

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar



CASO DE ESTUDIO:

**“ Uso de Bacterias Nitrificantes para el Control de Amonio y Nitrito
en Cultivos Intensivos de Camarón”**

EXAMEN COMPLEXIVO

FASE ORAL

Previa a la obtención del Título de:

ACUICULTOR

Presentado por:

FABIAN DAVID PALADINES CÓRDOVA

Guayaquil – Ecuador

2015

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mis padres y a las personas que me han apoyado,
para seguir avanzando día a día en mis proyectos y metas.

DEDICATORIA

DEDICADO A:

MI FAMILIA.

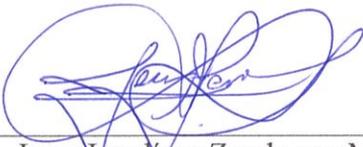
TRIBUNAL DE GRADO



Marco Álvarez Gálvez Ph.D.
EVALUADOR



Fabricio Marcillo M.Sc.
EVALUADOR



Jerry Landívar Zambrano M.Sc.
PROFESOR GUÍA

Uso de Bacterias Nitrificantes para el Control de Amonio y Nitrito en Cultivos Intensivos de Camarón

David Paladines Córdova, Msc. Jerry Landívar
Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar
Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL)
Campus Gustavo Galindo, Km 30,5 vía Perimetral
Apartado 09-01-5863. Guayaquil-Ecuador
dfpaladines@hotmail.com

Resumen

Este estudio consiste en la adición de bacterias nitrificantes en el inicio del cultivo para un control autotrófico de amonio y nitrito, dando como resultado final la acumulación de nitrato que no es tóxico para el camarón. Se usaron tres tanques de 1300 lt cada uno, para los tres tanques se usó aireación con una potencia de 150 watts. Para remoción de sólidos suspendidos se usó en cada tanque un filtro de fraccionamiento de espuma. En cada tanque se sembró 600 post larvas de 5,2 mg promedio. Se realizó análisis patológico para verificar el estado de salud de los camarones y para el control de vibrios patógenos se usó probióticos casi a diario. Para el control de amonio y nitrito se usó bacterias nitrificantes preparadas de agua de mar. Durante el ensayo no se registraron subidas bruscas de amonio y nitrito desde el inicio, y permanecieron en niveles seguros no así el nitrato que se fue acumulando paulatinamente. Se concluye que con la adición de bacterias nitrificantes directamente en el tanque sin el uso de biofiltros ni melaza se puede controlar amonio y nitrito en cultivos intensivos de camarón.

Palabras claves: bacterias nitrificantes, amonio, nitrito, sistema autotrófico, cultivo intensivo de camarón.

Abstract

This study consists in the addition of nitrifying bacteria at the start of the culture for an autotrophic control of ammonia and nitrite, giving as a final result the accumulation of nitrate, which is not toxic to shrimps. Three tanks, each 1,300 lt were used. Total aeration for the three tanks was 150 watts. Suspended solids removal was done with a foam fractioning filter, one for each tank. In each tank was seeded 600 larvae, 5.2 mg average. Pathological analysis was done to establish the health of the shrimp and for vibrio control it was used a probiotic mix almost daily. Control of ammonia and nitrite was made inoculating nitrifying bacteria cultured from the sea. During the essay couldn't be observed a sudden rise of ammonia or nitrite, and remained in a safe range, and nitrate accumulated steadily. It is concluded that the addition of nitrifying bacteria directly in the tanks without bio filters use or molasses is enough to control ammonia and nitrite in shrimp intensive culture.

Keywords: nitrifying bacteria, ammonia, nitrite, autotrophic system, intensive shrimp culture.

