

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT



SISTEMA DE BIBLIOTECAS

---

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO, AGROPECUARIAS Y PESQUERAS

---

**Evaluación de tres fuentes de carbono a base de melaza y harina de trigo en la calidad del Biofloc y en el crecimiento de la tilapia Nilótica *Oreochromis niloticus***

Tesis presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Maestría en Ciencias  
Pesqueras

PRESENTA  
BERENICE SANTIAGO CERVANTES

Xalisco, Nayarit. Diciembre 2016



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS**

CBAP/136/16.

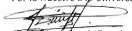
Xalisco, Nayarit, 11 de julio de 2016.

**ING. ALFREDO GONZÁLEZ JÁUREGUI**  
**DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR**  
**P R E S E N T E.**

Con base al oficio de fecha 08 de julio del presente, enviado por los CC. Dr. Emilio Peña Messina, Dr. Gustavo Alejandro Rodríguez Montes de Oca, Dr. Javier Marcial de Jesús Ruiz Velazco Arce, Dr. José Cristóbal Román Reyes y M.C. Carlos Alberto Romero Bañuelos, donde se indica que el trabajo de tesis cumple con lo establecido en forma y contenido, y debido a que ha finalizado con los demás requisitos que establece nuestra institución, se autoriza a la C. Berenice Santiago Cervantes, continúe con los trámites necesarios para la presentación del examen de grado de Maestría en Ciencias Biológico Agropecuarias en el Área de Ciencias Pesqueras.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente  
"Por lo Nuestro a lo Universal"



D. J. Diego García Paredes  
Coordinador del Posgrado



C.c.p.- Expediente

&mfm

Dr. Juan Diego García Paredes  
Coordinador del Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias  
Universidad Autónoma de Nayarit  
PRESENTE

Quienes suscribimos, integrantes del comité tutorial de la alumna Berenice Santiago Cervantes; después de revisar minuciosamente su trabajo de tesis titulado: "Evaluación de tres fuentes de carbono a base de melaza y harina de trigo en la calidad del biofloc y en el crecimiento de la tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*)", hemos determinado que la tesis cumple con los criterios de calidad y originalidad suficientes, por lo cual puede ser presentada por la alumna para aspirar al grado de Maestría en Ciencias, con la opción terminal en Pesquerías

Lo anterior para dar cumplimiento a los lineamientos del reglamento de estudios del Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias de la UAN vigentes, a fin de que la alumna Santiago Cervantes continúe con los trámites de titulación.


Atentamente:

Los integrantes del comité tutorial



Dr. Emilio Peña Messina

Director

  
Dr. Gustavo Alejandro Rodríguez  
Montes de Oca  
Co-Director

Dr. J. Marcial de Jesús Ruiz Velasco Arce  
Asesor

  
Dr. José Cristóbal Román Reyes  
Asesor  
Dr. Carlos Alberto Romero Bañuelos  
Asesor

## Dedicatoria

*A mi familia:*

*Mi esposo Leopoldo Robles Montiel que ha sido el impulso durante mi carrera y el pilar principal para la culminación de la misma, que con su apoyo constante ha sido fuente de calma y consejo en todo momento.*

*Mi hijo Javier Alejandro Robles Santiago que su existencia hace que ningún sacrificio sea suficiente.*

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por haberme brindado el apoyo económico para la realización de los estudios de maestría.

Al posgrado en Ciencias Biológicas, Agropecuarias y Pesqueras (CBAP-UAN), por su valioso apoyo en mi formación académica.

Al Dr. Emilio Peña Messina, por haberme brindado la oportunidad de realizar mi tesis bajo su dirección.

Al Dr. Gustavo Rodríguez Montes de Oca (FACIMAR-UAS), por darme los conocimientos necesarios para poder desarrollar mi trabajo de investigación.

A mis asesores: M. en C. Carlos Alberto Romero Bañuelos, Dr. José Cristóbal Román Reyes y el Dr. Javier Marcial de Jesús Ruiz Velazco Arce, por sus valiosas sugerencias, orientaciones y apoyo para la realización del presente trabajo.

A mis profesores: Dr. José Irán Bojorquez Serrano, Dr. Juan Diego García Paredes, Dr. Javier Germán Rodríguez Carpena, Dr. Clemente Lemus Flores, Dr. Jesús Bernardino Velázquez Fernández y Dr. Emilio Peña Messina, por impartirme las materias y ampliar mi conocimiento.

Al Dr. Edgar Iván Jiménez Ruiz (UAN) por brindarme asesoría en mi experimento y al Dr. Alberto Sánchez González (CICIMAR-IPN), por brindarme de la oportunidad de ampliar mi trabajo de investigación.

Al departamento de Bioensayos del Laboratorio de Alimentos (UAN) por darme el espacio para realizar mi experimento en las instalaciones; Al Laboratorio de Calidad de Alimentos del CENIT<sup>2</sup>, Al Laboratorio de Nutrición Vegetal de la Unidad Académica de Agricultura (UAA), al Laboratorio de Contaminación y Toxicología Ambiental (UAN), al Laboratorio de Espectrometría de Masas de Razones Isotópicas CICIMAR-IPN, por darme el espacio y equipo para poder procesar mis muestras.

Al técnico José Oscar Barragán Ortega (CENITT-UAN) por ayudarme en preparar las instalaciones donde se desarrollo el presente trabajo; A las técnicas IBQ Sarahy Navidad Murrieta (CENITT-UAN), Ing. María de los Ángeles Rodríguez (UAA), por asesorarme en las técnicas empleadas para procesar mis muestras. Y al técnico Ángel Humberto Ruvalcaba Díaz (CICIMAR-IPN), por ayudarme a procesar las muestras correspondientes a la huella isotópica de carbono.

A todos los compañeros de la maestría, por su solidaridad, convivencia y palabras de ánimo.

<b>Contenido</b>	
<b>Dedicatoria</b> .....	IV
<b>Agradecimientos</b> .....	V
<b>Contenido</b> .....	VI
<b>Índice de Tablas</b> .....	IX
<b>Índice de Figuras</b> .....	IX
<b>RESUMEN</b> .....	XI
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1 ANTECEDENTES</b> .....	3
<b>1.1.1 La tecnología del cultivo en biofloc</b> .....	3
<b>1.1.1.2 Valor nutritivo del biofloc</b> .....	3
<b>1.1.1.3 Manejo del sistema biofloc</b> .....	4
<b>1.1.1.3.1 Fuentes de Carbono</b> .....	5
<b>1.1.1.3.2 Aireación</b> .....	7
<b>1.1.1.3.3 Equilibrio de la relación C:N</b> .....	8
<b>1.1.1.3.4 Manejo de los sólidos suspendidos o sedimentables</b> .....	9
<b>1.1.1.3.5 Manejo de la alcalinidad</b> .....	9
<b>1.1.2 Uso del biofloc en el cultivo de la tilapia Nilótica <i>Oreochromis niloticus</i></b> .....	9
<b>1.2 JUSTIFICACIÓN</b> .....	11
<b>1.3 HIPÓTESIS</b> .....	11
<b>1.4 OBJETIVOS</b> .....	12
<b>1.4.1 Objetivo general</b> .....	12
<b>1.4.2 Objetivos específicos</b> .....	12
<b>2. MATERIALES Y METODOS</b> .....	13
<b>2.1 Diseño experimental</b> .....	13

2.2 Preparación del floc.....	15
2.3 Descripción de los organismos experimentales.....	15
2.4 Alimentación.....	15
2.5 Variables.....	16
2.5.1 Peces.....	16
2.5.2 Biofloc.....	19
2.5.3 Composición proximal del Biofloc.....	20
2.6 Análisis estadístico.....	27
3. RESULTADOS.....	28
3.1 Parámetros de crecimiento.....	28
3.2 Relación talla-peso e índice de condición.....	30
3.3 Volumen de biofloc.....	32
3.4 Composición proximal de Biofloc.....	33
3.5 Parámetros de calidad del agua.....	34
3.6 Compuestos nitrogenados.....	37
4. DISCUSION.....	41
4.1 Parámetros de crecimiento.....	41
4.2 Volumen de biofloc.....	42
4.3 Composición proximal de biofloc.....	43
4.4 Calidad del agua.....	44
4.5 Compuestos nitrogenados.....	45
5. CONCLUSIONES.....	47
6. BIBLIOGRAFÍA.....	48
7. ANEXOS.....	56
7.1 Determinación de humedad en productos alimenticios (NMX-F-083-1986).....	56

7.2 Determinación de cenizas en alimentos (NMX-F-066-S-1978).....	57
7.3 Determinación de proteínas (NMX-F-068-S-1980).....	58
7.4 Determinación de extracto etéreo (EE) por método de Soxhlet.....	59
7.5 Determinación de energía bruta .....	61
7.6 Técnicas de Microplacas para la cuantificación de compuestos Nitrogenados (NO <sub>2</sub> , NO <sub>3</sub> , NH <sub>4</sub> ).....	63
7.6.1 Determinación de Nitritos (NO <sub>2</sub> ) .....	64
7.6.2 Determinación de Nitratos (NO <sub>3</sub> ).....	66
7.6.3 Determinación de Amonio (NH <sub>4</sub> ).....	67



## Índice de Tablas

Tabla 1. Composición proximal del biofloc.....	4
Tabla 3. Datos del crecimiento de las tilapias. Valores de la Tasa de Crecimiento Específico (TCE), Factor de conversión alimenticia (FCA), Índice de condición (IC), en los diferentes tratamientos: T1 (100 % melaza), T2 (100 % harina de trigo), T3 (50 % melaza, 50 % harina de trigo).....	28
Tabla 4. Registro del promedio $\pm$ DE del IC semanal de los peces en los tratamientos.....	31
Tabla 5. Media y DE de los valores de Humedad y Cenizas en los tratamientos.....	33
Tabla 6. Media $\pm$ DE de proteína, lípidos y energía de los tratamientos.....	33
Tabla 7. Media $\pm$ DE de los parámetros ambientales en los tratamientos.....	34
Tabla 8. valores promedios $\pm$ DE de amonio, nitrito y nitrato de cada tratamiento.....	37

## Índice de Figuras

Figura 1 Cálculo de la adición de carbono para 50 kg de pez $m^{-3}$ (traducido de: De Schryver et al., 2008).....	8
Figura 2 Diseño experimental.....	13
Figura 3 Tanques de tilapia en biofloc con diferentes fuentes de carbono.....	14
Figura 4 Muestra de peces para la biometría.....	17
Figura 5 Biometrías de peces.....	17
Figura 6 Cono imhoff.....	19
Figura 7 Método Kjeldahl.....	20
Figura 8 Equipo Soxhlet.....	21
Figura 9 Recuperación del Éter de petróleo.....	22
Figura 10 Bomba calorimétrica.....	23
Figura 11 "Pastillas" de biofloc.....	23
Figura 12. A. Desarrollo de la técnica de microplaca B. Placas incubadas listas para su lectura.....	24
Figura 13 diagrama de flujo de metodología microplaca de nitrito.....	25
Figura 14 Metodología de la técnica de microplaca para amonio.....	25
Figura 15 Metodología de la técnica de microplaca de nitrato.....	26

## Índice de graficas

Grafica 1. Incremento en el peso de los peces en los diferentes tratamientos.....	29
Grafica 2 Variación del volumen del biofloc en los tratamientos a través del tiempo.....	32
Grafica 3 Registro semanal de la temperatura del agua en los tratamientos .....	34
Grafica 4 Concentraciones de $O_2$ en $mg L^{-1}$ en los tratamientos por semana.....	35
Grafica 5 Comportamiento del pH en las semanas de cultivo en los tratamientos .....	36
Grafica 6 Concentraciones semanales del amonio los tratamientos.....	38
Grafica 7 Concentración de nitrito durante las semanas de cultivo .....	39
Grafica 8 Valores de nitrato en $mg L^{-1}$ durante el cultivo por tratamiento .....	40

## RESUMEN

Se analizó el efecto de tres fuentes de carbono en el crecimiento de los peces y en la composición proximal del biofloc poniendo a prueba la melaza y la harina de trigo en un cultivo de tilapia utilizando un sistema biofloc (BFT). En el experimento se utilizaron 25 crias de tilapia por tratamiento, con un peso promedio de 3.47 g y una densidad de 50 peces/m<sup>3</sup> colocados en tanques de 500 L, durante 15 semanas de cultivo. Los tratamientos triplicados fueron T1 (melaza 100 %), T2 (harina de trigo 100 %) y T3 (50 % melaza y 50 % harina de trigo); la relación Carbono: Nitrogeno fue de 15:1. Los resultados mostraron que el crecimiento de los peces no fue diferente en los tratamientos T1 (1.19 g) y T3 (1.25) ( $p>0.05$ ), mientras que en T2 (fue significativamente menor que T1 1.19, 1.41 y 1.25, respectivamente. Mientras que para el IC no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. Los resultados demostraron que el T3 presentó el mayor porcentaje de proteína, sin embargo menor valor de energía bruta, lo que puede explicar porque T1 reporto las mayores ganancias en peso. Finalmente los resultados demuestran que el T1 presentó los valores de amonio, nitrito y nitrato significativamente más bajos con respecto a los otros tratamientos, lo que se debe a la degradación más rápida de la melaza que contribuyo que las bacterias heterotróficas lo utilizaran en el metabolismo del amonio, lo que mejoro la calidad del agua. Se concluye que el uso de melaza (Pura o en combinación con otra fuente) permite un mayor crecimiento en los peces y mejora la calidad del agua.

## 1. INTRODUCCIÓN

La necesidad de disminuir al máximo el efecto contaminante de los efluentes acuícolas, reducir el uso del agua y mejorar la utilización del alimento proporcionado a los organismos en cultivo, ha propiciado el desarrollo de nuevas alternativas de producción sustentables y económicamente viables, como la tecnología de cultivo en biofloc (Crab *et al.*, 2012).

El cultivo en biofloc (BFT por sus siglas en inglés), es un modelo de producción que ofrece la ventaja de servir como método de tratamiento del agua, que implica la asimilación del nitrógeno inorgánico por las bacterias heterotróficas (Liu *et al.*, 2014). Éste se ha implementado principalmente en cultivos de camarón y tilapia con excelentes resultados. Consiste en manipular la relación carbono-nitrógeno (C:N), que está presente en el sistema de cultivo, mediante la adición de fuentes de carbono orgánico como: dextrosa (Suita, 2009), melaza (Kim M. *et al.*, 2015), o acetato de sodio (Luo *et al.*, 2014), entre otros; ya que la producción de biofloc depende de la calidad de sustrato añadido y su relación C:N (Avnimelech., 2007). El carbono desempeña un papel fundamental en la formación del biofloc, su composición microbiana y sus valores nutritivos (Hollender *et al.*, 2002; Oehmen *et al.*, 2004).

