

ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

**"CALIDAD DE AGUA EN UN SISTEMA DE RECIRCULACION CON
BIOFILTROS PARA LA PRODUCCION INTENSIVA DE
POST-LARVAS DE CAMARON *Litopenaeus vannamei*".**

TESIS DE GRADO

Previa a la Obtención del Título de:

Ingeniero en Acuicultura

Presentado por:

Danny Raúl Arcos Correa

Guayaquil - Ecuador

2005

DEDICATORIA

Ante todo y como siempre a Dios y mis
padres Sr. Raúl Arcos y Sra. Narcisa de Arcos

DECLARACION EXPRESA

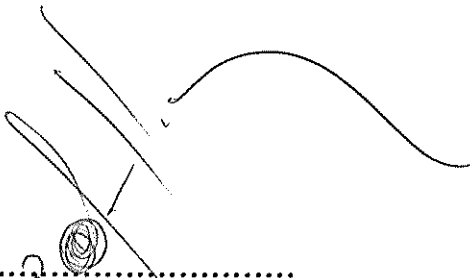
"La responsabilidad por los hechos, ideas y doctrinas expuestos en esta tesis, me corresponden exclusivamente, y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado corresponde a la Escuela Superior Politécnica del Litoral".

(Reglamento de Exámenes y Títulos profesionales de la ESPOL)



.....

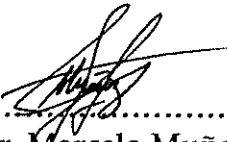
Danny Raúl Arcos Correa



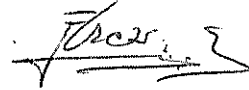
.....
Ac. Henry Alvarez Arellano.
Presidente del Tribunal



.....
Dr. Stanislaus Sonnenholzner
Director de Tesis



.....
Dr. Marcelo Muñoz N.
Miembro del Tribunal



.....
Dr. Fernando Arcos C.
Miembro del Tribunal

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera especial al Dr. Stanislaus Sonnenholzner por su amistad, continúa asistencia y guía a través de este estudio. A todo el cuerpo académico de la Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar de la ESPOL, por toda su colaboración durante mi programa de estudios.

Mi mas sincera gratitud a la fundación Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM), Guayaquil - Ecuador por su soporte financiero.

Finalmente estoy muy agradecido a mi familia mis padres por su incondicional amor y sostén.

TABLA DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	4
1. SISTEMAS DE RECIRCULACIÓN.....	4
1.1 Principios.....	4
1.2 Tanque de cultivo.....	5
1.2.1 Configuración Racetrack.....	7
1.2.2 Sustratos artificiales.....	7
1.3 Filtración de sólidos.....	8
1.3.1 Fuentes de sólidos en sistemas de recirculación.....	8
1.3.2 Consecuencias de acumulación excesiva de sólidos.....	9
1.3.3 Mecanismos de filtración.....	9
1.3.3.1 Sedimentación.....	9
1.3.3.2 Fraccionador de espuma.....	10
1.4 Filtración biológica.....	12
1.4.1 Fuentes de amonio y nitrito.....	12
1.4.2 Mecanismos de control de amonio.....	13
1.4.2.1 Nitrificación.....	13
1.4.3 Filtro de lecho flotante.....	16
1.4.3.1 Medios biofiltrantes.....	17
1.4.3.2 Maduración del filtro biológico.....	18
1.4.4 Variables que afectan el desarrollo del biofiltro.....	19
1.4.5 Diseño del biofiltro	20
2 OPERACIÓN Y MANEJO DE SISTEMAS DE RECIRCULACIÓN.....	21

3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
3.1	Descripción del sistema de recirculación.....	22
3.2	Diseño experimental.....	28
3.2.1.	Pruebas de campo.....	28
3.2.1.1.	Corrida en Raceway piloto comercial.....	29
3.2.1.2	Muestreo y análisis del sistema piloto de recirculación.....	30
3.2.2.	Pruebas de laboratorio.....	32
3.2.2.1	Experimento 1.....	32
3.2.2.2	Experimento 2.....	33
3.2.2.3	Experimento 3.....	34
3.3	Análisis físicos, químicos y microbiológicos.....	34
3.4	Análisis estadístico.....	35
3.4.1	Ecuación de Verhulst.....	36
3.4.2	Eficiencia de nitrificación.....	38
4.	Resultados.....	39
4.1	Investigación de laboratorio.....	39
4.1.1.	Experimento 1.....	39
4.1.2.	Experimento 2.....	43
4.1.3.	Experimento 3.....	48
4.2	Investigación de campo.....	52
5.	DISCUSIÓN.....	59
6.	CONCLUSION.....	64
7.	RECOMENDACIONES.....	66
8.	ANEXOS.....	67
9.	BIBLIOGRAFIA.....	70

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1	Diagrama esquemático del sistema piloto de Raceway con filtros y recirculación.....	23
Fig. 2	Diagrama del sistema de tratamiento de agua	23
Fig. 3	Diagrama esquemático del tanque sedimentador (TS).....	25
Fig. 4	Diagrama esquemático del proteína Skimmer (PS).....	26
Fig. 5	Diagrama esquemático del biofiltro y el reservorio.....	26
Fig. 6	Kineco Macrolite® Ceramic Spheres.....	27
Fig. 7	Reducción diaria de la concentración de TAN en el biofiltro y blanco (control).....	40
Fig. 8	Acumulación diaria de la concentración de NO ₃ en el biofiltro y blanco.....	41
Fig. 9	Serie de tiempo de las concentraciones de TAN, NO ₂ y NO ₃ en el biofiltro.....	41
Fig. 10	Ajuste de puntos mediante ecuación tipo sigmoideal, representa la acumulación de NO ₃ en el biofiltro.....	42
Fig. 11	Reducción diaria de TAN, para 250, 500, 1000, y 2000 cm ₃ de macrolita.....	44
Fig. 12	Reducción de la concentración de TAN para 5, 10, 20, 40 ppm.	49
Fig. 13	Acumulación de NO ₃ para los reactores con TAN 5, 10, 20, 40 ppm.....	49

Fig. 14	Serie de tiempo de TAN en el biofiltro.....	53
Fig. 15	Serie de tiempo de NO ₃ en el biofiltro.....	53
Fig. 16	Serie de tiempo de TAN dentro del Raceway.....	54
Fig. 17	Serie de tiempo de NO ₃ dentro del Raceway.....	54
Fig. 18	Serie de tiempo de parámetros físicos en el biofiltro.....	55
Fig. 19	Serie de tiempo de parámetros físicos en el Raceway.....	55
Fig. 20	Demanda bioquímica de Oxígeno (DBO ₅) de la macrolita contenida en el biofiltro.....	56
Fig. 21	Microbiología de la macrolita contenida en el biofiltro en agar marino, TCBS y agar nitrificantes, al día 0.....	57
Fig. 22	Microbiología de la macrolita contenida en el biofiltro en agar marino, TCBS y agar nitrificantes, al día 12 en que el sistema operó en conjunto.....	57
Fig. 23	Microbiología de la macrolita contenida en el biofiltro en agar marino, TCBS y agar nitrificantes, al día 17 en que el sistema dejó de operar en conjunto.....	58

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Valores promedio de temperatura, oxígeno disuelto y pH en los reactores durante el experimento.....	39
Tabla 2. Análisis de varianza del pH entre reactores.....	39
Tabla 3. Variación de la concentración de TAN en los reactores.....	40
Tabla 4. Variación de la concentración de NO ₃ en los reactores.....	41
Tabla 5. Parámetros de nitrificación calculados a partir de la ecuación de Verhulst.....	42
Tabla 6. Valores promedio de temperatura, oxígeno y pH en los reactores durante el experimento.....	43
Tabla 7. Análisis de varianza del pH en los reactores a las 48 y 96 horas.....	44
Tabla 8. Variación de la concentración de TAN en los reactores.....	44
Tabla 9. Promedio de TAN a las 48 y 96, indicando el análisis estadístico.....	46
Tabla 10. Remoción de TAN (mg por cm ³) de biolecho después de 48 horas.....	46
Tabla 11. Remoción de TAN (mg por cm ³) de biolecho después de 96 horas.....	47
Tabla 12. Valores promedio de temperatura, oxígeno disuelto y pH en los reactores durante el experimento. sustrato de biofiltro de 873 cm ³ /30L.....	48
Tabla 13. Análisis de varianza del pH en los reactores a las 48 horas.....	48

Tabla 14	Remoción de la concentración de TAN a las 48 horas en función de la concentración de TAN inicial.....	49
Tabla 15	Producción de nitrato a las 48 horas en función de la concentración de TAN inicial.....	50
Tabla 16	Remoción de TAN (mg por cm ³) de biolecho en función de la concentración inicial de TAN después de 48 horas.....	50
Tabla 17	Tasa de nitrificación en función de TAN.....	51

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Medios De Cultivo Empleados En Pruebas Microbiológicas.....	67
Anexo B. Protocolo De Larvicultura CENAIM.....	68
Anexo C. Características Del Biolecho (macrolita) Empleando En El Biofiltro (FBF).....	69

RESUMEN

El trabajo se dividió en dos etapas: 1) Investigación de campo (Sistema de Piloto de Recirculación CENAIM) y 2) Investigación de laboratorio (tanques exteriores dentro del complejo)

Se realizó un estudio para evaluar el sistema piloto de recirculación y tratamiento de agua del CENAIM, con una producción comercial de post larvas de camarón *Litopenaeus vannamei* durante los estadios de (PL5- PL 25). En el cual se observó el desarrollo de un proceso de nitrificación a partir del día dos. Así mismo se determinó la población bacteriana en el biofiltro durante la corrida de post larvas en el cual se cuantificó porcentualmente las proporciones de bacterias adheridas al sustrato (macrolita) contenido en el biofiltro.

Además se contrastó el consumo de O₂ de las bacterias nitrificantes vs. bacterias heterotróficas, mediante el empleo de un inhibidor de nitrificación.

En la investigación de laboratorio, tres experimentos fueron conducidos. El primer experimento con la finalidad de establecer el tiempo de maduración de un filtro biológico y la tasa de asimilación de TAN, en 2,8 días y 3,05 mg NO₃ L⁻¹ d⁻¹, respectivamente.

En el segundo experimento se determinó la remoción de TAN en función de la relación entre amonio y volumen de biolecho empleado; a las 48 horas las cantidades necesarias de macrolita para oxidar la mayor cantidad de amonio fueron 1000 y 2000 cm³. Sin embargo, a las 96 horas se estableció que 500 cm³ fue la cantidad más eficiente.

En el tercer experimento se determinó la cantidad de TAN removido en función de la concentración de amonio; así, a las 48 horas la cantidad de TAN removido por cm³ de biolecho aumentó en directa proporcionalidad al incremento en la concentración de TAN inicial.

INTRODUCCION

La industria de la Acuicultura está enfrentando serios cambios técnicos con la finalidad de desarrollar formas económicas y efectivas de mejorar su producción (Malone y Beecher, 2000).

La producción de Post larvas de camarón *Litopenaeus vannamei* se realiza con elevados recambios de agua cercanos al 300% del volumen total, para mantener la calidad de la misma. Esta práctica, sin embargo, incrementa el riesgo de introducción y propagación de enfermedades.

Tal es el caso que cuando se presentan episodios de deterioro en la calidad del agua, ocasionadas por marea roja en la fuente de captación, provocada por la proliferación de un tipo de dinoflagelados, resulte que los laboratorios limiten su capacidad de bombeo, debido al potencial riesgo de mortalidad producto de la toxicidad que representan estos eventos a las unidades de producción.

En lugares donde el agua es escasa, de elevado costo, y/o donde la contaminación suele ser además alta, ha sido necesario desarrollar sistemas, denominados de "recirculación", que incorporan unidades de tratamiento para mantener una adecuada calidad de agua.

Según Tseng *et al.* (1994); Menasveta *et al.* (1989,1991); y Millamena *et al.* (1991), sistemas de recirculación han sido satisfactoriamente usados en el cultivo de anguila; y también en tanques de desove y larvicultura de *Penaeus monodon* (Tseng *et al.*, 1998).

Durante la última década las unidades de proceso requeridas para el tratamiento de los sistemas de recirculación han sido claramente definidas (Lucchetti y Gray, 1988; Huguenin y Colt, 1989; Rosenthal y Black, 1993), las cuales incluyen aeración, clarificación (remoción de sólidos, Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO)), biofiltración (remoción de Amonio y Nitrito).

En sistemas de recirculación es necesario evaluar los parámetros de calidad de agua considerados como críticos en acuicultura entre estos: Amonio, oxígeno disuelto, nitrito, temperatura y pH, ya que la producción podría ser desfavorablemente afectada con mortalidades debido a niveles inaceptables de compuestos orgánicos e inorgánicos en el ambiente de cultivo.

El monitoreo continuo de estos parámetros durante el ciclo de producción podría ser costoso (Rogers y Klemetson, 1985). Con la finalidad de solventar los costos de producción en estos sistemas, se incrementa la biomasa de cultivo. Esto sin embargo, eleva la carga de nutrientes y materia orgánica; por lo cual es necesario incorporar un sistema de tratamiento que incluye: sedimentador (remoción de sólidos y materia orgánica), biofiltro (remoción de amonio y nitrito), y Proteín Skimmer (remoción de carbón orgánico).

El empleo de procesos biológicos para el tratamiento de sistemas de recirculación podría brindar condiciones más estables de calidad de agua dentro de las unidades de cultivo, optimizando el uso del agua, y de esta manera minimizar la descarga de efluentes, logrando así una reducción

considerable en la contaminación del medio. Lo cual lo hace un sistema ambientalmente amigable (Van Rijn y Rivera, 1990; Van Rijn, 1996).

Según Lawrence y Lee (1997), el advenimiento de estos sistemas han sido identificados como una necesidad para el desarrollo del cultivo de camarón.

Con un sistema de recirculación y biofiltros se pretende alcanzar una estabilidad en las características de la calidad del agua, lo que permitirá establecer una comunidad bacteriana en equilibrio, reduciendo el riesgo de la presencia de bacterias patógenas en forma dominante.

Mediante este proyecto se pretende evaluar la viabilidad de un cultivo intensivo de larvas *Litopenneus vannamei* (P15-P125), en el sistema de "raceway piloto del CENAIM", a través de una caracterización de la calidad de agua del sistema en conjunto, determinar el tiempo de maduración de un filtro biológico, y establecer la población bacteriana en el biofiltro.

ANTECEDENTES

1. SISTEMAS DE RECIRCULACIÓN.-

1.1. PRINCIPIOS.-

El interés en sistemas de producción usando la tecnología de recirculación está creciendo en el mundo entero (Losordo et al., 2000; Lawrence, 1987). La intensificación en acuicultura empleando los sistemas de recirculación es considerado como una manera de incrementar las producciones, al mismo tiempo que se minimiza el empleo de recursos, especialmente de agua y se previenen los efectos negativos sobre el medio ambiente al reducir la descarga de efluentes. Los sistemas de recirculación pueden mantener una buena calidad de agua en los tanques de cultivo, han sido satisfactoriamente usados en el cultivo de anguila (Tseng et al., 1994; Menasveta et al., 1989,1991; y Millamena et al., 1991); y también en tanques de desove y larvicultura de *Penaeus monodon*. (Tseng et al., 1998).

La continua innovación en los sistemas de producción de acuicultura son necesarios, para hacer que la industria sea sustentable, ambientalmente amigable y económicamente viable (Liao, 2000).

El diseño del sistema de producción es uno de los factores más importantes que determinan el éxito o fracaso de una operación en acuicultura.

Las tecnologías de recirculación en acuicultura están integradas de muchos componentes:

Tanques de cultivo, filtro de sólidos, fraccionador de espuma (Protein skimmer), filtro biológico, sistema de aireación, bombas, sistema de distribución de agua y sistema de drenaje (Lucchetti y Gray, 1988; Huguenin y Colt, 1989; Rosenthal y Black, 1993; Tseng *et al.*, 1998; Van Wyk *et al.*, 1999) Escoger la opción más eficiente, no es una decisión simple, ya que cada componente tiene que ser seleccionado como parte integral tomando en consideración cómo cada elemento podría afectar la operación de las demás estructuras que conforman el sistema.

Alcanzar este objetivo no es fácil, especialmente considerando que el sistema tiene que ser económico desde su construcción hasta su operación. (Van Wyk *et al.*, 1999).

1.2. TANQUE DE CULTIVO.-

El tanque de cultivo es un componente crítico del sistema de producción, este debe proveer suficiente espacio, creando además un ambiente saludable para que el camarón crezca hasta la talla comercial.