1. Introducción

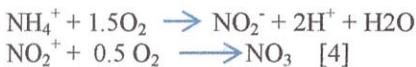
El amonio (NH_4) es una molécula producto del metabolismo de las proteínas del alimento del camarón [1], a diferencia de los mamíferos que generalmente lo expulsan en forma de urea. En ambientes naturales, debido a su concentración baja, desaparece rápidamente del medio. En cultivos en estanques con densidades bajas o medianas tampoco es un problema frecuente ya que sirve como fertilizante para algas. En cultivos intensivos empieza a acumularse [2], no solo de la excreción directa del camarón sino también de la mineralización de las heces y residuos de alimento [3].

El amonio en el agua se disocia en amonio ionizado NH_4^+ y amonio no ionizado NH_3 , este último siendo sumamente tóxico para el camarón. La concentración de las dos formas de amonio depende del pH, salinidad y temperatura, como regla general a mayor pH, temperatura y menor salinidad, mayor toxicidad de amonio.



El amonio puede ser además transformado en nitrito (NO_2^-) por bacterias especializadas autotróficas, llamadas bacterias oxidantes de amonio (AOB, por sus siglas en ingles), y en nitrato (NO_3^-) por bacterias oxidantes del nitrito (NOB) [5].

Estas son las ecuaciones de la nitrificación:



Como se observa, la nitrificación produce acidez, y a medida que la biomasa va aumentando, se alimenta más, el agua se va acidificando, consumiendo la alcalinidad, es por esto que tenemos que usar algo para controlar la acidez. Esto se hace adicionando bicarbonato de sodio al agua para recuperar la alcalinidad.

El amonio no ionizado es una molécula pequeña, soluble en lípidos y sin carga eléctrica, de tal forma que fácilmente pasa las células membranosas [7], mientras que la forma ionizada (NH_4^+) no puede traspasar los microporos hidrofóbicos de las branquias del camarón.

1.1. Toxicidad por amonio

El amonio causa en tilapias irritación de las branquias, con hiperplasia celular y fusión lamelar, lo que a su vez conlleva un reducido flujo de agua en las branquias y estrés por oxígeno [8]. Numerosas pruebas se han llevado a cabo para establecer la toxicidad por amonio en camarones, dando resultados muy diversos, esto se debe a que existen muchas variables, siendo las principales el pH, temperatura, salinidad, edad del camarón, oxígeno disuelto, alcalinidad, nutrición, etc.

Juveniles de *litopenaeus vannamei* (22±2.4 mm) fueron expuestos a diferentes concentraciones de amonio total (TAN), a diferentes niveles de salinidad, 15 ppt, 25 ppt, 35 ppt, pH 8,05 y 23 grados C. El LC50 para 24, 48, 72 y 96 horas fue 59.72, 40.58, 32.15, 24.39 mg l⁻¹ a 15‰; 66.38, 48.83, 43.17, 35.4 mg l⁻¹ a 25‰; 68.75, 53.84, 44.93, 39.54 mg l⁻¹ a 35‰. También el LC50 a 24, 48, 72 y 96 horas para NH₃-N fue 2.95, 2.00, 1.59, 1.20 mg l⁻¹ a 15‰; 2.93, 2.16, 1.91, 1.57 mg l⁻¹ a 25‰; 2.78, 2.18, 1.82, 1.60 mg l⁻¹ a 35‰, en este mismo estudio el autor concluyó los niveles considerados como seguros fueron 2.44, 3.55, 3.95 mg l⁻¹ para amonio-N 0.12, 0.16, 0.16 mg l⁻¹ para NH₃-N in 15‰, 25‰ y 35‰, respectivamente [9].

1.2. Toxicidad por nitrito

El nitrito también es tóxico para los camarones, aunque en menor grado que el amonio. La toxicidad del nitrito no está relacionada a un sitio específico de irritación, sino es una función del efecto que ejerce en el sistema circulatorio e inmune de los organismos acuáticos. Cuando entra en la sangre inhibe la unión del oxígeno a la molécula de hierro de hemoglobina en peces [1]. La oxidación del hierro por el nitrito conlleva a elevados niveles de metahemoglobina y niveles decrecientes de hemoglobina [10]. Esto causa

el síndrome de “sangre café” en la cual la sangre pierde su color rojo y se vuelve café debido a la falta de oxígeno. La sangre del camarón como la de otros invertebrados no contiene hemoglobina, sino el oxígeno se une a una molécula a base de cobre (hemocianina) y es llevada a través del cuerpo. La fisiología de los efectos del nitrito en camarones no ha sido bien estudiada, pero se cree que puede funcionar al igual que en los organismos que contienen hemoglobina en la sangre.