Aunado a lo anterior, diversos autores han reportado los beneficios de utilizar la tecnología del biofloc en el cultivo de camarón y de peces con respecto a la reducción de costos de producción, dado que constituye una fuente de alimento *in situ*, reduce la demanda de proteína en el alimento, reduce el factor de conversión alimenticia (FCA) al igual que los costos por alimentación (Avnimelech, 1999; De Schryver *et al.*, 2008; Ray *et al.*, 2012; Xu y Pan, 2012; Kim *et al.*, 2014).

Básicamente se requiere la adición de una fuente de carbono, que ayude al crecimiento bacteriano heterotrófico, tales bacterias reducen la concentración de amonio por el proceso llamado nitrificación (Serra *et al.*, 2015). La información publicada indica que el contraste de diferentes fuentes de carbono, o la mezcla de las mismas induce cambios en el manejo de desechos nitrogenados, (De Lorenzo *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2015; Nootong y Pavasant, 2011) y el crecimiento de los organismos en cultivo (Luo *et al.*, 2014). Por lo que existe la posibilidad de que el uso de diferentes fuentes de carbono permita hacer un manejo más

eficiente de las unidades de cultivo, e incrementar el rendimiento productivo en la producción de tilapia. El objetivo del presente estudio fue comparar el efecto de dos fuentes de carbono, por separado y en una mezcla, en la calidad del biofloc y en el crecimiento de la tilapia Nilótica variedad GIFT.

## 1.1 ANTECEDENTES

### 1.1.1 La tecnología del cultivo en biofloc

Los primeros reportes del uso de la tecnología de cultivo en biofloc datan de la década de los 70's en las instalaciones del centro de investigaciones "Aquacop" (IFREMER) en Nueva Caledonia, Oceanía. Su implementación para resolver la crisis causada por la degradación de la calidad ambiental por la producción acuícola hiper-intensiva en Indonesia y Malasia, es una prueba fehaciente de su efectividad como alternativa ecológica y económicamente viable para la producción de camarón y tilapia. Entre las ventajas que se describen de su uso están: la optimización de insumos como el alimento artificial, el aumento de la densidad de siembra, mayor control de la calidad de agua, minimizar el consumo del agua, reducir la descarga de efluentes contaminantes y la producción de proteína bacteriana asimilable por los organismos cultivados (Wasielesky *et al.*, 2006; Crab *et al.*, 2012).

#### 1.1.1.1 Composición del biofloc

El Biofloc está constituido por una comunidad microbiana aerobia asociada a la materia orgánica, la cual se desarrolla gracias a la aireación y suspensión constante de los sólidos presentes en el cuerpo de agua. Análisis preliminares acerca de la composición del biofloc han demostrado un alto contenido de proteína, energía, carotenoides y minerales que pueden ser usados para la alimentación del camarón o para la tilapia, dados sus hábitos alimenticios omnívoros (Tacon *et al.*, 2002; Avnimelech, 1999).

#### 1.1.1.2 Valor nutritivo del biofloc

De acuerdo con Hargreaves (2013) los valores del contenido de proteína del biofloc en peso seco se encuentran en el intervalo de 25 a 50 % pero la mayoría de las estimaciones fluctúan entre el 30 y 45 % de proteína. El contenido de lípidos se estima entre 0.5 a 15 %, aunque la mayoría de las referencias citan un intervalo de 1 y 5 %. Según Azim y Little (2008), el

biofloc contiene 38 % de proteína, 3 % de lípidos, 6 % de fibra, 12 % de cenizas y 19 kJ de energía por gramo (en base seca). Sin embargo, Webster y Lim (2002) encontraron que el biofloc contiene 50 % de proteína cruda, 4 % de fibra, 7 % de cenizas y 22 kJ.g<sup>-1</sup> de energía (en base seca). La tabla 1 resume los resultados encontrados por diferentes autores. Las variaciones registradas en la composición proximal del biofloc se deben a la fuente de carbono suministrada y la relación C:N (Crab, 2010).

Tabla 1. Composición proximal del biofloc

Proteína cruda (%)	Lípidos (%)	Fibra cruda (%)	Cenizas (%)	Energía bruta (KJ g <sup>-1</sup> )	Referencias
43	12.5	-	26.5	-	McIntosh D. <i>et al.</i> (2000)
31.2	2.6	-	28.2	-	Tacon <i>et al.</i> (2002)
50	-	4	7	22	Webster y Lim (2002)
12-42	2-8	-	22-46	-	Soares R, <i>et al.</i> (2004)
31.1	0.5	-	44.8	-	Wasielesky W. <i>et al.</i> (2006)
38	3	6	12	19	Azim y Little (2008)
26-41.9	1.2-2.3	-	18.3-40.7	-	Ju Z. <i>et al.</i> (2008)
30.4	1.9	12.4	38.9	-	Ju Z. <i>et al.</i> (2008)
49	1.13	12.6	13.4	-	Kuhn D.D. <i>et al.</i> (2009)
19-40	17-41	-	3-20	27	Crab (2010)
38.8	<0.1	16.2	24.7	-	Kuhn D.D. <i>et al.</i> (2010)
28.8-43.1	2.1-3.6	8.7-10.4	22.1-42.9	-	Maicá P.F. <i>et al.</i> (2012)
30.4	0.5	0.8	39.2	-	Emerenciano <i>et al.</i> (2012)

### 1.1.1.3 Manejo del sistema biofloc

Los aspectos de manejo que se deben contemplar en la tecnología conocida genéricamente como BFT son: el manejo de la relación carbono-nitrógeno (C:N) en el agua con el fin de estimular el crecimiento de bacterias heterótrofas, el volumen de flóculos por litro (VF) y el pH, éste último como factor de estrés ambiental, condiciona efectos importantes en el desempeño fisiológico de algunos peces (Portz *et al.* 2006) y favorece el crecimiento de bacterias deseables en los límites adecuados (Avnimelech, 1999).

### 1.1.1.3.1 Fuentes de Carbono

En el cultivo del camarón, la melaza es la fuente de carbono más utilizada en el sistema BFT (Baloi *et al.*, 2013; Schweitzer *et al.*, 2013; Correia *et al.*, 2014.). Con base en los resultados de Crab (2010), la fuente de carbono orgánico en biofloc no sólo influye en la calidad nutricional de éste, sino también afecta los parámetros de calidad de agua tales como: la concentración de oxígeno disuelto y el potencial de hidrógeno (pH). Avnimelech (1999), sustenta que es posible manejar la relación C:N al incorporar una fuente adicional de carbono orgánico (por ejemplo, glucosa, acetato y glicerol) o cambiar la composición de la alimentación y por lo tanto aumentar su contenido de carbono orgánico.

Tabla 2. Fuentes de carbono actualmente utilizadas para el cultivo de diferentes especies acuáticas.

Fuentes de carbono	Relación C:N	Especie	Referencia
Melaza, mezcla de melaza de soya y caña	12:1	<i>L. vannamei</i>	Do Espirito Santo <i>et al.</i> (2016)
Melaza	10:1, 12.5:1, 15:1, 17.5:1, 20:1	<i>O. niloticus</i>	Pérez-Fuentes <i>et al.</i> (2016)
Melaza; mezcla de melaza, harina de maíz y salvado de trigo	16:1	<i>L. vannamei</i>	Wang <i>et al.</i> (2015)
Melaza, Harina de tapioca, Harina de trigo	-	<i>L. vannamei</i>	Rajkumar <i>et al.</i> (2015)
Harina de arroz, Melaza	10:1	<i>P. monodon</i>	Kumar <i>et al.</i> (2015)
Dextrosa, salvado de arroz	15:1	<i>L. vannamei</i>	Serra F. <i>et al.</i> (2015)
harina de papa, harina de trigo	16:1	<i>Oreochromis</i> sp.	Marlowe <i>et al.</i> (2015)
Melaza	-	<i>F. chinensis</i>	Kim M. <i>et al.</i> (2015)
Melaza, Dextrosa	-	<i>L. vannamei</i>	De Lorenzo <i>et al.</i> (2015)
acetato de sodio	-	<i>O. niloticus</i>	Luo G. <i>et al.</i> (2014)
melaza, tapioca, salvado de arroz	15:1	<i>L. vannamei</i>	Ekasari J. <i>et al.</i> (2014)
Tapioca	16:1	<i>O. niloticus</i>	Nootong y Pavasant (2011)
glucosa, glicerol,	10:1	<i>Macrobrachium</i>	Crab <i>et al.</i> (2010)



acetato	-	<i>rosenbergii</i>	
Dextrosa	-	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Suita (2009)
Almidón	-	Tilapia ( <i>Mozambique</i> ) y tilapia <i>O.</i> <i>niloticus</i> x <i>O.</i> <i>aureus</i>	Crab <i>et al.</i> , (2009)
Harina de trigo	-	<i>Oreochromis sp.</i>	Azim y Little (2008)
Tapioca	-	<i>M. rosenbergii</i> y <i>L. vannamei</i>	Asaduzzaman <i>et al.</i> (2008)
Melaza	-	<i>L. vannamei</i>	Samocha <i>et al.</i> (2007)
Melaza	-	<i>L. vannamei</i>	Burford <i>et al.</i> (2004)

Crab (2010) postuló que el uso de fuentes de carbono orgánico de bajo valor podría potenciar los beneficios del BFT. Trabajos previos referentes al uso de diferentes fuentes de carbono orgánico soportan esta hipótesis. Furtado *et al.* (2011) compararon el efecto del hidróxido de calcio, el carbonato y el bicarbonato de sodio en la calidad del agua y el crecimiento de *Litopenaeus vannamei*, utilizaron una densidad de 333 camarones m<sup>3</sup>, con los tratamientos T1 (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), T2 (Ca(OH)<sub>2</sub>), T3 (NaHCO<sub>3</sub>) y T4 (control); comprobaron que el bicarbonato de sodio incrementó los niveles de pH y ayudó a complementar la alcalinidad, mientras que en el tratamiento control los valores de pH y alcalinidad disminuyeron a través del cultivo. Saritha (2009), evaluó la eficiencia de cinco fuentes de carbono y encontró que todas ellas fueron efectivas para el incremento de bacterias heterotróficas, este resultado concuerda con lo descrito por Burford *et al.* (2003) y Varghese (2007). Por su parte Cotner *et al.* (2000) informaron que la adición de glucosa al agua redujo el Nitrógeno amoniacal total (NAT) de 17.1 a 7.4 mg L<sup>-1</sup> debido a la mejora del crecimiento microbiano. En otro experimento, Asaduzzman *et al.* (2010) compararon la eficiencia del almidón de tapioca y harina de maíz como agentes de biofloculación y observaron concentraciones mínimas de nitrógeno orgánico en ambos casos.

Crab *et al.* (2010), describieron el valor nutricional del biofloc madurado con diferentes fuentes de carbono y su capacidad para servir de alimento para postlarvas de *Macrobrachium rosenbergii*. Las fuentes de carbono utilizadas fueron: acetato, glicerol, glicerol con *Bacillus* y glucosa. Encontraron que el biofloc compuesto por Glicerol con *Bacillus* como fuente de carbono obtuvo un contenido de proteína más alto (58 ± 9 %), el glicerol y acetato registraron

un contenido similar (42-43 %), mientras que la glucosa contenía  $28 \pm 3$  % PS. El contenido de ácidos grasos más alto se encontró en el biofloc madurado con glicerol y glicerol + *Bacillus*. De éste estudio se concluyó que la fuente de carbono afecta la calidad nutricional del biofloc por lo que la correcta elección de la fuente es sumamente importante. Por otra parte Souza *et al.* (2014) evaluaron la adición de melaza como fuente de carbono en la calidad del agua, formación del floc y el rendimiento de *F. brasiliensis*; ellos encontraron que la presencia de *Vibrio spp.* fue más baja en el tratamiento de melaza comparada con el control. Los resultados del rendimiento de *F. brasiliensis* fueron: tasa de supervivencia ( $88.87 \pm 6.36$  %), peso final ( $1.22 \text{ g} \pm 0.38$ ) y tasa de crecimiento específico ( $0.0309 \pm 1.06$ ) en el tratamiento con melaza y de  $80.5 \pm 2.42$ ;  $1.03 \pm 0.13$  y  $0.0256 \pm 0.97$  respectivamente, en el control. Encontraron que la adición de melaza contribuyó a mantener la calidad del agua con una concentración de *Vibrio spp.* de  $20 \times 10^2$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ , mientras que el control presentó una variación inestable ( $80 \times 10^2$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ ), lo cual confirmó el beneficio del biofloc generado con la adición de melaza.

#### 1.1.1.3.2 Aireación.

La concentración de oxígeno disuelto (OD), intensidad de la mezcla y la densidad del floc son factores directamente influenciados por la intensidad de la aireación (Boyd, 1998). Crab (2010), observó que los niveles de OD no solo son esenciales para la actividad metabólica de las células microbianas sino que también influyen en el tamaño del floc. Wilen y Balmer (1999), observaron una tendencia relacionada con la formación de floculos largos y más compactos cuando se presentaron altas concentraciones de OD. Crab (2010), reportó la presencia de altas cantidades de bacterias filamentosas a niveles de OD bajos, de alrededor de  $1.1 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ .

### 1.1.1.3.3 Equilibrio de la relación C:N

Se debe considerar que la relación entre la adición de hidratos de carbono, la reducción del amonio y la producción de proteínas microbianas depende de la relación C:N en la biomasa microbiana y el contenido de carbono del material añadido (Avnimelech *et al.*, 2008). El ajuste de la relación C:N mediante la adición de hidratos de carbono es calculada de acuerdo a fórmulas establecidas por Avnimelech, (1999). La figura 1 muestra el cálculo basado en la cantidad de nitrógeno excretado por la especie.