Una desventaja de los sistemas de recirculación es que debido a las altas densidades de cultivo que normalmente son aplicados, conllevan a incrementar el riesgo de enfermedades, debido al estrés causado por el confinamiento de los organismos (Lawson, 1995)

La calidad de agua en el tanque debería ser relativamente uniforme y los sólidos no se deberían acumular en el fondo. La uniformidad de la calidad de agua en el tanque y la eficiencia del transporte de sólidos fuera del mismo es determinada, en gran medida, por las características hidráulicas de éste, lo que

estará en función de su forma. (Van Wyk *et al.*, 1999). El tanque de cultivo debe poseer un diseño de recirculación para homogeneizar la columna de agua y distribución de oxígeno mejorando así la descomposición aeróbica (Wheaton, 1977). Pero es importante la formación de puntos muertos dentro del tanque y el diseño de tuberías de drenaje en estos puntos para eliminar los desechos sólidos.

En el cultivo de *penaeus*, la circulación del agua fue mencionado como un parámetro crítico por Mock *et al.* (1973). Un raceway es un tanque de cultivo con forma rectangular en el cual el agua fluye continuamente, El cultivo en raceways por décadas ha sido tradicionalmente aplicado a larvicultura de peces, por varias buenas razones: parámetros ambientales (calidad de agua, temperatura), y volumen de agua. Prácticas de alimentación, cosechas y tratamiento de enfermedades son más fáciles de manejar y controlar. El flujo generado en un raceway es llamado "plug flow" (Van Wyk *et al.*, 1999). Dentro del raceway el agua viaja con una velocidad uniforme pero no ocurre una buena homogeneización de la columna de agua. Como resultado de esto la calidad de agua puede variar significativamente entre la entrada de agua y el drenaje. El transporte de sólidos a través del raceway depende principalmente de la velocidad del flujo de agua, con la finalidad de que el raceway pueda ser capaz de mantenerse relativamente limpio, la velocidad de agua debería ser lo suficientemente alta para arrastrar los sólidos hasta el drenaje.

1.2.1. Configuración Racetrack.

Los tanques rectangulares pueden ser transformados en "racetrack" el cual es en esencia un híbrido entre un tanque circular y un raceway rectangular. Los racetracks en su configuración tienen dos drenajes colocados en lugares opuestos y centrados, una pared central divide al tanque en dos provocando de esta manera dos direcciones de flujo opuestas. El flujo generado en este tipo de tanques es de una forma oval. Este flujo genera una fuerza centrífuga lo que ocasiona que los sólidos se concentren alrededor del drenaje. El agua que ingresa al tanque debe ser inyectado en forma de chorros, de esta forma se ayuda a mantener una homogeneización de la columna de agua. El hecho de que el agua ingrese al tanque en forma de chorros es con el objetivo de incrementar la velocidad del flujo de agua en el tanque debido a que el agua ingresa con una velocidad mayor, además el agua es aireada en su ingreso. (Van Wyk *et al.*, 1999).

1.2.2. Sustratos Artificiales.

El "Sistema Piloto de Recirculación del CENAIM", en su protocolo de manejo, cuenta con la implementación de Aqua Mats, que son estructuras artificiales colocadas dentro del tanque de cultivo para proveer un área de superficie adicional para el camarón. En teoría, el uso de sustratos artificiales permite cultivar en altas densidades al reducir el estrés provocado por el canibalismo que es frecuentemente observado en cultivos de alta densidad.

Estos substratos artificiales pueden permitir que se genere cierta cantidad de biofiltración al ocasionar que el área adicional que es provista sea colonizado por bacterias nitrificantes (Van Wyk *et al.*, 1999). Estos, a pesar de incrementar el área de superficie en el tanque de cultivo, brindan un mayor sustrato sintético para la fijación de algas bénticas, y ser probado como una alternativa económica para hacer más eficiente la alimentación de los animales cultivados (Peterson, 2000), son además una barrera en el sistema de raceway complicando la hidrodinámica del tanque, lo que seguramente pueden interferir con el transporte de sólidos la remoción de camarón muerto y exuvias, ocasionando el establecimiento de puntos muertos, afectando así el flujo de drenaje hacia el sistema de filtros, permitiendo que cierta cantidad de los sólidos que deberían pasar a la batería de filtros, se acumulen en el tanque de cría.

1.3. FILTRACIÓN DE SÓLIDOS

1.3.1 Fuentes de sólidos en sistemas de recirculación.-

Los desechos sólidos en un cultivo de camarón con sistemas de recirculación consisten en alimento no consumido, heces, exuvias, y materia orgánica en descomposición.

La efectiva remoción de sólidos es crítica para el éxito de sistemas de recirculación de alta densidad.

1.3.2 Consecuencias de acumulación excesiva de Sólidos.-

La acumulación de desechos sólidos produce un sinnúmero de consecuencias adversas. La acumulación de partículas en las branquias del camarón, los hace menos tolerantes a bajas concentraciones de oxígeno disuelto y más susceptible a infecciones bacterianas.

Acumulación de materia fecal y alimento no consumido en el fondo del tanque puede proveer un sustrato para el desarrollo de bacterias heterotróficas las cuales pueden consumir grandes cantidades de oxígeno, resultando en bajos niveles de oxígeno dentro del tanque, algunas de estas bacterias, especialmente las consideradas en el grupo de *Vibrios*, pueden ser patógenas para el camarón y provocar infecciones bacterianas.

1.3.3 Mecanismos de filtración.-

1.3.3.1 Sedimentación.-

El primer paso en el proceso de tratamiento de agua es la filtración de sólidos suspendidos del agua, (Van Wyk *et al.*, 1999).

La aplicación de un sedimentador, crea condiciones en las que el agua es retenida por un tiempo, su velocidad disminuye, lo que ocasiona que los sólidos se sedimenten en el fondo del tanque. Idealmente los tanques de sedimentación deberían tener un fondo cónico o de alguna otra forma que permita concentrar los sólidos sedimentados (Van Wyk *et al.*, 1999). Este lodo es sifoneado diariamente, según lo descrito en el reporte de Bovendeur *et al.* (1987).

La sedimentación ocurre debido a la diferencia de densidad entre las partículas sólidas y el agua, asumiendo que las partículas son más pesadas que el agua y tienden a caer por efecto de la gravedad, (Chen *et al.*, 1994; Lawson, 1995). Los sedimentadores son fáciles de instalar y de operar, no requieren técnicas especializadas y pueden ser instalados en conjunto con otros sistemas de tratamiento.

La principal desventaja asociada con los tanques sedimentadores es la deficiente remoción de sólidos suspendidos <100um y los extensos requerimientos de espacio (Losordo, 1991; Van Wyk *et al.*, 1999).

(Chen *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2000) reportaron que una eficiente remoción de sólidos suspendidos no puede ser obtenida por sedimentación.

1.3.3.2. Fraccionador de espuma (Protein Skimmer).-

El nombre común para el sistema de remoción de sólidos suspendidos (surfactantes, carbón orgánico disuelto y carbón orgánico particulado), presentes en el agua provenientes del cultivo utilizando burbujas de aire, es conocido como Protein Skimmer o fraccionador de espuma (Chen *et al.*, 1993; Lawson, 1995).

En un fraccionador de espuma se inyectan pequeñas burbujas de aire en el fondo del tanque en el cual el agua está fluyendo. A medida que las burbujas ascienden a la superficie del tanque, van incorporando sobre ellas partículas orgánicas (Van Wyk *et al.*, 1999). Este proceso genera la formación de espuma, la misma es drenada en la parte superior de la columna de agua (Losordo y

Westers, 1994). Los fraccionadores de espuma son efectivos para remover sustancias surfactantes, las cuales se caracterizan por tener un terminal polar hidrofílico (afinidad con el agua), y un terminal no polar hidrofóbico (repelencia al agua). Las moléculas surfactantes se ligan sobre la superficie de la burbuja de aire a través de su extremo no polar, mientras que su extremo polar sigue en contacto con el agua. Los sólidos removidos por los fraccionadores de espuma son generalmente partículas (< 30um), de origen fecal y de alimento no consumido (Van Wyk *et al.*, 1999).

El funcionamiento de un fraccionador de espuma depende de: la naturaleza del agua, la temperatura, viscosidad, pH, salinidad, tamaño de la burbuja y tiempo de contacto (Huguenin y Colt, 1989). Sin embargo estos factores generalmente están fuera del control de los acuicultores, con excepción del tamaño de la burbuja, la temperatura y el pH, (Lawson, 1995).

El tamaño de la burbuja puede ser controlado dependiendo del tipo de difusor, burbujas pequeñas brindan una extensa área de contacto a la cual las sustancias surfactantes pueden adherirse, se determinó que el diámetro ideal de las burbujas es de 0,8mm.

El diseño de un efectivo fraccionador de espuma para acuicultura, más que una ciencia es un arte, debido principalmente a la complejidad química del proceso. (Lawson, 1995).

1.4. FILTRACIÓN BIOLÓGICA.-

A medida que las leyes ambientales se están volviendo más estrictas con respecto a los niveles permisibles de contaminantes en los efluentes, para cultivos de alta densidad cerrados o semicerrados en acuicultura, la biofiltración es usada con frecuencia como un método de purificación de agua (Van Rijn y Rivera, 1990).

El empleo de tratamientos biológicos en sistemas de recirculación, podrían brindar condiciones más estables de calidad de agua dentro de las unidades de cultivo, y también una reducción considerable en la contaminación del ambiente. En este contexto, el control biológico por bacterias ha sido hasta ahora lo más económicamente accesible (Van Rijn, 1996).

El término de filtración biológica o biofiltración es empleada para referirse a la remoción de amonio y nitrito por bacterias.

Se considera que después del oxígeno, el amonio es el factor limitante para el éxito de un sistema cerrado de recirculación (Lawson, 1995).

1.4.1. Fuentes de amonio y nitrito.-

Una de las consecuencias de alimentar camarón es que cerca del 10% de la proteína del alimento es convertida en amonio. La mayor parte del alimento suministrado al cultivo es consumido por el camarón, la proteína que es ingerida puede ser asimilada o puede pasar a través del tracto digestivo sin ser metabolizada y ser excretada en las heces.

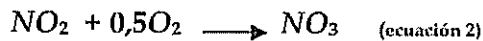
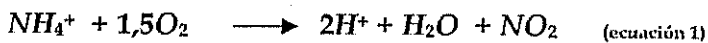
Las bacterias heterótrofas metabolizan las proteínas del alimento no digerido y de las heces, excretando amonio como un subproducto de su metabolismo.

1.4.2. Mecanismos de control de amonio.-

1.4.2.1. Nitrificación.-

La mayoría de los sistemas de recirculación en acuicultura dependen del proceso de nitrificación para el control de los niveles de amonio y nitrito.

La transformación del amonio excretado, producto de la descomposición orgánica del alimento no digerido y materia fecal en descomposición, toma lugar a través del proceso biológico de nitrificación (Van Rijn *et al.*, 1984). La nitrificación es un proceso clave en el tratamiento en un sistema de recirculación de agua (Speece, 1973). La nitrificación es un proceso que se lleva a cabo en dos pasos, siendo el primer paso la conversión de amonio a nitrito por las bacterias *Nitrosomonas*, (ecuación 1) y el segundo paso es la transformación de nitrito a nitrato por las *Nitrobacter* (ecuación 2).



El amonio está presente de dos formas en los cuerpos de agua; amonio no ionizado (NH_3) y amonio ionizado (NH_4). La suma de la concentración de las dos formas es llamada Nitrógeno Amoniacal Total (TAN siglas en inglés). La fracción de TAN en la forma no ionizada depende del pH y la temperatura del agua.

A un pH de 7 la mayor parte de TAN está en la forma ionizada. La fracción de TAN en la forma no ionizada incrementa con el incremento de la temperatura.

La forma no ionizada de amonio y nitrito son altamente tóxicos para peces y camarones, mientras que la forma ionizada de amonio y el nitrato son relativamente no tóxicos (Lawson, 1995; Van Wyk *et al.*, 1999).

Las bacterias autótrofas generan su energía de componentes inorgánicos a diferencia de las bacterias heterotróficas que generan su energía de componentes orgánicos (WPCF, 1983). Las bacterias nitrificantes, son llamadas quimioautótrofas, utilizan nitrógeno inorgánico como fuente de nitrógeno para la síntesis de proteínas.

Existen cerca de 400 especies de bacterias que son capaces de oxidar amonio. *Nitrosomonas* y *nitrobacter* son dos de los más importantes géneros de bacterias nitrificantes.

Entre estas el mayor grupo de autótrofas son las *Nitrosomonas spp.*, que son las mejores oxidadoras de amonio y las *Nitrobacter spp.*, realizan la conversión de nitrito a nitrato.

Nitrosomonas usan amonio como fuente de nitrógeno y excretan nitrito (NO_2^-). *Nitrobacter* utilizan nitrito como fuente de nitrógeno y excretan nitrato (NO_3^-).

Las tres formas de nitrógeno inorgánico (amonio, nitrito, y nitrato) están presentes en el agua todo el tiempo.

La conversión de amonio a nitrato es un proceso aeróbico. (Van Wik *et al.*, 1999;

Lawson, 1995). La presencia de materia orgánica inhibe normalmente el rango de nitrificación y promueve el desarrollo de bacterias heterotróficas, las cuales compiten con las bacterias nitrificantes autótrofas benéficas para el sistema por espacio, oxígeno y nutrientes (Sharma y Ahlerf, 1977). Las bacterias heterótrofas comparadas con las bacterias autótrofas se desarrollan a una tasa de crecimiento de 5:2

Nitrosomonas y *Nitrobacter*, se encuentran generalmente en todos los sistemas de acuicultura desarrollándose sobre cualquier superficie como: paredes de tanques, tuberías. La población de estas bacterias puede aumentarse mediante la aplicación de un biofiltro al sistema.

Un biofiltro simplemente es un aparato que brinda una vasta área de superficie sobre la cual las bacterias nitrificantes puedan desarrollarse y crear un ambiente propicio para que se dé lugar el proceso de nitrificación. Existe una variedad de biofiltros y medios filtrantes. (Van Wik *et al.*, 1999; Van Rijn, 1996).

1.4.3. Filtro de lecho flotante.-

Un nuevo tipo de biofiltro combina la remoción de sedimento y la nitrificación. Los Floating Bead Filters (filtros de lecho flotante) han ganado popularidad como removedores de sólidos y amonio. Estos filtros utilizan lechos de menor densidad que el agua de 3-5 mm de diámetro como medio filtrante sus lechos ofrecen un área de superficie de $1145 \text{ m}^2\text{m}^{-3}$ de sustrato, que sirve para el desarrollo y fijación de bacterias nitrificantes y bacterias heterotróficas, lo cual es una superficie muy grande comparada con cualquier otro lecho fabricado. Las bacterias tienden a adherirse a la superficie y a las porosidades del lecho flotante. La nitrificación ocurre de manera más eficiente cuando las bacterias han formado una película sobre la superficie de algún tipo de medio.

La capacidad de nitrificación de este tipo de biofiltros es de $270 \text{ mg TAN m}^2\text{día}^{-1}$, y se determinó que un metro cúbico de lecho flotante es capaz de brindar tratamiento al agua y mantener los niveles de $\text{TAN} < 0,5 \text{ mg L}^{-1}$ (Malone *et al.*, 1993). La gran desventaja de los filtros de lecho flotante es su alto costo de inversión (Van Wik *et al.*, 1999).

El nivel de TAN aceptado como seguro en acuicultura es $< 1 \text{ mg L}^{-1}$ (Losordo y Westers, 1994). El tamaño del medio filtrante cuando se trabajan con valores de $\text{TAN} > 1 \text{ mg L}^{-1}$ debe ser entre 1-2mm de diámetro.

1.4.3.1. Medios biofiltrantes.-

Kruner y Rosenthal, (1983) estudiaron el efecto de la superficie del medio filtrante sobre la nitrificación.

Cualquier material sólido no tóxico podría ser usado como sustrato o medio biofiltrante, existen varios tipos de sustratos que incluyen: arena, roca, conchilla, y módulos de plástico o de cerámica (macrolita) de varias formas.

La selección del medio o sustrato a utilizarse va a depender en gran medida del costo, disponibilidad, peso y área de superficie deseada.

Los biofiltros que contienen arena, roca y conchilla son probablemente los materiales de menor costo. Los módulos de plástico y macrolita generalmente tienen un tiempo de vida indefinido pero son costosos

El material ideal debe tener bastante área de superficie por unidad de volumen, ser barato, y durable.

