



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

Tratamiento de aguas residuales del cultivo intensivo de camarón blanco del Pacífico mediante el sistema MaB-floc, el "Biofloc verde"

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Previo a la obtención del título de:

BIÓLOGO

Autor:

Juan Carlos Figueroa Aguilera

Tutora:

Sofie Van Den Hende, Ph.D.,

I Término
2015 - 2016

GUAYAQUIL - ECUADOR

Tratamiento de aguas residuales del cultivo intensivo de camarón blanco del Pacífico mediante el sistema MaB-floc, el “Biofloc verde”

Juan Carlos Figueroa^{1*}, Jessica Salcedo², Stanislaus Sonnenholzner^{2,3}, Sofie Van Den Hende^{1,2}

¹ Facultad de Ciencias de la Vida, FCV, Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Campus Gustavo Galindo, Km 30.5 Vía Perimetral, P.O. Box 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador, www.espol.edu.ec, jucafigu@espol.edu.ec, shende@espol.edu.ec

² Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas, CENAIME, Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Campus Gustavo Galindo, Km 30.5 Vía Perimetral, P.O. Box 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador, www.cenaim.espol.edu.ec, jsalcedo@espol.edu.ec, ssonnen@espol.edu.ec, shende@espol.edu.ec

³ Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas, Oceánicas y Recursos Naturales, FIMCBOR, Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Campus Gustavo Galindo, Km 30.5 Vía Perimetral, P.O. Box 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador, www.espol.edu.ec, ssonnen@espol.edu.ec

Resumen

*La acuicultura puede mejorar la seguridad alimenticia y traer beneficios económicos, sin embargo también puede producir impactos negativos al medio ambiente. Para mitigar el impacto ambiental, se han desarrollado sistemas de tratamiento de sus efluentes. El sistema MaB-floc surge para solucionar la necesidad de proveer oxígeno y carbono orgánico que presenta el sistema convencional de Biofloc. En el presente estudio a escala piloto se comparó la calidad de los efluentes de los reactores MaB-flocS y BioflocS que trataron los efluentes superficiales de un cultivo intensivo de camarón blanco del Pacífico *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* (Boone, 1931) llevado a cabo en las instalaciones del CENAIME. El reactor MaB-flocS fue efectivo en la producción fotosintética de oxígeno y la remoción de la demanda bioquímica de oxígeno. Ambos reactores redujeron las concentraciones de nitrógeno total y nitrógeno amoniacal total (NAT). No obstante, el reactor BioflocS fue mejor para reducir la concentración de $N-NO_2^-$ y $N-NO_3^-$. El influente y los efluentes de ambos reactores cumplieron con las normas ecuatorianas de descarga de efluentes en aguas marinas y con los parámetros para su reutilización en el cultivo de camarón blanco del Pacífico, excepto el fósforo reactivo (PR) y $N-NO_2^-$ en el MaB-flocS. La biomasa de ambos reactores presentó actividad biofloculante y buena capacidad para sedimentarse. Son necesarias investigaciones a futuro para valorizar la biomasa de ambos sistemas, hacer un análisis del ciclo de vida (life cycle analysis, LCA) y un análisis económico para decidir cuál de los dos sistemas es más beneficioso. Adicionalmente, el reactor BioflocF trató las aguas del fondo del tanque de camarón. Este reactor fue eficiente para la remoción del NAT y $N-NO_3^-$, pero se necesita mejorar la remoción del PR en este sistema.*

Palabras Clave: sostenibilidad, tratamiento de aguas residuales, camarón blanco del Pacífico, Biofloc, MaB-floc, aireación fotosintética, microalga

Abstract

*Aquaculture can improve food security and bring along economic benefits, but can also have a negative impact on the environment. To mitigate this environmental impact, wastewater treatment systems have been developed for effluent treatment. The MaB-floc system was developed to address the need to provide oxygen and organic carbon in a conventional Biofloc system. In the present pilot scale study carried out at the premises of CENAIME, the quality of the effluents of the MaB-floc and Biofloc reactors which treated surface effluent from an intensive cultivation of Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* (Boone, 1931) were compared. The MaB-floc reactor was effective with respect to photosynthetic aeration and removal of biochemical oxygen demand. Both reactors reduced the concentrations of total nitrogen and total ammonia nitrogen. However, the reactor Bioflocs was better to reduce the concentration of $N-NO_2^-$ and $N-NO_3^-$. The influent and effluent qualities of both reactors met with Ecuadorian standards for effluent discharge in marine waters and the recommended quality for reuse in the cultivation of Pacific white shrimp, except for reactive phosphorus (RP) and $N-NO_2^-$ in MaB-flocS. The biomass of both reactors showed a sufficient bioflocculation and settling ability. Future research is needed to valorize the biomass of both systems, a life cycle analysis (LCA) and an economic analysis are needed to decide which of both systems are more beneficial. Additionally, the BioflocF reactor treated the water of the bottom of the shrimp tank. This reactor was efficient for the removal of NAT and $N-NO_3^-$, but needs to improve PR removal in this system.*

Keywords: *sustainability, wastewater treatment, Pacific white shrimp, Biofloc, MaB-floc, photosynthetic aeration, microalga*

Introducción

En el Ecuador más del 90% de la acuicultura corresponde al cultivo del camarón blanco del Pacífico (*Penaeus vannamei* (Boone, 1931)) (De la Roche, 2016). Esta especie representa el 19,5% de las exportaciones no petroleras tradicionales del país (Banco Central del Ecuador, 2016), contribuyendo con la mitigación de la pobreza al incrementar la generación de empleos para los estratos económicos más bajos (FAO, 2005). Los sistemas de producción más utilizados en Ecuador son los extensivos y semi-intensivos, en los cuales, recambios relativamente altos del agua se consideran la herramienta de gestión más viable y económica para corregir problemas de calidad del agua (Sonnenholzner et al., 2002). Si bien la acuicultura puede mejorar la seguridad alimenticia y traer beneficios para países en desarrollo, también es una de las actividades más criticadas debido a sus numerosos impactos (Martínez & Martínez, 2012), los cuales para el cultivo de camarón han sido ampliamente descritos (Páez, 2001). Para mitigar el impacto ambiental y mantener la actividad acuícola dentro de los conceptos de sustentabilidad, se han desarrollado numerosos sistemas de tratamiento de sus efluentes (Turcios & Papenbrock, 2014; Rubino & Wilson, 1993).

Los sistemas de biorremediación son cada vez más estudiados, siendo la tecnología Biofloc la que se ha

propagado más rápidamente y en la que se han invertido los mayores esfuerzos de investigación (Avnimelech, 2007). Estos sistemas son utilizados para mantener la calidad del agua a través de la conversión de desechos de nitrógeno en biomasa proteica bacteriana después de la adición de una fuente externa de carbono (Schneider et al., 2005; Crab et al., 2010a, 2010b; Xu & Pan, 2012a; Xu et al., 2012b, 2012c). La misma que puede ser utilizada como alimento para ciertos organismos acuáticos de cultivo (Avnimelech, 2005). Las falencias del sistema Biofloc, radican en que demandan una alta cantidad de energía para proveer oxígeno y requieren la adición de una fuente de carbono externa (Emerenciano et al., 2012). Para solucionar estas falencias surge el sistema MaB-floc (proviene del inglés: microalgal bacterial floc), donde las interacciones entre microalgas y bacterias no fotosintéticas contribuyen entre otros aspectos, a eliminar la necesidad de proveer al sistema de oxígeno y carbono orgánico. Sin embargo, este sistema requiere que la biomasa se mantenga en constante suspensión y que las aguas residuales posean una baja turbidez, ya que de lo contrario el crecimiento y la producción de oxígeno de las algas fotosintéticas, disminuye (Van Den Henden, 2014).

El objetivo principal del presente estudio es comparar experimentalmente la eficiencia de un reactor MaB-floc frente a un reactor Biofloc para tratar las aguas residuales superficiales de un cultivo de camarón blanco del Pacífico. Adicionalmente, para procesar las

aguas residuales con alta turbidez del fondo del cultivo se complementa el tratamiento de estas aguas utilizando otro reactor Biofloc. La eficiencia de los reactores para el tratamiento de aguas residuales es evaluada mediante análisis de los parámetros fisicoquímicos; oxígeno disuelto (OD), pH, demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅), nitrógeno total (NT), nitrógeno amoniacal total (NAT), nitrito (N-NO₂⁻), nitrato (N-NO₃⁻), fósforo total (PT), fósforo reactivo (PR), sólidos suspendidos totales (SST), sólidos suspendidos volátiles (SSV), índice de volumen de lodo diluido (diluted sludge volumen index, dSVI), índice A664b:A665a, clorofila *a*, feofitina *a*, y carotenoides.

Materiales y métodos

Sistemas de tratamiento de aguas residuales del cultivo de camarón

El sistema experimental de tratamiento de aguas residuales del cultivo intensivo de camarón blanco del Pacífico (*Penaeus vannamei* (Boone, 1931)) se desarrolló de abril a agosto de 2016 en el Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM), en San Pedro, Ecuador. El sistema experimental estuvo conformado por: (1) un tanque en el que se cultivaron camarones (tanque de cultivo de camarón, TCC); (2) dos reactores en los que se trataron las aguas residuales superficiales del TCC, reactor MaB-floc (MaB-floc de aguas superficiales, MaB-flocS) y reactor Biofloc (Biofloc de aguas superficiales, BioflocS); (3) y, un reactor Biofloc con el que se trataron las aguas del fondo (Biofloc de aguas de fondo, BioflocF) (Fig. 1).