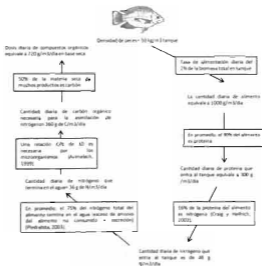


Figura 1. Cálculo de la adición de carbono para 50 kg de pez m<sup>-3</sup> (traducido de: De Schryver *et al.*, 2008)

#### 1.1.1.3.4 Manejo de los sólidos suspendidos o sedimentables

Los conos de sedimentación de Imhoff son un método sencillo y práctico para medir la concentración de sólidos utilizando una muestra de 1 litro de agua. El tiempo para determinar la concentración de sólidos contenidos en ese volumen, normalmente es de 10 a 20 minutos. En cultivos de tilapia, el intervalo óptimo de la concentración del biofloc es de 25 a 50 ml L<sup>-1</sup> (Hargreaves, 2013). Por su parte Avnimelech (2009), menciona que una concentración de 100 ml L<sup>-1</sup> es indicativo de buena salud del biofloc.

#### 1.1.1.3.5 Manejo de la alcalinidad

La alcalinidad es la capacidad del agua para amortiguar los cambios en el pH en respuesta a la adición de sustancias que modifican la relación ácido o base. Vinatea *et al.* (2010), afirman que mantener alta la alcalinidad reduce la fluctuación del pH diario. La actividad de las bacterias nitrificantes es responsable de la mayor parte de la pérdida de la alcalinidad en los sistemas de biofloc intensivos. El ácido producido por la nitrificación consume la reserva de alcalinidad en el agua. Una vez que se agota la alcalinidad, el pH puede reducirse drásticamente y condicionar la inhibición de la función bacteriana, incluyendo la de las bacterias nitrificantes importantes. En ese caso, el amoníaco se acumula hasta el punto donde se restringe el apetito y la respuesta de alimentación de los peces. Esto limita la tasa diaria de alimentación, la eficiencia de conversión alimenticia, y, en última instancia, el rendimiento. La alcalinidad debería mantenerse entre 100 y 150 mg L<sup>-1</sup> como CaCO<sub>3</sub> por adiciones periódicas de bicarbonato de sodio. Para una adecuada nitrificación en los sistemas intensivos de biofloc, cada kilogramo de alimento introducido en el sistema debe ser complementado con 0.25 kg de bicarbonato de sodio (Hargreaves, 2013).

#### 1.1.2 Uso del biofloc en el cultivo de la tilapia Nilótica *Oreochromis niloticus*

Existen en la actualidad diversos estudios que refieren el uso de la tecnología de biofloc para el cultivo experimental de tilapia. Crab *et al.* (2009) en un ciclo de 50 días, encontró una tasa de crecimiento media diaria de  $0.27 \pm 0.02$  g por pez para la tilapia híbrida (*O. niloticus* x *O.*

*Aureus*) de diferentes pesos iniciales de 50 y 100 g respectivamente, durante la temporada de invierno. La densidad de población fue de 20 kg m<sup>-3</sup>, con una relación C:N de 20:1. Por su parte, Dias Purnomo (2012), comparo el efecto de diferentes fuentes de carbono: tapioca, melaza y control, en la productividad de la tilapia *O. niloticus* con la tecnología BFT a una densidad de 50 peces m<sup>-3</sup> con un peso inicial de 15.7 g durante 35 días para cada tratamiento. El FCA en los tratamientos y control fue de 1.16, 1.06 y 1.42 respectivamente; lo que demuestra que la adición de hidratos de carbono al sistema estimula la proliferación de bacterias heterotróficas que sirven de alimento a las tilapias y que contribuyen a reducir notablemente el factor de conversión alimenticia. También Cedano-Castro *et al.*, (2013) evaluaron el crecimiento de *O. niloticus* variedad Chitralada en un cultivo en biofloc en el cual adicionaron melaza a una relación 15:1 (C:N); la densidad de siembra fue de 16 peces m<sup>-3</sup> con un peso promedio de 110.2 g, los cuales en un periodo de seis y medio meses alcanzaron un peso promedio de 826.5 g, con una factor de conversión alimenticia (FCA) de 1.85 y una supervivencia de 86.5%.

Caipang *et al.* (2015) compararon la harina de trigo y la harina de maíz como fuentes de carbono para la producción de biofloc en tilapia de agua dulce y mostraron que no había efectos significativos en la calidad del agua entre los grupos biofloc y el control; Sin embargo, en términos de ganancia de peso y la conversión alimenticia (FCR), la harina de trigo se comportó mejor que la harina de maíz.

## 1.2 JUSTIFICACIÓN

Las ventajas del uso de la tecnología biofloc han sido documentadas a través de resultados de investigación científicamente validados. El uso del biofloc puede considerarse una alternativa de biorremediación pues su principal objetivo es reutilizar y convertir el exceso de nutrientes en biomasa microbiana de alto contenido proteico y energético para la nutrición de los organismos en cultivo. Este reciclaje de energía permite mejorar la conversión alimenticia, y disminuir el costo de producción lo cual hace más rentable el cultivo, además de disminuir el uso del agua y controlar las descargas contaminantes que afectan la calidad ambiental de los acuíferos de los cuales depende para su operación.

Como se conoce que la fuente de carbono orgánico en los estanques de cultivo en biofloc no sólo influye en la calidad nutricional de éste, sino también afecta los parámetros de calidad de agua tales como: la concentración de oxígeno disuelto y el potencial de hidrógeno (pH); por lo tanto, ¿Cuál es la mejor opción de fuente de carbono para potenciar los beneficios del uso de este desarrollo tecnológico en el cultivo de tilapia?

## 1.3 HIPÓTESIS

H<sub>0</sub>: El uso de tres fuentes de carbono a base de melaza y harina de trigo no afectarán la calidad del biofloc, y en consecuencia, no modificarán la respuesta de los parámetros de producción de la tilapia Nilótica, variedad GIFT.

H<sub>a</sub>: El uso de tres fuentes de carbono a base de melaza y harina de trigo afectarán la calidad del biofloc lo cual originará una respuesta diferente en los parámetros de producción de la tilapia Nilótica, variedad GIFT.

## 1.4 OBJETIVOS

### 1.4.1 Objetivo general

Evaluar tres fuentes de carbono a base de melaza y harina de trigo en la calidad del biofloc y su efecto en los parámetros de producción de la tilapia Nilótica *Oreochromis niloticus*.

### 1.4.2 Objetivos específicos

- i. Determinar los parámetros de crecimiento (crecimiento específico, supervivencia, factor de conversión alimenticia) de la tilapia cultivada en un sistema de biofloc con tres fuentes de carbono a base de melaza y harina de trigo.
- ii. Caracterizar aspectos del manejo de la calidad de biofloc (relación C:N, y volumen del floc).
- iii. Determinar la calidad del biofloc en términos de la composición proximal (energía bruta, proteína total, grasas totales, ceniza y humedad) en los diferentes tratamientos y su efecto en las variables de producción.

## 2. MATERIALES Y METODOS

El experimento se llevó a cabo en el laboratorio de bioensayos de la Unidad de Tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma de Nayarit. Éste consistió en un cultivo experimental de Tilapia Nilótica variedad GIFT bajo el modelo de biofloc el cual para su maduración requirió de un periodo de acondicionamiento de 7 días, después de lo cual inició el ciclo de cultivo de la tilapia Nilótica. El experimento tuvo una duración de 15 semanas, lo cual en acuicultura comercial corresponde a la etapa de preengorda.

### 2.1 Diseño experimental

Se utilizaron nueve tanques de polietileno con capacidad de 500 l. para constituir tres tratamientos con tres repeticiones cada uno en un diseño experimental completamente al azar, la disposición de los tratamientos con sus repeticiones con distribución al azar como se muestra en la figura 2. Los tratamientos fueron: melaza (T1), harina de trigo (T2) y una mezcla con el 50 % de melaza y 50 % de harina de trigo (T3).

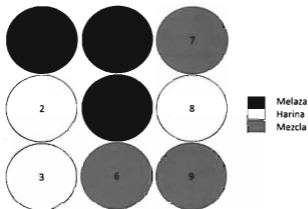


Figura 2. Diseño experimental





Figura 3. Tanques de tilapia en biofloc con diferentes fuentes de carbono

La aireación necesaria para mantener una adecuada concentración de oxígeno disuelto en el sistema de cultivo fue provista por un blower regenerativo ClearWater™ con potencia nominal de ¼ HP. El sistema de aprovisionamiento de aire fue construido con tubería de PVC de ½" con anillos de aireación de fondo contruidos con manguera de polietileno de pared rígida a la cual se le hicieron pequeñas perforaciones para distribuir uniformemente las burbujas en la columna de agua.

Se realizaron recambios semanales de entre el 10 al 20 % para mantener una adecuada concentración de sólidos en el biofloc. El agua de descarte en cada recambio fue la del fondo de los tanques con lo cual se intentó retirar la mayor cantidad de lodos y con ello mantener las mejores condiciones de calidad del agua en el cultivo.

## 2.2 Preparación del biofloc

Se utilizó un inóculo de biofloc para iniciar el acondicionamiento de los tanques de cultivo el cual fue donado por el Laboratorio de producción de crías de tilapia de la unidad Nayarit del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (UNCIBNOR<sup>+</sup>). Cada tanque fue inoculado con 20 L de biofloc, el cual se activó con alimento comercial para tilapia y melaza (25 g m<sup>-3</sup>) durante 5 días.

## 2.3 Descripción de los organismos experimentales

Se utilizaron especímenes de tilapia Nilótica (*O. niloticus* variedad GIFT), con un peso inicial promedio de 3.47 g. Los organismos fueron clasificados y distribuidos uniformemente dentro de los nueve tanques de cultivo a una densidad de siembra de 50 organismos por m<sup>3</sup> (25 peces por tanque).

## 2.4 Alimentación

Los peces fueron alimentados diariamente con alimento balanceado marca WINFISH (Zeigler®) para cada una de las etapas de crecimiento. Durante las primeras semanas se suministró alimento con 40 % de proteína. El porcentaje de proteína se redujo gradualmente hasta un mínimo de 30 %. La ración de alimento se suministró en dos horarios del día (10:00 h y 16:00 h). El alimento suministrado inicialmente correspondió al 8 % de la biomasa corporal de los individuos en los tanques y se disminuyó un 1 % cada 15 días hasta llegar al 2 % de la biomasa corporal.

La relación carbono nitrógeno utilizada como base para el mantenimiento del biofloc fue de 15:1. Para obtener la cantidad de melaza o harina se siguió la siguiente metodología sugerida por Avnimelech (1999): Se obtuvo la densidad (g m<sup>-3</sup>), y se multiplicó por la tasa de alimentación (se obtiene la cantidad de alimento que se suministra por día); dependiendo de la

cantidad de proteína, se obtiene la cantidad (g) de proteína que se suministra; a este valor se le obtiene la cantidad de nitrógeno (16 %); a la cantidad de nitrógeno (g) se le obtiene el 75 % que es el nitrógeno liberado al agua; finalmente esta cantidad de nitrógeno se multiplica por 15, para obtener los gramos de carbono a suministrar por día.

## 2.5 Variables

Las mediciones corresponden a la parte biológica (peces), ambientales (calidad del agua) y el biofloc (volumen) con la finalidad de establecer el efecto de la fuente de carbono sobre el cultivo de acuerdo al diseño experimental.

### 2.5.1 Peces

Semanalmente se realizaron biometrías para registrar el incremento de la biomasa. Se tomaron 30 tilapias por tratamiento (10 por tanque), se utilizó una balanza marca Escali® con sensibilidad de 0.01 g para el peso y un ictiometro de madera con escala en cm para la talla de cada organismo.

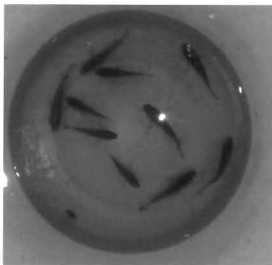


Figura 4. Muestra de peces para la biometría



Figura 5. Biometrías de peces

A partir de los datos generados de la biomasa se pudo calcular la Tasa de crecimiento específica (TCE), se tomó en cuenta el peso final e inicial de los peces, aplicando la ecuación 1.

$$TCE (\%) = \frac{\ln Pf - \ln Pi}{\text{días}} \times 100 \quad (1)$$

Donde: Ln es logaritmo natural, Pf es peso final y Pi es peso inicial.

El factor de conversión alimenticia (FCA) Se calculó al final del cultivo, aplicando las ecuaciones 2 y 3.

$$FCA = \frac{\text{Alimento consumido}}{\text{biomasa ganada}} \quad (2)$$

$$\text{Peso ganado} = W_f - W_o \quad (3)$$

Donde:  $W_f$  es el peso final y  $W_o$  es el peso inicial.

La Tasa de supervivencia (%) se calculó al final del ciclo de producción de cada tanque y se determinó mediante la ecuación 4, utilizada por Cruz *et al.*, (1993).

$$TS (\%) = \frac{N^{\circ} \text{ animales cosechados}}{N^{\circ} \text{ animales sembrados}} \times 100 \quad (4)$$

El índice de condición (IC) fue calculado de acuerdo con Ali *et al.* (2008) usando la siguiente ecuación:

$$IC = \frac{W}{L^3} \times 100 \quad (5)$$

Donde: IC es el factor de condición,  $W$  es el peso en gramos y  $L$  es la longitud del cuerpo en centímetros.

### 2.5.2 Biofloc

Los sólidos sedimentables se determinaron aplicando el método de sedimentación por conos de Imhoff (figura 6). Se tomó una muestra de un litro de agua, y se dejó en reposo por un lapso de tiempo de entre 15 a 20 minutos. Se determinó el volumen del biofloc en  $\text{ml L}^{-1}$  (Eaton *et al.*, 1995).



Figura 6. Cono imhoff

### 2.5.3 Composición proximal del Biofloc

Al final del cultivo se recolecto el biofloc para el análisis proximal según la metodología descrita por la Asociación de Métodos Analíticos Químicos (AOAC 2000). De cada tanque se realizaron 3 réplicas para cada análisis. Los detalles de las técnicas se describen en el apartado de anexos de este documento.

El contenido de humedad se determinó mediante el secado de la muestra en un horno a 55 °C hasta alcanzar peso constante; El contenido de cenizas se obtuvo por calcinación de las muestras a 550 °C durante 4 horas y por diferencia de pesos en relación a la muestra seca.