Al igual que con el amonio se han hecho múltiples estudios de la toxicidad del nitrito en camarones. Juveniles de *litopenaeus vannamei* (56± 9.6mm) se expusieron a diferentes concentraciones de nitrito-N, en salinidades de 15 ‰, 25 ‰ y 35 ‰, pH 8.02 y 18 °C. El LC50 de 24, 48, 72, 96 y 144 horas fue 187.9, 142.2, 92.5, 76.5, 61.1 ppm a 15 ppt 274.1, 244.0, 224.8, 178.3, 152.4 mg/l a 25‰; 521.2, 423.9, 375.0, 321.7, 257.2 mg/l a 35‰, respectivamente. Los niveles seguros para cultivar juveniles *L. vannamei* fueron 6.1, 15.2, 25.7 mg/l en 15‰, 25‰ y 35‰ [3].

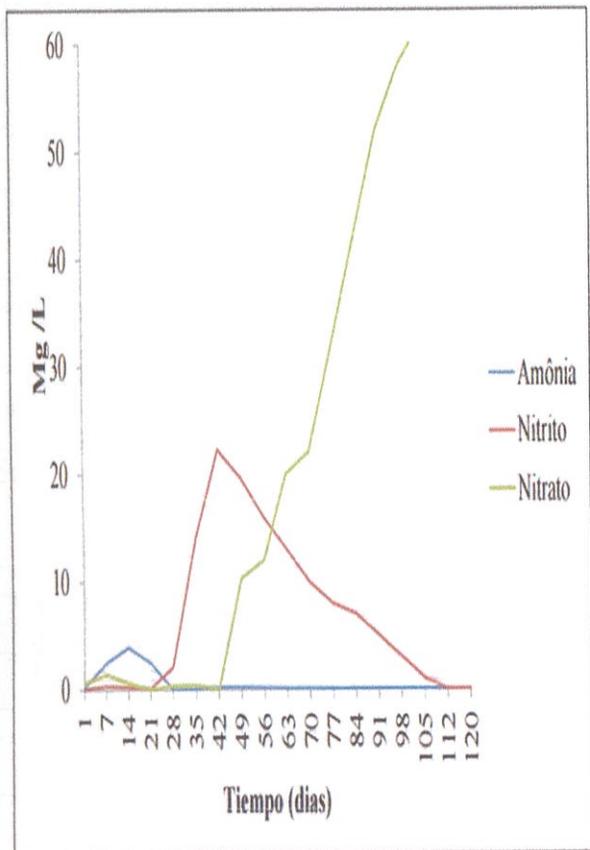
1.3. Control de amonio y nitrito.

En los RAS (sistemas recirculatorios acuícolas), el agua es mecánicamente filtrada para la remoción de sólidos suspendidos y para la remoción de amonio y nitrito se usa biofiltros.

En los sistemas de bioflocs no se usa biofiltros, existe tres vías principales de eliminación de amonio y nitrito, el fotoautotrófico que es realizado principalmente por las algas y el amonio pasa a formar parte de su biomasa. El heterotrófico en el cual el amonio pasa a formar parte de la biomasa bacteriana heterotrófica, y el autotrófico que transforma el amonio en nitrito y nitrato por medio de bacterias autotróficas (AOB y NOB) [11].

Generalmente se explota el sistema heterotrófico, pero se necesita de la adición diaria de carbono orgánico el cual generalmente es melaza, para la formación constante de nuevas bacterias heterotróficas de tal forma que el amonio pasa a formar parte de sus proteínas. La relación que se usa de carbono orgánico a TAN es 6:1 [11, 12].

