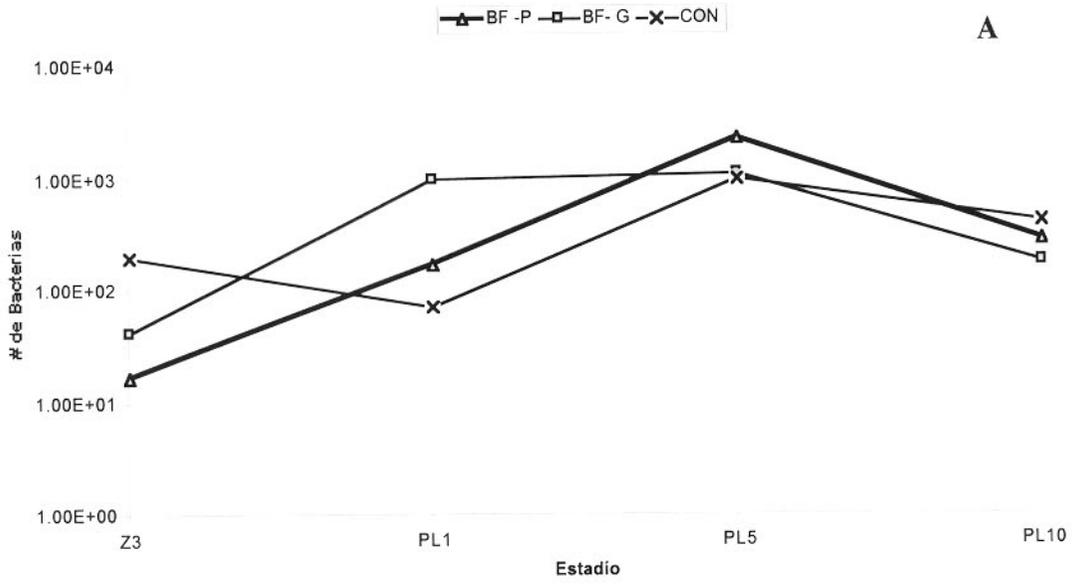


Gráfico 6. Carga bacteriana encontrada en los diferentes estadios durante el ciclo de cultivo. (A) experimento 1 y (B) experimento 2

## CONCLUSIONES

- Se concluye que ambos tipos de filtros biológicos armados en el sistema de recirculación con las dimensiones mencionadas, manejan exitosamente el nivel de amonio presente en el sistema desde Z2 hasta PL10, sin renovación constante de agua. Solo hubo diariamente un aporte de agua nueva por adición de algas, lo cual sirvió para mantener los niveles de agua en los tanques de cultivo.
- En cuanto a los parámetros físicos (temperatura, oxígeno disuelto y pH) se mantuvieron en rangos aceptables para el cultivo de camarones.
- En cuanto al análisis microbiológico concluimos que la cantidad de bacterias se encuentra en un rango aceptable en comparación con los muestreos realizados en laboratorios comerciales (comunicación personal, 1995).
- Desde el punto de vista de producción ambos biofiltros resultaron apropiados para el cultivo de larvas de camarón *Penaeus Vannamei* ya que se obtuvo una biomasa final similar en ambos sistemas y en el control
- Concluimos que se puede cultivar larvas de *P. vannamei* en un circuito cerrado manejando un filtro biológico.

## RECOMENDACIONES

- En estos experimentos se utilizó biofiltros con un volúmen igual a la quinta parte del cultivo, llegando a postlarvas de performance idéntica a las larvas de un cultivo abierto, sería interesante para fines comerciales tratar de minimizar este volumen sin que este presente consecuencias negativas para el desarrollo de los camarones.
- En la literatura no están descritos los niveles tóxicos (concentraciones letales después de 96 horas de exposición), de amonio, nitrito y nitrato para larvas y postlarvas de camarón *Penaeus vannamei*. Los resultados de esta tesis indican que los niveles de seguridad publicados son demasiado bajos para *Penaeus vannamei*. Pruebas de toxicidad aguda facilitarían datos muy útiles para los laboratorios de camarón y darían pautas para la investigación del uso de biofiltros en el cultivo de camarón.
- Habría que mejorar la técnica de colonización de bacterias determinando el momento oportuno de inocular las *Nitrobacter* para que tengan sustrato disponible suficiente para poder procesar todo el  $\text{NO}_2$  producido por las Nitrosomonas.
- Teóricamente, si se trabajara a escala comercial, en donde la carga orgánica a procesar sería mayor, los BF-P preentarían las ventajas de proveer una mayor superficie de fijación para las bacterias nitrificantes

## **REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.**

- Anthonised, A.C., Loechr, R.C., Prakasam, T.B.S., E.G. Srinath. 1976. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. Journal Water Pollution Control Federation 48(5): 835-852. En: Wheaton *et al.*, 1994. Nitrification Filter Principles. Aquaculture Water Reuse Systems: Engineering Design and Management: Editor Michael B. Timmons y Thomas M. Losordo, USA.
  