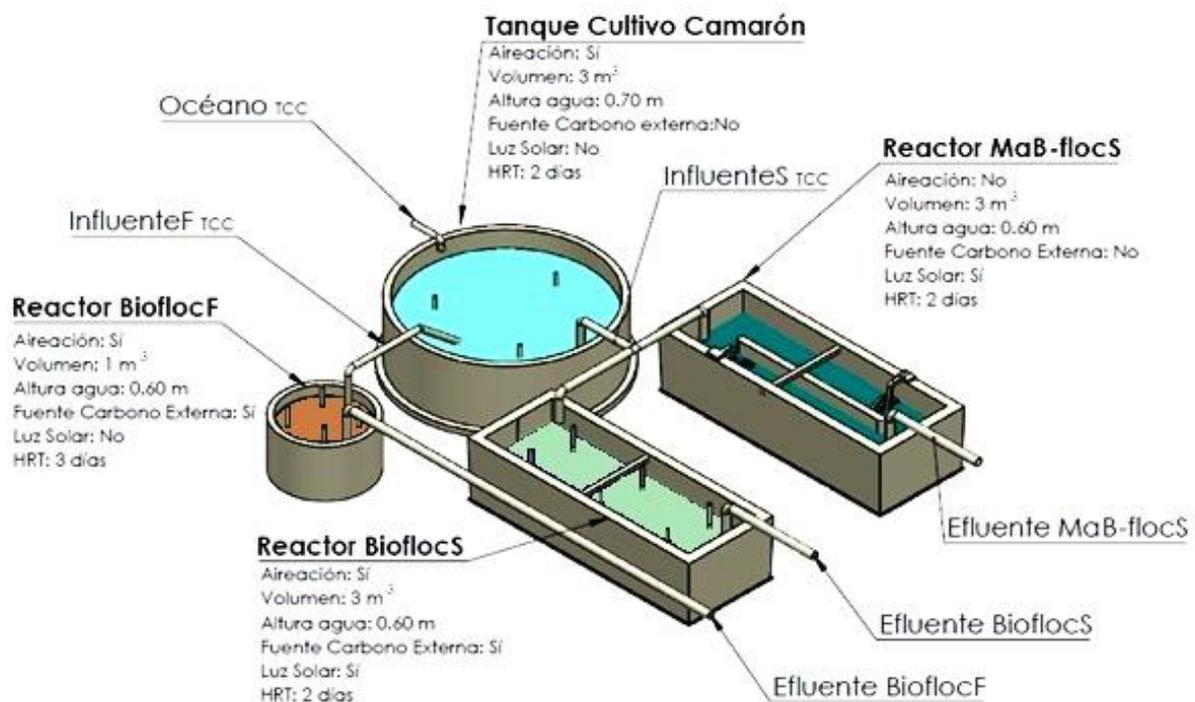


Fig. 1. Sistema de tratamiento de aguas residuales de un tanque de cultivo intensivo de camarón blanco del Pacífico. El sobrenadante del cultivo de camarón (Influente_STCC) es tratado mediante los reactores MaB-flocS y BioflocS. El efluente del fondo del tanque (Influente_FTCC) es tratado mediante el reactor BioflocF.

Sistema de cultivo

El TCC constó de una población aproximada de 2.7-3.6 kg camarón m^{-3} con crecimiento promedio de 0,70 g semana⁻¹, cultivados en 6 m^3 de agua de mar filtrada (5 μm), en un tanque circular y cubierto por una tela semi-transparente de la luz solar. La alimentación se realizó manualmente a las 08h30, 12h30 y 16h30, con alimento granulado comercial para camarón (28% de proteína; INPROSA, Ecuador) combinado con la mezcla de probióticos P62 y P64 (*Vibrio* y *Bacillus*, respectivamente) producidos e utilizados como inmunoestimulantes en CENAIM (Gullian y Rodriguez, 2002). La cantidad de alimento se determinó en relación al 2% de la biomasa cultivada y se ajustó según los resultados de los muestreos del peso y la actividad de los camarones. Adicionalmente, a diario se administró el probiótico ILI (*Vibrio alginolyticus*) producido en CENAIM (Gullian et al., 2004) al agua de cultivo. Cada mañana se realizaron recambios de 3000 L de aguas superficiales con agua del mar. Además, a diario se extrajeron 300 L de aguas del fondo del tanque cargadas con los desechos de mayor peso del cultivo.

Tratamiento de aguas superficiales

La biomasa del MaB-flocS estuvo dominada por algas filamentosas del género *Phormidium* spp., mientras que la del BioflocS fue dominada por algas filamentosas del género *Ulva* spp. (ambas fueron identificadas mediante la observación microscópica directa de las muestras frescas. Los reactores consistieron en tanques de 3 m^3 , al aire libre y expuestos a la luz solar directa. El MaB-flocS era tipo 'raceway', dividido parcialmente mediante una pared de fibra de vidrio de 2 m y equipado con dos bombas sumergibles de agua (Pedrollo TOP-2, Verona, Italia) las cuales permitían la circulación durante el día del contenido del reactor. El BioflocS estaba equipado con seis piedras difusoras que le brindaron un flujo de aire durante el día y mantuvieron la biomasa en suspensión.

El funcionamiento diario del MaB-flocS (Fig. 2) comenzaba a las 20h00, cuando un sistema de apagado automático detenía el funcionamiento de las bombas de circulación (Pedrollo, TOP-2, San Bonifacio, Verona, Italia) permitiendo que los MaB-flocs se asienten en el fondo del reactor. A las 07h00 se activaba una bomba de agua (Pedrollo, TOP-2, San Bonifacio, Verona, Italia) que bombeaba 1500 L del sobrenadante del MaB-flocS (Efluente_{MaB-flocS}) al sistema de drenaje de las instalaciones. Cuando el nivel del reactor alcanzaba un volumen de 1500 L, sensores de nivel de la bomba detenían el bombeo de agua, al mismo tiempo que, un

sensor de nivel del tanque activaba una bomba de agua en el TCC (Pedrollo, TOP-2, Verona, Italia) que bombeaba los efluentes superficiales del TCC (Influente_{TCC}) hacia los reactores, cuyo funcionamiento se detenía, cuando el contenido del reactor alcanzaba un volumen de 3000 L en total. A las 08h10 se encendían automáticamente las bombas de circulación del reactor.

El funcionamiento diario del BioflocS (Fig. 3), también comenzaba a las 20h00, cuando de forma manual se cerraba el flujo de aire permitiendo que los bioflocs se asienten en el fondo del tanque. A las 07h00, se activaba una bomba de agua (Pedrollo, TOP-2, San Bonifacio, Verona, Italia) que impulsaba el sobrenadante del BioflocS (Efluente_{BioflocS}) al sistema de drenaje de las instalaciones. Cuando el nivel del reactor alcanzaba un volumen de 1500 L, sensores de nivel de la bomba detenían el bombeo de agua, mientras un sensor de nivel del tanque activaba una bomba de agua en el TCC (Pedrollo, TOP-2, Verona, Italia) que bombeaba el Influente_{TCC} hacia los reactores, cuyo funcionamiento se detenía, cuando el contenido del reactor alcanzaba un volumen de 3000 L en total. A las 08h10 se abría nuevamente el flujo de aire del BioflocS. Adicionalmente a diario se administró una dosis de sacarosa según proporciones de C: NT de 10 g: 1 g descritas por Avnimelech (2014).

Tratamiento de aguas del fondo

La biomasa del BioflocF estuvo dominada por bacterias, mantenidas en un tanque de 1000 L al aire libre, protegido de la luz solar directa y equipado con cuatro piedras difusoras para mantener un flujo constante de aire y la biomasa en suspensión. Su funcionamiento diario (Fig. 4) comenzaba a las 08h00, cuando el flujo de aire se cerraba manualmente permitiendo que los bioflocs se asienten en el fondo del tanque. Luego de dos horas, se procedía a realizar la extracción de 300 L del sobrenadante del BioflocF (Efluente_{BioflocF}), los cuales eran liberados al sistema de drenaje de las instalaciones. Finalmente, se reactivaba el sistema de aireación. La reposición del agua del BioflocF se llevaba a cabo tres veces al día antes de la alimentación de los camarones, recolectando 100 L de influentes del fondo del TCC (Influente_{F_{TCC}}) filtrados a través de una malla de 15 mm. Adicionalmente a diario se administró una dosis de sacarosa según proporciones de C: NT de 10 g: 1 g descritas por Avnimelech (2014).

Toma de muestras

Semanalmente se colectaron muestras de los influentes y efluentes del sistema de tratamiento de aguas residuales, al igual que de la biomasa de cada reactor. Las muestras del efluente superficial del MaB-flocS (Efluente_{MaB-flocS}), del BioflocS (Efluente_{BioflocS}) y BioflocF (Efluente_{BioflocF}) eran colectadas cuando la biomasa de los reactores se encontraba asentada en el fondo de los tanques justo algunos minutos antes de la descarga de sus efluentes. Las muestras del licor del MaB-flocS (Licor_{MaB-flocS}), del BioflocS (Licor_{BioflocS}) y Biofloc F (Licor_{BioflocF}) se colectaron cuando el sistema de circulación del MaB-flocS y el de aireación del Biofloc S y Biofloc F se encontraban activados y su contenido estaba homogéneo. Se colectaron también muestras del Influyente_{TCC} que alimentaban al reactor

BioflocF, al igual que del Influyente_{TCC} que ingresaban en los reactores MaB-flocS y BioflocS y del agua del océano que ingresaba al TCC (Océano_{TCC}). Las muestras se refrigeraban inmediatamente después de ser colectadas a una temperatura igual o inferior a 4°C (excepto las muestras de Licor_{MaB-flocS}, Licor_{BioflocS} y Licor_{BioflocF}) y una parte de cada muestra que se utilizaba directamente para la determinación de alcalinidad, OD y pH. Fueron colectadas muestras de biomasa del MaB-flocS, BioflocS y BioflocF separando la biomasa del agua mediante un tamiz (200 µm) y son mantenidas a temperatura ambiente hasta ser analizadas para microbiología (resultados no presentados en este artículo).

