ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

"Respiración del suelo como herramienta para evaluar calidad de fondos en acuicultura. I. Desarrollo de un protocolo estándar para medir dióxido de carbono"

Tesis de Grado

Previa a la obtención del título de:

MAGISTER EN CIENCIAS

Presentada por:

Luciano Krebs Reginatto

Guayaquil – Ecuador

2003

TESIS ELABORADA CON EL SOPORTE DE:

FUNDACION CENAIM-ESPOL

COOPERACION TECNICA BELGA

UNIVERSIDAD DE GANTE
BELGICA

UNIVERSIDAD CATOLICA
DE LOBAINA – BELGICA

VITA

Luciano Krebs Reginatto, hijo de Ary Antonio Reginatto y Ena Marita Krebs Reginatto, nació en Lages, Estado de Santa Catarina, Brasil, el 01 de octubre de 1969. En 1987 obtiene el título de Bachiller en Ciencias Naturales en el Colegio Barddal en Florianópolis, Estado de Santa Catarina, Brasil. En 1996 ingresa en la Empresa de Pesquisa Agropecuaria del Estado de Santa Catarina (EPAGRI), donde desarrolla su trabajo para obtención del grado de Ingeniero Agrónomo. Desde entonces hasta enero de 1999 realiza actividades involucradas con la Agricultura. En 1999 realiza actividades en el Laboratorio de Cultivo de Camarones Marinos de la Universidad Federal de Santa Catarina (UFSC), cuando fue aceptado en el programa de Maestría en Acuicultura Marina de la Escuela Superior Politécnica del Litoral, y Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas, becado por la Cooperación Técnica Belga.

DECLARACIÓN EXPRESA

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

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

Luciano Krebs Reginatto

TRIBUNAL DE TESIS

Ing. Eduardo Cervantes	**Jerry Landívar, M.Sc.**
Presidente del Tribunal	**Miembro del Tribunal**
Jorge Calderón V., Ph.D.	**Laurence Massaut, Ph.D.**
Miembro del Tribunal	**Miembro del Tribunal**

Stanislaus Sonnenholzner,

Ph.D. Director de Tesis

AGRADECIMIENTOS

Toda la felicidad y los beneficios que he recibido en mi vida te los debo sin duda alguna a ti Dios. Gracias Dios mío por estar aquí siempre.

A mis padres Ary y Ena, y hermanos Rafael y Louise, que desde lejos siempre me brindaron todo su amor y apoyo durante el desarrollo de mi maestría.

A ti amor, gracias por todo tu apoyo y tu confianza. Por ser el aliento que me da ánimo para seguir siempre adelante y por tus consejos, gracias Mercedes.

A la CBT por la beca otorgada para mi participación en este programa, y a la Fundación CENAIM-ESPOL por el apoyo académico y técnico.

A Jorge Calderón V., Ph.D. y a Laurence Massaut, Ph.D. por su profesional conducción del Programa y a Stanislaus Sonnenholzner, Ph.D. mi tutor, le agradezco su cooperación en la elaboración de esta tesis.

A mis compañeros, gracias por la energía y ánimos brindados.

Por último, a la "salsa" y a la "cerveza", que en los momentos de distracción me ayudaron a olvidar los problemas y sinsabores de estar lejos de mi patria.

DEDICATORIA

A mis padres, a los cuales les debo la vida,

a ellos que merecen todo y han recibido tan poco,

a ustedes, con todo mi Amor.