- Almendras, J.M.E. 1987. Acute nitrite toxicity and methemoglobinemia in juvenile milkfish (*chanos chanos Forsskal*). Aquaculture 61:33-40. En: Russo y Thurston, 1991. Toxicity of Ammonia, Nitrite, and Nitrate to Fishes. Advances in World Aquaculture, Volumen 3. Aquaculture and Water Quality. Editores: David E. Brune and Joseph R. Tomasso, USA.
  
- Arellano, E. 1993. Guías Técnicas en el cultivo de Larvas de Camarón. En Memoria de Edgar Arellano M.: once años dedicados a la Investigación y desarrollo de la Acuicultura en el Ecuador, Editores: Jorge Calderon V. y Stanislaus Sonnenhlzner S, Ecuador. 53-77 p.
  
- Boghen, D.A. y Castell, D.J. 1979. Essential fatty acids in the diet of juvenile lobsters, (*Homarus Americanus*). 10th Annual Meeting of the World. Maric.Soc. Hawaii-Honolulu. 25 p.
  
- Boyd, E. C. 1990. Water Quality in Ponds for Aquaculture. Alabama Agricultural Experiment Station Auburn University, Alabama. Lowell T. Frobish, Director. 80-86, 380-382 y 156-161 p.
  
- Chin, T.S. y Chen, C.J. 1987. Acute toxicity of Ammonia to Larvae of the tiger Prawn, *Penaeus monodon*. Aquaculture, 66: 247-253. En Boyd. 1990. Water Quality in Ponds for Aquaculture. Alabama Agricultural Experiment Station Auburn University, Alabama. Lowell T. Frobish, Director.

- Colt, J.E. y Armstrong, D.A. 1979. Nitrogen toxicity to Crustaceos, Fish and Molluscs. Dept. Civil Eng., Univ. California, DAavis. 30 p. En: Boyd. 1990. Water Quality in Pons for Aquaculture. Alabama Agricultural Experiment Station Auburn University, Alabama. Lowell T. Frobish, Director.
  
- Dhert, P., Lavens, P. y Sorgeloos, P. 1991. A Recirculation System for the Experimental Hatchery-Rearing of Turbot (*Scophthalmus Maximus*) Larvae. Larvi'91-Fish & Crustacean Larviculture Symposium European Aquaculture Society, Special Publication No 15, Gent, Belgium.: 339-342 p.
  
- Emerson, K., Russo, R.C., Lund, R.E. y Thurston, R.V. 1975. Aqueous ammonia equilibrium calculations: effect of pH and temperature. J. Fish. Res. Board Can:32:2379-2383.
  
- Forster, M.R.J. 1974. Studies on Nitrification in Marine Biological Filters. Aquaculture, 4:387-397.
  
- Van Gorder, V.D.S. 1994. Operating and Managing Water Reuse Systems. Aquaculture Water Reuse Systems: Engineering Design and Management: Editor Michael B. Timmons y Thomas M. Losordo, USA. 281-305 p.
  
- HACH WATER ANALYSIS HANDBOOK 2nd Edition.
  
- Léger, Ph., Johns, D.M. y Sorgeloos, P. 1987. Description of a standard bioassay test with the marine crustacean *Mysidopsis bahia* (M.) for the evaluation of the nutritional effectiveness of *Artemia* nauplii and metanauplii: p. 395-410. En *Artemia* research and its applications. Vol. 3. Sorgeloos, P., Bengtson, D.A, Declair, W., Jaspers, E., (Eds). Universa Press, Wetteren, Belgium, 556 p.
  
- Léger, Ph., Ferraz de Queros, J. y Sorgeloos, P. 1989. The effect of broodstock diet on reproductive activity and offspring quality in the marine crustacean *Mysidopsis*

*bahia* (M). En: Aquaculture- a biotechnology in progress. De Pauw, N., Jaspers, E., Ackefors, H., Wilkins, N., (Eds) European Aquaculture Society, Bredene, Belgium, in press. 1-9 p.