El área de superficie del lecho filtrante se entiende como el área disponible para la fijación de las bacterias. Medios con un diámetro pequeño tienen una mayor área de superficie por unidad de volumen. La actividad nitrificante en un biofiltro es determinada por la capacidad de oxidar amonio a nitrato, (Lawson, 1995; Skjølstrup *et al.*, 1997).

El nivel de oxidación de amonio y nitrito a nitrato por microorganismos en un biofiltro depende de dos factores: de la capacidad de nitrificación individual de las bacterias y el número de bacterias nitrificantes presentes en el biofiltro. Este último depende del área de superficie disponible para su adhesión.

1.4.3.2. Maduración del filtro biológico.-

Los filtros biológicos normalmente requieren de varias semanas para llegar a ser completamente funcionales, la activación de un biofiltro nuevo es de 4-6 semanas, este tiempo de activación puede ser reducido al inocular alguna fuente comercial de bacterias nitrificantes y a la vez proveer una fuente inorgánica de amonio (Lawson, 1995).

Varios inóculos comerciales que contienen bacterias nitrificantes vivas están disponibles en el mercado. Así la suspensión nitrificante ABIL (Aqua Avecom N.V. Belgium) fue utilizada para la activación de un biofiltro en el cultivo intensivo de rotíferos (Suantika *et al.*, 2001). El ABIL es efectivo en términos de oxidación de amonio pero no es capaz de realizar la conversión completa de TAN a nitrato (Rombaut *et al.*, 2001).

Manthe *et al.*, (1987) probaron que la adición de una solución de cloruro de amonio redujo el tiempo de activación de un biofiltro de 36 días a 10 días. Los controles requirieron de 36 días para activarse.

En la activación natural de un biofiltro con componentes orgánicos, las bacterias autótrofas tienen que competir con las heterótrofas por espacio sobre la superficie del medio filtrante. Pero con la adición de una solución inorgánica de amonio, las *nitrosomonas* llegan a desarrollarse antes de que ingresen componentes orgánicos y el consecuente desarrollo de las heterotróficas.

1.4.4. Variables que afectan el desarrollo de un biofiltro.-

La nitrificación es un proceso oxidativo así que se debería proporcionar una adecuada cantidad de oxígeno. El nivel mínimo de oxígeno para éste proceso de nitrificación es aproximadamente 2mg/L, (Wheaton *et al.*, 1991; Lawson 1995).

La temperatura óptima para las nitrificantes es de 25-30 °C. Los biofiltros podrían operar en un rango de pH de 5-10 (Wheaton *et al.*, 1991). Sin embargo la eficiencia de nitrificación decrece si el pH está fuera del rango. La nitrificación tiene un ligero descenso en valores de pH por debajo de 7.

La nitrificación es un proceso de acidificación por lo que se forman iones hidrógeno los cuales consumen la alcalinidad y bajan el pH (Bisogni y Timmons ,1991; Hargrove *et al.*, 1995). Malone y Burden (1988) indicaron que la alcalinidad puede ser crítica para el crecimiento de las nitrificantes. Las bacterias nitrificantes requieren iones bicarbonato como fuente de carbón, pues estas consumen 7,14g de bicarbonato por cada gramo de amonio que es convertido a nitrato (Wheaton *et al.*, 1991). Sin embargo es difícil saber cuál es el nivel exacto de bicarbonato que debería mantenerse, debido a que la química del bicarbonato en el agua es muy compleja.

Se ha encontrado que los niveles de luz tienen un efecto significativo sobre las bacterias nitrificantes (Lawson, 1995; Van Wik *et al.*, 1999).

Olson (1981) determinó que las bacterias nitrificantes son inhibidas a niveles de luz menores al 1% de la intensidad de luz del día.

Es importante además mantener la salinidad estable para una eficiente operación del biofiltro.

Akai *et al.* (1983) encontró que cambios bruscos en la salinidad reducen la tasa de crecimiento de las bacterias nitrificantes.

La operación de un biofiltro puede ser afectada debido a la muerte o inhibición de las bacterias nitrificantes, las bacterias pueden ser afectadas por varios tratamientos químicos, así que esto debería ser considerado antes de adicionar algún antibiótico para el control de enfermedades en los organismos de cultivo.

1.4.5. Diseño del biofiltro.-

Uno de los pasos más críticos en el diseño de los sistemas de recirculación, es determinar el tamaño correcto para el biofiltro. Si el biofiltro es demasiado pequeño, los niveles de amonio y nitrito no podrían controlarse, resultando en el deterioro de la calidad de agua dentro del sistema de recirculación. Un sobredimensionamiento podría ocasionar un alto costo de inversión (Van Wik *et al.*, 1999).

Wheaton (1977) presentó un largo procedimiento para el diseño de biofiltros empleando técnicas establecidas por Speece (1973) para el cultivo de trucha en aguas frías, este procedimiento es usado como una guía pero tiene muy poca aplicación para biofiltros operando en aguas cálidas. Losordo (1991) demostró que el procedimiento de "balance de masas" es aplicable para el diseño de biofiltros. El balance de masas es un método ingenieril que se basa en leyes físicas de conservación de masa que establecen que la materia no se crea ni

se destruye simplemente se transforma (Tchobanoglous y Schroeder, 1985). Empleando el análisis de balance de masas (Losordo y Westers, 1994), un diseñador puede estimar el flujo de agua requerido desde el tanque de cultivo hacia las unidades de tratamiento para disminuir los sólidos y amonio. La técnica de balance de masas debería ser usada para diseñar sistemas o componentes prototipo, que puedan servir para proveer datos operacionales, que permitan tener criterios de diseño más precisos. (Hargrove et al., 1995).

2. OPERACIÓN Y MANEJO DE SISTEMAS DE RECIRCULACIÓN.-

Los beneficios asociados con la implementación de la tecnología de recirculación son: reducción en los requerimientos de agua, control ambiental, y el control en la calidad del producto (Losordo, 1991).

Los sistemas de recirculación son muy sofisticados y complejos en términos biológicos, y su manejo requiere de personal técnico y entrenado además de una rutina de monitoreo y mantenimiento constante para el éxito de operación del sistema.

En un futuro cercano se espera que los sistemas de recirculación contribuyan a la producción de post-larvas libres de enfermedades (Malone, 1994).

Según Lawrence y Lee (1997), el advenimiento de este sistema ha sido identificado como una necesidad para el desarrollo del cultivo de camarón.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.-

Este estudio fue desarrollado en las facilidades del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas CENAIM-ESPOL, bajo la dirección del departamento de Análisis Ambiental Químico, por un período de 6 meses (marzo-octubre, 2002)

El trabajo comprendió 2 etapas:

1. *Investigación de campo (Sistema Piloto de Recirculación)*
2. *Investigación de laboratorio (tanques exteriores dentro del complejo)*

3.1. DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA DE RECIRCULACIÓN.-

Un sistema de recirculación para acuicultura integrado de: Tanque de cultivo (TC), Sedimentador (TS), "Protein skimmer" (PS), filtro biológico del tipo Floating Bead Filter (FBF), Reservorio (TR), fue usado en este estudio. Como muestran las Figuras. 1 y 2.

Los criterios del dimensionamiento fueron establecidos básicamente en términos de carga de Nitrógeno Amoniacal del sistema (TAN).

La circulación en el circuito se genera por bombeo de agua de (TR) a (TC). El cabezal de agua en (TC) produce la circulación a través de (TS, PS y FBF,

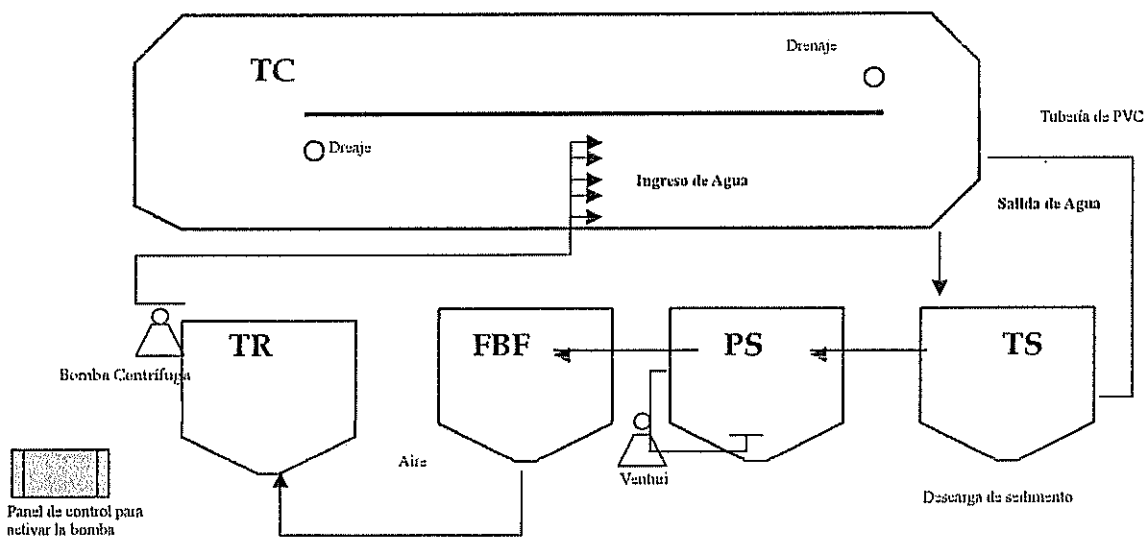
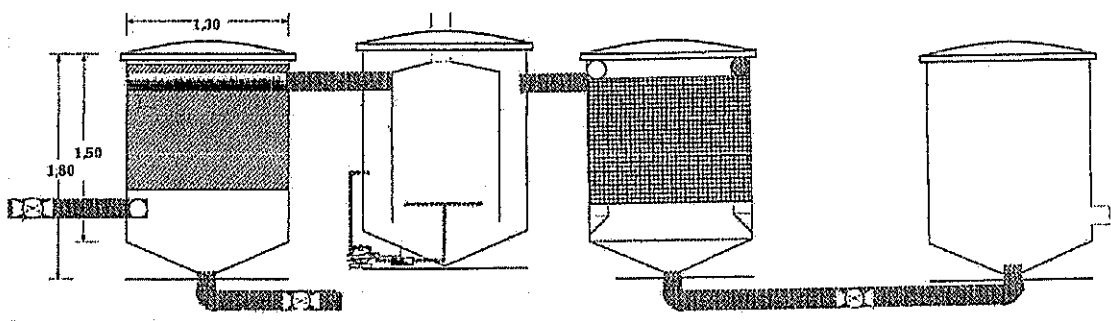


Figura 1 Diagrama esquemático del sistema piloto de raceway con filtros y recirculación



Batería de Filtros en el Raceway Piloto CENAIM

Figura 2 Diagrama del sistema de tratamiento de agua

Las características y dimensiones del sistema de tratamiento se detallan a continuación:

El (TC) con un volumen de 48m^3 , con dimensiones 12 (eje mayor) x 4 (eje menor) x 1,2m. (profundidad de agua 1m.), es un tanque excavado, rectangular con las esquinas redondeadas de acuerdo a la configuración Racetrack, revestido con un polímero sintético o "Liner". El agua ingresa al tanque por tuberías en la parte superficial de $\frac{3}{4}$ " (Figura 1) generando una circulación uniforme. Dentro del tanque se posicionaron dos conductos para el drenaje del agua hacia el (TS), la tubería de drenaje es de 3" PVC, el criterio de posicionamiento de los ductos de drenaje fue con la finalidad de establecer puntos muertos en el flujo de agua dentro del tanque para provocar la acumulación de sólidos en estos sitios.

La aireación en (TC) fue permitida con la finalidad de abastecer la demanda de oxígeno de las post-larvas de camarón.

El (TS) hecho de PVC con capacidad de 2m^3 tenía la finalidad de sedimentar las heces y partículas en suspensión.

Las dimensiones de (TS) son mostradas en la Figura 3. El agua ingresa a su interior desde el fondo creando un flujo de forma circular que concentraba los sólidos en el centro, los cuales eran sifoneados. A medida que el agua ascendía hacia la salida atravesaba el material plástico filtrante que estaba contenido en el interior de (TS).

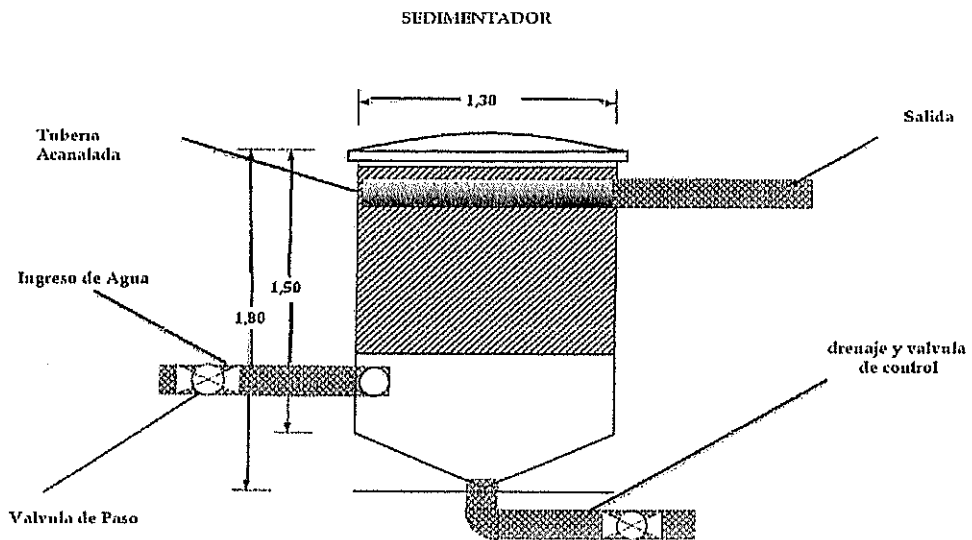


Figura 3 Diagrama esquemático del tanque sedimentador (TS)

Las dimensiones del (PS) hecho de PVC son mostradas en la figura 4. El (PS) con capacidad de 2m^3 tenía la configuración contra corriente, se inyectaron pequeñas burbujas de aire en el fondo del tanque en el cual el agua está fluyendo, con la finalidad de remover sustancias surfactantes, las cuales se caracterizan por tener un terminal polar hidrofílico (afinidad con el agua), y un terminal no polar hidrofóbico (repelencia al agua).

Las moléculas surfactantes se ligan sobre la superficie de la burbuja de aire, a través de su extremo no polar, mientras que su extremo polar sigue en contacto con el agua.

A medida que las burbujas ascendían a la superficie del tanque, iban incorporando sobre ellas partículas orgánicas, este proceso generó la formación de espuma, la misma que fue drenada por la parte superior del (PS).

Así el aire fue inyectado por medio de un venturi complementado con una bomba (0,5 HP y 8,4 GPM) de esta manera se generaban las pequeñas burbujas de aire necesarias.

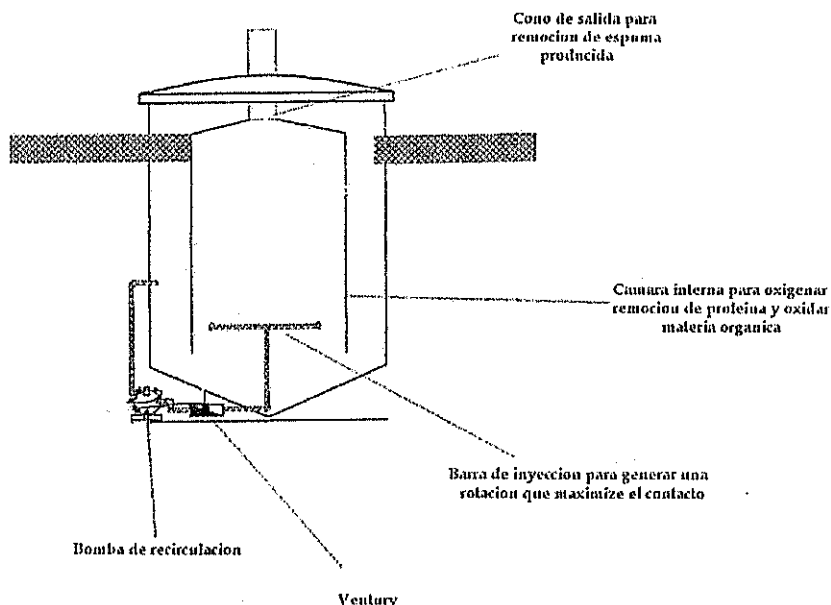


Figura 4 Diagrama esquemático del protein skimmer (PS)

El (FBF) de PVC con capacidad de 2m^3 era un reactor con dimensiones mostradas en la Figura 5, el cual se empleó como lecho biofiltrante, un sustrato sintético de forma esférica (Kineco Macrolite® Ceramic Spheres) (Figura 6), con gravedad específica (0,4-1,3) y cuyo diámetro osciló entre 2-3mm, la cual brindó un área de superficie de aproximadamente $1145\text{ m}^2\text{m}^{-3}$ área necesaria para la adherencia de las bacterias nitrificantes las cuales oxidan amonio vía nitrito a nitrato, proceso denominado nitrificación.