Aos meus pais, a quem lhes devo a vida,

A eles que merecem tudo y tem recebido tão pouco,

A vocês, com todo meu Amor

TABLA DE CONTENIDO

INDICE DE FIGURAS xi

INDICE DE TABLAS xii

LISTA DE ABREVIATURAS xiii

RESUMEN xv

1. INTRODUCCION 1

2. ANTECEDENTES 4

2.1. PROPIEDADES QUIMICAS, FISICAS Y BIOLOGICAS DEL FONDO DE ESTANQUES DE IMPORTANCIA PARA ACUICULTURA 5

2.2. RESPIRACION DEL SUELO 15

2.2.1. Factores abióticos que afectan la respiración aeróbica del suelo 17

2.2.1.1. Temperatura 17

2.2.1.2. Oxígeno disuelto 17

2.2.1.3. Humedad del suelo 18

2.2.1.4. pH 19

2.2.1.5. Nutrientes 19

2.2.2. Métodos para determinar la respiración de suelos 20

2.3. PRINCIPIO QUIMICO DE MEDICION DEL CO_2 23

3. MATERIALES Y METODOS 25

3.1. CONSTRUCCION Y EVALUACION DEL EQUIPO EXPERIMENTAL 25

3.1.1. Descripción de los métodos 25

3.1.1.1. Descripción del aparato de aireación continua 25

3.1.1.2. Descripción de la cámara de respiración estática 27

3.1.2. Preparación del sustrato experimental 28

3.1.2.1. Selección del sustrato.. 28

3.1.2.2. Determinación de la capacidad de campo del sustrato 29

3.1.2.3. Solución de nutrientes.. 30

3.1.2.4. Suspensión bacteriana.. 30

3.1.2.5. Fuente de carbón.. 30

3.1.2.6. Preparación de los reactivos.. 31

3.1.3. Corrida de calibración del equipo experimental..................................... 31

3.2. ETAPA EXPERIMENTAL 31

3.2.1. Ensayo 1 32

3.2.2. Ensayo 2 32

3.2.3. Ensayo 3 32

3.3. ANALISIS ESTADISTICO.. 34

4. RESULTADOS 35

4.1. CONSTRUCCION Y EVALUACION DEL EQUIPO EXPERIMENTAL 35

4.1.1. Determinación de la capacidad de campo del sustrato............................ 35

4.1.2. Determinación de la viabilidad de las bacterias 35

4.2. ETAPA EXPERIMENTAL 35

4.2.1. Ensayo 1 35

4.2.2. Ensayo 2 36

4.2.3. Ensayo 3 37

5. DISCUSION.. 39

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 43

7. BIBLIOGRAFIAS 44

ANEXOS.. 51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema del aparato de aireación continua. 26

Figura 2: Esquema del aparato de la cámara de aire 27

Figura 3: Aparato para determinación de la CC en las muestras de suelo..................... 29

Figura 4: Respiración del sistema de incubación con diferentes concentraciones de carbón orgánico medido a 96 y 120 h.. 37

Figura 5: Comparación de métodos para medición de respiración de sustratos 38

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Propiedades del suelo que influyen en el manejo de piscinas de acuicultura ... 6

Tabla 2: Potencial redox para suelos de camaronera 10

Tabla 3. Producción acumulada de CO_2 en $KgCO_2$/ha/d, durante 96 h de incubación en las corridas del primer ensayo 36

Tabla 4. Producción de CO_2 promedio en $KgCO_2$/ha/d despues de 120h de incubación, registrado en los sistemas de incubación por flujo continuo y estático 38

LISTA DE ABREVIATURAS

AM	Agar Marino
BOD_5	Demanda bioquímica de oxígeno 5 días
CENAIM	Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas
CEC	Capacidad de intercambio de cationes
CC	Capacidad de campo
C:N	Relación entre Carbón y Nitrógeno
CV	Coeficiente de variación
M	Molaridad
MO	Materia orgánica
nM	Nano molar
N	Concentración Normal
OD	Oxígeno disuelto
PMP	Punto de marchitez permanente
RPM	Revoluciones por minuto
SC	suelo de camaronera
SIR	Respiración por sustrato inducido
TCBS	Tiosulfato Citrato Bilis Sucrosa
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
V	voltios
w/w	Relación peso/volumen
$\bar{x}$	promedio
”	pulgada

RESUMEN

La calidad de los suelos es determinada principalmente por métodos químicos tales como: contenido de materia orgánica (MO), azufre, elementos minerales, potencial de hidrógeno (pH) y potencial redox, entre otros. Una de las principales limitantes de estos análisis se presenta en la interpretación de los resultados por falta de estudios científicos que liguen la producción resultante del estanque con concentraciones existentes al momento del análisis. Además, los métodos analíticos existentes sólo determinan una parte del complejo sistema químico del suelo y por lo general en forma aislada del componente biológico. Se requiere por lo tanto de un método analítico que integre respuestas biológicas con el entorno físico-químico. La medición de la respiración generada por la comunidad del suelo resulta en un método sencillo para evaluar indirectamente las características químicas del sustrato. Un sustrato con condiciones químicas adversas afectará de manera directa la respiración de las comunidades bentónicas, y viceversa. El presente estudio estuvo dirigido a estandarizar algunos de los componentes de un método de respiración reportado en la literatura. El método de respiración adoptado consiste básicamente de una cámara de respiración conteniendo el sustrato, a través del cual circula un flujo continuo de aire libre de dióxido de carbono (CO_2). El CO_2 generado por el sustrato es atrapado en una solución alcalina y determinado químicamente mediante titulación con ácido. Los ensayos de estandarización estuvieron enfocados a determinar: i) la viabilidad y respuesta del material biológico inoculado al sustrato, ii) la adición de glucosa como sustrato orgánico, iii) la viabilidad de usar el criterio de capacidad de campo (CC) para humedecer el sustrato con inoculación de nutrientes, y iv) preparar un estándar interno consistente en un sustrato (arena) con mezcla de solución de nutrientes (a nivel de CC),

inoculación de bacterias distribuidas comercialmente y adición de glucosa como fuente conocida de MO. El criterio de estandarización para las diferentes pruebas fue establecido en función de la variabilidad entre réplicas de cada nivel de prueba con un tope del coeficiente de variación <20%. Como control estándar interno se proyectó usar el sustrato artificial en cada ensayo y también validar su condición de estándar al presentar valores de respiración con una variación <20% entre corridas. Se realizaron varias corridas y la variabilidad entre réplicas y corridas fue >20%. Además, se presentaron inconsistencias en los valores de respiración con niveles de sustrato orgánico. Especulamos que hubo contaminación del flujo de aire que ingresó a las cámaras de incubación atribuyendo probablemente al filtro alcalino localizado al inicio de la línea de aire. Se comparó el método del flujo continuo adoptado en este estudio con un método de respiración estático, este último resultado con menor variabilidad entre réplicas (<20%) y consistente con niveles de glucosa adicionado. Consideramos además que el criterio de CC para humedecer el sustrato es adecuado por estar en función del tipo y grosor del sustrato, reduciendo el problema de incorporación excesiva o reducida de agua al no depender de un valor fijo de humedad. A pesar de los resultados obtenidos en el presente estudio, consideramos que este método presenta un gran potencial para caracterizar la calidad del suelo al integrar la respuesta metabólica de respiración con las propiedades físicas y químicas del sustrato.