La proteína cruda se determinó a partir del análisis de nitrógeno total utilizando el método micro Kjeldahl (Figura 7). Para la digestión se utilizó un equipo SpeedDigester K-436 acoplado a un sistema de filtración de gases Scrubber K-415 (3 L de NaOH al 20% y 100 mg de azul de metileno) este proceso se estandarizo a 1:30 h.



Figura 7. Método Kjeldahl

El contenido de lípidos se determinó con la técnica de extracción de grasas totales con un equipo Soxhlet marca Novatech modelo VH-6; para la recuperación del éter de petróleo utilizado como solvente se utilizó un equipo rotoevaporador marca IKA RV 10 Basic acoplado a un sistema de enfriamiento por agua a 6.5 °C, baño maria a 55 °C y 850 revoluciones mbar. El proceso de recuperación del éter se llevó a cabo en un lapso de 20 minutos por muestra (figura 8 y 9).



Figura 8. Equipo Soxhlet





Figura 9. Recuperación del ícter de petróleo

La energía bruta contenida en las muestras de biofloc se determinó con la ayuda de la bomba calorimétrica de oxígeno (figura 10). Previamente se realizaron las “pastillas” de muestra, comprimiendo entre 0.5 a 1 g de muestra seca de biofloc. Las pastillas se dejaron secar para eliminar los restos de humedad (Figura 11).



Figura 10. Bomba calorimétrica

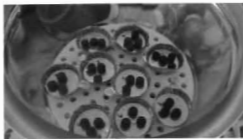


Figura 11. "Pastillas" de biofloc

#### 2.5.4 Calidad del agua

Los factores abióticos: temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) y pH se registraron tres veces por semana con un medidor (YSI 30). El oxígeno disuelto y el porcentaje de saturación (% de S) se midieron diariamente con un equipo "Dissolved Oxygen Meter" HI 9146. Cuando los valores de pH eran inferiores a 7 se añadió el 25% de bicarbonato de sodio de la cantidad de alimento suministrada en el momento como sugiere Hargreaves (2013). Se recolectaron y congelaron semanalmente muestras de 50 ml de agua de cada estanque para determinar la concentración de las especies inorgánicas de nitrógeno: Nitrogeno amoniacal total  $\text{N-NH}_4^+$ , Nitrito ( $\text{N-NO}_2^-$ ) y Nitrato ( $\text{N-NO}_3^-$ ) cuantificados en  $\text{mg L}^{-1}$  con las técnicas descritas en APHA-Stardard Methods (2005), adaptadas al uso de microplacas por Hernández López y Vargas-Albores (2003).

Al final del experimento se analizaron las muestras de agua para determinar la concentración de cada nutriente (Figura 12). Las figuras 13 a la 15 ilustran el proceso de análisis de los nutrientes con la técnica descrita.

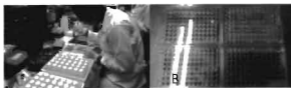


Figura 12. A) Desarrollo de la técnica de microplaca. B) Placas incubadas listas para su lectura

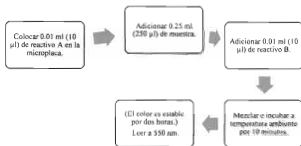


Figura 13 diagrama de flujo de metodología microplaca de nitrito

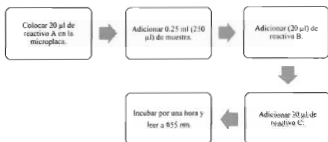


Figura 14. Metodología de la técnica de microplaca para amonio

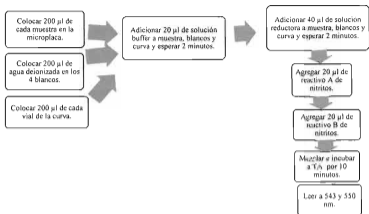


Figura 15. Metodología de la técnica de microplaca de nitrato

## 2.6 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el Software Statistica® Versión 7.

Los datos obtenidos para las diferentes variables medidas en los tratamientos experimentales se sometieron al análisis de homocedasticidad y Normalidad con la prueba de Levene y Kolmogorov-Smirnov, respectivamente, para determinar el tipo de estadístico paramétrico o no paramétrico a utilizar.

Para el análisis del peso y el índice de condición de los peces se utilizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con un nivel de significancia de 0.05.

Para la comparación de medias de los datos de proteína y lípidos se utilizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA), con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey y un nivel de significancia de 0.05. Para los datos de energía bruta se utilizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con un nivel de significancia de 0.05.

Para el análisis de los valores de amonio, nitrito, nitrato y volumen del biofloc se utilizó una prueba no paramétrica Kruskal-Wallis con un nivel de significancia de 0.05.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Parámetros de crecimiento

En la tabla 3 se muestran los valores de los parámetros de crecimiento de los peces en los diferentes tratamientos evaluados. El peso promedio final a partir de los juveniles de 3 g se mantuvo en el intervalo de 170 a 196 g, lo que fue conseguido en un periodo de 15 semanas en los diferentes tratamientos.

El mayor crecimiento en peso correspondió al tratamiento T1, en el cual se utilizó melaza al 100%. Se evidenciaron diferencias significativas en el crecimiento en peso de las tilapias en los diferentes tratamientos (Kruskal-Wallis  $H= 7.144$ ,  $gl=2$ ,  $p= 0.0281$ ). El tratamiento T1 (195.5 g) fue estadísticamente diferente al tratamiento T2 (175.94 g); sin embargo, ambos no fueron diferentes al tratamiento T3 (171.73 g) (tabla 3).

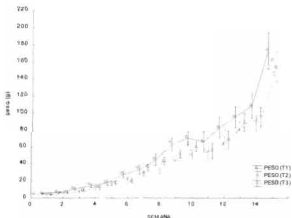
Tabla 2. Datos del crecimiento de las tilapias. Valores de la Tasa de Crecimiento Específico (TCE), Factor de conversión alimenticia (FCA), Índice de condición (IC), en los diferentes tratamientos: T1 (100 % melaza), T2 (100 % harina de trigo), T3 (50 % melaza, 50 % harina de trigo).

Parámetros	T1	T2	T3
Peso individual inicial (g)	3.47	3.47	3.47
Peso individual final (g)	195.95 ± 55.46a	175.94 ± 29.35b	171.73 ± 38.03ab
Densidad inicial (Kg m <sup>-3</sup> )	0.1735	0.1735	0.1735
Densidad final (Kg m <sup>-3</sup> )	8.62	7.74	8.24
Tasa de supervivencia (%)	88	88	96
TCE	3.84	3.73	3.71
FCA	1.19	1.41	1.31
IC	1.90 ± 0.16 a	1.90 ± 0.17 a	1.87 ± 0.18 a

\*Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre el peso individual final y el IC.

La grafica 1, describe el comportamiento de la ganancia en peso de las tilapias a través del tiempo en las quince semanas del experimento. Al inicio el crecimiento fue gradual pero relativamente lento el cual se disparó a partir de la treceava semana. Desde el inicio se hizo

evidente un mayor crecimiento en peso individual en los organismos correspondientes al tratamiento T1.



Gráfica 1. Incremento en el peso de los peces en los diferentes tratamientos.

En relación a la supervivencia, se encontró que el T1 (valor) y T2 (valor) tuvieron un comportamiento similar, mientras que el tratamiento T3 (valor) presentó el mayor porcentaje de supervivencia (Tabla 3).

En lo que respecta al factor de conversión alimenticia (FCA), el valor más bajo lo presentó el tratamiento T1 (1.19:1), en comparación con los otros tratamientos (Tabla 3). Los valores calculados de este factor fluctuaron en el intervalo de 1.19:1 a 1.41:1 en este experimento, lo cual puede considerarse bajo, de acuerdo con los resultados observados en cultivos comerciales de tilapia.



### 3.2 Relación talla-peso e índice de condición

Para la relación talla peso de los organismos en los diferentes tratamientos se generaron las ecuaciones que se muestran a continuación: para el tratamiento T1;  $\text{Peso}=0.0164 \text{ Talla}^{3.059}$  ( $R^2=0.9941$ ). Para el tratamiento T2;  $\text{Peso}=0.0317 \text{ Talla}^{2.794}$  ( $R^2=0.9059$ ) y en lo que respecta al tratamiento T3;  $\text{Peso}=0.0167 \text{ Talla}^{3.0436}$  ( $R^2=0.9837$ ). Los valores del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de las tres ecuaciones mostraron un buen ajuste de los valores observados a las ecuaciones de crecimiento calculadas para los organismos en cada tratamiento.

En lo que respecta a los valores del Índice de Condición (IC), éstos no mostraron la normalidad y homocedasticidad esperadas. El análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis reveló que no se encontraron diferencias significativas en el índice de condición de los peces cultivados en los diferentes tratamientos ( $H=4.993$ , g.l.=2 y  $p=0.0824$ ). Los valores del índice de condición de los organismos en los diferentes tratamientos se resumen en la Tabla 4. Los valores observados de éste índice se mantuvieron en el intervalo de 1.71 a 2.05 con una tendencia a incrementar paulatinamente en magnitud a medida que la edad del cultivo fue avanzando. Estos valores son coherentes con un comportamiento alométrico negativo que en términos generales refleja buena condición en los peces comparado con los valores reportados en poblaciones silvestres y en cultivos comerciales.

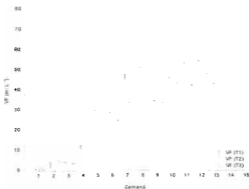
Tabla 3. Registro del promedio  $\pm$  DE del IC semanal de los peces en los tratamientos

semana	IC (T1)	IC (T2)	IC (T3)
1	1.78 $\pm$ 0.14	1.82 $\pm$ 0.32	1.73 $\pm$ 0.15
2	1.81 $\pm$ 0.14	1.76 $\pm$ 0.13	1.78 $\pm$ 0.11
3	1.92 $\pm$ 0.16	1.87 $\pm$ 0.16	1.86 $\pm$ 0.15
4	1.91 $\pm$ 0.12	1.91 $\pm$ 0.20	1.89 $\pm$ 0.12
5	1.89 $\pm$ 0.19	1.90 $\pm$ 0.13	1.68 $\pm$ 0.29
6	1.94 $\pm$ 0.20	1.96 $\pm$ 0.13	1.93 $\pm$ 0.19
7	1.95 $\pm$ 0.12	1.98 $\pm$ 0.11	1.89 $\pm$ 0.18
8	1.92 $\pm$ 0.18	1.92 $\pm$ 0.12	1.91 $\pm$ 0.11
9	1.99 $\pm$ 0.30	1.94 $\pm$ 0.11	1.87 $\pm$ 0.13
10	1.88 $\pm$ 0.12	1.84 $\pm$ 0.13	1.84 $\pm$ 0.13
11	1.91 $\pm$ 0.11	1.80 $\pm$ 0.11	1.83 $\pm$ 0.078
12	1.93 $\pm$ 0.12	1.94 $\pm$ 0.12	1.92 $\pm$ 0.10
13	1.97 $\pm$ 0.15	2.05 $\pm$ 0.21	2.02 $\pm$ 0.12
14	1.96 $\pm$ 0.12	1.98 $\pm$ 0.11	1.97 $\pm$ 0.12
15	1.93 $\pm$ 0.14	2.00 $\pm$ 0.13	1.94 $\pm$ 0.14

### 3.3 Volumen de biofloc

En lo que respecta al volumen del biofloc, no se encontraron diferencias significativas ( $p=0.4503$ ) entre los tratamientos. Los valores promedio y su desviación estándar fueron: para el tratamiento T1,  $33.92 \pm 20.25 \text{ ml L}^{-1}$ ; para el tratamiento T2,  $29.08 \pm 19.61 \text{ mg L}^{-1}$  y para el tratamiento T3,  $30.46 \pm 19.75 \text{ mg L}^{-1}$ .

Como puede apreciarse en la grafica 2, el incremento en el volumen del biofloc fue notable a partir de la cuarta semana del cultivo, después de lo cual se realizaron recambios semanales en los tanques experimentales para homologar el volumen del biofloc en los diferentes tratamientos y mantener niveles aceptables para la salud de los organismos.



Grafica 2. Variación del volumen del biofloc en los tratamientos a través del tiempo

### 3.4 Composición proximal de Biofloc

En lo concerniente al análisis de la composición proximal del biofloc, la tabla 5 describe los valores correspondientes al porcentaje de humedad y porcentaje de cenizas del biofloc, al final del experimento en cada tratamiento.

Tabla 4. Media y DE de los valores de Humedad y Cenizas en los tratamientos

Tratamiento	% de humedad $\pm$ DE	% de ceniza $\pm$ DE
T1	83.16 $\pm$ 6.27	10.62 $\pm$ 4.85
T2	86.00 $\pm$ 4.00	6.92 $\pm$ 0.37
T3	85.29 $\pm$ 5.57	7.11 $\pm$ 0.59

Los resultados referentes al porcentaje de proteína, porcentaje de lípidos y energía bruta en KJ g<sup>-1</sup>, se reportan en la tabla 6. Como puede apreciarse, se encontraron diferencias significativas respecto al porcentaje de proteína entre los tratamientos; el tratamiento T3, tuvo los valores más altos y significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) comparado con los tratamientos T1 y T2, los cuales a su vez fueron estadísticamente diferentes entre sí. El valor más bajo en cuanto al porcentaje de proteína correspondió al tratamiento T2 (Mezcla).

Tabla 5. Media  $\pm$  DE de proteína, lípidos y energía de los tratamientos.

Tratamiento	% de Proteína	% de Lípidos	Energía Bruta (KJ g <sup>-1</sup> )
T1	24.59 $\pm$ 2.08 b	10.22 $\pm$ 1.66 b	12.84 $\pm$ 1.26 a
T2	27.76 $\pm$ 1.43 c	12.22 $\pm$ 1.64 a	11.96 $\pm$ 1.94 a
T3	26.76 $\pm$ 1.54 a	11.42 $\pm$ 1.60 ab	7.28 $\pm$ 2.69 b

\* Letras diferentes en los valores promedio evidencian diferencias significativas entre tratamientos

En lo que respecta a los lípidos; el tratamiento T2 presentó los valores más altos y fue estadísticamente diferente ( $p < 0.05$ ) del tratamiento T1; No obstante, no se evidenciaron diferencias significativas del tratamiento T3 con respecto a los tratamientos T1 y T2.