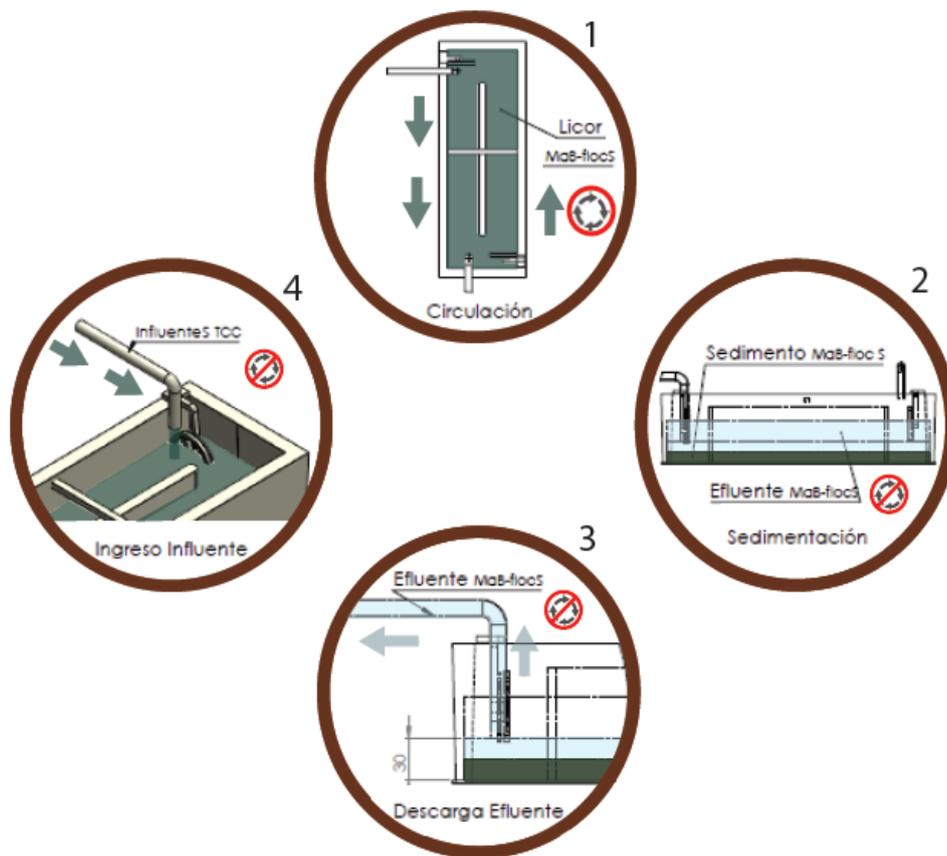


Fig. 2. Funcionamiento del reactor MaB-flocS para el tratamiento del sobrenadante del cultivo intensivo de camarón blanco del Pacífico. 1) Circulación del contenido del reactor (Licor_{MaB-flocS}). 2) La circulación se detiene y se forman dos fases (Efluente_{MaB-flocS} y el sedimento). 3) Descarga del sobrenadante (Efluente_{MaB-flocS}). 4) Ingreso del agua del sobrenadante del cultivo intensivo de camarón al reactor MaB-flocS y se reactiva la circulación.

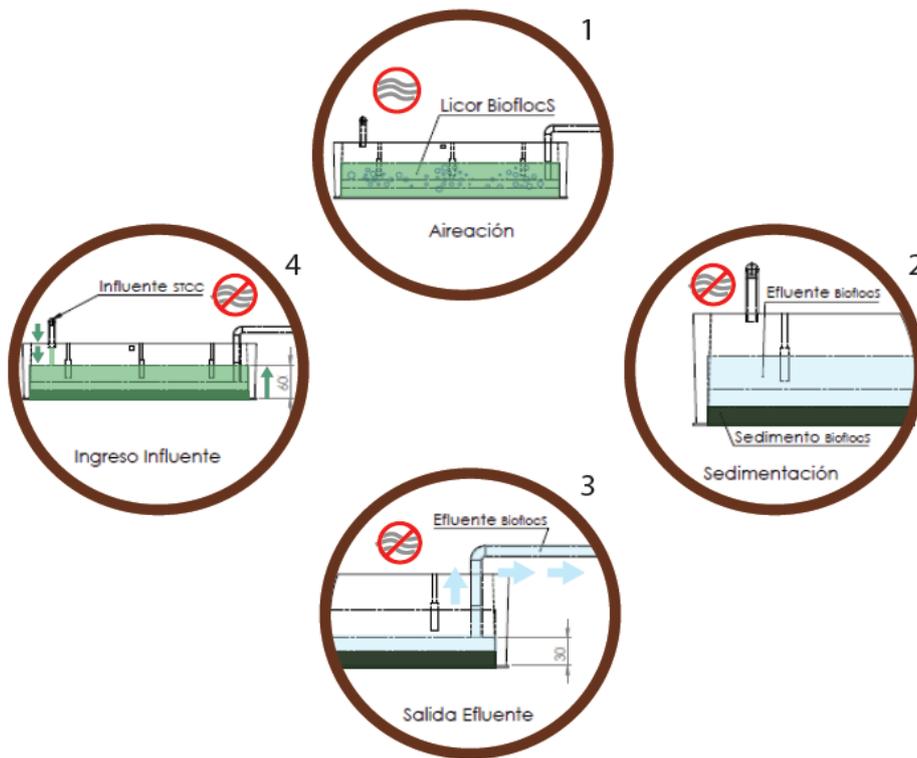


Fig. 3. Funcionamiento del reactor BioflocS para el tratamiento del sobrenadante del cultivo intensivo de camarón blanco del Pacífico. 1) Aireación del contenido del reactor ($Licor_{BioflocS}$). 2) La aireación se detiene y se forman dos fases ($Efluente_{BioflocS}$ y el sedimento). 3) Descarga del sobrenadante ($Efluente_{BioflocS}$). 4) Ingreso del agua del sobrenadante del cultivo intensivo de camarón al reactor BioflocS y se reactiva la aireación.

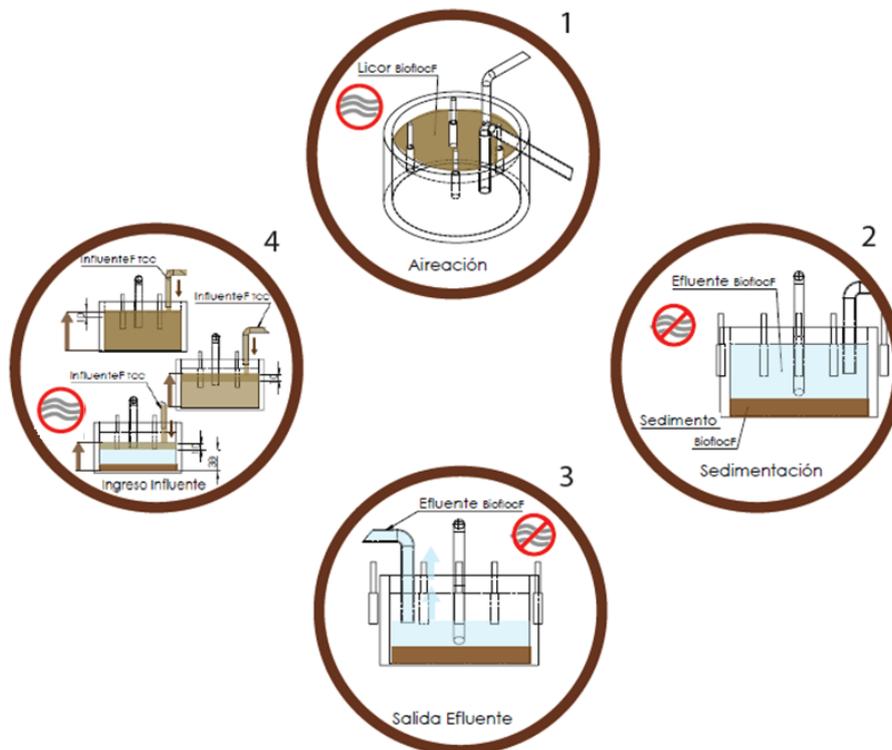


Fig. 4. Funcionamiento del reactor BioflocF para el tratamiento del agua del fondo del cultivo intensivo de camarón blanco del Pacífico. 1) Aireación del contenido del reactor ($Licor_{BioflocF}$). 2) La aireación se detiene y se forman dos fases ($Efluente_{BioflocF}$

y el sedimento). 3) Descarga del sobrenadante (Efluente_{BioflocF}). 4) Ingreso del agua del sobrenadante del cultivo intensivo de camarón tres veces al día antes de la alimentación de los camarones.

Análisis de muestras

Se determinó el pH con un pH metro (OAKTON, PC 2700, Illinois, Estados Unidos), la salinidad con un refractómetro (Atago, MASTER – S/Millα, Tokyo, Japón), el OD y la temperatura con un oxígeno metro (YSI 52, Yellow Springs, Ohio, Estados Unidos) con las muestras de agua no refrigeradas. Aproximadamente 225 mL de cada muestra refrigerada y de las muestras Licor_{MaB-flocS}, Licor_{BioflocS} y Licor_{BioflocF} se filtraron a través de un filtro de microfibras de vidrio (1,2 μm), utilizando una bomba al vacío (WELCH 2567B-50 B, Niles, Estados Unidos). La demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅) se determinó de las muestras de agua del efluente de los reactores (Efluente_{MaB-flocS}, Efluente_{BioflocS} y Efluente_{BioflocF}) y los influentes de los reactores (Influente_{S_{TCC}} y Influente_{F_{TCC}}) y del TCC (Océano_{TCC}) de acuerdo a APHA et al. (2012). Con los sólidos retenidos en el filtro, se calcularon los SST y SSV (APHA et al., 2012). Con las muestras filtradas se realizan análisis de PT, PR, NT, N-NO₂⁻, N-NO₃⁻, y NAT (N-NH₃ + N-NH₄⁺), utilizando un espectrofotómetro visible (Thermo Spectronic, GENESYS 20 Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), de acuerdo a sus respectivas metodologías APHA et al. (2012). Con las muestras de agua refrigeradas y las muestras del Licor_{MaB-flocS}, Licor_{BioflocS} y Licor_{BioflocF} se determinó el contenido de clorofila *a*, feofitina *a* y carotenoides totales siguiendo la metodología de Van Den Hende et al. (2014a), realizando las siguientes modificaciones: se centrifugó 40 mL de cada muestra mediante una centrífuga (Kokusan, H-103N, Tokyo, Japan) a 1711 g por 15 min a temperatura ambiente, se les adicionó 10 mL de solución (90% etanol y 10% de la solución saturada de MgCO₃) y para lograr romper las células se utilizó un dispersor (Janke & Kunkel, ULTRA-TURRAX T25, Staufen, Alemania). La lectura del contenido de los pigmentos, se realizó cinco días después mediante un espectrofotómetro visible (Thermo Spectronic

GENESYS 20 Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) de acuerdo a APHA et al. (2012). Con las muestras Licor_{MaB-flocS}, Licor_{BioflocS} y Licor_{BioflocF}, se determinó el dSVI y el índice A664b:A665a de acuerdo a APHA et al. (2012).