- Losordo, M.T. y Timmons, B.M. 1994. An Introduction to water Reuse Systems. Aquaculture water Reuse Systems: Engineering design and Management. USA. 1-6 p.

- Meade, W.J. 1985. Allowable Ammonia for Fish Culture. National Fishery Research and Development Laboratory. U.S. Fish and Wildlife Service. Wellsboro, Pennsylvania. Prog. Fish-Cult. 47(3) 135-145.

- Menasveta, P., Aranyakamonda, P., Rungsupa, S. y Moree, N. 1989. Maturation and Larviculture of Penaeid Prawns in Closed Recirculating Seawater Systems. Aquacultural Engineering 8 (357-368).

- Morales, C. J. 1982. Acuicultura Marina Animal. Ph. D. in Biology, Massachusetts Institute of Technology. 670 p.

- Muir, F.J., 1976. How Filters Improve Water Quality for Fish Farmers. Strathclyde University, Glasgow, Scotland. 35-38 p.

- Person, Le Ruyet. J. 1989. El cultivo de larvas de rodaballo (*Scophthalmus maximus*). En: Seminario sobre tecnoloxia do cultivo do rodaballo. Sada. A Coruña. Publicacións do Seminario de estudos Galegos. Edición do Castro. 58 p.

- Petit, J. 1990. Water supply, treatment and recycling in aquaculture. Aquaculture Volúmen 1: Gilbert Barnabé (edit.), England. 79 p.

- Romdhane, M.S., Devresse, B., Léger. y Sorgeloos, P., 1979. Effects of feeding (n-3) HUFA enriched *Artemia* during a progressively increasing period on the larviculture of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*, 1-11 p.

- Russo, C.R., y Thurston, V.R. 1991. Toxicity of Ammonia, Nitrite, and Nitrate to Fishes. *Advances in World Aquaculture*, Volúmen 3. *Aquaculture and Water Quality*. Editores: David E. Brune and Joseph R. Tomasso, USA. 58-89 p.
  
- Saeki, A. 1958. Studies on fish culture in filtered closed-circulation aquaria.I. Fundamental theory and system design standards. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 23:684-695. ( Trans. E.R.Hope, Dir. Sci. Inf. Serv., Def. Board Can., issued Jan. 1964.). En Spotte, S., 1979. *Fish and Invertebrate Culture. Water Management In Closed Systems* Second Edition. A Willey-Interscience publication, Canada.
  
- Spotte, S., 1979. *Fish and Invertebrate Culture. Water Management In Closed Systems* Second Edition. A Willey-Interscience publication, Canada. 2-12 p.
  
- Tabash, B.F., y Murillo, S.R. 1988. Un sistema de recirculación de agua para el desarrollo de experiencias en alimentación del camarón blanco *Penaeus stylirostris*, Stimpson, 1-4 p.
  
- Wheaton, W.F. 1977. *Aquacultural Engineering. Agricultural Engineering Department/University of Maryland.* A wiley-Interscience Publiation.
  
- Wheaton, F., Hochheimer, J. y Kaiser, E. G. 1991. Fixed Film Nitrification Filters for Aquaculture. *Advances in World Aquaculture*, Volúmen 3. *Aquaculture and Water Quality*: Editor David E. Brune and Joseph R. Tomasso, USA. 272-301 p.
  
- Wheaton, W.F., Honchheimer, N.J., Kaiser, E.G., Krones, J.M., Libey, S.G. y Easter, C.C. 1994. Nitrification Filter Principles. *Aquaculture Water Reuse Systems: Engineering Design and Management*: Editor Michael B. Timmons y Thomas M. Losordo, USA. 100-125 p.
  
- Wickins, J.F. 1976. The Tolerance of Warm-Water Prawns to Recirculated Water. *Aquaculture*, 9: 19-37.

- Wickins, F.J. 1983. Studies on Marine Biological Filters. Ministry of Agriculture Fisheries and Food. Directorate of Fisheries Research Fisheries Experiment Station, Conwy. Water Res. 17(1769-1780).

- Wickins, F.J. 1985. Ammonio Production and Oxidation During the Culture of Marine Prawns and Lobsters in Laboratory Recirculation Systems. Aquacultural Engineering 4(155-174).

- Wyban, A. J. y Sweeney, N.J. 1991. Intensive Shrimp Production Technology. The Oceanic Institute Shrimp Manual, USA. 12 p.

---