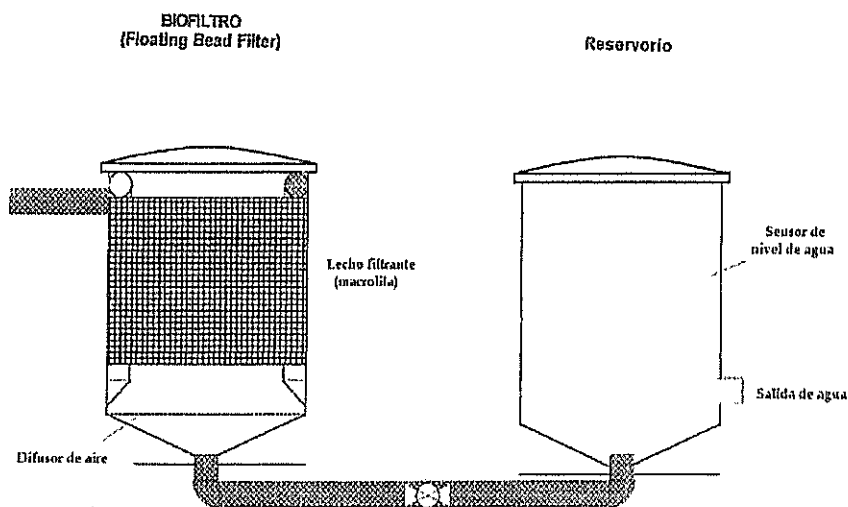


Figura.5 Diagrama esquemático del Biofiltro y el Reservorio

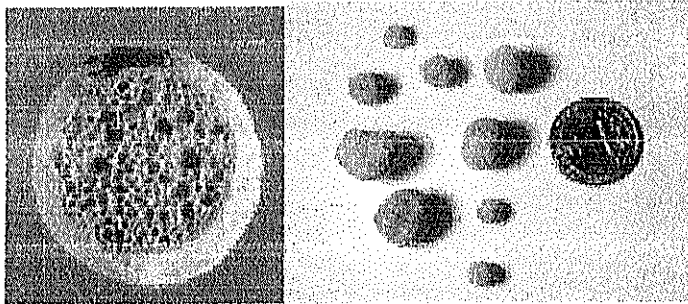


Figura 6 Kineco Macrolite® Ceramic Spheres

El flujo de agua a través del circuito (TC, TS, FBF, TR) fue de forma intermitente (Plug Flow) y esto se logró ya que el TR al alcanzar un volumen de 2 toneladas accionaba un interruptor automático, lo que permitía que se encienda la bomba (7,5 HP Pacer) de retorno hacia el TC.

El Caudal (Q) estimado a través del circuito (TC, TS, PS, FBF, TR) fue calculado:

Datos

Tiempo de llenado de TR	15 min.
Tiempo de vaciado de TR	5 min.
Q de salida de TR	467 Lm^{-1}

$$Q = \frac{467L}{1 \text{ min}} \cdot \frac{5 \text{ min}}{1 \text{ ciclo}} \cdot \frac{3 \text{ ciclos}}{1 \text{ h}} \cdot \frac{24 \text{ h}}{\text{día}}$$

$$Q = 168129 L$$

Si el volumen total del TC fue de 48 Ton, y si el Q a través del circuito fue de 168,13 Ton. Entonces el volumen de agua que atravesó la batería de filtros en un día fue el equivalente a 3,5 veces el volumen total del TC.

3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.

3.2.1. Pruebas de campo (Sistema Piloto de Recirculación)

El sistema de recirculación y tratamiento de agua fue evaluado con una producción comercial de Post larvas de camarón *Litopenaeus vannamei* durante los estadios de (PL5- PL 25). El experimento se llevó a cabo a partir del 4 al 31 de julio del 2002. De aquí en adelante nos referiremos a estos días como (0 y 27) respectivamente.

Post-larvas (PL 5), fueron sembradas en (TC) a una densidad de 103PI L⁻¹, en total se sembró 4'946.957 PL. La tasa de alimentación fue del 26-30% de la biomasa, el porcentaje de proteína del alimento fue de 52%.

Las post larvas fueron mantenidas en el TC durante 21 días, a partir del 10 de julio (día 6), y durante 6 días TC funcionó individualmente, sujeto al protocolo del departamento de larvicultura del CENAIM (Ver Anexo 2).

El 16 de julio (día 12) se integró TC a la batería de filtros (TS, PS, FBF, TR) y operó en conjunto durante 5 días (día 17). Cabe destacar que durante este periodo el protocolo de manejo fue el mismo, excepto que no se realizaron recambios de agua.

Sin embargo desde el 21 (día 17) hasta el 31 de julio (día 27) TC dejó de operar de forma integrada al sistema de tratamiento.

Cabe destacar que los horarios y tipo de alimento estaban sujetos a los protocolos elaborados por el departamento de larvicultura del CENAIM.

Conjuntamente se caracterizó la calidad de agua en el sistema de cultivo y se evaluó la eficiencia de los biofiltros mediante el análisis sistemático de variables químicas y físicas. Además se evaluó la población bacteriana adherida al biolecho (macrolita) del biofiltro, de acuerdo al esquema presentado más adelante.

3.2.1.1. Corrida en Raceway piloto de recirculación

El (FBF), que contenía 1m^3 del medio granular hecho de cerámica, con agua de mar, fue inoculado con una suspensión comercial de bacterias nitrificantes (ABIL Aqua Avecom Belgium) 100ul L^{-1} , dosis recomendada por el fabricante. Previo al inóculo de bacterias, se adicionó cloruro de amonio (ClNH_4) en concentración de 40 mg L^{-1} de nitrógeno total (TAN).

EL (FBF) fue acondicionado a partir del 4 de julio (día 0) y mantenido de manera individual durante 12 días, antes de entrar a operación en conjunto con (TC), con la finalidad de que se active o madure, es decir hasta que el amonio comenzara a ser consumido por las bacterias nitrificantes

3.2.1.2 Muestreo y análisis del sistema piloto de recirculación

En TC muestras de agua y sedimento fueron colectadas al inicio del experimento (día 6), cuando se sembraron las PL y posteriormente a intervalos de dos días para determinación de temperatura, pH, oxígeno disuelto, amonio total (TAN), nitrito (NO_2), nitrato (NO_3), y demanda bioquímica de oxígeno (DBO_5).

Muestreos para dureza y alcalinidad fueron realizados en (día 12, 17) y al final (día 27) del experimento

Además se analizó sólidos totales suspendidos (TSS) a partir del (día 8).

Sólidos totales suspendidos fueron evaluados cada dos días a partir del (día 14) tanto en el TS y PS. Sin embargo, el muestreo solo se efectuó durante el tiempo en que el sistema operó en conjunto.

Muestras de agua fueron colectadas en el FBF a partir del 4 de julio (día 0) y posteriormente cada 2 días durante el período de maduración (día 12). A partir de este día, en que el sistema operó en conjunto se dejó de tomar muestras del FBF, para continuar luego a partir del (día 17) en que el sistema dejó de operar de forma integrada. Se evaluó temperatura, pH, oxígeno disuelto, amonio total (TAN), nitrito (NO_2), nitrato (NO_3).

Se colectaron además muestras del sustrato de cerámica (macrolita) contenido en el FBF a partir del (día 12) con intervalos de 2 días, y se evaluó el consumo de oxígeno de las bacterias y microorganismos adheridos a este sustrato mediante el método de la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO_5)

Muestras adicionales de la macrolita fueron realizados en los días (0, 12 y 17) con la finalidad de determinar la población bacteriana adherida al sustrato de cerámica (FBF), mediante cultivo selectivo en agares específicos: para bacterias heterotróficas (Agar Marino), bacterias nitrificantes (anexo A), y *Vibrios sp.* (TCBS)

Las bacterias presentes en la macrolita fueron determinadas mediante un proceso inicial de extracción de las mismas por medio de la agitación de la muestra (5 macrolitas) en 5 ml de una solución salina por 0,5 horas, seguido de centrifugación por 15 minutos, a 3000 revoluciones por minuto (RPM), el sedimento fue sembrado (100uL) en los agares específicos.

Previa a la siembra del contenido centrifugado, se prepararon 3 placas petri que contenían cada una, uno de los tres agares específicos a utilizarse, paralelamente se prepararon otras tres placas petri con el mismo contenido en cuanto a agares que las anteriores, pero esta vez se agregó un inhibidor de nitrificación a cada placa, con la finalidad de inhibir el desarrollo de las bacterias nitrificantes, y de esta manera poder contrastar el crecimiento bacteriano con las placas sembradas sin el inhibidor, y así determinar la proporción de bacterias heterotróficas y nitrificantes adheridas a la macrolita. Bajo la asunción de que al agregar el inhibidor no se permitirá el crecimiento de las bacterias nitrificantes.

Las siembras en placas fueron realizadas por duplicado

3.2.2. Pruebas de Laboratorio.-

Se realizaron 3 pruebas de laboratorio. De aquí en adelante nos referiremos a estas pruebas como Experimento1, Experimento2 y Experimento 3.

3.2.2.1. Experimento 1.-

Con el propósito de determinar el tiempo de maduración del biolecho (macrolita), se diseñó un experimento para medir la reducción de la concentración del TAN y la producción de nitrito (NO_2) y nitrato (NO_3) en los bioreactores.

En 3 tanques de 30 L con agua de mar filtrada, se colocó el sustrato de cerámica (macrolita) en una cantidad teórica calculada de 873cm^3 que proveen un área de superficie de 1m^2 .

Los tanques fueron provistos de aireación, inóculo de bacterias nitrificantes (ABIL Aqua Avecom Belgium) 400ul/L , dosis recomendada por el fabricante, y se adicionó una fuente inorgánica de amonio en este caso cloruro de amonio (ClNH_4) en concentración de 20 mg L^{-1} de N-NH_4 (TAN).

Las muestras fueron colectadas a partir del día cero cada dos días y se evaluó la concentración de (TAN), (NO_2) y (NO_3), presentes en los bioreactores. El experimento fue conducido durante 8 días.

Los tanques fueron cubiertos con plástico de color negro para reducir o evitar la posible fotoinhibición de las bacterias nitrificantes.

Como control (blanco), se prepararon 3 tanques con las mismas condiciones de los bioreactores, excepto que a estos no se les adicionó el inóculo de bacterias nitrificantes.

Durante los 8 días de muestreo se midió temperatura, oxígeno disuelto y pH en todos los bioreactores.

3.2.2.2. Experimento 2.-

Con la finalidad de determinar la remoción de TAN en función de la relación entre la concentración de amonio y volumen de macrolita para la remoción de TAN, se diseñó un experimento que consistió en la preparación de bioreactores (tanques de 30L) con volúmenes variables de sustrato maduro de 0, 250, 500, 1000, 2000 cm^3 , manteniendo constante la concentración de amonio en 20 mg L⁻¹ de TAN. Cada tratamiento-bioreactor (30L) fue replicado.

Las muestras fueron colectadas a partir del día cero, cada 2 días y se evaluaron las concentraciones de TAN, NO₂, NO₃ presentes en los bioreactores. El experimento fue conducido durante 6 días. Durante los 6 días de muestreo se midió temperatura, oxígeno disuelto y pH en los bioreactores con las diferentes cantidades del biolecho.

Los tanques fueron cubiertos con plástico de color negro para reducir o eliminar la posible fotoinhibición de las bacterias nitrificantes.

3.2.2.3. Experimento 3.-

Con el propósito de determinar la cantidad de TAN removido por el biolecho en función de la concentración de TAN, se diseñó un tercer y último experimento que consistió en preparar biolechos (tanques de 30L) con 873cm^3 de macrolita madura, a los cuales se les adicionó diferentes cantidades de TAN (tratamientos) equivalentes a 0; 5; 10; 20; 40 mg L^{-1} .

Las muestras se colectaron a partir del día cero, cada 2 días y se evaluaron las concentraciones de TAN, NO_2 , NO_3 presentes en los bioreactores. El experimento fue conducido durante 10 días.

Durante los 10 días de muestreo se midió temperatura, oxígeno disuelto y pH en los bioreactores con las diferentes concentraciones de TAN mg. L^{-1}

Los tanques fueron cubiertos con plástico de color negro para reducir o evitar la posible fotoinhibición de las bacterias nitrificantes.

Todos los tratamientos contaron con 3 réplicas.

3.3. ANÁLISIS FÍSICOS, QUÍMICOS Y MICROBIOLÓGICOS.-

Amonio Total ($\text{N-NH}_4 + \text{N-NH}_3$), Nitrito (NO_2) y Nitrato (NO_3) fueron determinados de acuerdo a los métodos descritos en el Boletín Técnico INP (1983). (DBO_5) fue determinado de acuerdo a la metodología descrita en Standart Methods for the Examination of Water and Waste Water (APHA 1995). Sólidos Totales Suspendidos (TSS), dureza y alcalinidad fueron analizados de acuerdo a los procedimientos descritos por Boyd and Tucker (1992).

Temperatura y oxígeno disuelto fueron medidos con un instrumento YSI modelo 55 (Yellow Springs Instruments, Ohio). El pH fue medido utilizando un Potenciómetro TOA (HM-5S).

Para evaluar el consumo de oxígeno y el desarrollo de las bacterias nitrificantes en el sustrato de cerámica (FBF) del Sistema Piloto de Recirculación, se empleó para las pruebas microbiológicas y pruebas de (DBO₅) anteriormente descritas, un inhibidor de nitrificación (2 cloro 6 tricloro metil pyridina. HACH Cat. No. 2533-35).

Los medios utilizados en las pruebas microbiológicas están descritos en el Anexo 1.

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos de concentración de TAN y NO₃ al término de cada experimento, fueron analizados mediante análisis de varianza de una vía.

Diferencias significativas entre tratamientos fueron establecidos a un nivel de confianza de ($\alpha = 0,05$) y demarcados por letras. Así: tratamientos con diferencias significativas estarían denotados por letras a, b, o c.

3.4.1 Ecuación de Verhulst

Se aplicó la ecuación de Verhulst, a la serie de tiempo de concentración de nitrato, para estimar la tasa media de nitrificación y el tiempo medio de inicio de nitrificación. En el experimento 1, la evolución de la concentración de nitrato en tiempo se ajustó a una curva sigmoïdal la cual puede ser representada por la ecuación de Verhulst, dada:

$$y[f(t)] \approx \frac{a}{1 + \left[\left(\frac{a}{N_0} \right) - 1 \right] \bullet e^{-a \bullet k(t-t_0)}} \quad (1)$$

Ecuación de Verhulst

Donde:

- a = Valor asintótico de nitrato
- No = Nitrato inicial
- k = Constante
- t₀ = Tiempo inicial
- y = Contenido de N-Nitrato en función del tiempo

La máxima pendiente de la curva se obtiene cuando $N = \frac{1}{2} a$, en $t_0 = 0$.

Al sustituir $a/2$ en el diferencial, entonces se obtiene la máxima tasa de nitrificación, la cual está dada por $k_{\text{máx}}$:

$$k_{(\text{max})} = \frac{k \bullet a^2}{4} \quad (2)$$

Al reemplazar $N = a/2$ en la ecuación 1 obtenemos el tiempo (t_{\max}) en el cual ocurre la máxima tasa de nitrificación:

$$t_{(\max)} = (1/ak) \ln \left[\left(\frac{a}{N_0} \right) - 1 \right] \quad (3)$$

El tiempo de iniciación t' y terminación t_s del proceso de nitrificación pueden ser estimados mediante las ecuaciones:

$$t' = t_{\max} - \frac{\left(\frac{a}{2} - N_0 \right)}{k_{\max}} \quad (4)$$

$$t_s = t_{\max} + \frac{\left(\frac{a}{2} - N_0 \right)}{k_{\max}} \quad (5)$$

La duración de la máxima tasa de nitrificación, puede también ser obtenida:

$$\Delta t = t_s - t' \quad (6)$$

El experimento 3 fue sujeto del mismo análisis con el objeto de determinar únicamente las tasas de nitrificación a diferentes concentraciones de amonio total inoculado.