Análisis estadístico

El OD, así como para los del pH, DBO₅, NT, NAT, N-NO₂⁻, N-NO₃⁻, PT, PR, dSVI, productividad, cantidad de pigmentos (clorofila *a*, feofitina *a* y carotenoides totales), SST, SSV e índice A664b:A665a de las muestras de efluentes e influentes de los reactores fueron analizados estadísticamente mediante SPSS Statistics 21 (SPSS Incorporated, Chicago, Illinois). Cuando se observó una distribución normal, se analizaron las diferencias en las medias con una prueba paramétrica randomized block design ANOVA y test post-hoc de Tukey ($p < 0,05$). De lo contrario, las diferencias en las medias se analizaron mediante una prueba no paramétrica de Friedman y un test post-hoc Wilcoxon-signed Rank incluyendo la corrección de Bonferroni ($p < 0,05$).

Resultados y discusión

Tratamiento de aguas superficiales:

Efluente_{MaB-flocS} y Efluente_{BioflocS}

Uno de los aspectos más importantes a analizar en esta investigación fue la calidad del agua de los efluentes de los reactores MaB-flocS y BioflocS denominados “Efluente_{MaB-flocS}” y “Efluente_{BioflocS}” respectivamente; al igual que los efluentes superficiales del cultivo de camarón blanco denominados “Influente_{S_{TCC}}”. Para esto fueron analizados y se comparó el OD, pH, DBO₅, las concentraciones de las especies de nitrógeno y de fósforo, SST, SSV y clorofila *a* (Tabla 1).

Tabla 1

Parámetros principales analizados de los efluentes de los reactores MaB-flocS y BioflocS para el tratamiento de los influentes superficiales de un cultivo intensivo de camarón blanco del Pacífico

Parámetro ¹	Unidad	Influente _{S_{TCC}}	Efluente		Normativa descarga ²	Reutilización ³
			MaB-flocS	BioflocS		
OD	% sat	89,5 ± 7,7 ^a	90,6 ± 7,3 ^a	73,1 ± 16,3 ^b	-	-
pH	-	7,39 ± 0,15 ^b	7,77 ± 0,27 ^a	7,40 ± 0,18 ^b	9 > X > 6	-
DBO ₅	mg O ₂ L ⁻¹	11,29 ± 4,49 ^a	6,80 ± 9,85 ^b	13,25 ± 9,52 ^a	200	-
NT	mg N L ⁻¹	12,40 ± 1,78 ^a	8,45 ± 0,93 ^b	7,71 ± 2,50 ^b	40	-
NAT	mg N-(NH ₄ ⁺ + NH ₃) L ⁻¹	0,69 ± 0,14 ^a	0,33 ± 0,14 ^b	0,20 ± 0,19 ^b	-	<2,0 mg N-NH ₄ ⁺ L ⁻¹ , <0,1 mg N-NH ₃ L ⁻¹
N-NO ₂ ⁻	mg N-NO ₂ ⁻ L ⁻¹	0,32 ± 0,07 ^a	0,35 ± 0,19 ^a	0,01 ± 0,00 ^b	-	<0,23
N-NO ₃ ⁻	mg N-NO ₃ ⁻ L ⁻¹	0,57 ± 0,30 ^a	0,54 ± 0,48 ^a	0,09 ± 0,09 ^b	-	<10
PT	mg P L ⁻¹	0,75 ± 0,28	0,69 ± 0,29	0,66 ± 0,36	-	-
PR	mg P L ⁻¹	0,16 ± 0,10 ^b	0,44 ± 0,18 ^a	0,18 ± 0,21 ^b	-	<0,2
SST	mg SST L ⁻¹	132,0 ± 75,0	96,31 ± 26,5	132,5 ± 78,6	250	-
SSV	mg SSV L ⁻¹	34,3 ± 18,2 ^a	15,7 ± 4,9 ^b	35,7 ± 25,6 ^a	-	-
Clorofila <i>a</i>	mg clorofila <i>a</i> L ⁻¹	0,02 ± 0,04	0,02 ± 0,02	0,00 ± 0,03	-	-

¹ Promedios y desviaciones estándar de los datos del periodo de tiempo de estudio desde los días 101 a 163 (1 muestra por semana).

² Normativa de descarga de efluente en aguas marinas en Ecuador (Ministerio de Ambiente, 2015).

³ Recomendaciones para la reutilización de efluentes en el cultivo de camarón blanco del Pacífico (Boyd & Haws, 2001).

^{a, b} Diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el influente superficial del tanque de cultivo de camarón, el efluente del reactor MaB-flocS y el efluente del reactor BioflocS son indicadas con una letra propia de acuerdo a una prueba paramétrica randomized block design ANOVA y un test posthoc Tukey, o una prueba no-paramétrica Test de Friedman y Wilcoxon-signed Rank post-hoc test incluyendo la corrección de Bonferroni.

El sistema MaB-floc se basa en el uso del oxígeno producido mediante la fotosíntesis como una alternativa para reducir el uso de fuentes de aireación mecánica. En el presente estudio se observó que el promedio del OD del Efluente_{MaB-flocS} fue elevado, aunque no presentó diferencias con el del Influente_{S_{TCC}} (Tabla 1). Esto es un indicativo de que la aeración mediante la fotosíntesis en el sistema MaB-floc es una buena alternativa para aireación mecánica. Además, el OD del Efluente_{MaB-flocS} fue más alto ($p < 0,01$) que la del Efluente_{BioflocS} (Tabla 1). Cabe recalcar que los efluentes (Efluente_{MaB-flocS} y Efluente_{BioflocS}) fueron colectados en las mañanas después de haber permanecido en reposo durante 12 horas. El reactor MaB-flocS estuvo conformado mayormente por una población de cianobacterias, presuntamente *Phormidium* spp. (según características morfológicas observadas mediante microscopía directa), capaces de producir oxígeno por fotosíntesis. Mientras el reactor BioflocS se conformó de una población de bacterias y clorofitas (*Ulva* spp.; según características morfológicas observadas mediante microscopía directa) y dispuso de un sistema de aireación mecánica. Las bacterias y las microalgas descienden los niveles de OD en el medio circundante durante las noches debido a sus procesos de respiración (Haas et al., 2010a; Wild et al., 2010). Considerando que durante la fase lumínica la fotosíntesis se produce

oxígeno, es muy probable que durante el transcurso del día el OD se incremente. En el tratamiento de aguas residuales mantener un adecuado OD es fundamental para el tratamiento biológico aeróbico, ya que es utilizado por los microorganismos aerobios que biodegradan y/o adsorben los desechos orgánicos (Fritsche y Hofricht, 2000). La dependencia de fuentes externas de oxígeno y por ende de energía, debe ser reducida si se busca mejorar el tratamiento de los efluentes y aumentar la sustentabilidad de la actividad acuícola (Turcios y Papenbrock, 2014). El alto OD por las mañanas en el Efluente_{MaB-flocS} es un indicativo de que la actividad fotosintética en la fase luminosa puede producir una cantidad de OD lo suficientemente alta (0,1 a 0,3 mg O₂ L⁻¹) requerida por las comunidades de bacterias aerobias en este reactor (Wagner, 1996) y que no existe un consumo considerable de oxígeno por los microorganismos en el reactor durante la noche. Mientras el menor OD en el Efluente_{BioflocS} puede estar relacionado con una mayor actividad de respiración de los microorganismos, el método de aireación y/o una menor producción de OD por su comunidad de microalgas.

El valor del pH del Efluente_{MaB-flocS} fue mayor que el del Influente_{S_{TCC}} ($p < 0,08$) y Efluente_{BioflocS} ($p < 0,038$). Mientras entre el Efluente_{BioflocS} y el

Influyente_{TCC} no existieron diferencias significativas (Tabla 1). Es conocido que el crecimiento fotosintético de las microalgas puede aumentar el pH (Richmond, 2004). Este aumento ocurre debido entre otras razones a procesos de absorción del CO₂ y la liberación de iones de hidróxido (OH⁻) durante la fase luminosa de la fotosíntesis (Richmond, 2004).

En el tratamiento de aguas residuales, la DBO₅ es un parámetro de vital importancia. Descargar efluentes con alta DBO₅ pueden agotar el OD del cuerpo receptor pudiendo provocar la muerte de peces y anaerobiosis (Abdel-Raouf et al., 2012). En nuestro estudio la DBO₅ en el Efluente_{MaB-flocS} fue significativamente menor que la del Efluente_{BioflocS} ($p < 0,04$) y del Influyente_{TCC} ($p < 0,01$) (Tabla 1). Mientras que entre el Efluente_{BioflocS} y el Influyente_{TCC} no existieron diferencias significativas (Tabla 1). Consideramos que la producción de OD por las cianobacterias (*Phormidium* spp.) en el reactor MaB-flocS, es uno de los factores que contribuye a disminuir la DBO₅. Es posible que otros mecanismos como la adsorción y floculación de DBO₅ con *Phormidium* spp. (Kim et al. 2010) y sedimentación del DBO₅ también disminuyan este parámetro, aunque no pudimos determinar cuál de estos mecanismos fue el más importante. Para el mantenimiento del reactor BioflocS la sacarosa es adicionada según las proporciones de C: N de 10 g: 1 g descritas por Avnimelech (2014), ya que la administración de suplementos de carbono orgánico beneficia el crecimiento de bacterias heterotróficas que degradan los desechos y lo convierten en biomasa microbiana (Avnimelech, 1999; Ebeling et al., 2006). La adición demasiado alta de sacarosa o la descomposición de materia orgánica durante la noche podría explicar el hecho de que la DBO₅ no se redujo en el sistema BioflocS. En general, en cuanto a la eliminación de DBO₅, el sistema de MaB-flocS funcionó mejor que el de BioflocS.