1. INTRODUCCION

El cultivo de camarón en el mundo se ha venido desarrollando y es en la actualidad una de las actividades de mayor crecimiento a nivel mundial. Sin embargo, dada la extensión de la actividad, se crearon con la misma problemas de diversa índole, considerando actualmente factores prioritarios: las enfermedades del camarón durante el cultivo y el manejo de la calidad del agua y suelo (Cruz-Barreras, 1998).

El suelo es un factor clave en la producción acuícola, pero menos atención se ha dado para sus condiciones, que para el agua. Los productores de camarón están concientes de la importancia de la calidad del suelo en la producción de animales acuáticos en piscinas, pero a la vez, existe un desconocimiento de la interrelación suelo-agua con la producción acuícola.

Ciertas condiciones en el agua y en el suelo de piscinas camaroneras pueden causar estrés en camarones, así como pérdida de apetito, crecimiento lento, susceptibilidad a las enfermedades y parásitos, y un incremento de la mortalidad. Estos factores traen como consecuencia una disminución de la producción y menores ganancias. Sin embargo, a pesar de la amplia conciencia sobre la producción eficiente de camarones, que depende de un medio ambiente de alta calidad, los productores por lo general no tienen un adecuado conocimiento de las fuentes del suelo, la buena calidad del agua, ni de como manejar las piscinas camaroneras, a fin de prevenir o reducir estos problemas (Boyd y Tucker, 1992).

Según Boyd (1995), los suelos agrícolas han sido bien identificados y clasificados, mientras que poco conocimiento se tiene acerca de suelos de estanques de acuicultura. Para la agricultura, se ha estudiado más detalladamente los diferentes requerimientos nutricionales del suelo: nitrógeno (N), fósforo (P), iones, capacidad de intercambio de cationes (CEC), pH, entre otros, para diferentes cultivos. En la acuicultura sólo se conoce el efecto de la textura, contenido de MO, pH y presencia o ausencia de componentes solubles particulares, que pueden ser beneficiosos o perjudiciales para el cultivo de camarón.

En agricultura, la realización de experimentos es más fácil de conducir, mejor observada y de menor costo (pequeñas parcelas, invernaderos, etc.), mientras que en la acuicultura hay dificultad para observar la evolución del ciclo de producción (Boyd, 1995).

En base a la necesidad de determinar la viabilidad de los suelos para el cultivo de camarón, fue objetivo del presente estudio estandarizar un método que permita determinar en forma indirecta el potencial de un suelo para sustentar el crecimiento bacteriano, a través del reciclaje de nutrientes y degradación de materia orgánica, sirviendo como índice de productividad del suelo. La estandarización permite la replicación y reducción de la variabilidad, favoreciendo el control de variables (humedad, textura, contenido bacteriano, nutrientes, etc.) que puedan afectar la respiración. La condición óptima de estas variables favorece la productividad natural del mismo, lo cual contribuye a la productividad natural del sistema. Por consiguiente, al haber adecuada productividad se espera una buena respiración del suelo. Si la comunidad bentónica se ve afectada por alguna variable adversa del suelo, esto se debería reflejar en la respiración. Debido a que en todo proceso bioquímico hay respiración, se propuso la utilización de un método simple para medir CO_2 en un sistema de flujo de aire continuo, con una modificación de la técnica de respiración de sustrato inducido (SIR).

2. ANTECEDENTES

Las características edáficas y reacciones bioquímicas de los suelos influyen directamente en la calidad de agua y salud de peces y camarones en estanques acuícolas, (Sonnenholzner y Boyd, 2000a). A pesar, que la calidad del fondo de estanques ha sido reconocida por investigadores y acuicultores como elemento clave para el buen desarrollo del cultivo, muy pocas investigaciones sobre rangos óptimos de variables químicas, físicas y biológicas de los suelos han sido realizados (Boyd y Teichert-Coddington, 1994).

Existen varios estudios que describen las propiedades de los suelos de estanques camaroneros (Morales *et al.*, 1991; Boyd *et al.,* 1994a; 1994b; Munsiri *et al.*, 1996; Ritvo *et al.,* 1998), pero muy pocos los han relacionado con producciones y salud de los organismos de cultivo. El principal obstáculo para definir relaciones entre características de suelos y agua con producción, lo constituye principalmente la falta de piscinas experimentales para conducir este tipo de estudios (Rouse, 1968; Walsh y Beaton, 1973).