En relación al aporte de energía bruta el tratamiento T3 presentó el valor más bajo y estadísticamente diferente ( $p = 0.0011$ ) comparado con los tratamientos T1 y T2. Estos últimos no mostraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre sí.

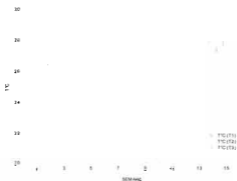
### 3.5 Parámetros de calidad del agua

En lo que respecta al análisis de los factores físico químicos como parámetros de estimación de la calidad del agua, la tabla 7 muestra los valores del monitoreo de estos factores durante el cultivo, en donde aparecen también (en la columna a la derecha) los intervalos de variación recomendados o sugeridos por diferentes autores en relación al cultivo de tilapia en biofloc.

Tabla 6. Media  $\pm$  DE de los parámetros ambientales en los tratamientos

Parámetro	T1	T2	T3	Referencia
Temperatura (°C)	27.49 $\pm$ 0.96	26.88 $\pm$ 1.45	26.85 $\pm$ 1.01	-
OD (mg L <sup>-1</sup> )	5.06 $\pm$ 0.75	4.63 $\pm$ 0.64	5.13 $\pm$ 0.91	>4.0 mg L <sup>-1</sup> (Avnimelech, 2011)
pH	7.5 $\pm$ 0.40	7.59 $\pm$ 0.40	7.54 $\pm$ 0.39	7-8 (Nootong K. y Pavasant P., 2011)

Como puede notarse en la gráfica 3, al inicio del cultivo se registraron valores de temperatura en el intervalo de 22 °C a 24 °C. La variabilidad observada al inicio del cultivo experimental fue estabilizándose paulatinamente a través del tiempo a mediados y hacia el final del experimento.

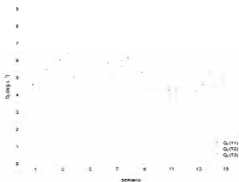


Gráfica 3. Registro semanal de la temperatura del agua en los tratamientos

De acuerdo con lo observado en este experimento, el oxígeno disuelto (OD) no fue en apariencia un factor limitante para el crecimiento de las tilapias o bien, para adecuado desarrollo del biofloc. Los valores de este factor se mantuvieron en el intervalo de 4.6 a 5.1 mg L<sup>-1</sup> en los tanques experimentales durante las quince semanas de duración del estudio.

Se evidenciaron diferencias significativas entre tratamientos en cuanto a la concentración de Oxígeno Disuelto ( $p < 0.05$ ). El tratamiento T2 registró los valores más bajos de la concentración de este gas ( $4.636 \pm 0.648$  mg L<sup>-1</sup>) y fue estadísticamente diferente de los tratamientos T1 y T3 ( $5.067 \pm 0.755$  mg L<sup>-1</sup>;  $5.132 \pm 0.915$  mg L<sup>-1</sup>), quienes a su vez no fueron significativamente diferentes entre sí.

La grafica 4 muestra el comportamiento del oxígeno disuelto en los diferentes tratamientos a través del tiempo.

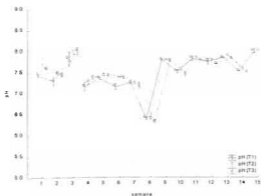


Grafica 4. Concentraciones de O<sub>2</sub> en mg L<sup>-1</sup> en los tratamientos por semana

## pH

En relación a los valores de pH, éste factor limitante para el mantenimiento del biofloc tuvo un comportamiento muy estable durante la mayor parte del experimento, que no evidenció diferencias significativas ( $p= 0.3306$ ) en los valores del potencial de hidrógeno en los diferentes tratamientos.

La grafica 5 muestra la variación de este factor durante las quince semanas de estudio. Los valores del pH registrados fueron de neutros a alcalinos durante la mayor parte del experimento, excepto en la octava semana donde se registraron valores ligeramente ácidos sin perjuicio aparente de la calidad del biofloc. Así lo demuestra la tendencia observada en la gráfica 2 de este apartado, en la cual se denota un ligero descenso del volumen del biofloc entre la semana octava y novena, seguido de una rápida recuperación de los volúmenes normales a partir de la décima semana.



Grafica 5. Comportamiento del pH en las semanas de cultivo en los tratamientos

### 3.6 Compuestos nitrogenados

Con respecto a la concentración de los compuestos nitrogenados en los tanques de cultivo experimental; la tabla 8 muestra un resumen de los valores de media y desviación estándar de cada uno de éstos compuestos. Ninguno de los parámetros tuvo la normalidad y homocedasticidad esperadas por lo que los resultados corresponden al análisis no paramétrico y la prueba de medianas correspondiente. Las graficas 6, 7 y 8 muestran el comportamiento de los valores de Amonio, Nitrito y Nitrato, respectivamente, durante el cultivo experimental.

La variabilidad observada en estos nutrientes fue amplia en los diferentes tratamientos, lo cual explica la falta de normalidad de los datos registrados. Se encontraron diferencias significativas en los diferentes tratamientos (Tabla 8).

En cuanto a las concentraciones de Nitrito y Nitrato, no se evidenciaron diferencias estadísticas entre los tratamientos del experimento.

Tabla 7. Valores promedio  $\pm$  DE de amonio, nitrito y nitrato de cada tratamiento.

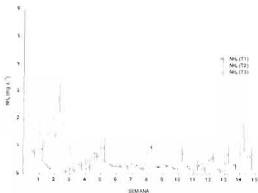
Parámetro	T1	T2	T3
Amonio (mg L <sup>-1</sup> )	0.361 $\pm$ 1.06 b	0.753 $\pm$ 1.42 ab	0.726 $\pm$ 1.04 a
Nitrito (mg L <sup>-1</sup> )	0.723 $\pm$ 1.18 a	1.347 $\pm$ 1.97 a	0.906 $\pm$ 1.65 a
Nitrato (mg L <sup>-1</sup> )	79.078 $\pm$ 55.65 a	107.13 $\pm$ 97.78 a	99.934 $\pm$ 77.05 a

\*Letras diferentes en cada parámetro indican las diferencias significativas entre tratamientos

#### Amonio

En lo que concierne al amonio se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ( $p=0.0363$ ): Solo se encontró diferencias significativas entre los tratamientos T1 y T3; el tratamiento T2 presentó los valores más altos de amonio.



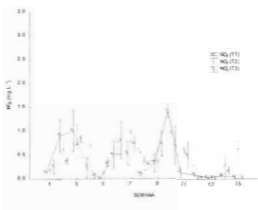


Gráfica 6. Concentraciones semanales del amonio los tratamientos.

En lo que corresponde al comportamiento de la concentración de amonio a través del tiempo en los diferentes tratamientos, la concentración máxima de amonio reportada en los tanques fue de  $3.82 \text{ mg L}^{-1}$  y la menor de  $0.33 \text{ mg L}^{-1}$  (gráfica 6). La amplia variabilidad inicial registrada durante las dos primeras semanas se estabilizó en la semana 3 donde el intervalo de variación se redujo considerablemente hasta el final del experimento.

## Nitrito

En cuanto a la concentración de nitrito, esta variable presentó mayor inestabilidad a través del cultivo (grafica 7). Los valores mínimos y máximos fueron de 0.05, 1.79 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. No se evidenciaron diferencias significativas ( $p= 0.1201$ ) en los valores de esta variable como se muestra en la tabla 8.

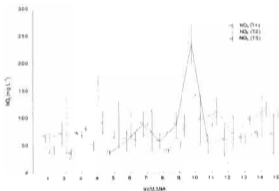


Grafica 7. Concentración de nitrito durante las semanas de cultivo

## Nitrato

En lo que respecta a la concentración de nitrato en los diferentes tratamientos del experimento, se encontró una amplia variabilidad a través del tiempo como entre tratamientos. Los valores mínimos y máximos de nitrato fueron de 8.15 y 276.55 mg L<sup>-1</sup> respectivamente. Sin embargo, los tratamientos no presentaron diferencias significativas ( $p=0.6049$ ) entre sí.

La grafica 8, muestra el comportamiento del nitrato en los tratamientos a través del tiempo. Como puede apreciarse, en general los valores de nitrato fueron altos (mayores a 25 mg L<sup>-1</sup>), lo cual no necesariamente afecta a las tilapias, sobre todo a pH neutro y con niveles de oxigeno superiores a 5 mg L<sup>-1</sup>, como es el caso que nos ocupa.



Grafica 8 Valores de nitrato en mg L<sup>-1</sup> durante el cultivo por tratamiento

## 4. DISCUSION

### 4.1 Parámetros de crecimiento

El tratamiento que reportó mayor crecimiento en peso en las tilapias durante el experimento fue el de melaza, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Dias Purnomo (2012), quien comparó diferentes fuentes de carbono y demostró que la melaza disminuye significativamente el FCA. Los valores del FCA de los diferentes tratamientos obtenidos en el presente trabajo son menores que los obtenidos por Cedano-Castro *et al.*, (2013) quien reporta un FCA de 1.85 utilizando melaza como fuente de carbono orgánico, y concluyeron que las fuentes de carbono empleadas respondieron favorablemente al crecimiento de los peces. Pérez-Fuentes *et al.*, (2016) reportaron un FCA de  $1.03 \pm 0.01$  utilizando melaza como fuente de carbono y 15:1 de C:N, el valor es menor al que se reporta en el presente trabajo bajo las mismas condiciones 1.19.

Los parámetros de crecimiento del presente trabajo corresponden a valores similares; los mejores resultados del tratamiento melaza, hace que siga siendo la fuente de carbono favorita para los investigadores; donde concluyen que la fuente de carbono influye directamente en el crecimiento del pez (Baloi *et al.* 2013; Schweitzer *et al.* 2013; Correia *et al.* 2014). Aunque el crecimiento individual tuvo la misma tendencia a través del tiempo, los peces del tratamiento melaza alcanzaron mayores tamaños en el mismo periodo.

La relación talla-peso y el índice de condición (IC) son descriptores de gran interés en la biología de poblaciones de peces, ya que aportan información fundamental sobre estrategias de crecimiento, estado nutricional, entre otros. Los valores cercanos a dos del índice de condición reflejan que el estado de salud de los organismos en cualquier tratamiento era similar, los peces presentaron una alometría negativa, es decir, la proporción de la talla-peso fue menor, porque los peces presentaban mayor longitud corporal para el peso.

## 4.2 Volumen de biofloc

De acuerdo con Avnimelech, (2009) un indicativo de buena calidad del biofloc en el cultivo de tilapia es una concentración de biofloc de  $100 \text{ ml L}^{-1}$ ; mientras Hargreaves (2013) recomienda mantener la concentración entre  $25$  a  $50 \text{ ml L}^{-1}$ . Las concentraciones registradas en el presente estudio estuvieron mayormente en el intervalo de  $50$  a  $80 \text{ ml L}^{-1}$ , por lo que se puede determinar que la salud del biofloc fue aceptable de acuerdo a estas recomendaciones. Con ayuda de los recambios semanales del  $10 \%$  el volumen no sobrepasó los óptimos para el cultivo de tilapia.

Pérez-Fuentes *et al.* (2016) compararon el efecto de la C:N en la remoción del nitrógeno y la producción del tilapia en altas densidades ( $75 \text{ peces/m}^2$  con peso inicial de  $38.4 \pm 1.49 \text{ g}$ ); los resultados que encontraron para un C:N de  $15:1$  con melaza fueron que el VF máximo de  $70 \text{ ml L}^{-1}$ , valor similar al reportado en el presente trabajo.

La formación del biofloc es constante en el sistema BFT. Con la adición de fuentes orgánicas de carbono, hubo una acumulación de SST durante el ciclo. En el experimento, los tratamientos no difirieron en la concentración del biofloc y al final del experimento, las medias fueron similares.

### 4.3 Composición proximal de biofloc

La composición proximal del biofloc varía en cada estudio realizado; en lo que respecta al porcentaje de proteína se reportan valores de la composición del biofloc que van desde el 12 hasta el 50 %. El mismo comportamiento puede referirse en relación al porcentaje de lípidos; la literatura consultada reporta resultados que van desde <0.1 hasta el 41 % del contenido de lípidos. Los trabajos que reportaron evaluaciones de la energía bruta refieren resultados superiores a los 20 KJ g<sup>-1</sup> (Azim y Little (2008), Emerenciano *et al.* (2012), entre otros). La composición proximal del biofloc en los diferentes tratamientos evaluados en el presente trabajo concuerda con lo reportado por los autores citados anteriormente. Sin embargo, Rajkumar *et al.* (2015) evaluaron el efecto de diferentes BFT en un cultivo de *L. vannamei*; del tratamiento donde se utilizaron melaza registraron 45.98 % ± 0.59 de Proteína cruda (PC), 0.57 % ± 0.07 de lípidos y 22.45 ± 0.56 de KJ g<sup>-1</sup> de energía bruta; con respecto al tratamiento donde utilizaron harina de trigo 53.65 % ± 0.7 de PC, 0.92 ± 0.003 de lípidos y 27.25 KJ g<sup>-1</sup> ± 0.86 de energía bruta, estos valores superan los encontrados en el presente trabajo.

Con esta variabilidad se puede constatar que efectivamente la composición proximal se ve afectada primordialmente por la fuente de carbono elegida, y que ésta influye en la composición microbiana que determina las características nutritivas, lo cual hace a cada biofloc único en cuanto a su composición bioquímica (Crab 2010; Ekasari *et al.* 2010, 2014). Además, Kuhn *et al.* (2010) incluye que la composición del biofloc depende de las condiciones ambientales como la salinidad, el VF y la intensidad de la luz y aún más importante la edad del biofloc, en biofloc "joven" las bacterias heterotróficas se presentan, mientras que en biofloc "viejo" es dominado por hongos. Sin embargo, el hecho de que el porcentaje de proteína entre los tratamientos solo varía entre el 2-3 % y su impacto en el crecimiento de los peces, se puede considerar que forzosamente es mejor utilizar la melaza sola o en combinación de otra fuente de carbono.

#### 4.4 Calidad del agua

El monitoreo continuo de los parámetros de calidad de agua en el sistema BFT garantiza un buen manejo del cultivo que conlleva al éxito del mismo, tal cuestión es además vital para mantener los parámetros dentro de los intervalos óptimos requeridos tanto para el pez como para el biofloc (Crab 2010).

La temperatura registrada a lo largo del periodo de cultivo se ajustó a los límites óptimos para el biofloc y también para el cultivo de tilapia.