Uno de los parámetros que más se toman en cuenta en el tratamiento de aguas residuales es la remoción de diferentes especies de nitrógeno. El NT y el NAT en el Influyente_{TCC} fueron significativamente mayores que en el Efluente_{MaB-flocS} ($p < 0,012$ y $p < 0,008$, resp.) y el Efluente_{BioflocS} ($p < 0,012$ y $p < 0,008$, resp.) (Tabla 1). Mientras que entre el Efluente_{MaB-flocS} y Efluente_{BioflocS} no se encontraron diferencias significativas. En ambos reactores, es probable que la moderada remoción del NAT en los reactores (Fig. 5) pueda haber ocurrido debido a la actividad nitrificante de la comunidad bacteriana y/o al uso de NAT para el crecimiento de

microorganismos. El efluente del reactor MaB-flocS presentó una concentración de N-NO₂⁻ y N-NO₃⁻ mayor que el reactor BioflocS ($p < 0,08$; $p < 0,01$) y no presentó diferencias significativas en cuanto a los mismos parámetros con el Influyente_{TCC} (Tabla 1). A pesar de que no reportamos disminución del N-NO₂⁻ en el reactor MaB-flocS, es posible que este parámetro durante el día disminuya y en las noches se incremente. Esto coincide con otros estudios en los que algunas especies de microalgas marinas excretan N-NO₂⁻ en condiciones de oscuridad (Vaccaro y Ryther, 1960; Laws y Wong, 1978; Collos, 1982; Raimbault, 1986). Provocando que durante las mañanas las concentraciones de este parámetro sean más altas, con tendencia a disminuir con la exposición a la luz (ZoBell, 1935). Esto se puede explicar por los requerimientos de luz de la enzima nitrito reductasa (ferredoxina) presente en las microalgas la cual se sintetiza durante la fotosíntesis solamente (Losada et al., 1981). Esto indica que probablemente la cantidad de N-NO₂⁻ se reducirá conforme se incremente la actividad fotosintética durante el día. La moderada actividad de las bacterias nitrificantes en el reactor MaB-flocS mencionada anteriormente puede contribuir también con el incremento del N-NO₂⁻. Por otra parte, la elevada remoción del N-NO₂⁻ en el Efluente_{BioflocS} (Fig. 5) sugiere que en este reactor existe mayor actividad nitrificante por parte de la comunidad bacteriana que en el MaB-flocS. Al igual que disponer de una temperatura ambiental óptima para el crecimiento de las bacterias nitrificantes (*Nitrobacter*) de entre 25 y 28°C (Sorokin et al., 1998). La moderada remoción de N-NO₃⁻ en el reactor MaB-flocS y en el reactor BioflocS (Fig. 5) puede estar relacionada con su absorción por las microalgas y conversión a proteínas microbianas. En general, en cuanto a la eliminación de especies de nitrógeno, el sistema de BioflocS funcionó mejor que el de MaB-flocS.

De acuerdo a la vigente norma ecuatoriana de descargas de efluentes en aguas marinas (Ministerio del Ambiente, 2015), los influentes y efluentes del sistema de tratamiento de aguas superficiales cumplen durante todo el período de investigación con los límites permisibles (Tabla 1). En cuanto al potencial de reutilizar los efluentes tratados mediante los reactores MaB-flocS y BioflocS (Tabla 1), el Efluente_{MaB-flocS} excede los límites permisibles en cuanto a la concentración de N-NO₂⁻ y PR; por otra parte, el Efluente_{BioflocS} presentó las características idóneas para su reutilización.

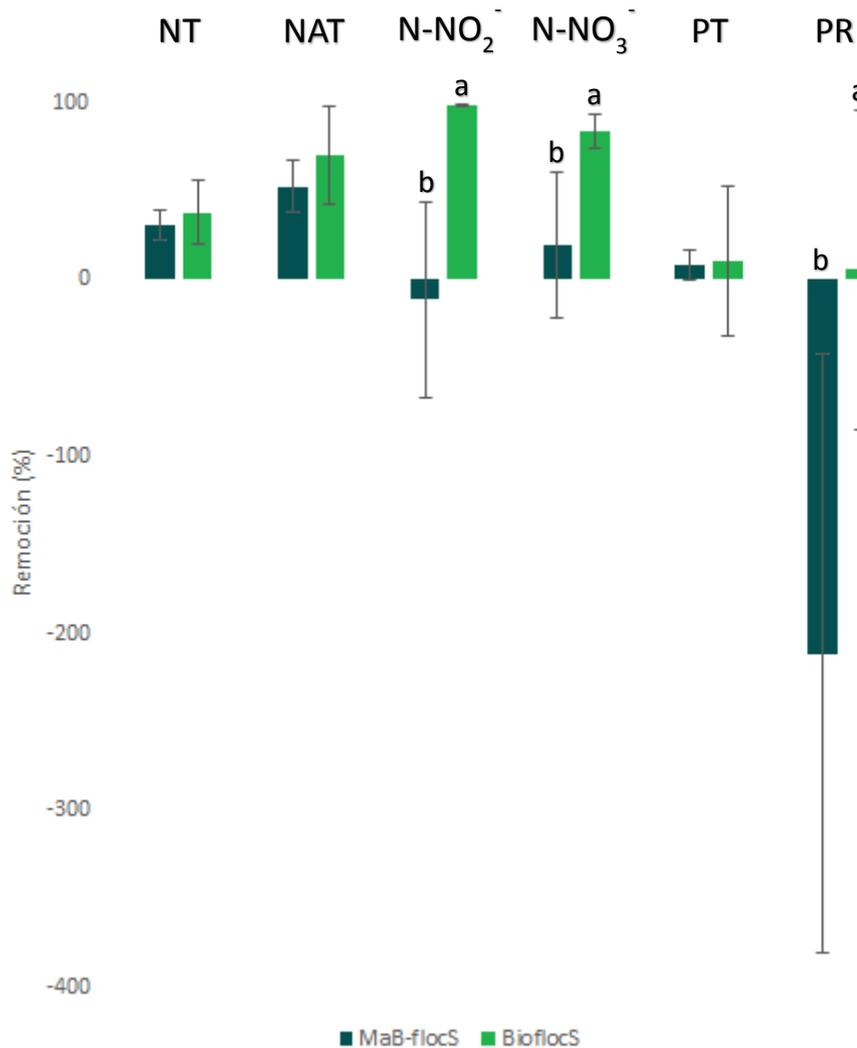


Fig. 5. Remoción de especies de nitrógeno y fósforo en los reactores MaB-flocS y el BioflocS para el tratamiento de los influentes superficiales de un cultivo intensivo de camarón blanco del Pacífico

Se considera que a más del nitrógeno, el fósforo también es un factor clave en la eutrofización del agua (Prased, 1982; Geddes, 1984). La concentración de PT en el Efluente_{MaB-flocS} no presentó diferencias significativas con el Efluente_{BioflocS}, y el Influyente_{S_{TCC}} y este a su vez no presentó diferencias significativas con el Efluente_{BioflocS}. La mayor forma por la cual las microalgas absorben y adsorben fósforo es en forma de fosfato inorgánico (Barsanti and Gualtieri, 2006). Este fosfato es esencial para la mayoría de los procesos celulares tales como la biosíntesis de ácidos nucleicos y fosfolípidos y para la transferencia de energía (Becker, 2008). La concentración de PR fue mayor en el Efluente_{MaB-flocS} que en el Efluente_{BioflocS} ($p < 0,021$) y el Influyente_{S_{TCC}} ($p < 0,01$) (Tabla 1). Mientras entre el Efluente_{BioflocS} y el Influyente_{S_{TCC}} no existieron diferencias significativas. En general podemos observar que no existe mayor reducción de PT ni de PR en los

dos reactores (Fig. 5), de hecho, en el reactor MaB-flocS aumenta la cantidad de PR (Tabla 1). Futuras investigaciones son necesarias para establecer cuáles son los mecanismos que influyen en la producción o remoción del PR en los reactores. La liberación de fosfatasa extracelular que convierte el fósforo orgánico en ortofosfatos disueltos por ciertas microalgas (Solovchenko et al., 2016) puede haber contribuido al incremento de estos en el Efluente_{MaB-flocS}. Es posible que la precipitación de especies de fósforo en los reactores también contribuya en la reducción del PR (Zhou et al., 2005). Sin embargo, no es probable que este mecanismo haya sido influyente ya que el pH del efluente se mantuvo neutral (Tabla 1).

En Ecuador no existen aún normativas referentes a la concentración de PR permisible para la descarga de efluentes en aguas marinas. Sin embargo, cómo se discutió anteriormente si el objetivo es su reutilización

en el cultivo de camarón, el PR sobrepasa los límites permisibles en el Efluente_{MaB-flocS} (Tabla 1). Las principales tecnologías utilizadas para remover el fósforo de los efluentes de aguas residuales son mediante la formación de estruvita y adsorción mediante materiales naturales (De-Bashan y Bashana, 2004). El uso de sistemas de adsorción de PR mediante materiales naturales de fácil adquisición como apatita, bauxita, dolomita, la piedra caliza, arena de conchas, zeolita, partículas de madera, fibras de palmera datilera (Jellali et al., 2010) o tejidos de macroalgas (Fong et al., 1994a) pueden resultar factibles para reducir este parámetro en el Efluente_{MaB-flocS} y para el aprovechamiento de este nutriente en las aguas residuales del Efluente_{MaB-flocS} previo a su reutilización o liberación al océano. Por otra parte, el Efluente_{BioflocS} puede descargarse con menores riesgos ambientales y cumple con los criterios de reutilización de efluentes según Boyd y Haws (2001) (Tabla 1).

Biomasa del MaB-flocS y BioflocS

Se analizó el asentamiento y la producción de biomasa de MaB-flocS y BioflocS. Considerando que la altura a partir de la cual se bombean los efluentes de los reactores durante su descarga es por sobre los 30 cm es necesario que la capacidad de asentamiento de la biomasa de los reactores sea la adecuada de modo que se evite la descarga de biomasa en cuerpo receptor del efluente y la pérdida de biomasa de microalgas. Esta biomasa es un material que podría ser económicamente viable (Solovchenko et al., 2016; Richmond, 2004). Cabe recalcar que una buena capacidad de asentamiento también facilita la cosecha de la biomasa, la cual es de suma importancia en los sistemas de tratamientos de aguas residuales con microalgas.