Uno de los inconvenientes que presenta este sistema es que las bacterias heterotróficas prefieren usar el amonio y no el nitrito como fuente de nitrógeno, y debido a la presencia natural de bacterias autotróficas (AOB), transforman el amonio a nitrito lentamente dando como resultado la acumulación de este en el sistema, llegando a niveles no letales pero si tóxicos causando retardo en el crecimiento.



Dariano Krummenauer 2014 [13]

Gráfico 1. Gráfico hipotético del ciclo del nitrógeno a lo largo de un ciclo de cultivo de 120 días en sistema de biofoco.

El objetivo de este ensayo es explotar el uso de bacterias autotróficas para el control directo de amonio y nitrito de tal forma que los niveles de ambos se mantengan dentro de los rangos seguros y que permitan un normal desarrollo del camarón, eliminando el uso de melaza, reduciendo de manera significativa el costo del cultivo. Además tiene la ventaja de que el consumo de oxígeno va a ser mucho menor ya que la eficiencia de estas bacterias es tal que pueden llegar a convertir amonio a nitrato hasta 100 ppm TAN-N/día

2. Materiales y Métodos

En este ensayo se usó tres tanques de 1300 litros cada uno. Un aireador marca JAD de una potencia de 150 watt fue usado para la oxigenación de los 3 tanques. Los difusores que usé fueron marca sweetwater. Se usó 1800 larvas las cuales fueron puestas en número de 600 en cada tanque. Se usó un filtro fraccionador de espuma para cada tanque. El

balanceado que usé para la alimentación diaria fue de marca Nicovita, 35% proteína. Usé tres comederos pequeños uno en cada tanque para dar la ración diaria de alimento y así poder controlar la cantidad a dar. Como probiótico usé Total Pack, (EM). Para el control de amonio y nitrito use un cultivo de bacterias nitrificantes obtenidas del mar. Para el control de alcalinidad usé bicarbonato de sodio. El agua usada fue directamente de un brazo de mar, sin desinfección ni filtración de ningún tipo. Este sistema fue cero recambio de agua, adicionando agua con cero salinidad de un pozo solo para las pérdidas por evaporación y lo perdido por el filtro fraccionador de espuma.

El día 5 de agosto se procedió a llenar los tanques con agua de un brazo de mar (El Macho, sector El Coco, Machala), con una salinidad de 14 ppt. Desde el primer día use probióticos. El mismo día se adicionó las bacterias nitrificantes, esperando por un lapso de 10 días antes de sembrar debido a que deben tener un periodo de adaptación antes de empezar a nitrificar.

El alimento usado en los primeros 30 días fue Nicovita para estadios iniciales. Y luego se usó el pellet para camarón adulto. La cantidad de alimento fue ajustada diariamente de acuerdo al consumo del camarón en el comedero. Se tomó parámetros de oxígeno, temperatura, pH, alcalinidad, amonio, nitrito, nitrato y sólidos suspendidos. La alcalinidad fue controlada usando bicarbonato de sodio.

3. Resultados.

Después de la activación de las bacterias nitrificantes el amonio y nitrito se mantuvieron en rangos tolerables para el camarón. El amonio durante todo el ensayo no sobrepasó 1 ppm TAN-N, al igual que el nitrito, el cual no sobrepasó 0,5 ppm NO₂-N, y se mantuvo en niveles bajos, no así el nitrato que paulatinamente fue subiendo hasta llegar al día 60 con una concentración de 72 ppm NO₃-N de promedio en los tres tanques.