Esta falta de información sobre relaciones físico-químicas del suelo con producción dificultan muchas veces la interpretación de análisis químicos del suelo (Boyd, 1995). Los suelos del fondo de los estanques son depósito de muchas sustancias que se acumulan en el ecosistema de un cultivo y la concentración de varias sustancias se encuentra influenciada por las prácticas de manejo (fertilización y alimentación), concentración de sales y otros compuestos que ingresan con el agua de llenado o recambio. Las variables de suelo que han sido mayormente estudiadas y sobre las cuales se conoce el efecto directo de estos sobre la calidad de agua y salud del cultivo son la concentración de MO total, contenido de azufre total, acidez y pH.

2.1. PROPIEDADES QUIMICAS, FISICAS Y BIOLOGICAS DEL FONDO DE ESTANQUES DE IMPORTANCIA PARA ACUICULTURA

El análisis de las características físicas y químicas del suelo sobre el cual se van a construir las piscinas, son esenciales para el éxito del proyecto acuícola. Los análisis químicos y físicos utilizados en agricultura son estándares y pueden ser adoptados para acuicultura con pocas modificaciones. El problema se presenta, sin embargo, al momento de establecer niveles de concentración u otras características edáficas para fomentar actividades biológicas tales como el incremento de productividad natural del fondo para aumentar el contenido de alimento vivo para cultivos tales como el de camarón, o para incrementar la actividad microbiana de reciclaje de nutrientes y materia orgánica. En la Tabla 1 se presentan las principales propiedades químicas, físicas y biológicas del fondo de los estanques de importancia para acuicultura.

Una de las principales preocupaciones del acuicultor es la acumulación de MO en el fondo, la misma que genera una demanda de oxígeno por la respiración aeróbica de bacterias y otros microorganismos (Boyd, 1992). Además, la anegación del suelo durante el cultivo disminuye la disponibilidad de oxígeno atmosférico, y suprime la tasa a la cual los microorganismos descomponen la MO aeróbicamente, contribuyendo indirectamente a la acumulación de MO. Como resultado de la demanda de oxígeno, se generan condiciones anóxicas y ácidas y en ausencia de oxígeno disuelto (OD), las bacterias utilizan otros compuestos oxidados como agentes receptores de electrones o agentes oxidantes, tales como nitratos (NO_3^-) y sulfatos (SO_4^{2-}) durante el proceso de respiración, creando condiciones de reducción y formación de compuestos químicos, tales como nitrito (NO_2^-), amonio (NH_4^+), gas sulfídrico (H_2S), metano (CH_4), hierro ferroso (Fe^{2+}) y manganeso (Mn^{2+}), que pueden llegar a ser tóxicos y afectar el crecimiento del organismo cultivado (Avnimelech y Zohar, 1986; Boyd, 1995).

Tabla 1: Propiedades del suelo que influyen en el manejo de piscinas de acuicultura (Adaptado de Boyd, 1995).

PROPIEDAD	PROCESO AFECTADO EN EL ESTANQUE
Tamaño de partícula y textura	Erosión y sedimentación, estabilidad de diques, filtración y adecuado hábitat del fondo
pH y acidez	Disponibilidad de nutrientes, actividad microbiológica, productividad bentónica, toxicidad del ión hidrógeno
Materia orgánica	Estabilidad de diques, demanda de oxígeno, suplemento de nutrientes, adecuado hábitat del fondo
Concentración de N y relación C:N	Descomposición de materia orgánica, disponibilidad de nutrientes
Potencial redox	Producción de toxinas, solubilidad de minerales
Profundidad del sedimento	Reducción en la profundidad del estanque, adecuado hábitat del fondo
Concentración de nutrientes	Disponibilidad de nutrientes y productividad

Un leve decrecimiento en la concentración de MO del suelo fue observado después de cinco semanas de reposo en piscinas en Honduras (Ayub *et al.*, 1993). La respiración de suelos durante el período de reposo en post-cosecha de piscinas en Honduras, fue comparada con la respiración durante el período de crecimiento (Boyd y Teichert-Coddington, 1994). El promedio de la respiración fue de 4,7 $gCO_2/m^2/d$ durante el período de reposo y solamente 0,75 $gCO_2/m^2/d$ durante el período de crecimiento. Estos datos son correspondientes a respiración aeróbica y anaeróbica.

La selección de suelos para estanques acuícolas debe considerar, entre otros factores, un contenido de MO relativamente bajo para reducir la demanda de oxígeno durante el cultivo. Según Boyd (1995), la mayoría de las piscinas para acuicultura están constituidas sobre suelo mineral conteniendo no más del 5 al 10% de MO. La MO tiene una concentración promedio de 58% de C., lo que indica que las concentraciones de carbono orgánico del sedimento usualmente son inferiores al 4% en el fondo de piscinas, mientras que en piscinas nuevas el suelo puede contener menos de 0,25% (Boyd, 2003). Sonnenholzner y Boyd (2000a) reportaron que la concentración de carbón orgánico promedio de 74 estanques de cultivo de camarón en Ecuador era de 2,4%.