El dSVI (i.e. en volumen en mL de 1 g de SST flóculos después de 30 minutos de sedimentación) promedio del reactor MaB-flocS fue mayor ($p < 0,047$) que el del BioflocS (Tabla 2). Esto indica que la

biomasa del MaB-flocS presentó una menor capacidad de asentamiento y ocupó un mayor volumen que el ocupado por el BioflocS. En ambos reactores su comunidad de microalgas creció en forma de filamentos que se unen entre sí formando flóculos. El menor asentamiento de la biomasa en el reactor MaB-flocS puede estar relacionado con el mayor tamaño y conformación intrincada de los filamentos de los flóculos. Es probable que otras características de las microalgas tengan el potencial de modificar también su capacidad de asentamiento. Estudios con otras especies de cianobacterias han reportado que algunas tienen capacidad de producir exopolisacáridos con actividad floculante (Flores et al., 2005). Esta característica de algunas especies puede contribuir con facilitar la supervivencia y crecimiento de las cianobacterias bentónicas que ocupan una zona de poca luz (Fattom y Shilo, 1984; Bender et al. 1994), a través de la sedimentación de las partículas que llevan absorbidos nutrientes. Los cuales quedan disponibles para las cianobacterias bentónicas (Fattom y Shilo, 1984). Tal vez la liberación de floculantes en el reactor MaB-flocS pudo haber provocado un incremento de la superficie de los flóculos y por ende una menor capacidad de asentamiento de la biomasa. Consideramos que es posible que la presencia de floculantes en el reactor MaB-flocS también esté relacionada con la reducción de la DBO₅ (Tabla 1) descrita anteriormente (Sección 3.1.1. Efluente_{MaB-flocS} y Efluente_{BioflocS}) mediante la captura y sedimentación de sustancias que elevan el DBO₅. A pesar de haber reportado una mejor capacidad de asentamiento en el reactor MaB-flocS que en el BioflocS, análisis de la concentración de clorofila *a* en el efluente de ambos (Tabla 2) indicaron que no existieron diferencias significativas en su concentración. Por lo tanto, la pérdida de biomasa en ambos durante la descarga de sus efluentes es muy baja. Cabe recalcar que este asentamiento ocurre sin la adición de floculantes caros y contaminantes del agua.

Tabla 2

Parámetros principales analizados de la biomasa de los reactores MaB-flocS y BioflocS para el tratamiento de los influentes superficiales de un cultivo intensivo de camarón blanco del Pacífico

Parámetro ¹	Unidad	Licor ^{MaB-flocS}	Licor ^{BioflocS}
dSVI	mL g SST ⁻¹	283 ± 103 ^a	145 ± 82 ^b
SSV	mg SSV L ⁻¹	740,5 ± 334, 3 ^a	266,5 ± 154,0 ^b
A664b:A665a	-	1,63 ± 0,11	1,69 ± 0,22
Clorofila <i>a</i>	mg clorofila <i>a</i> L ⁻¹	18,80 ± 19,80 ^a	0,68 ± 0,69 ^b
Feofitina <i>a</i>	mg feofitina <i>a</i> L ⁻¹	1,00 ± 4,76	0,06 ± 0,15
Carotenoides totales	mg carotenoides L ⁻¹	11,83 ± 11,77 ^a	0,56 ± 0,47 ^b

¹ Promedios y desviaciones estándar de los datos del periodo de tiempo de estudio desde los días 101 a 163 (1 muestra por semana).

^{a, b} Diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el licor de los reactores BioflocF (Licor^{BioflocF}) y BioflocS (Licor^{BioflocS}) son indicadas con una letra propia de acuerdo a una prueba paramétrica randomized block design ANOVA y un test posthoc Tukey, o una prueba no-paramétrica Test de Friedman y Wilcoxon-signed Rank post-hoc test incluyendo la corrección de Bonferroni.

La productividad en el reactor MaB-flocS de 15,6 mg SSV L_{reactor} día⁻¹ fue tres veces más alta que la del BioflocS de 5,6 mg VSS L_{reactor} día⁻¹. Esta productividad, puede estar relacionada con diferentes factores entre estos la especie predominante de cianobacteria cultivada (*Phormidium* spp.) y un sistema de circulación adecuado. Por otra parte, la menor productividad en el reactor BioflocS puede deberse a que en este existe una menor población de microalgas, tal vez debido a la competencia con una biomasa bacteriana con un rápido crecimiento. También en el reactor BioflocS se observaron depredadores de biomasa microbiana, como rotíferos y copépodos. Estos no se observaron en MaB-flocS. Además había mayor pérdida de SSV en el efluente de BioflocS (Tabla 1) en comparación con MaB-flocS. Otros factores que podrían haber afectado la productividad de la biomasa en el reactor pueden estar relacionados con el método utilizado para mantenerla en suspensión. En el MaB-flocS se utilizó un sistema de circulación constante durante la fase lumínica, mientras en el BioflocS se utilizó una fuente de aireación externa. Es posible que el sistema de circulación del MaBflocS haya contribuido en el desarrollo de una mayor productividad. Esto puede deberse al efecto sombra que se incrementa en el reactor al tener altas densidades de biomasa en suspensión, induciendo a que las microalgas entren en la fase oscura de la fotosíntesis (Muñoz y Guieysse, 2006). Al aumentar la frecuencia de ciclos de luz/oscuridad se puede optimizar la actividad fotosintética (Richmond, 2004). En cuanto a su productividad, el sistema MaB-floc fue mejor que el Biofloc. Con respecto a otros estudios la productividad en el reactor MaB-flocS es similar que la obtenida en Bélgica en el tratamiento de los efluentes de la industria de alimentos (22 ± 23 mg SSV L_{reactor} día⁻¹ y 11 ± 19, mg SSV L_{reactor} día⁻¹) (Van Den Henden et al., 2016) y casi el doble que el obtenido con efluentes de

acuicultura de agua dulce (8 ± 18 mg SSV L_{reactor} día⁻¹) (Van Den Henden et al., 2014).

Otra característica importante es la condición fisiológica de las microalgas en los reactores MaB-flocS y BioflocS. La proporción A664b:A665a es un indicador de la condición fisiológica de las microalgas (Van Den Henden et al., 2011). En el presente estudio no se encontraron diferencias significativas entre el reactor MaB-flocS y el BioflocS. Sus proporciones A664b:A665a en ambos reactores (Tabla 2) muy cercanas a la proporción de 1.7 (indicativo de la existencia de clorofila *a* pura) nos revelan que la biomasa de ambos presenta una buena condición fisiológica. La cantidad de clorofila *a* en el Licor^{MaB-flocS} fue significativamente mayor ($p < 0,033$) que la del Licor^{BioflocS} (Tabla 2). En cuanto a la cantidad de feofitina *a* estos no presentan diferencias significativas (Tabla 2). La concentración de carotenoides fue significativamente mayor ($p < 0,017$) en el Licor^{MaB-flocS} que en el Licor^{BioflocS} (Tabla 2). Los carotenoides en las cianobacterias tienen dos funciones principales: sirven como pigmentos para la fotosíntesis y las protegen contra daños por foto-oxidación (Bryant, 1996). Por lo tanto, es probable que la alta cantidad de carotenoides en las microalgas sea provocada por protegerse contra daños por foto-oxidación, ya que el flujo de fotones por área por tiempo (photosynthetic photon flux density, PPFD) es alta en Ecuador siendo un país ubicado en los trópicos. La mayor cantidad de pigmentos en Licor^{MaB-flocS} que en el Licor^{BioflocS} muestra que MaB-floc tenían contienen más organismos fotosintéticos. Esta característica puede ser importante para la valorización de la biomasa microbiana producida.

Tratamiento de aguas de fondo:

Efluente_{BioflocF}

La tecnología MaB-floc pierde su eficiencia de biorremediación con una cantidad muy elevada de

sólidos suspendidos (Van Den Hende et al., 2016). Tomando en cuenta esto, fue necesario implementar un tercer reactor aplicando la tecnología Biofloc para el tratamiento de las aguas de fondo denominadas “Influente_{F_{TCC}}”. Se analizó y comparó los mismos parámetros del agua del efluente del reactor BioflocF denominado “Efluente_{BioflocF}” y del Influente_{F_{TCC}} (Tabla 3).

Tabla 3

Parámetros principales analizados de los efluentes de los reactores MaB-flocS y BioflocS para el tratamiento de los influentes superficiales de un cultivo intensivo de camarón blanco del Pacífico

Parámetro ¹	Unidad	Influente F _{TCC}	Efluente BioflocF	Normativa descarga ²	Reutilización ³
OD	% sat	84,07 ± 10,41	87,45 ± 14,81	-	
pH	-	7,46 ± 0,09	7,55 ± 0,10	9 > X > 6	
DBO ₅	mg O ₂ L ⁻¹	11,12 ± 6,59	9,86 ± 8,39	200	
NT	mg N L ⁻¹	14,69 ± 4,04	11,32 ± 5,32	40	
NAT	mg N-(NH ₄ ⁺ + NH ₃) L ⁻¹	0,64 ± 0,13 ^a	0,32 ± 0,22 ^b	-	2,0 mg N-NH ₄ ⁺ L ⁻¹ <0.1 mg N-NH ₃ L ⁻¹
N-NO ₂ ⁻	mg N-NO ₂ ⁻ L ⁻¹	0,29 ± 0,05	0,36 ± 0,31	-	<0,23
N-NO ₃ ⁻	mg N-NO ₃ ⁻ L ⁻¹	0,68 ± 0,25 ^a	0,02 ± 0,04 ^b	-	10
PT	mg P L ⁻¹	2,67 ± 1,95	2,84 ± 2,55	-	-
PR	mg P L ⁻¹	0,23 ± 0,19 ^b	1,13 ± 0,74 ^a	-	0,2
SST	mg SST L ⁻¹	117,0 ± 65,4	158,8 ± 76,0	-	-
SSV	mg SSV L ⁻¹	29,1 ± 13,9	69,4 ± 38,2	-	-
Clorofila <i>a</i>	mg clorofila <i>a</i> L ⁻¹	0,07 ± 0,10	0,02 ± 0,08	-	-

¹ Promedios y desviaciones estándar de los datos del periodo de tiempo de estudio desde los días 101 a 163 (1 muestra por semana)

² Normativa de descarga de efluente en aguas marinas en Ecuador (Ministerio de Ambiente, 2015).