Los valores de oxígeno disuelto reportados en el presente estudio fueron superiores de  $4.0 \text{ mg L}^{-1}$ ; sin embargo, se menciona recurrentemente en la literatura la conveniencia de mantener el oxígeno disuelto cercano a  $6 \text{ mg L}^{-1}$  (Hargreaves, 2013).

Los valores de pH se mantuvieron en la mayoría del tiempo superiores a 7, lo cual es recomendable (Nootong y Pavasant, 2011); sin embargo, se registró una disminución abrupta de tal parámetro durante la octava semana. Hargreaves, (2013) y Ebeling et al., (2006) atribuyen esta situación al proceso de nitrificación; donde la actividad de las bacterias nitrificantes desgasta la reserva de alcalinidad en el agua. De acuerdo con Furtado et al. (2011), para evitar el descenso de los valores de pH y los niveles de alcalinidad es necesaria la aplicación de los compuestos de alcalinización para evitar un efecto negativo en la calidad del agua y el desempeño de los organismos cultivados. Hargreaves, (2013) recomienda añadir al sistema  $0.25 \text{ kg}$  de bicarbonato de sodio por cada kilogramo de alimento. Por lo tanto, en los casos donde se registraron valores menores a 7, se añadió el 25 % de bicarbonato de sodio de la cantidad de alimento suministrada en el momento, lo que se reflejó en la rápida recuperación de los valores neutros y ligeramente alcalinos en el sistema de cultivo.

#### 4.5 Compuestos nitrogenados

La adición de las fuentes de carbono no necesariamente representó un cambio significativo en la concentración del nitrógeno. Teóricamente las concentraciones de amonio, nitrito y nitrato deberían mantenerse estables y bajas en el BFT (Ebeling y Timmons 2007).

En los sistemas BFT la concentración del amonio se controla a través de tres principales vías: captación por las algas, bacterias y asimilación de la nitrificación. La importancia relativa de los tres procesos depende de varios factores tales como la concentración de amonio, biofloc volumen, tasa de alimentación diaria, intensidad de la luz y la relación C:N (Choo *et al.*, 2015).

Hargreaves 2013 menciona que si los sólidos no se eliminan a través del intercambio de agua, una gran proporción de nitrógeno en el sistema (amonio) con el tiempo se oxida en nitrato y por lo tanto resulta en la acumulación de la concentración de nitratos, que sólo es tóxico en altas concentraciones; en el presente trabajo no se realizaron recambios de agua sistemáticos, y su aplicación se debió más a la necesidad de controlar el volumen del biofloc en niveles aceptables, lo cual explica la presencia de concentraciones elevadas de nitrato.

El comportamiento de los tratamientos tuvo una tendencia a la acumulación del amonio, lo cual concuerda con los resultados reportados por Nootong y Pavaant (2011) que desarrollaron un cultivo de tilapia en biofloc utilizando harina de tapioca como fuente de carbono y observaron que los primeros días en NAT y el nitrito se mantuvieron inestables con concentraciones máximas de  $25 \text{ mg L}^{-1}$  y  $50 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente, sin embargo a partir del día 35 el nitrato empezó a incrementarse y el NAT y  $\text{NO}_2$  a disminuir y estabilizarse. Luo *et al.* (2014) compararon en sistema BFT contra un sistema de recirculación acuática (RAS) en el cultivo de tilapia; para el caso de BFT reportaron concentraciones máximas de NAT ( $60 \pm 0.45 \text{ mg L}^{-1}$ ) y nitrato ( $119 \pm 2.01 \text{ mg L}^{-1}$ ) en las primeras semanas de cultivo, conforme paso el tiempo las concentraciones se estabilizaron.

Por otra parte, Caipang *et al.* (2015) compararon la harina de trigo y la harina de maíz; sus resultados mostraron valores inferiores a los del presente trabajo, para el caso del NAT los valores máximos correspondieron a  $2 \text{ mg L}^{-1}$  en ambos tratamientos con una tendencia a la



disminución a través del tiempo; para el caso del nitrito mantuvieron una concentración máxima de  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , sin embargo esta concentración disminuyó notablemente por el proceso de nitrificación; y finalmente reportaron los valores de nitrato estables con concentraciones menores que  $20 \text{ mg L}^{-1}$  en los tratamientos; sin embargo, el desarrollo del trabajo de Caipang *et al.*, (2015) solo duró 45 días (30 días para producir el biofloc y 15 días con tilapias de 2.5 g en acuarios de 20 L) lo que puede explicar las concentraciones del NAT en comparación con las del presente trabajo.

Pérez-Fuentes *et al.*, (2016) comparó el efecto de la C:N en la remoción del nitrógeno y la producción de tilapia en altas densidades (75 peces/m<sup>3</sup> con peso inicial de  $38.4 \pm 1.49 \text{ g}$ ); utilizaron melaza como fuente de carbono y encontraron que en una C:N de 15:1 el promedio del  $\text{NH}_4$  se mantuvo en  $29.96 \pm 6.26 \text{ mg L}^{-1}$ , y el  $\text{NO}_2$  de  $0.97 \pm 1.14 \text{ mg L}^{-1}$ ; estos valores son mayores a los encontrados al presente trabajo utilizando la misma fuente de carbono y la C:N ( $\text{NH}_4$   $0.361 \pm 1.06 \text{ mg L}^{-1}$  y  $0.723 \pm 1.18 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{NO}_2$ ); sin embargo el  $\text{NO}_3$  que reportaron fue de  $48.36 \pm 57.6 \text{ mg L}^{-1}$  y es menor al encontrado en el presente trabajo  $79.078 \pm 55.65 \text{ mg L}^{-1}$ . Además, ellos discutieron con sus resultados que a C:N superiores a 15:1 los compuestos nitrogenados afectan negativamente la nitrificación, por lo que se puede considerar en el presente trabajo porque el  $\text{NH}_4$ ,  $\text{NO}_2$  y el  $\text{NO}_3$  no se encontró un punto de estabilización y tendencia a disminuir como se esperaba.

El nitrato es el producto final del proceso de nitrificación y tiende a acumularse en altas concentraciones. Sin embargo, este es considerado el compuesto menos tóxico, con efectos adversos observados solo a concentraciones por encima de  $60 \text{ mg L}^{-1}$  (Van Wyk and Scarpa 1999). Se observaron picos de emergencia de nitrato durante el experimento debido al proceso de nitrificación.

## 5. CONCLUSIONES

- i. De manera general se confirman los resultados de investigación descritos por otros autores donde existe un mayor crecimiento de la tilapia con el uso de la melaza como fuente de carbono en el cultivo en biofloc.
- ii. El volumen del biofloc fue similar en todos los tratamientos, pero no así su composición bioquímica lo cual permite inferir un efecto determinante de la fuente de carbono en su calidad nutricional.
- iii. A pesar de que la combinación de melaza y harina en el tratamiento Mezcla aportó más porcentaje de proteína a la nutrición de las tilapias en cultivo, esto no se reflejó en un mayor crecimiento de los peces en este tratamiento. Lo que se nos permite concluir que el aporte energético del biofloc en los tratamientos Melaza y Harina tuvo un efecto más influyente para el crecimiento de los peces.
- iv. Se demostró que la velocidad de degradación de la fuente de carbono utilizada fue independiente de su efectividad en el experimento, debido a que todas fueron efectivas en la reducción de las concentraciones de amonio, y en el incremento de la concentración de nitrito
- v. Estos factores guardan una relación estrecha con el proceso de nitrificación, la síntesis de nuevas células bacterianas y la formación del biofloc.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Ali, A., Al-Ogaily, S.M., Al-Asgah, N.A., Goddard, J.S., Ahmed, S.I., 2008. Effect of feeding different protein to energy (P/E) rations on the growth performance and body composition of *Oreochromis niloticus* fingerlings. *J. Appl. Ichthyol.* 24, 31-37.
- A.O.A.C (Association of Analytical Chemists), 2000: Official Methods of Analysis, 17th Edition, Washington, D.C.; U.S.A.
- APHA (2005) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (21st edn). American Public Health Association, Washington, DC, USA.
- Asaduzzaman M, Wahab MA, Verdegem MCJ, Huque S, Salam MA, Azim ME., 2008. C/N ratio control and substrate addition for periphyton development jointly enhance freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* production in ponds. *Aquaculture* 280:117-123
- Asaduzzaman, M., Rahman, M. M., Azim, M. E., Islam, M. A., Wahab, M. A., Verdegem, M. C. J. & Verreth, J. A. J. 2010. Effects of C/N ratio and substrate addition on natural food communities in freshwater prawn monoculture ponds. *Aquaculture*, 306, 127-136.
- Avnimelech, Y. 1999. Carbon/Nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture*. 176, 227-235.
- Avnimelech Y. 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bioflocs technology ponds. *Aquaculture*. 264:140-147.
- Avnimelech Y, Verdegem M, Kurup M, Keshavanath P. 2008. Sustainable land based Aquaculture: Rational Utilization of Water, Land and Feed Resources. *Mediterranean Aquaculture J*; 1(1): 45-55.
- Azim, M. E. & Little, D. C. 2008. The Biofloc Technology (BFT) in indoor tanks: water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 283, 29-35.

- Baloi M, Arantes R, Schweitzer R, Magnotti C, Vinatea L. 2013. Performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* raised in biofloc systems with varying levels of light exposure. *Aquacultural Engineering* 52:39–44.
- Boyd C.E., 1998. Pond water aeration systems. *Aquacultural Engineering*, 18: 9-40.
- Burford, M.A., Thompson, P.J., Bauman, R.H. & Pearson, D.C. 2003. Nutrient and microbial dynamics in high - intensive, zero - exchange shrimp ponds in Belize. *Aquaculture* 219, 393–411.
- Burford, M. A., Thompson, P. J., Mcintosh, R. P., Bauman, R. H. & Pearson, D. C. 2004. The contribution of flocculated material to Shrimp (*Litopenaeus Vannamei*) Nutrition in a high-intensity, zero exchange system. *Aquaculture*, 232, 525-537.
- Caipang CM., Choo HX., Bai Z., Huang H., Lay-Yag CM., Lim J., 2015. Small-scale production of biofloc using various carbon sources for the freshwater culture of tilapia, *Oreochromis* sp. *Animal Biology & Animal husbandry International Journal of the Bioflux Society* vol 7, 103-111.
- Cedano-Castro, M. D., Lujan-Bulnes, A. & Suarez Marin, H. 2013. Breeding of *Oreochromis niloticus* var Chitralada in bio-floc system in the produmar SA company, Guayaquil (Ecuador). *Rebiofest*, 1, 79-91.
- Choo HX., Marlowe AC., Caipang. 2015. Biofloc technology (BFT) and its application towards improved production in freshwater tilapia cultura. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation International Journal of the Bioflux Society* Volume 8, Issue 3. 362-366.
- Correia ES, Wilkenfeld JS, Morris TC, Wei L, Prangnell DI, Samocha TM. 2014. Intensive nursery production of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* using two commercial feeds with high and low protein content in a biofloc-dominated system. *Aquacultural Engineering* 59:48–54.
- Crab R., Kochva, M., Verstraete, W. & Avnimelech, Y. 2009. Bio-Flocs technology application in over-wintering of tilapia. *Aquacultural Engineering*, 40, 105-112.

- Crab R., Lambert, A., Defoirdt, T., Bossier, P. & Verstraete, W. 2010. The application of bioflocs technology to protect brine shrimp (*artemia franciscana*) from pathogenic *vibrio harveyi*. *Journal of Applied Microbiology*, 109, 1643-1649.
- Crab R. (2010). Bioflocs technology: an integrated system for the removal of nutrients and simultaneous production of feed in aquaculture. PhD thesis, Ghent University.
- Crab, R., Defoirdt, T., Bossier, P. & Verstraete, W. 2012. Biofloc technology in aquaculture: beneficial effects and future challenges. *Aquaculture*, 356-357, 351-356.
- De Lorenzo MA., Schweitzer R, Do Espírito Santo CM, Souza Candia EW, Pedreira Mourinho JL, 2015. Intensive hatchery performance of the Pacific white shrimp in biofloc system. *Aquacultural Engineering* 67, 53-58.
- De Schryver, P., Crab, R., Defoirdt, T., Boon, N. & Verstraete, W. 2008. The basics of bioflocs technology: the added value for aquaculture. *Aquaculture*, 277, 125-137.
- Dias Purnomo, P. 2012. The effect of carbohydrate addition in aquaculture media towards production of intensive tilapia culture (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Management and Technology*, 1, 161-179.
- Do Espírito Santo CM., Isabela Claudiana Pinheiro IC., Alves de Jesus GF., Pedreira Mourinho JL., Vieira FN. & Seiffert WQ., 2016. Soybean molasses as an organic carbon source in the farming of *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in a biofloc system. *Aquaculture Research*, 1-9.
- Furtado P.S., Poersch L.H., Wasielesky Jr. 2011. Effect of calcium hydroxide, carbonate and sodium bicarbonate on water quality and zootechnical performance of shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in bio-flocs technology (BFT) systems. *Aquaculture* 32, 130-135.
- Eaton, A. D., Cleserci, L. S. & Greenberg, A. E. 1995. Standard methods for the examination of water and waste water. Health Assoc. Washington D.C., 10 Th Edition.

- Ebeling J.M., Timmons M.B. & Bisogni J.J., 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture* 257, 346-358.
- Ekasari J, Crab R, Verstraete W. 2010. Primary nutritional content of bio-flocs cultured with different organic carbon sources and salinity. *HAYATI J Biosci* 17:125-130.
- Ekasari J, Angela D, Waluyo SH, Bachtiar T, Surawidjaja EH, Bosier P, De Schryver P. 2014. The size of biofloc determines the nutritional composition and the nitrogen recovery by aquaculture animals. *Aquaculture* 426-427:105-111.
- Emerenciano M, Ballester ELC, Cavalli RO, Wasielesky W. 2012. Biofloc technology application as a food source in a limited water exchange nursery system for pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817). *Aquaculture Research* 43:447-457.
- Hargreaves, J. (2013). *Biofloc Production Systems for aquaculture*. United States: Southern Regional Aquaculture Center.
- Hernández López, J. & Vargas-Albores, F. 2003. A microplate technique to quantify nutrients in seawater. *Aquaculture Research*, 34, 1201-1204.
- Hollender, J., van der Krol, D., Kornberger, L., Gierden, E., Dott, W., 2002. Effect of different carbon sources on the enhanced biological phosphorus removal in a sequencing batch reactor. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18 (4), 355-360.
- Ju ZY, Forster I, Conquest L, Dominy W, Kuo WC, Horgen FD. 2008. Determination of microbial community structures of shrimp floc cultures by biomarkers and analysis of floc amino acid profiles. *Aquaculture Research* 39:118-133.
- Ju ZY, Forster I, Conquest L, Dominy W. 2008. Enhanced growth effects on shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from inclusion of whole shrimp floc or floc fractions to a formulated diet. *Aquac Nut* 14:533-543.