La MO que se deposita en el fondo de las piscinas también es positivo para el cultivo, ya que constituye una fuente de carbón para el crecimiento de organismos bentónicos que sirven de alimento natural para peces y camarones. Según Anderson (1987), el tipo de degradadores, calidad del ambiente y características del residuo, son las variables que controlan la descomposición de la MO. Cada tipo de suelo contiene una flora microbiana adecuada para descomponer el sustrato orgánico, pero algunos elementos se descomponen más rápidamente que otros. La MO del sedimento puede dividirse en dos fracciones básicas: MO de fácil descomposición, denominada "lábil" y la MO "refractaria" de descomposición más lenta (Boyd,1995). Durante la degradación de un residuo orgánico, la fracción lábil es consumida más rápidamente por la actividad microbiana, mientras la fracción refractaria resiste a la descomposición y se acumula en el sedimento. Residuos orgánicos complejos contienen ambos componentes lábil y refractario. Los métodos analíticos para la determinación de MO no distinguen estas fracciones, lo cual dificulta la evaluación de la calidad de suelo por contenido de MO. Suelos con mismo porcentaje de materia orgánica total pueden generar diferentes reacciones biológicas y químicas, básicamente por su grado de descomposición o resistencia a la descomposición. Además, otros factores tales como contenido de N y relación C:N en el sustrato orgánico, así como el contenido de oxígeno, influyen directamente en la tasa de descomposición de la materia orgánica (Kristensen *et al.*, 1995). Por este motivo no se recomienda utilizar el contenido de MO como parámetro único estándar para caracterizar la calidad de suelos y relacionarlo posteriormente con condiciones de producción acuícola.

Lange (1967, 1970) reportó que la adición de sacarosa en sistemas conteniendo bacterias resultó en abundante crecimiento algal, argumentando que las bacterias asimilaron sacarosa y produjeron CO_2, lo que aceleró el crecimiento algal en cultivos con limitado CO_2. Boyd (1972) sostiene que la sacarosa es un sustrato que contiene C altamente disponible para las bacterias. Según Cheng y Colemann (1989), la comparación de tasas de respiración entre los métodos de adición de glucosa, bajo diferentes contenidos de agua, indicaran que la tasa respiratoria en adición en seco fue significativamente mayor, probablemente debido a una mejor distribución de glucosa, que bajo adición húmeda. Esto puede implicar en una mejor distribución de glucosa o un menor efecto a los microbios del suelo de la adición húmeda, a elevados contenidos de agua. Cuando el contenido de agua del suelo está por debajo del nivel óptimo, puede ocurrir una menor disponibilidad de agua y una mala distribución de glucosa, el cual puede causar una disminución en la respiración. A su vez, cuando el contenido de agua del suelo es mayor que el nivel óptimo, la baja provisión de oxígeno puede inhibir la actividad aeróbica de microorganismos, y decrecer la respiración (Orchard y Cook, 1983; Linn y Doran, 1984a). Anderson y Domsch (1973) observaron que después de la adición de glucosa en muestras de suelo, la respiración fue incrementada a niveles elevados por unas pocas horas (2 – 8) antes de que la liberación de CO_2 se incrementase, debido a la proliferación de la microflora del suelo.

La medición del potencial redox permite determinar el grado de oxidación o reducción química en el suelo. Potenciales de oxidación negativos reflejan condiciones de reducción producidas por la ausencia de oxígeno disuelto y están asociados a la generación de metabólitos potencialmente tóxicos. Chien *et al.* (1989) encontraron que concentraciones de gas sulfídrico, amonio, y nitrito en sedimentos de estanques, disminuyeron el potencial redox. Sugiriendo, que la evaluación de las condiciones de los suelos de estanques pueden ser determinadas a partir de la determinación del potencial redox.

Chien *et al.* (1989) categorizaron suelos de estanques de acuerdo con el potencial redox (Tabla 2) e indican que el potencial redox disminuye con la profundidad del sedimento. Shigeno (1978) midió el potencial redox en piscinas de camarón en Japón, donde encontró valores de 0,14 a –0,46V a 2 cm bajo la superficie del suelo.

Tabla 2: Potencial redox para suelos de camaronera categorizado por Chien *et al.* (1989).

CATEGORIA	POTENCIAL REDOX
Oxidado	0,40 a 0,70V
Moderadamente oxidado	0,10 a 0,40V
Moderadamente reducido	-0,10 a 0,10V
Reducido	-0,30 a -0,10 V

Masuda y Boyd (1994), en piscinas camaroneras en Taiwan, encontraron a 0,5 cm de profundidad, valores promedios de -0,113V; a 1,0cm -0,162V; a 1,5cm -0,180V y el menor valor reportado a 1,5cm fue -0,250V. Además, midieron potencial redox en estanques de agua dulce y reportaron que en la superficie de suelos en aguas bien oxigenadas, el potencial redox varió de 0,049 a 0,15V, mientras que a 2 cm por debajo de la interfase suelo-agua los valores variaron de -0,023 a 0,135V y a 5 cm de profundidad el potencial redox alcanzó rangos de -0,113 a -0,173V (Masuda y Boyd, 1994. Boyd (1995) midió el potencial redox en suelos de 36 camaroneras donde encontró valores de 0,00 a 0,050V cuando las piscinas fueron inicialmente llenadas y observó que el potencial redox disminuyó a valores de hasta -0,400V después de 3 a 4 meses de colocación de alimento en los estanques.