3.4.2. Eficiencia de nitrificación

En el experimento 2, se analizó la eficiencia de remoción de TAN, por unidad de sustrato (macrolita); para diferentes radios de concentración de amonio y volumen de macrolita, con la finalidad de evaluar la eficiencia de asimilación de TAN por cm^3 de macrolita (biolecho), en diferentes concentraciones de esta, a las 48 y 96 horas.

El análisis, reveló que el biolecho (m) es más eficiente cuando hay una alta remoción de TAN por cantidad de biolecho (X/m).

Cuando se emplea una cantidad sobreestimada de macrolita (un adsorbente), no logra saturarse del elemento adsorbido (TAN), es así que la eficiencia de remoción del biolecho podría variar considerablemente con la cantidad de esta que se emplee.

El experimento 3 fue sujeto del mismo análisis pero esta vez con el objeto de determinar la eficiencia de adsorción de una misma cantidad de macrolita por cm^3 en diferentes concentraciones de mg TAN L^{-1} .

Así:

X/m

Donde:

x = Cantidad de sustancia adsorbida (removida de la solución)

m = Masa de adsorbente (macrolita)

4. RESULTADOS.-

4.1. INVESTIGACION DE LABORATORIO

4.1.1 Experimento 1. -

Los promedios de temperatura, oxígeno disuelto y pH en los bioreactores con inóculo de bacterias y en los blancos (control), durante los 8 días que duró el experimento se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Valores promedio de temperatura, oxígeno y pH en los reactores durante el experimento (elaborado por el autor)

Reactores	Temperatura (°C)	Oxígeno Disuelto (mg.L ⁻¹)	pH.
Biofiltro (con inóculo)	23,4± 1,2	5,5± 0,4	7,6± 0,6
Blanco (sin inóculo)	23,2± 0,9	5,5± 0,4	8,0± 0,1

El pH en el biofiltro fue significativamente ($p < 0,05$) inferior que en el blanco a partir del día 4 en 0,2; 0,4; 1,5 unidades de pH, respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis de varianza del pH entre reactores (elaborado por el autor)

Días Reactores	0	2	4	6	8
Biofiltro	a	a	a	a	a
Blanco	A	a	b	b	b

La concentración de TAN en el biofiltro con inóculo de bacterias se redujo con el tiempo de 18,12 a 0,68 mg.L⁻¹ y en el blanco sin inóculo de 18,38 a 17,87 mg.L⁻¹ (Fig. 7) Las concentraciones de TAN en el biofiltro fueron significativamente ($p < 0,05$) inferiores que en el blanco, a partir del día 2.

El blanco tuvo la capacidad de remover apenas 0,5 mg.L⁻¹ de TAN en 8 días (Tabla 3)

Tabla 3. Variación de la concentración de TAN en los reactores.

Días Reactores	0	2	4	6	8
Biofiltro	18,12 ± 0,2 ^a	16,68 ± 0,1 ^a	12,69 ± 0,1 ^a	4,61 ± 0,7 ^a	0,68 ± 0,2 ^a
Blanco	18,38 ± 0,1 ^a	18,19 ± 0,5 ^b	18,68 ± 0 ^b	17,54 ± 0,3 ^b	17,87 ± 0,1 ^b

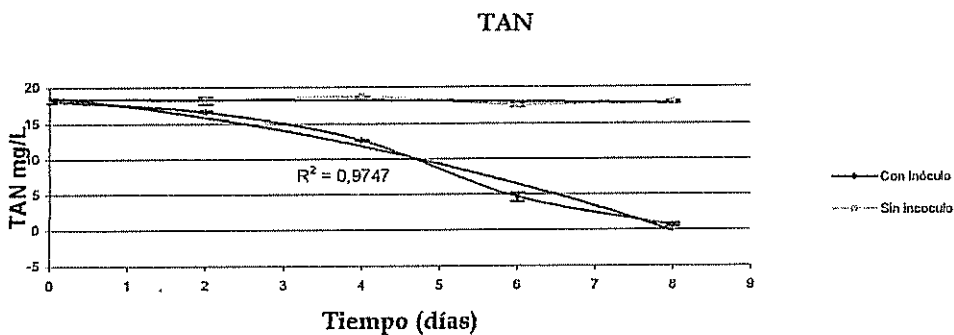


Figura 7 Reducción diaria de la concentración de TAN en el biofiltro y blanco (control)

La concentración de NO₃ en el biofiltro con inóculo de bacterias se incrementó con el tiempo de 0,53 a 16,02 mg.L⁻¹ y en el blanco sin inóculo de 0,36 a 0,51 mg.L⁻¹ (Tabla 4). Las concentraciones de NO₃ en el biofiltro fueron significativamente ($p < 0,05$) superiores que en el blanco (control), a partir del día 2 (Figura 8)

Tabla 4. Variación de la concentración de NO_3 en los reactores

Días Reactores	0	2	4	6	8
Biofiltro	$0,53 \pm 0,0^a$	$2,07 \pm 0,1^a$	$4,87 \pm 0,0^a$	$10,45 \pm 0,3^a$	$16,02 \pm 0,9^a$
Blanco	$0,36 \pm 0,2^a$	$0,44 \pm 0,0^b$	$0,39 \pm 0,0^b$	$0,46 \pm 0,0^b$	$0,51 \pm 0,2^b$

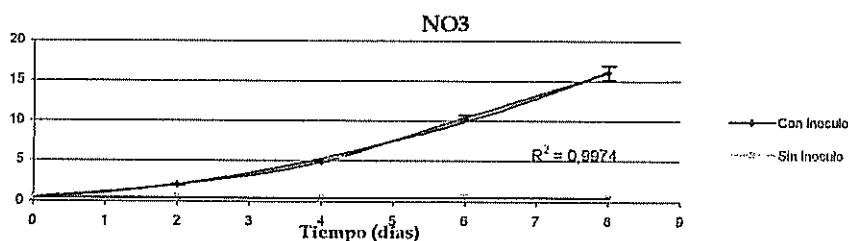


Figura 8 Acumulación diaria de la concentración de NO_3 en el biofiltro y blanco

TAN vs NO_2 y NO_3 en biofiltro con inóculo de bacterias nitrificantes

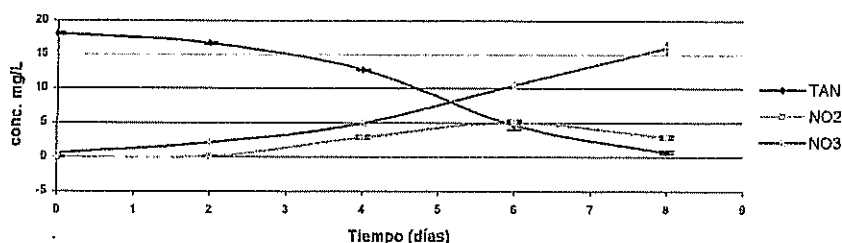


Figura 9. Serie de tiempo de las concentraciones de TAN, NO_2 y NO_3 en el biofiltro

Los parámetros de a , N_0 y k (Tabla 5) fueron calculados aplicando la ecuación de Verhulst 1, y ajustados a la curva sigmoideal generada por esta ecuación con un nivel de confianza del 95% para los datos del experimento (Figura 10)

Además las ecuaciones derivadas de Verhulst fueron aplicadas para calcular los parámetros de nitrificación.

Tabla 5. Parámetros de nitrificación calculados a partir de la ecuación de Verhulst

Reactores	Parámetros calculados			Parámetros de Nitrificación			
	a.*	No*	k**	K max	t'	Δt	ts
Biofiltro	17,96	0,45	0,038	3,05	2,80	6,62	9,43

* Unidades de a y No están expresadas en mg. $\text{NO}_3\text{-N L}^{-1}$

** k es una constante

$k_{(m\acute{a}x.)}$ = máxima tasa de nitrificación (mg $\text{NO}_3\text{ L}^{-1}\text{ d}^{-1}$)

t' = tiempo de maduración o activación del biofiltro (días)

Δt = duración de la fase de máxima nitrificación (días)

ts = terminación de la máxima tasa de nitrificación (días)

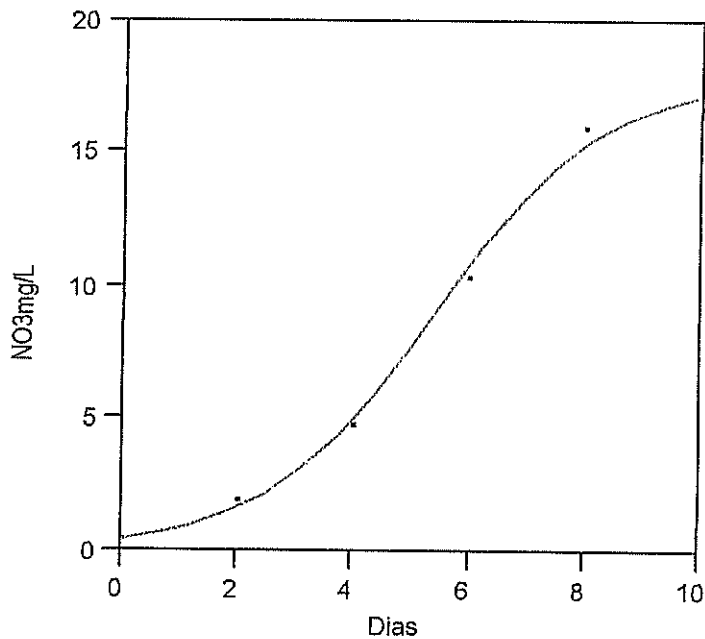


Figura 10. Ajuste de puntos mediante ecuación tipo sigmoideal, representa la acumulación de NO_3 en el biofiltro

4.1.2 Experimento 2. -

Los promedios de temperatura, oxígeno disuelto y pH en los bioreactores con las diferentes cantidades de macrolita (biolecho) durante los 6 días que duró el experimento se muestran en la Tabla 7.

Tabla 6. Valores promedio de temperatura, oxígeno y pH en los reactores durante el experimento

Reactores (macrolita cm ³)	Temperatura (°C)	Oxígeno Disuelto (mg. L ⁻¹)	pH.
250	26,2± 0,4	5,5± 0,4	7,5± 0,7
500	26,1± 0,5	5,0± 0,4	7,6± 0,6
1000	25,8± 0,3	5,4± 0,2	7,2± 0,9
2000	26,4± 0,8	5,0± 0,4	7,0± 1,1

El pH de los reactores con 250, 500, y 1000 cm³ de biolecho fué significativamente ($p < 0,05$) superior a las 48 horas con respecto al reactor con 2000 cm³, en 1,4; 1,3; 0,9 unidades de pH respectivamente.

A las 96 horas el pH del reactor con 250 cm³ fué significativamente ($p < 0,05$) superior a los reactores con 500, 1000 y 2000 cm³, en 0,7; 1,8; 2,0 unidades de pH respectivamente. Así mismo el pH del reactor con 500 cm³ fue significativamente ($p < 0,05$) superior a los reactores con 1000 y 2000 cm³ en 1,0, 1,3 unidades de pH respectivamente.

No se detectaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en el pH entre los reactores con 1000 y 2000 cm³ de biolecho (Tabla 7).

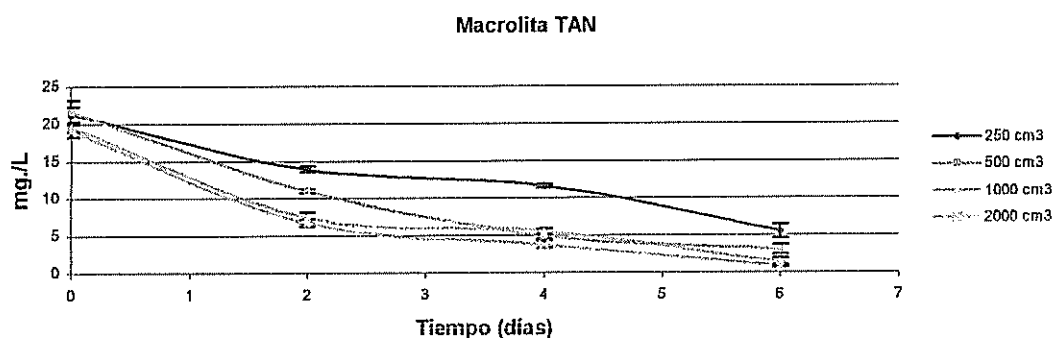
Tabla 7. Análisis de varianza del pH en los reactores a las 48 y 96 horas

Reactores	Horas	
	48	96
250	a	a
500	a	b
1000	a	c
2000	b	c

Las concentraciones de TAN en los reactores durante los 6 días del experimento mostraron tener variaciones entre sí (Tabla 8, Fig. 11)

Tabla 8. Variación de la concentración de TAN en los reactores

Reactores	Días			
	0	2	4	6
250	21,26 ± 1,0	13,92 ± 0,4	11,64 ± 0,3	5,52 ± 0,9
500	21,64 ± 1,5	11,99 ± 0,3	4,04 ± 0,4	3,04 ± 0,6
1000	19,61 ± 0,6	7,42 ± 0,7	5,51 ± 0,5	1,38 ± 0,5
2000	19,11 ± 0,8	6,41 ± 0,5	3,78 ± 0,6	0,87 ± 0,1

Figura 11 Reducción diaria de TAN, para 250, 500, 1000, y 2000 cm³ de macrolita

Se encontró que la concentración de TAN a las 48 horas en el reactor con 250 cm³ de biolecho fue significativamente ($p < 0,05$) superior a las concentraciones de TAN en los reactores con 500, 1000, 2000 cm³ en 1,93; 6,48 y 7,20 mg.L⁻¹ respectivamente (Tabla 9).

Así mismo se observó que la concentración de TAN en el reactor con 500 cm³ de biolecho fue significativamente superior a las concentraciones de TAN en los reactores con 1000 y 2000 cm³ en 4,57 y 5,27 mg.L⁻¹ respectivamente.

No se detectaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los reactores con 1000 y 2000 cm³ de biolecho.

A las 96 horas se observó que la concentración de TAN en el reactor con 250 cm³ fué significativamente superior a las concentraciones de TAN en los reactores con 500, 1000 y 2000 cm³ de biolecho en 7,6; 6,13; 7,86 mg.L⁻¹ respectivamente.

Así mismo se observó que la concentración de TAN en el reactor con 1000 cm³ de biolecho fue significativamente superior a las concentraciones de TAN en los reactores con 500 y 2000 cm³ de biolecho en 1,47 y 1,73 mg.L⁻¹.

No se detectaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en las concentraciones de TAN entre los reactores con 500 y 2000 cm³ de biolecho (Tabla 9)

Tabla 9. Promedio de TAN a las 48 y 96, indicando el análisis estadístico

Reactores (Macrolita cm ³)	TAN	
	48 h.	96 h.
250	13,92± 0,4 ^a	11,64± 0,3 ^a
500	11,99± 0,3 ^b	4,04± 0,4 ^b
1000	7,42± 0,8 ^c	5,51± 0,5 ^c
2000	6,72± 0,5 ^c	3,78± 0,6 ^b

La eficiencia de remoción de amonio por cm³ de biolecho disminuyó con el aumento de biolecho en el sistema. A las 48 horas se encontró, que al emplear 250 cm³ de biolecho, cada cm³ fue capaz de remover 0,029 mgTAN cm³.

Sin embargo la concentración de TAN en el reactor fue de 13,92 mgTAN L⁻¹. En contraste podemos observar que para disminuir la concentración de TAN a 6,72 mgTAN L⁻¹ en el reactor, se necesita emplear 2000 cm³ de biolecho, sin embargo cada cm³ de biolecho fue capaz de remover únicamente 0,006 mgTAN cm³. (Tabla 10), es decir menos por unidad de biolecho.

Tabla 10. Remoción de TAN (mg) por cm³ de biolecho después de 48 horas.

<u>m</u> Cantidad de Macrolita (cm ³)	<u>C</u> TAN(mg. L ⁻¹)	<u>X</u> TAN removido(mg)	X/m (mg. cm ⁻³)
250	13,921	7,341	0,029
500	11,004	10,636	0,021
1000	7,419	12,186	0,012
2000	6,716	12,395	0,006

La eficiencia de remoción de amonio por cm^3 de biolecho disminuyó con el aumento de biolecho en el sistema. A las 96 horas demostró que cuando se utilizó 250 cm^3 de biolecho, cada cm^3 fue capaz de remover $0,038 \text{ mgTAN cm}^3$. Sin embargo la concentración de TAN en el reactor fue de $11,64 \text{ mgTAN L}^{-1}$. En contraste podemos observar que para disminuir la concentración de TAN a $3,77 \text{ mgTAN L}^{-1}$ en el reactor, se necesita emplear 2000 cm^3 de biolecho, sin embargo cada cm^3 de biolecho fue capaz de remover únicamente $0,008 \text{ mgTAN cm}^3$. (Tabla 11)

Se observó el mismo comportamiento en cuanto a la remoción de TAN por cm^3 de biolecho a las 48 y 96 horas.