- Kim, S.-K., Pang, Z., Seo, H.-C., Cho, Y.-R., Samocha, T. & Jang, I.-K. 2014. Effect of bioflocs on growth and immune activity of pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* postlarvae. *Aquaculture Research*, 45, 362-371.
- Kim M., Min EY, Kim JH, Koo JK, Kang JC. 2015. Growth performance and immunological and antioxidant status of Chinese shrimp, *Fennerpenaeus chinensis* reared in bio-floc cultura system using probiotics. *Fish & Shellfish Immunology*. 141-146.
- Kuhn DD, Boardman GD, Lawrence AL, Marsh L, Flick GJ. 2009. Microbial flocs generated in bioreactors is a superior replacement ingredient for fishmeal or soybean meal in shrimp feed. *Aquaculture* 296:51-57.
- Kuhn DD, Lawrence AL, Boardman GD, Patnaik S, Marsh L, Flick GJ. 2010. Evaluation of two types of bioflocs derived from biological treatment of fish effluent as feed ingredients for Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 303:28-33.
- Kumar S., Shyne Anand PS., Debasis De, D Deo A., Ghoshal TK., Sundaray JK., Ponniah AG., Poochirian K., Jithendran, Raja RA., Biswas G. & Lalitha N., 2015. Effects of biofloc under different carbon sources and protein levels on water quality, growth performance and immune responses in black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius, 1978). *Aquaculture Research*, 1-15.
- Liu, L., Hu, Z., Dai, X. & Avnimelech, Y. 2014. Effects of addition of maize starch on the yield, water quality and formation of bioflocs in an integrated shrimp culture system. *Aquaculture*, 418-419, 79-86.
- Luo, G., Gao, Q., Wang, C., Liu, W., Sun, D., Li, L. & Tan, H. 2014. Growth, digestive activity, welfare, and partial cost-effectiveness of genetically improved farmed Tilapia (*Oreochromis Niloticus*) cultured in a recirculating aquaculture system and an indoor biofloc system. *Aquaculture*, 422-423, 1-7.
- Maicá PF, Borba MR, Wasiclesky W. 2012. Effect of low salinity on microbial floc composition and performance of *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles reared in a zero-water-exchange super-intensive system. *Aquaculture Research* 43:361-370.

- Marlowe AC, Caipang , Choo HX, Zemin Bai , Huilin Huang , Clara M. Lay-yag. 2015. Viability of sweet potato flour as carbon source for the production of biofloc in freshwater cultura of tilapia, *Oreochromis* sp. *Aquaculture Research* 7:329-336.
- McIntosh D., Samocha T.M., Jones E.R., Lawrence A.L., McKee D.A., Horowitz S. & Horowitz A. 2000. The effect of a bacterial supplement on the high-density culturing of *Litopenaeus vannamei* with low-protein diet in outdoor tank system and no water exchange. *Aquaculture Eng* 21:215-227.
- Nootong K. & Pavasant P., 2011. Effects of Organic Carbon Addition in Controlling Inorganic Nitrogen Concentrations in a Biofloc System. *World Aquaculture Society* Vol. 42, No. 3. 339-346.
- Oehmen, A., Yuan, Z., Blackall, L.L., Keller, J., 2004. Short-term effects of carbon source on the competition of polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms. *Water Sci. Technol.* 50 (10), 139-144.
- Pérez-Fuentes JA., Hernández-Vergara MP., Carlos I. Pérez-Rostro, Fogel I., 2016. C:N ratios affect nitrogen removal and production of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* raised in a biofloc system under high density cultivation. *Aquaculture* 452, 247-251.
- Portz D.E., Woodley C.M. and Cech J.J., 2006. Stress associated impacts of short-term holding on fishes. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 16: 125-170.
- Rajkumar M., Kumar Pandey P., Aravind R., Vennila A., Bharti V. & Purushothaman CS., 2015. Effect of different biofloc system on water quality, biofloc composition and growth performance in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquaculture Research*, 1-13.
- Ray, A. J., Seaborn, G., Vinatea, L., Browdy, C. L. & Leffler, J. W. 2012. Effects of biofloc reduction on microbial dynamics in minimal-exchange, superintensive shrimp, *Litopenaeus vannamei*, culture systems. *Journal of the World Aquaculture Society*, 43, 790-801.



- Samocha T.M., Patnaik S., Speed M., Ali A.M., Burger J.M., Almeida R.V., Ayub Z., Harisanto M., Horowitz A. & Brock D.L., 2007. Use of molasses as carbon source in limited discharge nursery and grow-out systems for *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Engineering* 36, 184–191.
- Saritha, T., 2009. Development of innovative low cost larviculture technologies of the Giant Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). Ph.D. Thesis, Cochin University of Science and Technology.
- Schweitzer R, Arantes R, Costodio PFS, do Espírito Santo CM, Arana LV, Seiffert WQ, Andreatta ER. 2013. Effect of different biofloc levels on microbial activity, water quality and performance of *Litopenaeus vannamei* in a tank system operated with no water exchange. *Aquacultural Engineering* 56:59–70.
- Serra F.P., Gaona C.A., Furtado P.S. Poersch L.H., Wasielesky Jr. W. 2015. Use of different carbon sources for the biofloc system adopted during the nursery and grow-out cultura of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Int* 23. 1325–1339
- Soares R, Jackson C, Coman F, Preston N. 2004. Nutritional composition of flocculated material in experimental zero-exchange system for *Penaeus monodon*. In: *Proceedings of Australian Aquaculture*, WAS, Sydney p.89.
- Souza D.M., Suita S.M., Romano L.A., Wasielesky W. Jr & Ballester E.L.C., 2014. Use of molasses as a carbon source during the nursery rearing of *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) in a Biofloc technology system. *Aquaculture Research* 45, 270–277.
- Suita SM. 2009. O uso da Dextrose como fonte de carbono no desenvolvimento de bioflocos e desempenho do camarão-branco (*Litopenaeus vannamei*) cultivado em sistema sem renovação de água. Tese de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil.
- Tacon AGJ, Cody JJ, Conquest LD, Divakaran S, Forster IP, Decamp OE. 2002. Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white Shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. *Aquaculture Nut* 8:121–137.

- Timmons Mb, Ebeling, J., Wheaton, F., Sommerfelt, S. & Vinci, B. 2002. Microbial biofloc and protein levels in green tiger shrimp. Recirculating Aquaculture Systems.
- Varghese, J.T., 2007. Carbon / nitrogen ratio optimization and periphyton development on the production and sustainability of *Penaeus monodon* (fabricius) in extensive culture system. Ph.D. Thesis. Cochin University of Science and Technology, Cochin, India.
- Vinatea, L., Galvez, A.O., Browdy, C.L., Stokes, A., Venero, J., Haveman, J., Lewis, B.L., Lawson, A., Shuler, A., Leffler, J.W., 2010. Photosynthesis, water respiration and growth performance of *Litopenaeus vannamei* in a super-intensive raceway cultura with zero water exchange: interaction of water quality variables. Aquacultural Engineering 42, 17–24.
- Xu, W.-J. & Pan, L.-Q. 2012. Effects of bioflocs on growth performance, digestive enzyme activity and body composition of juvenile *Litopenaeus vannamei* in zero-water exchange tanks manipulating C/N ratio in feed. Aquaculture, 356–357, 147-152.
- Wang G, Yu E, Xie J, Yu D, Li Z, Luo W, Qiu L, Zheng Z., 2015. Effect of C/N ratio on water quality in zero-water Exchange tanks and the biofloc supplementation in feed on the growth performance of crucian carp, *Carassius auratus*. Aquaculture 443:98–104.
- Wasielesky W.Jr, Atwood H, Stokes A, Browdy CL. 2006. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 258:396–403.
- Webster C.D. & Lim C.E., 2002. Nutrient Requirements and Feeding of Finfish for Aquaculture. CABI Publishing, Oxford, UK.
- Willen B.M. and Balmer P., 1999. The effect of dissolved oxygen concentration on the structure, size and size distribution of activated sludge flocs. Water Res., 33: 391-400.

## 7. ANEXOS

### 7.1 Determinación de humedad en productos alimenticios (NMX-F-083-1986)

#### APARATOS Y EQUIPO

- Balanza con sensibilidad de 0.1 mg
- Crisoles de porcelana
- Horno o estufa eléctrica con control de temperatura
- Desecador de sílica
- Pinzas para crisol

#### PROCEDIMIENTO

Pesar una cantidad de muestra conveniente en el crisol previamente tarado; colocar el crisol en la estufa y mantener la temperatura adecuada al producto (55°C), durante el tiempo necesario (hasta alcanzar peso constante).

Una vez obtenido el peso constante, transferir el crisol al desecador; dejar enfriar a la temperatura ambiente y pesar.

#### CÁLCULOS

$$\% \text{ humedad} = \frac{(P - P1)}{P2} \cdot 100$$

Donde:

P = Peso del recipiente con la muestra húmeda, en gramos.

P1 = Peso del recipiente con la muestra seca.

P2 = Peso de la muestra en gramos.

## 7.2 Determinación de cenizas en alimentos (NMX-F-066-S-1978)

### MATERIALES

- i. Crisol de porcelana.
- ii. Pinzas para crisol.
- iii. Desecador.

### APARATOS E INSTRUMENTOS

- i. Mufla.
- ii. Estufa
- iii. Balanza analítica con sensibilidad de 0.1 mg.

### PROCEDIMIENTO

- 1) Secar previamente los crisoles en una estufa hasta peso constante.
- 2) En el crisol, poner de 3 a 5 g de muestra por analizar;
- 3) Llevar el crisol a una mufla y efectuar la calcinación completa (4-5 horas).
- 4) Dejar enfriar en la mufla, transferirlo al desecador para su completo enfriamiento y determinar la masa del crisol con cenizas.

### CÁLCULOS

Calcular el porcentaje de cenizas con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ cenizas} = \frac{(P - p) \cdot 100}{M}$$

Donde:

P = Masa del crisol con las cenizas en gramos.

p = Masa de crisol vacío en gramos.

M = Masa de la muestra en gramos.

### 7.3 Determinación de proteínas (NMX-F-068-S-1980)

#### MATERIALES Y REACTIVOS

Matraces Kjeldahl y material común de laboratorio

Sulfato de sodio anhidro o sulfato de potasio

Sulfato de cobre pentahidratado

Ácido sulfúrico concentrado

Ácido bórico al 2 %

Hidróxido de sodio 50 %

Solución de ácido sulfúrico 0.1 N

Indicador Shiro Tashiro: Disolver 0.2 g de rojo de metilo en 60 ml de alcohol y aforar a 100 ml con agua. Disolver 0.2 g de azul de metileno y aforarlos a 100 ml con agua. Mezclar 2 partes de rojo de metilo y una de azul de metileno.

#### PROCEDIMIENTO

##### Digestión

1. Pesar 0.5 g de muestra y pasar a un matraz Kjeldahl,
2. Añadirle 6 g de sulfato de sodio anhidro y 0.5 g de Sulfato de cobre pentahidratado
3. Medir 15ml de ácido sulfúrico concentrado y añadirlo al matraz Kjeldahl.
4. Colocar el matraz en el digestor SpeedDigester K-436 y colocar el regulador en la posición 8,5 hasta que todo la muestra este digerida (tonalidad verde, alrededor de 1:30 h)
5. Enfriar y pasar a un matraz volumétrico de 50 ml, aforar y mezclar.

##### Destilación:

6. Verter agua destilada a la cámara del equipo (2/3 partes) y colocar el tapón que contiene la resistencia.
7. Medir 20 ml de ácido bórico 2 % y adicionar 4 gotas del reactivo Shiro Tashiro (se tomara color morado). Esta mezcla se vierte a un matraz elermeyer de 50 ml y colocar el matraz en la terminal del refrigerante.

8. Medir 5 ml de muestra y verter en la copilla del destilador.
9. Agregar 20 ml de hidróxido de sodio al 50 % en la copilla del destilador y cerrar la válvula de paso.
10. Encender el equipo a máxima temperatura; y destilar hasta obtener 50 ml de destilado.
11. Retirar el matraz y apagar equipo.

Titulación:

12. Colocar la muestra en un matraz elermeyer de 125 ml y titular con  $H_2SO_4$  al 0.1 N hasta hacer virar el color del indicador de violeta a verde.
13. Registrar los ml gastados y calcular el % de nitrógeno mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ nitrógeno} = \frac{V \cdot N + 0.014 \cdot 100}{m}$$

Donde:

V = Volumen de ácido clorhídrico empleado en la titulación, en cm<sup>3</sup>

N = Normalidad del ácido clorhídrico.

m = Masa de la muestra en g.

0.014 = Miliequivalente del nitrógeno.

El por ciento de proteínas se obtiene multiplicando el por ciento de nitrógeno obtenido por el factor correspondiente (6.25).

#### 7.4 Determinación de extracto etéreo (EE) por método de Soxhlet

#### REACTIVOS

Éter de petróleo (P.E. 30-60°C).

#### MATERIALES E INSTRUMENTOS

Desecador.

Algodón (libre de grasa).

Material común de laboratorio.