El potencial redox es un parámetro adecuado que indica el grado de anaerobiosis y condiciones químicas que pueden resultar perjudiciales para el cultivo acuícola. Sin embargo, su medición en el fondo del estanque es difícil. Boyd (1995) describe varios problemas asociados con el uso del potencial redox, entre estos: i) Diferentes medidores pueden ocasionar diferentes lecturas para una misma muestra de suelo o ubicación en el fondo del estanque; ii) El potencial redox declina rápidamente con la profundidad en el suelo y es difícil de insertar un electrodo comercial a una profundidad exacta; iii) El contenido de oxígeno disuelto en el agua puede contaminar el suelo cuando el electrodo es insertado; iv) Una disminución en el potencial redox con la profundidad es un fenómeno normal en un suelo saturado de agua; y v) Existen pocos datos que correlacionen potencial redox del suelo con supervivencia y crecimiento de especies acuícolas. A pesar que la información proporcionada por el potencial redox pueda resultar útil para la evaluación del estado del fondo y potenciales reacciones químicas durante el cultivo, no puede ser utilizado como herramienta de medición para propósitos de selección de suelos en proyectos acuícolas.

El pH del suelo es un parámetro de impacto directo extremadamente importante para la calidad de agua y bienestar de los organismos de cultivo. El ión hidrógeno interviene en un sinnúmero de reacciones bioquímicas y regula la distribución de sustancias químicas entre sus fracciones. Por ejemplo, la especie tóxica del amonio total (NH_3) decrece al disminuir el pH favoreciendo la formación de amonio ionizado (NH_4^+). Por el contrario, una disminución de pH favorece el porcentaje de sulfuro de hidrógeno no ionizado (H_2S), reduciendo la proporción de las sustancias de azufre ionizado no tóxicas (HS^- y

S^{2-}). Además, el pH del suelo es un criterio importante para predecir la capacidad del suelo para sustentar reacciones microbiológicas.

La mayoría de las especies de bacterias conocidas crecen en un rango de pH entre 4 y 9. Sin embargo, existen bacterias que pueden crecer en condiciones de pH entre 1 y 3, entre éstas, algunas especies de *Thiobacillus*, *Thermophalus* y *Sulfolobus* que oxidan minerales de azufre para producir ácido sulfúrico. El proceso de nitrificación es una de las reacciones más sensitivas a cambios de pH. *Nitrosomonas* spp. tienen un rango óptimo de pH de 7,3 a 9,6, y condiciones distintas de pH pueden favorecer la acumulación de amonio en el sistema. El pH de los suelo puede variar entre 2 a 9. En acuicultura, suelos ácidos son encontrados en instalaciones que han sido construidas sobre suelos con elevado contenido de azufre (>0,5% azufre total).

Sonnenholzner y Boyd (2000b) encontraron en su estudio sobre caracterización de los suelos de piscinas camaroneras en Ecuador que el 75% de 74 estanques, presentaban valores de pH entre 6,0 a 8,5. En la mayoría de los casos, suelos con pH ácidos pueden ser corregidos mediante la aplicación de carbonato de calcio.

El contenido de macro-nutrientes (N, P) y micro-nutrientes (Ca, Mg, K, Fe, Zn, entre otros) en el suelo, para el buen desarrollo de procesos biológicos en los estanques de acuicultura (metabolismo de plantas, bacterias y otros micro-organismos) ha sido poco estudiado. A diferencia del conocimiento que se ha adquirido en agricultura a lo largo de varios años de investigación sobre rangos óptimos de nutrientes para el desarrollo de plantas y cultivos, en acuicultura poco o nada se conoce sobre estas relaciones para favorecer el crecimiento de plantas bentónicas en los estanques y así proporcionar nutrientes naturales para las especies de cultivo.

La mayoría de los estudios realizados en acuicultura se han limitado a describir las concentraciones encontradas en suelos de diferentes regiones de cultivo (Morales *et al.,* 1991; Boyd *et al.,* 1994a; Munsiri *et al.,* 1996; Sonnenholzner y Boyd, 2000b).

Varios elementos químicos tienden a acumularse en el suelo con el paso de los ciclos de producción. Sin embargo no existe evidencia de un deterioro de la producción asociado a este proceso (Ritvo *et al.,* 1998). A la falta de correlación entre producciones y concentración de elementos en el suelo, se suma la variación del contenido del elemento para un mismo sustrato por efecto del tipo de solución utilizado para extraer el elemento del suelo.

Los elementos minerales se encuentran ligados en varias formas, ya sea a partículas del suelo o formando precipitados minerales. Dependiendo de la solución de extracción, se liberarán diferentes fracciones del mineral de interés (Com. pers. Sonnenholzner, 2001). Una solución ligeramente ácida extraerá minerales en forma básica, por ejemplo para el caso del P se disolverán compuestos de minerales de P-Ca, P-Mn, pero difícilmente se extraerán formas de P-Al, o P-Fe. Determinar la fracción significativa para procesos biológicos es difícil, más aún si consideramos que el equilibrio químico y procesos de absorción y liberación de fracciones de un elemento pueden alterarse por efecto de condiciones de pH o potencial redox. Por ejemplo, la solubilidad de Fe^{2+} y Mn^{2+} se incrementa en bajos valores de potencial redox, y al aumentar éstos su concentración, generan un desplazamiento de iones Ca^{2+}, Mg^{2+} y K^{+} por intercambio iónico.