Tabla 11. Remoción de TAN (mg) por cm^3 de biolecho después de 96 horas.

\underline{m} Cantidad de Macrolita (cm^3)	\underline{C} TAN(mg. L^{-1})	\underline{X} TAN removido(mg)	X/m (mg. cm^{-3})
250	11,636	9,625	0,038
500	5,00	16,639	0,033
1000	5,514	14,091	0,014
2000	3,775	15,335	0,008

4.1.3 Experimento 3. -

Los valores promedio de temperatura, oxígeno disuelto y pH en los bioreactores (tanques de 30L con 873cm³ de macrolita madura) con las diferentes concentraciones de TAN mg. L⁻¹ durante los 10 días que duró el experimento se muestran en la (Tabla 12)

Tabla 12 Valores promedio de temperatura, oxígeno y pH en los reactores durante el experimento. Sustrato de biofiltro de 873 cm³/30L.

Reactores Teórico(TAN mg. L ⁻¹)	Conc. inicial TAN	Temperatura (°C)	Oxígeno Disuelto (mg. L ⁻¹)	pH.
5	4,10± 0,1	25,2± 0,5	5,4± 0,2	8,1± 0,0
10	9,24± 0,1	25,7± 0,9	5,4± 0,4	7,9± 0,0
20	19,74± 0,4	25,2± 0,7	5,6± 0,6	7,3± 0,7
40	40,63± 0,4	25,2± 0,7	5,4± 0,2	7,4± 0,7

El pH de los reactores con las concentraciones teóricas de 5, 10 y 20 mg TAN L⁻¹, fue significativamente ($p < 0,05$) superior a las 48 horas con respecto al reactor con 40 mgTAN L⁻¹ teóricos, en 1,9; 1,7; 1,0; unidades de pH respectivamente.

(Tabla 13)

Tabla 13. Análisis de varianza del pH en los reactores a las 48 horas

Reactores \ Horas	48
5	a
10	a
20	a
40	b

Las concentraciones de TAN en los reactores durante los 10 días del experimento mostraron tener variaciones entre sí (Figura 12)

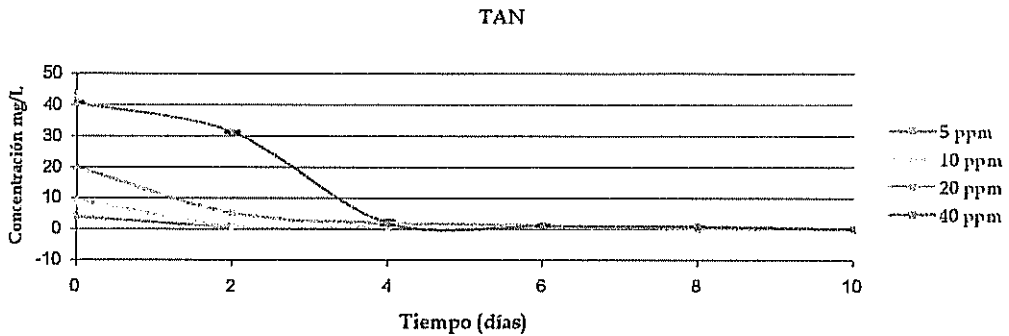


Figura 12 Reducción de la concentración de TAN para 5, 10, 20, 40 ppm

Tabla 14 Remoción de la concentración de TAN a las 48 horas en función de la concentración de TAN inicial

Reactores Teórico(TAN mg. L ⁻¹)	Reactores Conc. Inicial (TAN mg. L ⁻¹)	TAN 48 h.	Consumo de TAN mg L ⁻¹
5	4,10± 0,1	0,55± 0,1 ^a	3,55
10	9,24± 0,1	1,08± 0,0 ^a	8,16
20	19,74± 0,4	5,2± 0,5 ^b	14,54
40	40,63± 0,4	31,28± 0,3 ^c	9,35

Los valores de NO₃ en los reactores durante los 10 días del experimento mostraron tener variaciones entre sí (Figura 13)

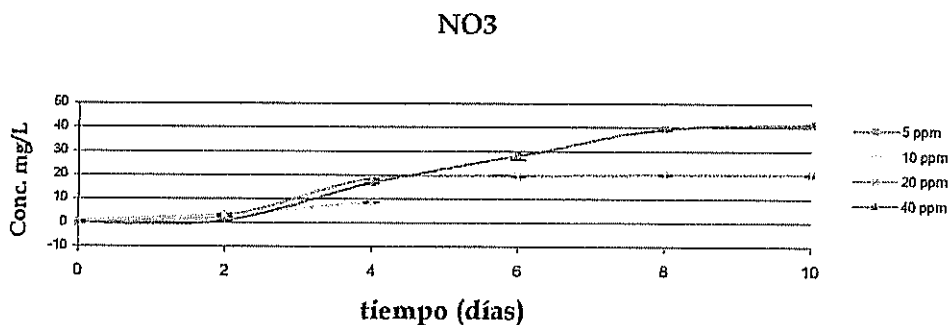


Figura 13 Acumulación de NO₃ para los reactores con TAN 5, 10, 20, 40 ppm

Tabla 15. Producción de Nitrato a las 48 horas en función de la concentración de TAN inicial

Reactores Teórico (TAN mg. L ⁻¹)	Reactores Conc. Inicial (NO ₃ mg. L ⁻¹)	(NO ₃ mg. L ⁻¹) 48 h.	Producción de NO ₃
5	0,79 ± 0,0	2,53 ± 0,1 ^a	1,74
10	0,93 ± 0,1	3,36 ± 0,0 ^b	2,43
20	0,28 ± 0,1	2,58 ± 0,0 ^a	2,3
40	0,28 ± 0,0	0,83 ± 0,1 ^c	0,55

La eficiencia de remoción de TAN por cm³ de biolecho aumentó a medida que se incrementó la concentración de TAN hasta 20 mg TAN L⁻¹, y luego decreció. Sin embargo la concentración óptima estuvo entre 20 y 40 mg TAN L⁻¹, así lo confirman los valores de $k_{\text{máx}}$ mostrados más adelante.

Tabla 16 Remoción de TAN (mg) por cm³ de biolecho en función de la concentración inicial de TAN después de 48 horas (elaborado por el autor)

Reactores (TAN mg. L ⁻¹)	m Macrolita (cm ³)	C (mg. L ⁻¹)	X (mg)	X/m (mg. cm. ⁻³)
5	873	0,55	3,55	0,004
10	873	1,08	8,16	0,009
20	873	5,22	14,54	0,016
40	873	31,28	9,36	0,011

La tasa de nitrificación máxima ($k_{\text{máx.}}$) estuvo asociada a las concentraciones de 20 y 40 mg TAN L⁻¹ (Tabla 17)

Tabla 17. Tasa de nitrificación en función de TAN (elaborado por el autor)

Reactores Teórico(TAN mg. L⁻¹)	K max. (mg NO₃ L⁻¹d⁻¹)
5	1,57
10	2,74
20	10,66
40	8,26

4.2 INVESTIGACION DE CAMPO

El departamento de larvicultura del CENAIM ordenó se suspenda con el sistema integrado de TC con la batería de filtros (TS, PS, FBF, TR); debido que las post larvas de camarón empleadas en este experimento estuvieron comprometidas comercialmente. Sin embargo las muestras que fueron analizadas con la finalidad de evaluar el sistema de tratamiento en conjunto, arrojaron varios datos los cuales son presentados en gráficos más adelante.

Así, al evaluar el desarrollo del biofiltro en base a la asimilación de TAN por parte de las bacterias nitrificantes inoculadas previamente (Fig. 14), se observó, un paulatino descenso de TAN a partir del día 2, indicando que el FBF desarrolló un proceso nitrificante, luego en el día 12 cuando se integró la batería de filtros con TC los niveles de TAN se mantuvieron por debajo de 1 ppm, lo cual permite afirmar entonces que el FBF se mantuvo activo.

Por otra parte, cuando el sistema dejó de operar en conjunto (día 17), se inoculó el FBF con otra dosis de $CLNH_4$ con la finalidad de proporcionar nutrientes a la población de bacterias contenidas en el FBF, y de esta manera mantener activas a las bacterias nitrificantes que lograron desarrollarse.

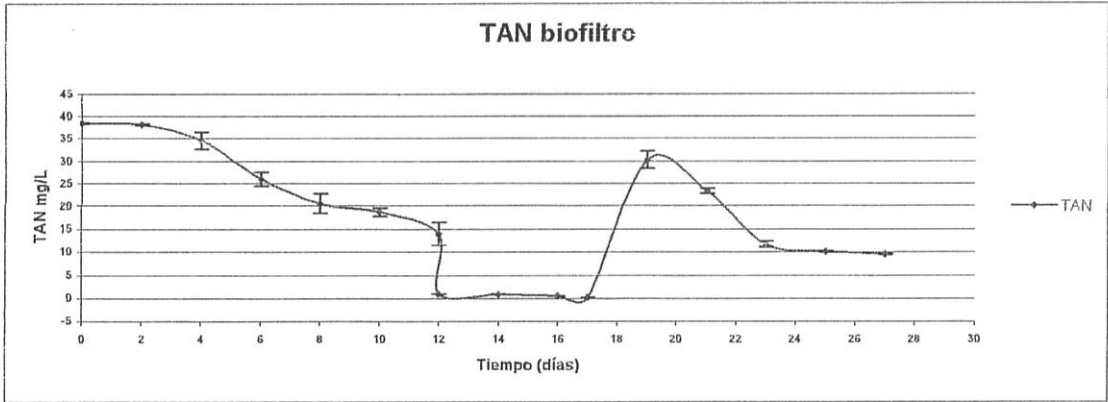


Figura 14 Serie de tiempo de TAN en el biofiltro

Al evaluar la acumulación de NO_3 en el FBF (Fig. 15), producto de la actividad nitrificante y la transformación de TAN, se observó que la tendencia de la concentración NO_3 fue de aumentar, sin embargo cuando el TC operó de forma integrada al sistema de filtros (día 12), se observó que el NO_3 disminuyó, por efecto de la dilución, aun así la tendencia en su concentración dentro del FBF, fue siempre la de aumentar.

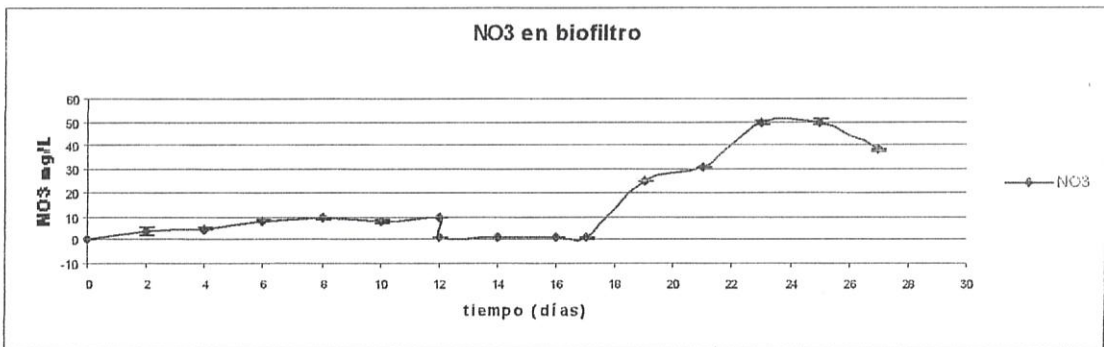


Figura 15 Serie de tiempo de NO_3 en el biofiltro

Así mismo al evaluar la acumulación de TAN, producto de la actividad metabólica, descomposición del alimento no consumido y excretas de las post-larvas de camarón dentro del TC (Figura 16).

Se observó, que a partir de que se sembraron las PL (día 6), la tendencia en la concentración de TAN fue de aumentar. Sin embargo cuando TC, operó en conjunto con el FBF (día 12), se observó que la concentración de TAN disminuyó. En contraste, cuando el sistema dejó de operar en conjunto (día 18) la tendencia de TAN fue nuevamente aumentar.

De la misma manera, se observó que la acumulación de NO_3 dentro del Raceway mantuvo en todo momento la tendencia al incremento, toda vez que el proceso de nitrificación se llevó a cabo dentro del sistema (Figura 17)

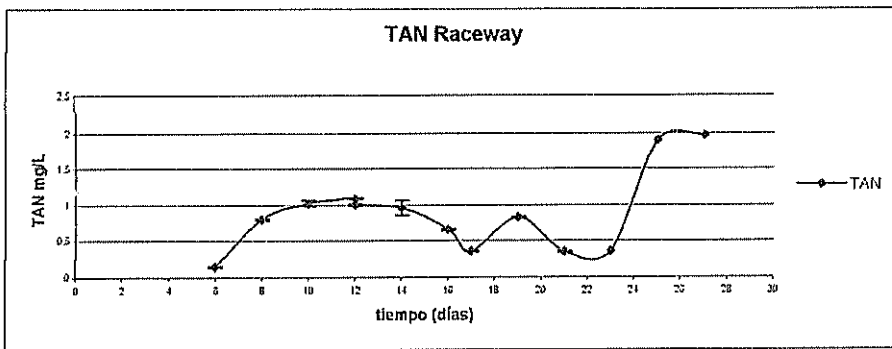


Figura 16 Serie de tiempo de TAN dentro del Raceway

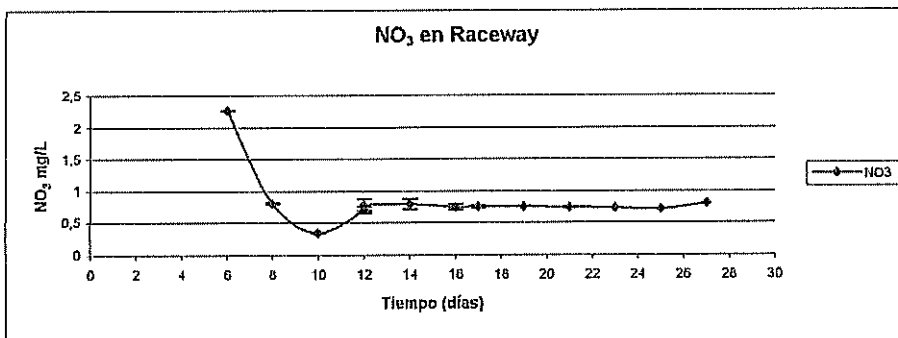


Figura 17 Serie de tiempo de NO_3 dentro del Raceway

Las condiciones ambientales de temperatura, pH, O₂ disuelto y salinidad mostraron valores similares entre el FBF (Figura 18) y Raceway (Figura 19), esto producto de que la fuente de agua fue la misma para ambos casos.

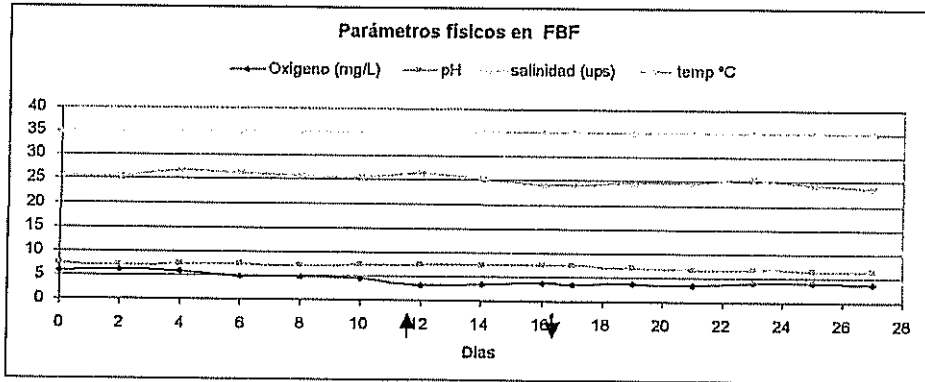


Figura 18 Serie de tiempo de parámetros físicos en el biofiltro

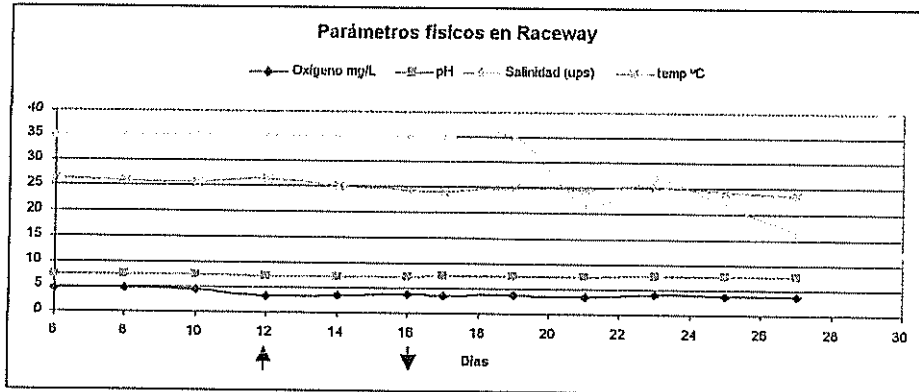


Figura 19 Serie de tiempo de parámetros físicos en el Raceway

Se analizó la demanda bioquímica de oxígeno (DBO_5) de la población bacteriana adherida a la macrolita contenida en el biofiltro, con la finalidad de evaluar el desarrollo de la población bacteriana responsable del proceso de nitrificación.