Extractor de Soxhlet

Cartucho o dedal de extracción de celulosa

Rotavapor IKA RV 10 basic

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT



SISTEMA DE BIBLIOTECAS

#### PROCEDIMIENTO:

1. Pesar 2g de muestra y colocar dentro del dedal previamente enumerado.
2. Tapar el dedal con una mota de algodón.
3. Pesar el balón vacío previamente secado hasta peso constante, haciendo el manejo con pinzas.
4. Colocar el dedal en el extractor.
5. Colocar 150 ml de éter de petróleo al matraz vacío y conectar al equipo soxhlet.
6. Circular el agua en el refrigerante e iniciar el calentamiento para provocar la destilación.
7. Observar durante los primeros 10 minutos si hay fuga del éter.
8. El tiempo de extracción es de 8 horas aproximadamente.
9. Suspender el calentamiento y retirar el dedal del extractor.
10. Retener el solvente en el matraz.
11. Conectar el matraz con el solvente en el rotavapor IKA RV 10 basic, con baño maría de 55 °C y 850 mbar de presión atmosférica.
12. Rotar a 130 rpm hasta que se recupere todo el solvente (20 minutos aproximadamente).
13. Colocar los matraces en el desecador por 30 minutos.
14. Pesar los matraces con la grasa adherida.
15. Calcular el % de EE con la siguiente fórmula:

$$\% EEA (base húmeda) = \frac{PB (EEA) - PBV}{PM} + 100$$

$$\% EEA (base seca) = \frac{\% EE (base húmeda)}{\% MS de la muestra} + 100$$

Donde: PBV= Peso matraz vacío, PM= peso de muestra, PB (EEA)= peso del matraz con el extracto etéreo y MS= materia seca

## 7.5 Determinación de energía bruta

### MATERIAL.

Calorimétrico de combustión básico con peletizadora y crisol metálico.

Balanza analítica

Termómetro digital.

Cronómetro digital.

Parrilla de calentamiento.

### PROCEDIMIENTO

1. Pesar aproximadamente de 0.5 a 1 g de muestra y peletizarla (se agrega unas gotas de agua destilada para aglutinarla, y vaciar en la peletizadora para obtener la pastilla).
2. Se agrega agua destilada al recipiente donde va sumergida la bomba. Y aumentar la temperatura del agua (solo unos grados arriba de la temperatura ambiente).
3. La pastilla se coloca en el crisol de metal, el cual se inserta en el dispositivo que tiene la tapa de la bomba y se conecta el alambre de tal forma que esté en contacto con la muestra.
4. A la bomba se le adiciona 1 ml de agua destilada y cierra herméticamente cuidadosamente para no zafar el alambre de la muestra.
5. Enseguida, una vez cerrada (bomba), se le suministra oxígeno (33 atmósferas), dejando escapar primero una pequeña cantidad, para purgar la bomba, y luego se cierra la válvula hasta que el manómetro del tanque indique la presión de oxígeno necesaria.
6. Ya con el oxígeno, se sumerge la bomba en el recipiente con agua y se conectan los electrodos que a su vez van conectados con una fuente de energía que será la que origine la reacción de combustión de la muestra.
7. Se coloca la tapa exterior, se coloca el termómetro, y se inserta la banda con el motor que hará girar una propela para homogenizar la temperatura del agua.
8. Al comenzar a agitar el agua se deberá poner en marcha un cronómetro.
9. Las temperaturas se registrarán a los 5 minutos, luego a los 10 minutos, tiempo en el cual se debe quemar la muestra (mediante una corriente de energía eléctrica).



10. Luego de los 10 minutos, las lecturas se realizarán cada medio minuto hasta que la temperatura comience a descender, a partir de esta lectura se cuentan 5 minutos más (sin registrar ya las temperaturas) y al término de estos se apaga la bomba.
11. Se desconecta la banda del motor y se destapa el recipiente exterior, para sacar la bomba. Se abre la válvula de escape para dejar salir el dióxido de carbono formado.
12. Se abre la bomba y se enjuaga todo perfectamente.
13. Por último se utiliza la siguiente fórmula:

$$cal = \frac{T_f - T_i (K)}{pm}$$

Donde:

T<sub>f</sub>= temperatura final (después de los últimos 5 min); T<sub>i</sub>= temperatura inicial (temperatura del minuto 10, donde se dio inicio la combustión); K= 1876 y pm= peso de la muestra.

## 7.6 Técnicas de Microplacas para la cuantificación de compuestos Nitrogenados ( $\text{NO}_2$ , $\text{NO}_3$ , $\text{NH}_4$ )

Todos los métodos utilizados para la determinación de nitritos, amonio y fosfatos en agua de mar se basan en la formación de complejos coloridos cuya absorbancia es directamente proporcional a la concentración del elemento, por lo que pueden cuantificarse por espectrofotometría. En general, los métodos utilizados comúnmente en oceanografía requieren de una muestra grande (50 o 100 ml) y celdas de 1 o 10 cm. de paso de luz. Algunos de estos métodos han sido automatizados (Tréguer y Le Corre, 1975); sin embargo, también requieren de personal especializado y equipo costoso. Como una alternativa se han implementado métodos que requieren volúmenes menores de muestras y reactivos, que aumenten la sensibilidad y no requieren de personal o equipos especializados. En este documento se presenta la descripción metodológica para la determinación de nitratos, nitritos, amonio y fosfatos utilizando técnicas que realizan en microplacas con pozos de 300  $\mu\text{l}$ , los cuales presenta la ventaja adicional de poder analizar varias muestras (90) simultáneamente.

### Unidades

La concentración de nitritos, nitratos, amonio y fosfatos se expresa generalmente como microgramos átomo por litro ( $\mu\text{g-at L}^{-1}$ ). Sin embargo, en el Sistema Internacional de Unidades, el gramo átomo ya no es utilizado y ha sido remplazado por el mol. Por esta razón, se sugiere que las unidades utilizadas en la preparación de las curvas patrón y en el análisis de las muestras sea el micromol por litro ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ).

### 7.6.1 Determinación de Nitritos ( $\text{NO}_2^-$ )

La detección de nitritos en agua de mar se realizó mediante una reacción acoplada. En solución ácida, los nitritos son convertidos en ácidos nitrosos ( $\text{HNO}_2$ ) el cual diazotiza con sulfanilamida. Esta sal de sulfanilamida-diazonium reacciona posteriormente con N-(1-Naphthyl)-ethylenediamina para producir un cromóforo que se mide a 540 nm. El método tradicional emplea 50 ml de muestra a la cual se le adiciona 1 ml de cada reactivo y el cual se lee en celdas de 10 cm. o de 1 cm.

#### Micro método para nitritos ( $\text{NO}_2^-$ )

1. Se colocó 10  $\mu\text{l}$  de sulfanilamida (reactivo A) en una micro placa.
2. Se adicionó 250  $\mu\text{l}$  de muestra.
3. Se adicionó 10  $\mu\text{l}$  de N-(1-Naphthyl) ethylenediaminadihydrochloride (reactivo B).
4. Se mezcló e incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos, el color es estable hasta 2 horas.
5. Se obtuvo la lectura de la absorbancia a 550 nm en un lector de microplacas.

#### Preparación de Reactivos para $\text{NO}_2^-$ .

##### Reactivo A

Se disolvió 0.5 g de sulfanilamida en una mezcla de 5 ml de ácido clorhídrico concentrado y 30 ml de agua deionizada, aforado a 50 ml con agua deionizada. Esta solución es estable durante varios meses.

##### Reactivo B

Se disolvió 0.05 g de N-(1-Naphthyl) ethylenediaminadihydrochloride en 50 ml de agua deionizada. Almacenado en recipiente oscuro. (Preparar nueva solución si se aprecia un color café oscuro).

### Preparación de estándar para NO<sub>2</sub>

Se disolvió 0.0345 g de nitrito de sodio (NaNO<sub>2</sub>), previamente secado a 110 ° C durante una hora, en 100 ml de agua desionizada. Adicionar 0.1 ml de cloroformo. (Almacenar en recipiente oscuro). Esta solución es estable aproximadamente dos meses. La concentración en esta solución es de 5 µg-at N ml<sup>-1</sup> (5 µmol L<sup>-1</sup>).

### Curva patrón

Hacer una dilución de 1:125 de la solución estándar para obtener una solución de trabajo con una concentración de 40 µmol L<sup>-1</sup>. Con esta solución de trabajo realizar diluciones dobles, de acuerdo al siguiente cuadro. Realizar metodología correspondiente y graficar observancia contra concentración, obtener ecuación correspondiente.

Tubo	Solución	Agua desionizada	Concentración (µmol l <sup>-1</sup> ) o (µg-at Nl <sup>-1</sup> )
1	1 ml sol de trabajo	1 ml	20.00
2	1 ml de sol 1	1 ml	10.00
3	1 ml de sol 2	1 ml	5.00
4	1 ml de sol 3	1 ml	2.50
5	1 ml de sol 4	1 ml	1.25
6	1 ml de sol 5	1 ml	0.62
7	1 ml de sol 6	1 ml	0.31
8	0 ml	2 ml	0.00

## 7.6.2 Determinación de Nitratos ( $\text{NO}_3^-$ )

Este método está basado en el método descrito por Spotte, (1979). Se realizó una solución de trabajo con 0.607 g de nitrato de sodio en 1000 ml de agua deionizada; de esta se tomaron 0.0 y 0.02, 0.05, 0.1, 0.2 ml para realizar una curva estándar. Las alícuotas de la muestra se colocaron en matraces de 125 ml con 20 ml de agua deionizada, y se les añadió 2 ml de solución buffer [partes iguales de hidróxido de sodio (14.175 g de NaOH en 100 ml de agua deionizada) y solución fenol (24 ml de fenol líquido en 500 ml de agua deionizada)], así como 1 ml de solución reductora [partes iguales de sulfato de cobre (0.1 g de sulfato cúprico pentahidratado en 1000 ml de agua deionizada) y solución de sulfato de hidracina (3.625 g de sulfato de hidracina en 500 ml de agua deionizada)]. Se almacenaron durante 24 horas en oscuridad a temperatura ambiente; y se les agregó 2 ml de acetona, 1 ml de sulfanilamida (5g de sulfanilamida en una solución de 50 ml de ácido clorhídrico concentrado y 300 ml de agua deionizada), 1 ml de dihidrocloro (0.05 g de N-(1-naftil)-etilendiaminadihidrocloro en 500 ml de agua deionizada) y 20 ml de agua deionizada. Se esperó el tiempo de reacción de 10 minutos y se leyó en el espectrofotómetro a 543 nm.

### Micro método para nitratos ( $\text{NO}_3^-$ )

1. Se colocó 100  $\mu\text{l}$  de la muestra en la micro placa.
2. Se adicionó 10  $\mu\text{l}$  de hidróxido de sodio (NaOH) solución búfer. + 10  $\mu\text{l}$  de fenol en una micro placa, y se dejó reposar durante 2 minutos.
3. Posteriormente se adicionó 20  $\mu\text{l}$  de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) + 20  $\mu\text{l}$  de sulfato de hidracina (solución reductora) y se dejó reposar durante 2 minutos.
4. Por último se adicionó 20  $\mu\text{l}$  de sulfanilamida + 20  $\mu\text{l}$  de N-(1-Naphtyl) ethylenediamine.
5. Se mezcló e incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos el color es estable hasta 2 horas.
6. Se midió la absorbancia a 550 nm en un lector de micro placa.

### Preparación de Reactivos para $\text{NO}_3^-$ .

**Solución Buffer:** Se disolvió 14.175 g de Hidróxido de sodio en 1 litro de agua deionizada.

**Solución reductora:** Se disolvió 0.1 g de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) en 1 litro de agua deionizada y 3.625 g de sulfato de hidracina en 500 ml de agua deionizada.

### 7.6.3 Determinación de Amonio ( $\text{NH}_4$ )

El amonio está presente naturalmente en el agua. Este procede tanto de la excreción de animales marinos, como de los restos de alimentos, plantas y organismos muertos. La forma no disociada del amonio es el amoniaco ( $\text{NH}_3$ ) que produce hinchazón en las branquias de los organismos acuáticos, cuyas láminas se pegan provocándoles la asfixia. Por su parte el amonio ( $\text{NH}_4$ ) es 100 veces menos tóxico que el ( $\text{NH}_3$ ) y su presencia depende en gran medida del pH y la temperatura del agua, mientras más bajo sea el pH y la temperatura, la forma preferente de este compuesto en el agua será ( $\text{NH}_4$ ).

#### Micro método para amonio ( $\text{NH}_4$ ), adaptación de Solórzano (1969)

1. Colocar 20  $\mu\text{l}$  de solución de fenol (Reactivo A) en una micro placa.
2. Después adicionar 250  $\mu\text{l}$  de la muestra.
3. Posteriormente adicionar 20  $\mu\text{l}$  de nitroprusiato (Reactivo B) y 30  $\mu\text{l}$  de mezcla oxidante (Reactivo C).
4. Se inocula durante 1 hora y se toma la lectura a una absorbancia de 655 nm.

#### Preparación de reactivos

##### Reactivo A

Se disolvieron 10 ml de fenol grado reactivo, en 100 ml de etanol al 95%.

##### Reactivo B

Se disolvieron 0.5 g de nitroprusiato de sodio [ $\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}_2\text{H}_2\text{O}$ ] en 100 ml de agua deionizada. Almacenar en recipiente oscuro.

##### Reactivo C

Se Mezclaron 10 ml de solución alcalina (en 10 g de citrato de sodio + 0.5 g de hidróxido de sodio en 50 ml de agua deionizada) con 2.5 ml de hipoclorito de sodio comercial. Esta solución se preparó en el momento de su uso y se mantuvo tapada mientras no se utilizó.

### Preparación del estándar de $\text{NH}_4$ .

Se disolvieron 0.01 g de sulfato de amonio  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ , en 100 ml de agua deionizada y adicionar 0.1 ml de cloroformo, y se almaceno en refrigeración. Esta solución es estable varios meses si está bien tapada. La concentración de esta solución es de 1.5  $\mu\text{gat N ml}^{-1}$  (1.5  $\mu\text{mol de NH}_4 \text{ l}^{-1}$ ).

### Curva patrón.

Se diluyo la solución patrón 1:7.5 con agua deionizada y, con la solución de trabajo realizar diluciones dobles, de acuerdo al siguiente cuadro. Realizar metodología correspondiente y graficar observancia contra concentración, obtener ecuación correspondiente.

tubo	Solución	Agua desionizada	Concentración ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ ) o ( $\mu\text{g-at N l}^{-1}$ )
1	1 ml sol de trabajo	1 ml	100.00
2	1 ml de sol 1	1 ml	50.00
3	1 ml de sol 2	1 ml	25.00
4	1 ml de sol 3	1 ml	12.50
5	1 ml de sol 4	1 ml	6.25
6	1 ml de sol 5	1 ml	3.12
7	1 ml de sol 6	1 ml	1.56
8	0 ml	2 ml	0,00