Determinar el déficit o exceso de cada uno de los macro y micro-nutrientes en el suelo y sus combinaciones, tanto entre sí como con otros factores físico-químicos para un desarrollo saludable de organismos de cultivo, requerirá de varios experimentos concentración-efecto. Desde el punto de vista nutricional y fisiológico (balance osmótico), la mayoría de los organismos de cultivo satisfacen sus demandas vía el alimento artificial y/o extracción desde el agua, por lo cual un déficit en un determinado macro o micro-nutriente no tendrá un efecto directo sobre la salud del organismo. Sin embargo, el déficit de micro o macro-nutrientes puede comprometer la fertilidad del suelo para productividades bentónicas, o afectar balances químicos que controlan la solubilidad de otras sustancias que pueden resultar tóxicas para el organismo de cultivo.

Las investigaciones sobre calidad del suelo se han centrado principalmente en términos físicos y químicos, como hemos descrito anteriormente. Sin embargo, la calidad del suelo abarca adicionalmente un componente biológico. Dentro de este componente podemos anotar mediciones de biomasa y actividad microbiológica o diversidad biológica, entre otros. La determinación de la biomasa y actividad microbiológica son de gran interés para el sistema de cultivo acuícola, debido a que por una parte conforman la base de la cadena trófica del ecosistema suelo-agua y por otra intervienen en varias reacciones bioquímicas que afectan la fertilidad del estanque y salud de los organismos de cultivo.

Es variable el número de bacterias presentes en el suelo, ya que diversos factores desempeñan una grande importancia en su crecimiento. En general, las mayores concentraciones se encuentran en los horizontes superficiales, por presentar condiciones más favorables de temperatura, oxígeno disuelto, humedad y alimentación (Brady, 1989).

2.2. RESPIRACION DEL SUELO

Según Moreira y Siqueira (2002), la respiración es uno de los parámetros más antiguos para cuantificar la actividad microbiana. Ella representa la oxidación de la materia orgánica hasta la formación del CO_2 por organismos aeróbicos del suelo, que por lo tanto utilizan O_2 como aceptor final de electrones, hasta el CO_2. La determinación del O_2 puede ser hecha por cromatografía gaseosa o electrorespirómetro y la de CO_2 por titulación o conductividad eléctrica (cuando es capturado por NaOH o KOH), cromatografía gaseosa, espectroscopía de infrarojo (IRGA) o por ^{14}C, en este caso cuando se desea monitorear compuestos orgánicos específicos. Se puede medir la respiración basal de una muestra con MO pre-existente o con inducción por sustrato, añadiéndose una fuente orgánica específica, como glucosa (Moreira y Siqueira, 2002).

Es de interés para ecologistas y acuicultores la estimación de la tasa de respiración de estanques en acuicultura, la cual determina un índice de la actividad de microorganismos de suelos. Además, desde el punto de vista ecológico, la determinación de la respiración del sistema es importante para estudios bioenergéticos (Odum, 1969).

La respiración de suelos en ambiente donde viven organismos acuáticos es particularmente importante, debido a que esta respiración representa una demanda de oxígeno que puede resultar en disminución del oxígeno disuelto en los cuerpos de agua (Boyd, 1995). En climas cálidos las tasas de respiración son mayores y varían con el pH del suelo, contenido de humedad, suplemento de O_2 y disponibilidad de N. Además, son mayores cerca de la superficie del suelo, debido a altas concentraciones de MO y a la disponibilidad de oxígeno.

Rangos usuales de respiración se encuentran entre 10 – 100 kgCO_2/ha/d, pero la mayoría de suelos se encuentran en el rango 25 - 40 kgCO_2/ha/d. Bowman y Delfino (1980) encontraron en laboratorio, en sistemas donde adecuadas concentraciones de oxígeno disuelto fueron mantenidas en muestras de suelo acuático, tasas de respiración por encima de 275 – 400 kgCO_2/ha/d. Cuando las tasas de respiración se tornan tan grandes que el oxígeno disuelto es agotado en el agua de los poros del suelo y en el agua del suelo de la interfase, un micro ambiente anaeróbico se desarrolla y productos de la respiración anaeróbica penetran en el agua del estanque (Boyd, 1995).

De acuerdo a Madenjian (1988), una estimación de la tasa total de respiración en estanques puede ser usada para estimar la tasa de respiración de un componente del estanque, que es por otro lado caro o difícil de medir directamente. La medida de la actividad microbiológica bajo condiciones anaeróbicas es más compleja que en condiciones aeróbicas. El producto de la fermentación y CH_4 producido dentro de un micro sitio anaeróbico puede difundir para áreas aeróbicas, donde la oxidación del CO_2 y H_2O puede ocurrir.