Las muestras de macrolita que contenían el inhibidor de nitrificación mostraron en promedio una menor demanda de oxígeno, en contraste las muestras sin inhibidor desarrollaron un mayor consumo de oxígeno, estos resultados observados, demuestran que el consumo de oxígeno adicional de la macrolita sin inhibidor fue producto de la demanda de O_2 de la masa de bacterias nitrificantes; y de esta manera, se confirma la hipótesis, de que la macrolita había desarrollado sobre su superficie un "biofilm" de bacterias las cuales estuvieron llevando a cabo la nitrificación (Figura 20)

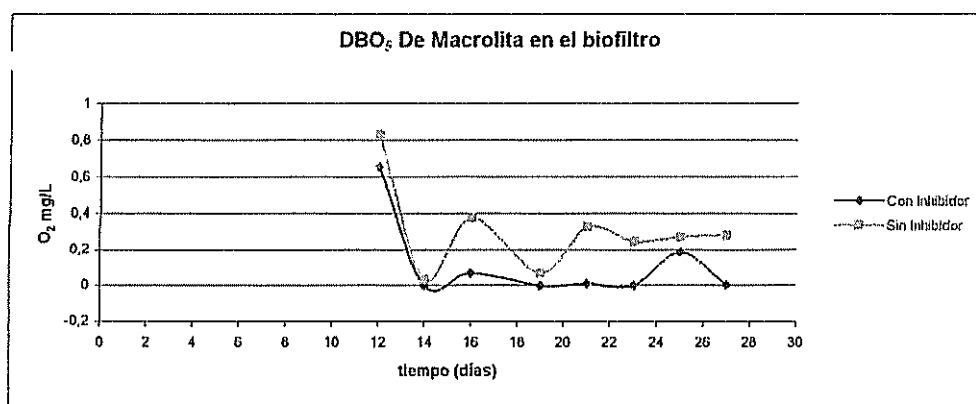


Figura 20 Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO_5) de la macrolita contenida en el biofiltro

Así mismo al realizar el análisis bacteriológico de la macrolita, con la finalidad de determinar las proporciones de bacterias adheridas al biolecho, se determinó que la población bacteriana adherida a la macrolita del FBF estaba constituida básicamente de bacterias heterotróficas en el día 0 (Figura 21)

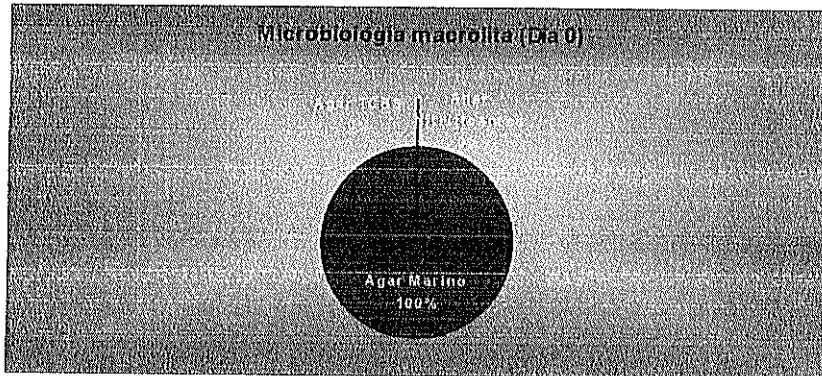


Figura 21 Microbiología de la macrolita contenida en el biofiltro en agar marino, TCBS y agar nitrificantes, al día 0 (elaborado por el autor)

Sin embargo luego del inóculo de bacterias nitrificantes, se observó que en el día 12, la población adherida a la macrolita estaba constituida por bacterias heterotróficas en mayor porcentaje; no obstante ya se observó un desarrollo importante de bacterias nitrificantes (Figura 22)

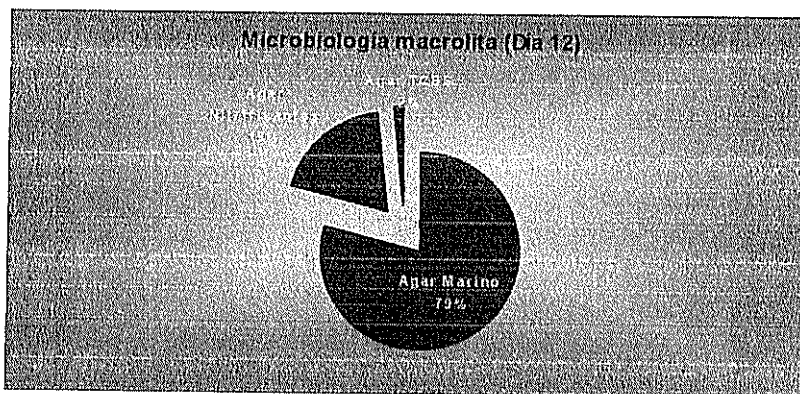


Figura 22 Microbiología de la macrolita contenida en el biofiltro en agar marino, TCBS y agar nitrificantes, al día 12 en que el sistema operó en conjunto (elaborado por el autor)

De la misma manera los resultados bacteriológicos al día 17 en que el sistema dejó de operar en conjunto, demostraron que las proporciones de bacterias adheridas a la macrolita no variaron en comparación con el día 12 (Figura 23)

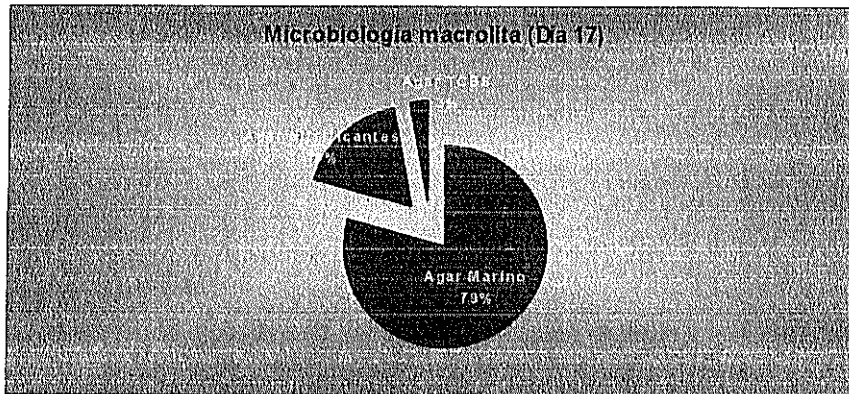


Figura. 23. Microbiología de la macrolita contenida en el biofiltro en agar marino, TCBS y agar nitrificantes, al día 17 en que el sistema dejó de operar en conjunto (elaborado por el autor)

5. DISCUSION-

Durante el proceso de nitrificación en sistemas de recirculación existe la tendencia de un gradual decline en el valor de pH (Wickins, 1983; Van Wik *et al.*, 1999). La nitrificación es un proceso de acidificación por lo que se forman iones hidrógeno los cuales consumen la alcalinidad y bajan el pH (Malone y Burden, 1988; Bisogoni y Timmons ,1991; Hargrove *et al.*, 1995). El proceso de nitrificación consume 7,14 g de alcalinidad como (CaCO_3), por cada gramo de amonio que es convertido a nitrato (Wheaton *et al.*, 1991). Sin embargo es difícil saber cual es el nivel exacto de bicarbonato que debería mantenerse, debido a que la química del bicarbonato en el agua es muy compleja (Van Wik *et al.*, 1999).

Así el experimento 1 mostró diferencias significativas de pH entre el blanco y el reactor que contenía el inóculo de bacterias.

En el reactor con inóculo de bacterias después 4 días de iniciado el experimento, se observó una tendencia a la disminución en el pH, lo cual concuerda con las diferencias estadísticas ($p < 0.05$) evidenciadas a partir del día 2 entre el blanco y el reactor, en el cual se observó una constante en la asimilación de TAN y la acumulación de NO_3 como resultado de la oxidación de amonio; no así en el blanco. Laubscher *et al.* (1990) reportaron resultados similares.

Esto indica que si el comportamiento descrito, es similar en campo es de esperarse valores cercanos a los obtenidos en este experimento, además de una disminución en cuanto al pH del medio producto de la acidificación ocasionada por la nitrificación, es así que se debería prever esa reducción en el pH mediante la adición de algún agente con capacidad buffer.

Se ha evidenciado en estudios precedentes, que la oxidación de amonio decrece cuando el pH baja a niveles de 6 y cesa cuando los valores están cercanos a 5 (Wickins, 1983). Sin embargo los valores de pH durante este experimento oscilaron entre 8 y 7,6.

Por otra parte, se ha indicado que el tiempo de inicio de un proceso de nitrificación oscila entre 29 - 41 días (Forster, 1974; Hirayama, 1974; Carmiggiani y Bennett, 1977).

Laubscher *et al.* (1990) cuantificó la máxima tasa de nitrificación k . (máx.)= 2,7 $\text{mg NO}_3 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$; el tiempo de maduración $t' = 4$ días; la duración de la fase de máxima nitrificación $\Delta_t = 13,7$ días; terminación de la máxima tasa de nitrificación $t_s = 17,6$ días. Sin embargo bajo las condiciones en los cuales se desarrolló este experimento se obtuvieron los siguientes valores; k . (máx.)= 3,05 $\text{mg NO}_3 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$; tiempo de maduración $t' = 2,8$ días; la duración de la fase de máxima nitrificación $\Delta_t = 6,62$ días; terminación de la máxima tasa de nitrificación $t_s = 9,43$ días.

(Lawson, 1995) reportó que la activación de un biofiltro nuevo es de 4-6 semanas, este tiempo de activación puede ser reducido al inocular alguna fuente comercial de bacterias nitrificantes y a la vez proveer una fuente inorgánica de amonio. Lo cual concuerda con lo observado al comparar los resultados entre el blanco y el reactor con inóculo de bacterias en los cuales se observó que, en los reactores acondicionados con un inóculo de bacterias el proceso de nitrificación fue acelerado, en contraste con el blanco en el cual el proceso de nitrificación fue tardío.

Kruner y Rosenthal, (1983) estudiaron el efecto de la superficie del medio filtrante sobre la nitrificación, la selección del medio o sustrato a utilizarse va a depender en gran medida del costo, disponibilidad, peso y área de superficie deseada. El material ideal debe tener una alta área de superficie por unidad de volumen, ser barato y durable.

Los biofiltros que contienen arena, roca y conchilla son probablemente los materiales de menor costo. Los módulos de plástico y macrolita generalmente tienen un tiempo de vida indefinido pero son costosos (\$16961/m³, fuente Acuapro S.A.).

El nivel de oxidación de amonio y nitrito a nitrato por microorganismos en un biofiltro depende de dos factores: de la capacidad de nitrificación individual de las bacterias y el número de bacterias nitrificantes presentes en el biofiltro. Este último depende del área de superficie disponible para su adhesión.

Es así que los resultados obtenidos en el Experimento 2 sugieren que, a las 48 horas de haberse iniciado el proceso de nitrificación, para concentración y volumen utilizados en este bioensayo, las cantidades adecuadas de macrolita necesarias para oxidar la mayor cantidad de amonio fueron 1000 y 2000 cm³ /30L, sin embargo esta abrupta oxidación de amonio influyó el descenso de los valores de pH.

Por otra parte al evaluar la cantidad óptima de macrolita para la remoción de amonio a las 96 horas se determinó que 500 cm³ fue la cantidad más eficiente en términos de asimilación de amonio, toda vez que no se detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre 500 y 2000 cm³, sin embargo al emplear 2000 cm³ fue necesario realizar un ajuste en el pH del medio ya que los valores alcanzados a esta concentración fueron considerados como críticos durante un proceso de nitrificación.

Es así que cuando se emplean medios filtrantes tales como plásticos o cerámicas, estos, al ser materiales inertes en términos de contribución al medio de la capacidad buffer, implica un continuo control del pH. No así con los medios tales como conchilla o dolomita (Wickins, 1983).

Al evaluar la eficiencia de nitrificación, en función de la remoción de TAN, por unidad de sustrato (macrolita); para diferentes radios de concentración de amonio y volumen de macrolita, a partir de los resultados observados durante este experimento, reveló que el biolecho 500 cm³ (macrolita) fue más eficiente, toda vez que se observó una alta remoción de TAN por cantidad de biolecho.

Sin embargo las mejores eficiencias de nitrificación fueron observadas, cuando se emplearon menores cantidades de macrolita. De allí que la eficiencia debe ser sacrificada, para obtener remociones de TAN mas rápidas.

Wickins, (1983) reportó que la nitrificación aumentó, cuando se incrementaron los valores de amonio. Estos resultados concuerdan al evaluar la cantidad de TAN removido en función de la concentración de TAN en el experimento 3, en el cual se determinó que a las 48 horas la cantidad de TAN removido por cm^3 de biolecho aumentó en directa proporcionalidad al incremento de TAN. Sin embargo la oxidación de amonio decreció por encima de los 20 mg TAN L^{-1} .

Por otra parte, al contrastar los valores de las máximas tasas de nitrificación $k_{(máx.)}$ obtenidas en los experimentos 1 y 3, se pudo observar que a pesar de haber empleado similares cantidades de biolecho, como de TAN, se obtuvieron distintos valores de $k_{(máx.)}$, esto sugiere que para biofiltros en los cuales ya exista una población de bacterias oxidadoras de amonio, evidentemente se obtendrán valores superiores de $k_{(máx.)}$.

Los resultados obtenidos en la fase investigación de campo (Sistema Piloto de Recirculación) no han sido sujetos de discusión puesto que el experimento no fue concluido.

6. CONCLUSIONES.-

En la investigación de campo (Sistema Piloto de Recirculación CENAIM); bajo las condiciones y durante el tiempo en que se mantuvo el experimento, los resultados aquí obtenidos, permiten concluir, que se observó el desarrollo de un proceso de nitrificación a partir del día dos en el FBF como lo demuestran la asimilación de TAN, y la consecuente acumulación de NO_3 . Así mismo, se confirmó el establecimiento de un biofilm de bacterias nitrificantes, en la superficie del biolecho. Además, a través de la bacteriología de la macrolita se evidenció el desarrollo de los grupos bacterianos adheridos al biolecho.

En la investigación de laboratorio, el primer experimento permitió establecer el tiempo de maduración de un filtro biológico y la tasa de asimilación de TAN, en 2,8 días y $3,05 \text{ mg NO}_3 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, respectivamente. Se validó el empleo de la ecuación de Verhulst para describir claramente el proceso de nitrificación y determinar sus parámetros

Al evaluar la eficiencia de nitrificación en el segundo experimento se observó que, a mayor cantidad de macrolita empleada para remover una determinada cantidad de TAN, la eficiencia de remoción por cm^3 de esta disminuye.

Así, se determinó la remoción de TAN en función del radio entre amonio y volumen de biolecho empleado; a las 48 horas las cantidades necesarias de

macrolita para oxidar la mayor cantidad de amonio fueron 1000 y 2000 cm³. Sin embargo a las 96 horas se estableció que 500 cm³ fue la cantidad más eficiente.

En el tercer experimento se determinó la cantidad de TAN removido en función de la concentración de amonio, así, a las 48 horas la cantidad de TAN removido por cm³ de biolecho aumento en directa proporcionalidad al incremento en la concentración de TAN inicial.

Así, se determinó en función de las constantes de nitrificación obtenidas que 20 mg L⁻¹ TAN es una concentración adecuada a la que un biofiltro podría operar.

7. RECOMENDACIONES.-

Con respecto a la investigación de campo, la cual fue desarrollada en el Sistema Piloto de Recirculación del CENAIM, sugerimos llevar a cabo el experimento completo hasta llegar a su conclusión. Toda vez que el presente estudio no llegó a su finalización ya que las post larvas de camarón empleadas en el experimento, estuvieron comprometidas comercialmente.