La alcalinidad se controló usando bicarbonato de sodio y no se dejó que baje de 190 ppm, el promedio fue de 218 ppm en los tres tanques. El oxígeno se mantuvo en un promedio de 5.1, y no hubo problemas. La temperatura se mantuvo en un promedio de 26°C, debido a que los tanques no estaban cubiertos con plástico invernadero. El pH se mantuvo también dentro de los parámetros normales para el cultivo con un promedio de 7.9. Los sólidos suspendidos fueron controlados con filtros fraccionadores de espuma para cada tanque y en promedio se mantuvo en 13 ml/lt. El crecimiento al final de los 60 días fue de 4.4, 4.0 y 3.9 gramos para los tanques 1, 2 y 3.

A Continuación en las tablas I, II, III se presenta un resumen de estos parámetros.

Parámetros físico-químicos de cultivo

Tanque 1	Promedio	Mínimo	Máximo
TAN-N ppm	0.4	0.15	0.8
NO2-N ppm	0.2	0.05	0.37
NO3-N ppm	39,5	4	75
Temperatura °C	26.5	24.4	28
pH	7.9	7.7	8.4
Alcalinidad ppm	228	192	244
Solidos suspendidos ml/lt	12	2	19
Oxígeno ppm	4.9	4.1	5.7

Tabla I

Tanque 2	Promedio	Mínimo	Máximo
TAN-N ppm	0.34	0.11	0.72
NO2-N ppm	0.16	0.04	0.29
NO3-N ppm	38.5	4	73
Temperatura °C	25.9	24.2	27.8
pH	8.1	7.8	8.5
Alcalinidad ppm	222	201	240
Solidos suspendidos ml/lt	11	2	17
Oxígeno ppm	5.0	4,3	5.8

Tabla II

Tanque 3	Promedio	Mínimo	Máximo
TAN-N	0.46	0.18	1
NO2-N	0.18	0.06	0.33
NO3-N	36	4	68
Temperatura °C	25.8	24.1	27.6
pH	7.8	7.6	8.3
Alcalinidad ppm	204	190	225
Solidos suspendidos ml/lt	15	2	18
Oxígeno ppm	5.4	4.4	6.4

Tabla III

Figura 1.

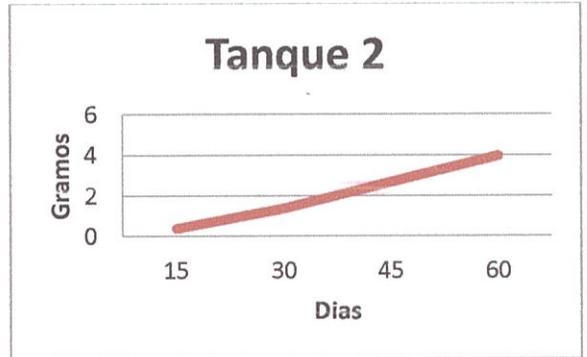


Figura 2.

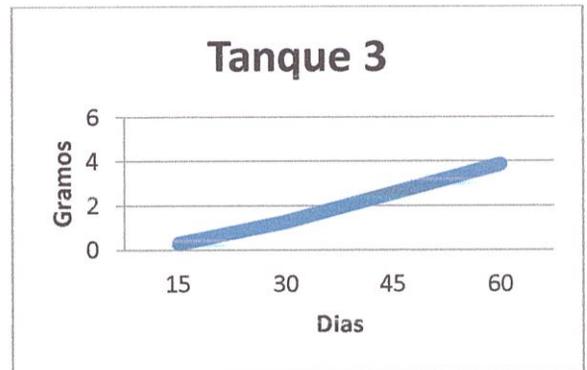


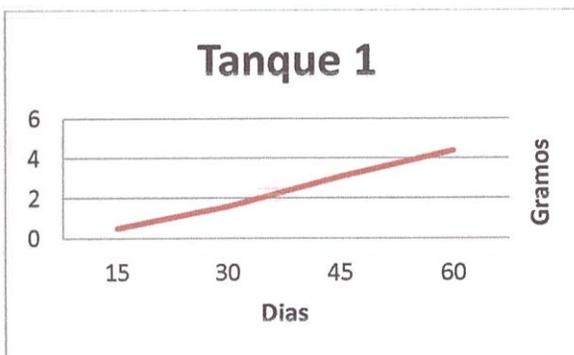
Figura 3.