³ Parámetros para la reutilización de efluentes en el cultivo de camarón blanco del Pacífico (Boyd, 2001).

^{a, b} Diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el influente de fondo (Influente_{F_{TCC}}) y el Efluente_{BioflocF} son indicadas con una letra propia de acuerdo a una prueba paramétrica randomized block design ANOVA y un test posthoc Tukey, o una prueba no-paramétrica Test de Friedman y Wilcoxon-signed Rank post-hoc test incluyendo la corrección de Bonferroni.

La concentración de OD y el pH en el Efluente_{BioflocF} no presentó diferencias significativas con respecto al del Influente_{F_{TCC}} que lo alimentaba (Tabla 3). Cabe recalcar que el Efluente_{BioflocF} fue colectado en las mañanas después de haber permanecido durante 2 horas en reposo. A pesar de no haber existido diferencias significativas entre el Influente_{F_{TCC}} y el Efluente_{BioflocF}, sabemos que existe consumo de oxígeno en el reactor por parte los microorganismos degradadores. Consideramos que la aireación mecánica en este reactor contribuyó de una manera fundamental a la provisión de oxígeno.

La DBO₅ en el reactor BioflocF no presentó diferencias significativas con la del Influente_{F_{TCC}} (Tabla 3). Para el mantenimiento del reactor BioflocF se agrega también sacarosa en las mismas proporciones

utilizadas en el reactor BioflocS descritas por Avnimelech (2014). La adición de sacarosa como describimos anteriormente contribuye a la remoción del nitrógeno por parte de las bacterias heterotróficas (Ling y Chen, 2004). Con cada litro de Influente_{F_{TCC}} tratado en el reactor, adicionamos más que 150mg de sacarosa. El hecho de que el DBO₅ no subió durante el tratamiento y fue menor que 10 mg/L en el efluente, indica que la mayor parte de la sacarosa (con un DBO₅ de 1.1 g O₂/L) fue eliminada del agua en el reactor BioflocF.

El reactor BioflocF fue eficiente para reducir el NAT y N-NO₃⁻ (Tabla 3). Sin embargo, no se observó disminución alguna de las especies de fósforo (PT y PR) (Tabla 3). La alta eficiencia de remoción del nitrato en el reactor BioflocF puede estar relacionada con una alta

actividad de las bacterias heterotróficas aeróbicas que degradan los desechos (Avnimelech, 1999; Ebeling et al., 2006).

De acuerdo a la actual norma ecuatoriana de descargas de efluentes en aguas marinas (Ministerio del Ambiente, 2015), los Influyente_{TCC} y el Efluente_{Biofloc F} del sistema de tratamiento de aguas de fondo cumplen durante todo el período de investigación con los límites permisibles (Tabla 3). Adicionalmente evaluamos el potencial de reutilizar los efluentes tratados mediante el reactor BioflocF de acuerdo con los parámetros establecidos por Boyd (2001) descritos anteriormente, y comprobamos que estos cumplen con la mayoría de los valores a excepción del PR y N-NO₂⁻ (Tabla 3). Más investigación es necesario para eliminar estos parámetros con el sistema de biofloc.

Biomasa del BioflocF

Se analizó el asentamiento y la producción de biomasa en el reactor BioflocF. El dSVI promedio del reactor BioflocF fue menor que el del BioflocS ($p < 0,04$) (Tabla 4). El cual indica una mejor y adecuada sedimentación. Se observó una disminución en la cantidad de SSV al final del periodo de estudio en el reactor de BioflocF. El reactor fue cubierto por cual se limitaba el crecimiento de organismos fotosintéticos. Además observaron copépodos en este reactor. Estos copépodos consumen biomasa microbiana. En general la cantidad de SSV en el reactor BioflocF se mantuvo constante durante el periodo de estudio y no presentó diferencias con el reactor BioflocS.

Tabla 4

Parámetros principales analizados de la biomasa del reactor BioflocF para el tratamiento de los influentes del fondo de un cultivo intensivo de camarón blanco del Pacífico en comparación con el reactor BioflocS

Parámetros ¹	Unidad	Licor _{Biofloc F}	Licor _{Biofloc S}
dSVI	mL g SST ⁻¹	23,80 ± 6,34 ^b	145,11 ± 81,54 ^a
SSV	mg L ⁻¹	380,6 ± 63,4	266,5 ± 154,0
A664b:A665a	-	1,48 ± 0,12	1,69 ± 0,22
Clorofila <i>a</i>	mg clorofila <i>a</i> L ⁻¹	0,25 ± 0,14 ^b	0,68 ± 0,69 ^a
Feofitina <i>a</i>	mg feofitina <i>a</i> L ⁻¹	0,10 ± 0,03	0,06 ± 0,15
Carotenoides totales	mg carotenoides L ⁻¹	0,33 ± 0,08 ^b	0,56 ± 0,47 ^a

¹ Promedios y desviaciones estándar de los datos del periodo de tiempo de estudio desde los días 101 a 163 (1 muestra por semana).

^{a,b} Diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el influente del fondo del TCC (Influente_{TCC}) y el licor del reactor BioflocF (Licor_{BioflocF}) son indicadas con una letra propia de acuerdo a una prueba paramétrica randomized block design ANOVA y un test posthoc Tukey, o una prueba no-paramétrica Test de Friedman y Wilcoxon-signed Rank post-hoc test incluyendo la corrección de Bonferroni.

También se determinó el índice A664b:A665a de las microalgas del Licor_{BioflocF}. No existieron diferencias significativas de este parámetro entre el del Licor_{BioflocF} y el Licor_{BioflocS}. En todo caso este valor es un indicativo de que existe mortalidad de los organismos fotosintéticos (presencia de feofitina) en el reactor BioflocF así como en el BioflocS. Esta mortalidad puede deberse a condiciones moderadamente tóxicas para estos organismos en el reactor y/o a un bajo ingreso de luz. La cantidad de microalgas y pigmentos, como clorofila *a* y carotenoides, fue más alta en el BioflocS que en el BioflocF ($p < 0,03$; $p < 0,03$), mientras en cuanto a la cantidad de feofitina *a* no se observaron diferencias significativas. En general, los valores de los contenidos de pigmentos fueron muy bajos en comparación con cultivos de microalgas. Por ejemplo, el contenido de clorofila de 8 especies de cianobacterias estuvo entre 0.17 y 4.36 mg clorofila *a* por 100 mg de materia seca (Piorreck et al., 1984). Cabe recalcar que

el reactor BioflocF estuvo cubierto por un plástico negro para evitar el ingreso de luz. Es probable que la producción de clorofila *a* en el reactor BioflocF haya ocurrido debido a que las paredes del tanque eran de plástico blanco y permitía el paso de una cierta cantidad de luz.

Conclusión

En este estudio, se investigaron a escala piloto sistemas para tratar dos tipos de efluentes de un cultivo intensivo de camarón.

El tratamiento mediante el reactor MaB-floc resultó en un efluente rico en oxígeno, demostrando que la aireación mecánica no es necesaria. La remoción de nutrientes fue mayor en el Biofloc que en el MaB-floc, principalmente para el nitrito y nitrato. El influente y los efluentes de ambos reactores cumplieron con las

normas ecuatorianas de descarga de efluentes en aguas marinas. También cumplieron con los parámetros para su reutilización en el cultivo de camarón blanco del Pacífico, excepto la concentración de PR y N-NO_2^- del reactor MaB-flocS. Por eso, estudios a futuro deben mejorar la capacidad de asimilación del PT y PR. La biofloculación en ambos reactores ayudó a que no se pierda biomasa durante la descarga del efluente. La productividad microbiana del reactor MaB-flocS fue mayor que la del reactor BioflocS. Más investigaciones son necesarias para valorizar los ficoquímicos como la ficoeritrina de la biomasa del reactor MaB-flocS. El sistema más efectivo para mejorar la calidad del agua fue el Biofloc, pero el de mayor productividad de biomasa fue el MaB-floc. Es necesaria la valorización de la biomasa para ambos sistemas, un análisis del ciclo de vida (life cycle analysis, LCA) y un análisis económico para decidir cuál de los dos es el más beneficioso.

Segundo, se trató el efluente del fondo del cultivo de camarón en un reactor BioflocF. Se logró la reducción del N-NO_3^- . Consideramos que la capacidad de remover especies de nitrógeno y fósforo en este reactor puede ser mejorada en investigaciones a futuro.

Agradecimientos

Este trabajo se realizó gracias al apoyo de CENAIM y ESPOL. Este trabajo es un producto del curso 'Proyecto de Investigación' de la carrera de pregrado de 'Biología Marina' tomado por Juan Carlos Figueroa. Los autores agradecen a Julio Baque, Walter Rodríguez, Víctor Granados, Yessenia Pozo, Nadia Cedeño, Nicolás Heymann y colegas del CENAIM del departamento de microbiología, mantenimiento y seguridad.