Sugerimos que los resultados obtenidos en la investigación de laboratorio desarrollado en tres experimentos, deberían ser confirmados a escala comercial.

ANEXOS

ANEXO A

Medios De Cultivo Empleados En Pruebas Microbiológicas

- Medio empleado para bacteriología general
Agar marino
- Medio empleado para Vibrios spp
Agar TCBS (Thiosulfato-citrato-sales biliares-sucrosa)
- El medio empleado para bacterias nitrificantes
Modificado (Akai et al. 1983)

Agua destilada	1L
NH ₄ Cl	153 mg
NaHCO ₃	500 mg
KH ₂ PO ₄	8.5 mg
K ₂ HPO ₄	21.75 mg
CaCl ₂	27.5 mg
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	44.6 mg
MgSO ₄ 7H ₂ O	22.5 mg
FeCl ₃ 6H ₂ O	0.25 mg

Bacto Agar	20 g
Inhibidor de Nitrificación (2 cloro 6 tricloro metil pyridina)	0.53 g

		ANEXO B		Protocolo de Laricultura CENAIM					
ESTADIO	VOL.	RECAM.	MALLA	ALGAS (l0*3)	PROB. (L)	EDTA	SECA	ARTEMIA	
	ton	%	micras	Cé/ml		20 ppm	mg/larva	naup.art/larva	
PL5	48	50%	500	NAV.AMP.BN	0.4	200	0.088	(cm) 100%* 35.0	
PL6	48	50%	500	NAV.AMP.BN	0.4	200	0.100	Biomasa/Artemia	
PL7	48	50%	500	NAV.AMP.BN	0.4	200	0.112	Biomasa/Artemia	
PL8	48	50%	500	NAV.AMP.BN	0.4	200	0.124	Biomasa/Artemia	
PL9	48	50%	500	NAV.AMP.BN	0.4	200	0.136	Biomasa/Artemia	
PL10	48	50%	500	NAV.AMP.BN	0.4	200	0.150	Biomasa/Artemia	
PL11	48	50%	500	NAV.AMP.BN	0.4	200	0.175	Biomasa/Artemia	
PL12	48	50%	500	NAV.AMP.BN	0.4	200	0.200	Biomasa/Artemia	
PL13	48	50%	600				0.213	Biomasa/Artemia	
PL14	48	50%	600				0.225	Biomasa/Artemia	
PL15	48	50%	600				0.238	Biomasa/Artemia	
PL16	48	50%	600				0.250	Biomasa/Artemia	
PL17	48	50%	600				0.263	Biomasa/Artemia	
PL18	48	50%	600				0.275	Biomasa/Artemia	
PL19	48	50%	600				0.288	Biomasa/Artemia	
PL20	48	50%	600				0.300	Biomasa/Artemia	
PL21	48	50%	600				0.313	Biomasa/Artemia	
PL22	48	50%	600				0.325	Biomasa/Artemia	
PL23	48	50%	600				0.338	Biomasa/Artemia	
PL24	48	50%	600				0.350	Biomasa/Artemia	
PL25	48	50%	600				0.363	Biomasa/Artemia	

Alimentación viva:

Microalgas Bloom Natural, Noricula, Amphora (Aquamats).

Dieta Seca:

Flake negro de artemia, Molino 55

Probióticos:

Vibrio alginolyticus desde N 5 hasta PL 30

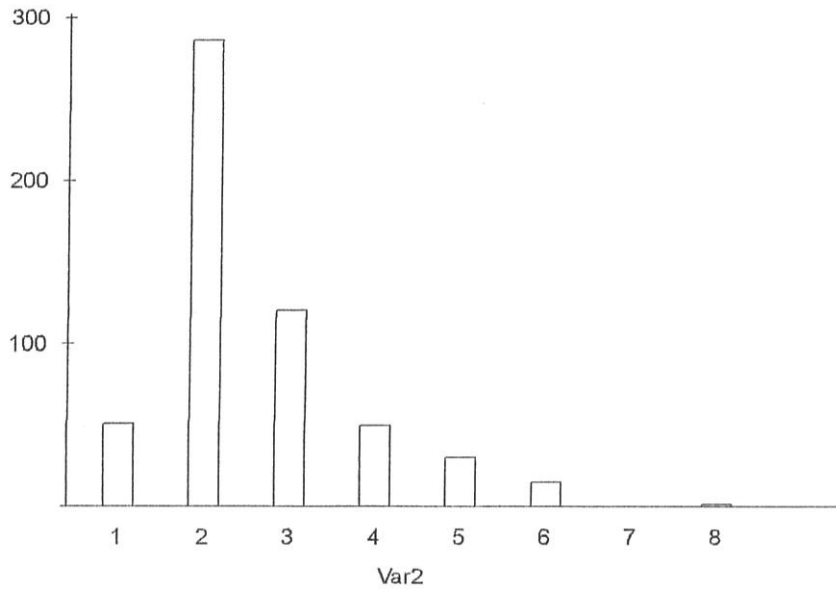
Alimentación:

Cada 2 horas

Lento recambio de agua de un 50% diario acompañado de un sifoneo previo al recambio cada 2 días.

ANEXO C

Características del biolecho (macrolita) empleado en el Biofiltro (FBF)



El grafico muestra la distribución de diámetros de la macrolita en (mm)

Tabla de frecuencias

	Área m ²
Volumen de macrolita (1m³)	1177,2
Número de muestras	560
Media (mm)	2,6125
Número de frecuencias	8
grupos	cantidad
1	52
2	287
3	121
4	50
5	31
6	16
7	1
8	2

9. BIBLIOGRAFIA.-

- AKAI, D., O. MIKI AND S. OHGAKI. 1983. Nitrification model with inhibitory effect of sea water. *Ecological Modeling* 19: 189-198.
- APHA. 1995. Standart Methods for the examination of water and waste water.
- BISOGONI, J.J. AND M.B. TIMMONS. 1991. Control of pH in closed cycle aquaculture systems. *Engineering Aspects of intensive Aquaculture, Proceedings from the Aquaculture Symposium, Cornell University, Ithaca, NY, April 4-6, 1991.* pp. 61-100
- BOID, C.E AND TUCKER, C.S. 1992. *Water Quality in Ponds for Aquaculture.* Auburn, AL: Auburn University/Alabama Agricultural Experiment station. pp. 303-315.
- BOLETIN TECNICO CIENTIFICO INP. 1983, Procedimientos de análisis de calidad de agua: Instituto Nacional de Pesca. *Aquaculture* 4: 387 -397.
- BOVENDEUR, J., EDING, E.H., HENKEN, A.M. 1987. Design and Performance of a water recirculation system for high-density culture of the african catfish, *Clarias gariepinus*. *Water Res.* 24 (2), 207-213.

Modeling aquaculture system. *Wat*

- CARMIGIANI, G.M., AND J.B. BENNETT. 1977. Rapid Star-up of a biological filter in a closed aquaculture system. *Aquaculture* 11: 85 -88.
- CHEN, S., M. B. TIMMONS, J. J. BISOGNI, AND D.J. ANESHANSLEY. 1993. Modeling surfactant removal in foam fractionation I: Theoretical development. *Journal Aquacultural Engineering*, in press.
- CHEN, S., STECHEY, D., MALONE, R.F., 1994. Suspended solids control in recirculating aquaculture systems. In: Timmons, M.B., Losordo, T.M (Eds), *Aquaculture Water Reuse Systems: Engineering Design and Management*. Elsevier, Amsterdam, pp. 61-100.
- CHEN, S., COFFIN, D.E., MALONE, R.F., 1997. sludge production and management for recirculating Aquacultural systems. *L. World Aqua. Soc.* 28 (4), 303-315.
- FOSTER, J. R.M. 1974. Studies on nitrification in marine biological filters. *Aquaculture* 4: 387 -397.
- HARGROVE, L.L., WESTERMAN, P.W., LOSORDO, T.M. 1995. Nitrification in Three-Stage and Single Stage Floating Bead Filters in a Laboratory scale recirculating aquaculture system. *World Aqua. Soc.* 28 (4), 303-315.

- HIRAYAMA, K. 1974. Water control by filtration in closed culture systems. *Aquaculture* 4: 369-385.
- HUGUENIN, J.E., COLT, J., 1989. Design and Operating Guide for Aquaculture Seawater Systems. Pp 59-71. Elsevier, New York.
- KRUNER, G. AND ROSENTHAL, H., 1983. Efficiency of nitrification in trickling filters using different substrates. *Aquaculture. Eng.*, 2: 49-67.
- LAUBSHER, D.J., VAN ZYL, J.M AND PREEZ, C.C. 1990. Equations to Calculate The Approximate Duration And Termination Of The Maximal Rate Phase Of Nitrification in Soil. *Common, in soil. Plant Anal.* 21(788). 611-621.
- LAWRENCE, A.L., LEE, P.G., 1997. Research in the Americas. In: D'Abramo, L., Conklin, D., Akiyama, D. (Eds), *Crustacean Nutrition*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, pp. 566-587.
- LAWSON, T. B. 1995. *Fundamentals of Aquacultural Engineering*. Department of Biological Engineering Louisiana State University. SH 137, L38, 639pp.
- LIAO, I.CH., 2000. Super Intensive Recirculating Eel Culture Systems in Taiwan. *Advocate Global Aquaculture* 3: 44-46

- LOSORDO, T.M., 1991. An introduction to recirculating production systems design. Engineering aspects of intensive aquaculture, Proceedings from the Aquaculture Symposium. Ithaca, NY: Cornell University, April 4-6, 1991.
- LOSORDO. T.M., WESTERS. H., 1994. System carrying capacity. In: Timmons. M.B., Losordo. T.M. (Eds), Aquaculture Water Reuse Systems: Engineering Design and management. Developments in Aquaculture and Fisheries Sciences, vol. 27. Elsevier. Amsterdam. Pp. 9-60
- LOSORDO, T.M., HOBBS, A.O., DE LONG, D.P., 2000. The design and operational characteristics of the CP&L/EPRI fish barn: a demonstration of recirculating aquaculture technology. *Aquaculture. Eng.* 22, 3-16.
- LUCCHETTI, G.L., GRAY, G.A., 1988. Water Reuse Systems: A review of principal components. *Prog. Fish. Cult.* 50 (1), 1-6.
- MALONE, R.F.1994. The future of recirculating systems in the USA. Aquaculture Industry, U.S. department of commerce, national Technical Information Service (PB96-107578) 58 pp.
- MALONE, R.F., AND D.G. BURDEN. 1988. Design of recirculating soft crawfish shedding systems. Baton Rouge, L.A: Louisiana Sea Grant College Program, Louisiana State University.

MALONE, R.F., CHITTA B.S., AND DRENNAN, D.G., 1993. Optimizing nitrification in bead filters for warm water recirculating aquaculture systems. *Techniques for Modern Aquaculture*, Wang, ed. St. Joseph, MI: American Society of Agricultural Engineers. ASAE Publication 02-93 (ISBN 0-9293355-40-7; LCCN 93-71584).

MALONE, R.F., BEECHER, L.E., 2000. Use of floating bead filters to recondition recirculating waters in warmwater aquaculture production systems. *Aquaculture. Eng.* 22: 57-73.

MENASVETA, R., ARANYAKANONDA, P., RUNGSUPA, S., MOREE. N., 1989. Maturation and Larviculture of Penaeid prawns in closed recirculating seawater systems. *Aquac. Eng.* 8: 357-368

MENASVETA, P., FAST, A, W., PIYATIRATTIVORAKUL, S., RUNGSUPA, S., 1991. An improved closed seawater recirculating maturation system for giant tiger prawn (*Penaeus monodon Fabricius*). *Aquac. Eng.* 10: 173- 181.

MILLANEMA, O.M., CASALMIR, C.M., SUBOSA, P.F., 1991. Performance of recirculating systems for prawn hatchery and broodstock maturation tanks. In: Tseng, K.F., Huei-Meei Su, Mao-Sun Su., 1998. *Culture of Penaeus Monodon in a Recirculating System. Aquaculture. Eng.* 17: 138-147.

MOCK, C.R., R.A. NEAL AND B.R. SALSER. 1973. A closed raceway for the culture of shrimp. In : Mock, C.R. Fontaine, C.T., and Kenneth T. Marvin. Description of a raceway hatchery system for the culture of penaeid shrimp larvae. Vol 3: Ecology, Culturing, Use in Aquaculture.

OLSON, R.J., 1981. Differential photoinhibition of marine nitrifying bacteria: a possible mechanism for the formation of the primary nitrite maximum. J. Mar. Res., 39: 227-238.

PETERSON, J. 2000. Use of Substrate Technology In Shrimp Larviculture. Advocate Global Aquaculture 3: 68-69

ROGERS, L.G., AND KLEMETSON, S.L. 1985. Ammonia Removal in Selected Aquaculture Water Reuse Biofilter. Aquacultural Engi. 4: 135-154.

ROMBAUT, G., ZIZHANG, Q., VANHOOT, V., SUANTIKA, G., DHERT, P., SORGELOOS, P., VERSTRACTE, W., 2001. A nitrifying culture (ABIL) used as probiotic supplement in rotifer batch cultures and starter for marine nitrifying biofilters. Aquaculture, 87: 133-143.

ROSENTHAL, H. AND BLACK, E.A., 1993. Recirculation systems in aquaculture. In: Jaw-Kai Wang (Editor), Techniques for modern Aquaculture. ASAE, st. Joseph, MI, pp. 284- 294.

SHARMA, B., AHLERT, R.C., 1977. Nitrification and nitrogen removal. Water. Res. 11, 897-925.

SKØLSTRUP, J., NIELSEN, P.H., FRIER, J.O. MC LEAN, E. 1997. Biofilters in recirculating aquaculture systems: state of the art. In: Makkonen, J. (Ed), Technical Solutions in the Management of environmental effects of aquaculture. The Scandinavian Association of Agricultural Scientist Seminar no. 258. 13-15September 1995, Oul, Finland, Kala-Jariistaraportteja, 95: 33-49.

SPEECE, R. E. 1973. Trout metabolism characteristics and the rational design of nitrification filters for water reuse in hatcheries. Transactions American Fisheries Society. 2:323-334.

SUANTIKA, G., DHERT, P., SORGELOOS, P., 2001. The use of sintered filter for high density rotifer recirculation system. Aquaculture. Eng. 25:1-11.

- TSENG, K.F., CHIOU, J.H., SHI, C.J., CHOU, S.C., LIAO, L.C., 1994. The treatment and reuse of aquaculture wastewater. The efficiency assessment of recirculating eel culture system. In: Tseng, K.F., Huei-Meei Su, Mao-Sun Su., 1998. Culture of *Penaeus Monodon* in a Recirculating System. *Aquaculture. Eng.* 17: 138-147.
- TSENG, K.F., HUEI-MEEI SU, MAO-SUN SU., 1998. Culture of *Penaeus monodon* in a Recirculating System. *Aquaculture. Eng.* 17: 138-147.
- TCHOBANOGLIOUS, G. AND E.D. SCHROEDER. 1985. (Revised 1987). *Water quality: characteristics, modeling, modification, reading*, MA: Addison-Wesley.
- VAN RIJN, J., 1996. The potential for integrated biological treatment systems in recirculating fish culture a review. *Aquaculture* 139, 181-201.
- VAN RIJN, J. AND RIVERA, G., 1990. Aerobic and anaerobic biofiltración in an Aquaculture unit- Nitrite accumulation as a result of nitrification and denitrification. *Aquaculture. Eng.*, 9: 217-234.
- VAN WIK, MEGAN DAVIS-HODKINS, ROLLAND LARAMORE, KEVAN L. MAIN, JOE MOUNTAIN, JOHN SCARPA. 1999. *Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater System*. Harbor Branch Ocenographic Institution.

WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION (WPCF). 1983. Nutrient Control. Manual of practice. Pub. No. FD-7, Washington, DC: Water Pollution Control Federation.

WHEATON, F.W. 1977. Aquaculture Engineering. Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, New York, 708 pp. In: Mock, C.R. Fontaine, C.T., and Kenneth T. Marvin. Description of a raceway hatchery system for the culture of penaeid shrimp larvae.

WHEATON, F.W., HOCHEIMER, J.N., KAISER, G.E., KRONES. 1991. Principles of biological filtration. Engineering Aspects of intensive aquaculture, proceedings from the aquaculture symposium, Ithaca, NY: Cornell University, April 4-6, 1991.

WICKINS. 1983. Studies on Marine Biological Filters Model Filters. Water Res. 1769 - 1780.