4. Conclusión.

Durante el ciclo de 60 días los parámetros de amonio y nitrito se mantuvieron dentro del rango tolerable para el cultivo de camarón, y no se subió el nitrito como sucede cuando se usa el sistema heterotrófico con la adición de melaza diariamente. El nitrato se fue acumulando paulatinamente confirmando de esta forma la nitrificación. Este sistema tiene la ventaja del ahorro de melaza y también un consumo menor de oxígeno.

El crecimiento estuvo lento, una causa puede ser la temperatura que estuvo baja en esta época del año y sin invernadero. Con el uso de invernadero se podría alcanzar temperaturas de hasta 30 grados, además la frecuencia de alimentación se la hizo una sola vez al día. Mejorando estos dos puntos se podría obtener mejores crecimientos. Mortalidades no se observó, puede ser por el uso de probióticos. Los análisis patológicos revelaron al día 15 un bajón de lípidos en el hepatopáncreas, pero después al día 35 se observó una mejoría notable. No se observó la presencia de gregarinas. La conversión alimenticia y la sobrevivencia no se han hecho, debido a que el

Tanque 1



ensayo sigue en curso y esperaré hasta unos 120 días para terminar el ensayo.

5. Referencias.

- [1] Hargreaves, J. A. "Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds". *Aquaculture*, 166, 1998, pp. 181-212.
- [2] Frias-Espéricueta, M. G., Harfush-Melendez, M., Osuna-Lopez, J. I. & Paez-Osuna. "Acute toxicity of ammonia to juvenile shrimp *Penaeus vannamei* Boone". *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 62, 1999, pp. 646-652.
- [3] Lin, Y.-C. & Chen, J.-C. "Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels". *Aquaculture*, 224, 2003, pp. 193-201.
- [4] Smart, G. R. "Investigations of the toxic mechanisms of ammonia to fish-gas exchange in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) exposed to acutely lethal concentrations". *Journal of Fish Biology*, 1978, pp. 93-104.
- [5] Vadivelu, V. M., Keller, J. & Yuan, Z. G. 2007. "Effect of free ammonia on the respiration and growth processes of an enriched *Nitrobacter* culture". *Water Research*, 41, 2007, pp. 826-834. }
- [6] Claude E. Boyd, "Water Quality An Introduction", 2nd edition, 2015, Springer.
- [7] Boardman, G. D., Starbuck, S. M., Hudgins, D. B., Li, X. Y. & Kuhn, D. D. 2004. "Toxicity of ammonia to three marine fish and three marine invertebrates". *Environmental Toxicology*, 19, 2004, pp. 134-142.
- [8] Caglan, A., Benli, K. & Koksul, G. "The acute toxicity of ammonia on tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) larvae and fingerlings". *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 29, 2005, pp. 339-344.
- [9] Yong-Chin Lin, Jiann-Chu Chen, "Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* Boone juveniles at different salinity levels". *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, volume 259, 30 April 2001, pp. 109-119.
- [10] Tilak, K. S., Veeraiyah, K. & Raju, J. M. P. "Effects of ammonia, nitrite and nitrate on hemoglobin content and oxygen consumption of freshwater fish, *Cyprinus carpio* (Linnaeus)". *Journal of Environmental Biology*, 28, 2007, pp. 45-47.
- [11] Ebeling, J., M. B. Timmons, and J.J. Bisogni. "Engineering analysis of the stoichiometry of ammonia-nitrogen in aquaculture production systems". *Aquaculture* 257, 2006, pp. 346-358.
- [12] Avnimelech, Y. "C/N ratio as a control element in aquaculture systems". *Aquaculture* 176, 1999, pp. 227-235.
- [13] Krummenauer Dariano, "Ventajas del cultivo con biofloc para la maduración y larvicultura del camarón", Congreso Ecuatoriano de Acuicultura, 2014.