Referencias

- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A.A., Ibraheem, I.B., 2012. Microalgae and wastewater treatment. Saudi Journal of Biological Sciences. 19(3), 257–275.
- American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), Water Environment Federation (WEF), 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd Edition.
- Avnimelech, Y., 1999. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. Aquaculture 176, 227–235.
- Avnimelech, Y., 2005. Tilapia harvest microbial flocs in active suspension research pond. Global Aquaculture Advocate 8(5), 57–58.
- Avnimelech, Y., 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bioflocs technology ponds. Aquaculture 264, 140–147.
- Avnimelech, Y., 2014. Biofloc technology – A Practical Guide Book. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United States, 258 p..
- Banco Central del Ecuador Subgerencia de Programación y Regulación Dirección Nacional de Síntesis Macroeconómica, 2016. Evolución de la Balanza Comercial Enero - Diciembre 2015 [en línea]. [Citado 26 Junio 2016]. <https://www.bce.fin.ec/index.php/component/k2/item/299-evoluci%C3%B3n-de-la-balanza-comercial/>
- Barsanti, L., Gualtieri, P., 2006. Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA, 301 p..
- Becker, E.W., 2008. Microalgae: biotechnology and microbiology. Cambridge studies in microbiology. Cambridge University Press, UK, Cambridge, 304 p..
- Bender, J., Rodríguez-Eaton, S., Ekanemesang, U.M., Phillips, P., 1994. Characterization of metal-binding biofloculants produced by the cyanobacterial component of mixed microbial mats. Applied Environmental Microbiology 60, 2311–231.
- Boyd C., Haws, M., 2001. Consideraciones sobre la calidad del agua y del suelo en cultivos de camarón. Métodos para mejorar la camaronicultura en Centroamérica. Managua: Imprenta UCA, 30 p..
- Bryant D.A., 1996. The molecular biology of cyanobacteria. Kluwer Academic publishers, 559–579.
- Collos Y., 1982. Transient situations in nitrate assimilation by marine diatoms 2. Changes in nitrate and nitrite following a nitrate perturbation. Limnology and Oceanography 27(3), 528–535.
- Crab, R., Chielens, B., Wille, M., Bossier, P., Verstraete, W., 2010a. The effect of different carbon sources on the nutritional value of biofloc, a feed for *Macrobrachium rosenbergii* postlarvae. Aquaculture Research 41, 559–567.
- Crab, R., Lambert, A., Defoirdt, T., Bossier, P., Verstraete, W., 2010b. The application of bioflocs technology to protect brine shrimp (*Artemia franciscana*) from pathogenic *Vibrio*

- harveyi*. Journal of Applied Microbiology, 109, 1643–1649.
- De la Roche, A., 2016. Estado actual y proyección de la acuicultura continental en el Ecuador. V Congreso Internacional de Acuicultura de Aguas Continentales (ESPE). Congreso llevado a cabo en Quito, Ecuador.
- De-Bashan, L.E., Bashana, Y., 2004. Recent advances in removing phosphorus from wastewater and its future use as fertilizer (1997–2003). Water Research 38, 4222–4246.
- Ebeling, J.M., Timmons, M.B., Bisogni, J.J., 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. Aquaculture 257, 346–358.
- Emerenciano, M., Gaxiola, G., Cuzon, G., 2012. Biofloc technology applied to shrimp broodstock. In: Avnimelech Y (ed). Biofloc technology -a practical guide book. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, 217–230.
- FAO, 2005-2016. National Aquaculture Sector Overview. Visión general del sector acuícola nacional - Ecuador. National Aquaculture Sector Overview Fact Sheets. Texto de Schwarz, L. In: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO [en línea]. Roma. Actualizado 1 Febrero 2005. [Citado 23 Junio 2016]. http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_ecuador/es.
- Fattom, A., Shilo, M., 1984. *Phormidium* J-1 biofloculant: production and activity. Archives of Microbiology 139, 421–426.
- Flores, E., Frías, J. E., Rubio, L. M., Herrero, A., 2005. Photosynthetic nitrate assimilation in cyanobacteria. Photosynthetic Research 83, 117–133.
- Fong, P., Donohoe, R.M., Zedler, J.B., 1994a. Nutrient concentration in tissue of the macroalga *Enteromorpha* as a function of nutrient history: an experimental evaluation using field microcosms. Marine. Ecology Progress Series 106, 273–281.
- Fritsche, W., Hofrichter, M., 2000. Aerobic degradation by microorganisms, in Environmental Processes- Soil Decontamination, J. Klein, Ed., Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 146–155.
- Geddes, M.C., 1984. Limnology of lake Alexandrina River, Muar, South Australia and the effect of nutrients and light on the phytoplankton. Australian Journal of Marine and Freshwater Research 35(4), 399–415.
- Gullian, M., Rodríguez, J., 2002. Immunostimulant qualities of probiotic bacteria. Global Aquaculture Advocate 5, 52–54.
- Gullian, M., Thompson, F., Rodríguez, J., 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. Aquaculture 233, 1–14.
- Haas, A.F., Wild, C., 2010a. Composition analysis of organic matter released by cosmopolitan coral reef associated green algae. Aquatic Biology 10, 131–138.
- Jellali, S., Diamantopoulos, E., Kallali, H., Bennaceur, S., Anane, M., Jedidi, N., 2010. Dynamic sorption of ammonium by sandy soil in fixed bed columns: evaluation of equilibrium and non-equilibrium transport processes. Journal of Environmental Management 91, 897–905.
- Laws, E.A., Wong, D.C., 1978. Studies of carbon and nitrogen metabolism by three marine phytoplankton species in nitrate-limited continuous culture. Journal of Applied Phycology 14, 406–416.
- Ling, J., Chen, S., 2005. Impact of organic carbon on nitrification performance of different biofilters. Aquaculture Engineering 33, 150–162.
- Losada, M., Guerrero, M.G., Vega, J.M., 1981. The assimilatory reduction of nitrate. In: Bothe H, Trebst A (eds) Biology of inorganic nitrogen and sulfur. Springer-Verlag. Berlin, 384 p..
- Martinez-Porchas, M., Martinez-Cordova, L.R., 2012. World Aquaculture: Environmental Impacts and Troubleshooting Alternatives. The Scientific World Journal 38962, 3–9.
- Ministerio del Ambiente, 2015. Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundarias TULAS. Norma de Calidad Ambiental y de Descarga de Efluentes: Recurso Agua: Libro Vi Anexo 1.
- Muñoz, R., Guieysse, B., 2006. Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. Water Research 40, 2799–2815.
- Páez, F., 2001a. The environmental impact of shrimp aquaculture: causes, effects, and mitigating alternatives. Environmental Management 28, 131–140.
- Piorreck, M., Baasch, K., Pohl, P., 1984. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater Green and Blue-Green Algae under different nitrogen regimes. Phytochemistry 23(2), 207–216.
- Prasad, D.Y., 1982. Effect of phosphorus on decomposition of organic matter in fresh water. Indian Journal of Environmental Health 24(3) 206–214.

- Raimbault, P. 1986. Effect of temperature on nitrite excretion by three marine diatoms during nitrate uptake. *Marine Biology* 9, 149–155.
- Richmond, A., 2004. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Sciences Ltd., Oxford, UK, 588 p..
- Rubino, M.C., Wilson, C.A., 1993. *Issues in Aquaculture Regulation*. Bluewaters, Inc. Bethesda, Maryland, 72 p..
- Schneider, O., Blancheton, J.P., Varadi, L., Eding, E.H., Verreth, J.A.J., 2006. Cost price and production strategies in european recirculation systems. Conference: Aqua 2006: Linking Tradition & Technology Highest Quality for the Consumer, Firenze, Italy.
- Solovchenko, A., Verschoor, A.M., Jablonowski, N.D., Nedball, L., 2016. Phosphorus from wastewaters to crops: an alternative path involving microalgae. *Biotechnology Advances* 34(5), 550–564.
- Sonnenholzner, S., Massaut, L., Saldias, C., Calderón, J., Boyd, C., 2002. *Case Studies of Ecuadorian Shrimp Farming*. Report prepared under the World Bank, NACA, WWF and FAO Consortium Program on Shrimp Farming and the Environment. Work in Progress for Public Discussion. Published by the Consortium. 55 p..
- Sorokin, D. Y., Muyzer, G., Brinkhoff, T., Kuenen, J.G., Jetten, M.S., 1998. *Archives of Microbiology* 170, 345–352.
- Turcios, A.E., Papenbrock, J., 2014. Sustainable treatment of aquaculture effluents – what can we learn from the past for the future? *Sustainability* 6, 836–856.
- Vaccaro RF, Ryther, J.H., 1960. Marine phytoplankton and the distribution of nitrite in the sea. *Journal du Conseil / Conseil Permanent International pour l'Exploration de la Mer* 25, 260–271.
- Van Den Hende, S., 2014. *Microalgal bacterial flocs for wastewater treatment: from concept to pilot scale*. Ph.D. dissertation. Ghent University, Ghent, Belgium.
- Van Den Hende, S., Beelen, V., Bore, G., Boon, N., Vervaeren, H., 2014a. Up-scaling of aquaculture wastewater treatment by microalgal bacterial flocs: from lab reactors to an outdoor raceway pond. *Bioresource Technology* 159, 342–354.
- Van Den Hende, S., Beyls, J., De Buyck, P.J., Rousseau, D.P.L., 2016. Food-industry effluent-grown microalgal bacterial flocs as a bioresource for high-value phycochemicals and biogas. *Algal Research* 18, 25–32.
- Van Den Hende, S., Vervaeren, H., Saveyn, H., Maes, G., Boon, N., 2011. Microalgal bacterial floc properties are improved by a balanced inorganic/organic carbon ratio. *Biotechnology Bioengineering* 108, 549–558.
- Wagner, M., 1996. In situ analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. *Water Science and Technology* 1, 237–244.
- Wild, C., Niggli, W., Naumann, M.S., Haas, A.F., 2010. Organic matter release by Red Sea coral reef organisms — potential effects on microbial activity and in-situ O₂ availability. *Marine Ecology Progress Series* 411, 61–71
- Xu, W.J., Pan, L.Q., 2012a. Effects of biofloc on growth performance, digestive enzyme activity and body composition of juvenile *Litopenaeus vannamei* in zero-water exchange tanks manipulating C/N ratio in feed. *Aquaculture* 356, 147–152.
- Xu, W.J., Pan, L.Q., Sun, X.H., Huang, J., 2012b. Effects of bioflocs on water quality, and survival, growth and digestive enzyme activities of *Litopenaeus vannamei* (Boone) in zero-water exchange culture tanks. *Aquaculture Research* 44(7), 1093–1102.
- Xu, W.J., Pan, L.Q., Zhao, D.H., Huang, J., 2012c. Preliminary investigation into the contribution of biofloc on protein nutrition of *Litopenaeus vannamei* fed with different dietary protein levels in zero-water exchange culture tanks. *Aquaculture* 350, 147–153.
- Zhou, A.M., Tang, H.X., Wang, D.H., 2005. Phosphorus adsorption on natural sediments: Modeling and effects of pH and sediment composition. *Water Research* 39, 1245–1254.
- ZoBell, C.E., 1935. The assimilation of ammonium nitrogen by *Nitzschia closterium* and other marine phytoplankton. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 21(9), 517–522.