2.2.1. Factores abióticos que afectan la respiración aeróbica del suelo

Los microorganismos respiran continuamente y la tasa de respiración es un índice confiable de la tasa de crecimiento. Los factores que afectan el crecimiento también influyen en la respiración en el mismo grado. Los principales factores conocidos que afectan la respiración aeróbica de bacterias heterotróficas son: temperatura, oxígeno disuelto, humedad del suelo, pH, y nutrientes.

2.2.1.1. Temperatura

La temperatura es un factor crítico en el control del crecimiento microbial. Un incremento de 10ºC a partir de temperaturas sub-óptimas, puede duplicar la respiración y crecimiento de las bacterias (Thamdrup *et al.* 1998). Muchas bacterias encontradas en el suelo crecen mejor entre 30 a 35ºC (Thamdrup *et al.* 1998).

2.2.1.2. Oxígeno disuelto

La respiración aeróbica requiere de una continua presencia de oxígeno. En suelos anegados el oxígeno atmosférico no puede penetrar en el suelo prontamente y la tasa de respiración aeróbica declina, originándose la respiración anaeróbica. La descomposición anaeróbica de sustratos orgánicos, generalmente es reducida y menos completa que la descomposición aeróbica. Aunque el fondo de los estanques es usualmente anaeróbico, los primeros milímetros de la capa superficial del fondo pueden resultar aeróbicos. Obviamente durante la cosecha, los estanques son drenados y el fondo entra en contacto directo con el oxígeno de la atmósfera acelerando la descomposición aeróbica de los sustratos orgánicos (Boyd, 1995).

2.2.1.3. Humedad del suelo

Los suelos anegados tienen por lo general una menor tasa de respiración debido a que el agua ocupa los espacios porosos y el oxígeno atmosférico no puede penetrar rápidamente. Un exceso de agua por otro lado puede afectar el transporte y difusión de oxígeno hacia el interior de las partículas de suelo, creando condiciones anaeróbicas y reduciendo la respiración aeróbica (Orchard y Cook, 1983; Linn y Doran, 1984a, 1984b). Sin embargo, la disminución de la humedad del suelo también afecta adversamente la actividad biológica y respiración de los suelos (Smith *et al.* 1993). La respiración de los suelos terrestres es comúnmente mayor al 60 – 80% de la capacidad de retención de humedad. A este contenido de humedad el suelo presenta un contenido de agua suficiente para la actividad microbial, ya que algunos poros no están saturados de agua y el aire puede ingresar para proveer oxígeno. La concentración de humedad óptima para la respiración del suelo, estudiada por Boyd y Pippopinyo (1994) en suelos de piscinas de cultivo de bagre en Alabama, usando cámaras de respiración, fue de 12 a 20%. En suelos de estanques de cultivo de camarón en Honduras el contenido óptimo de humedad fue de 35 – 45% (Boyd y Teichert-Coddington, 1994). Sin embargo, el contenido óptimo de humedad depende de la textura del suelo y tipo de arcilla. El porcentaje de arcilla en los estanques de Alabama fue aproximadamente el mismo que el de las piscinas de Honduras, no obstante, la arcilla de Alabama estuvo constituida por kaolinita, mica e hidróxidos, con un área superficial específica de las partículas de $100m^2/g$ de arcilla, mientras que los suelos de Honduras estuvieron conformados en su mayoría por smectita y el área superficial específica fue de $439m^2/g$. Debido al mayor área superficial, los suelos de los estanques hondureños retienen el agua más firmemente, reduciendo el contenido de agua biodisponible para el metabolismo de las bacterias.

2.2.1.4. pH

El pH es un parámetro que tiene un marcado efecto sobre el metabolismo y procesos fisiológicos de organismos acuáticos (Catalan y Catalan, 1987). El pH del suelo varía entre 2 en suelos ácidos a 9 en suelos alcalinos. Sin embargo, la mayoría de los suelos de acuicultura tienen pH superior a 6,5. Boyd (1995) indica que el rango óptimo de pH para la descomposición bacteriana se encuentra entre pH 7 – 8. Sin embargo, cada especie de microorganismos presenta un pH óptimo para su funcionamiento metabólico.

Boyd y Pippopinyo (1994) estudiaron la influencia del encalado, entre otros factores, en la respiración de suelos para cultivo de bagre en Alabama, utilizando cámaras de respiración y encontraron una mayor respiración del suelo en rangos de pH entre 7,5 y 8,0. Tanto el hidróxido de calcio como el carbonato de calcio fueron efectivos para incrementar la respiración del suelo, sin embargo, el hidróxido de calcio provocó un aumento inicial del pH, el cual retardó la respiración del suelo por pocos días, hasta declinar el pH al rango óptimo Boyd y Pippopinyo, 1994.

2.2.1.5. Nutrientes

Los nutrientes suplen energía para crecimiento y reacciones químicas. Los carbohidratos de nutrientes orgánicos son oxidados en la respiración y la energía liberada es usada para dirigir reacciones químicas para síntesis de componentes bioquímicos necesarios para el crecimiento y mantenimiento. Además, los microorganismos deben tener una concentración adecuada de elementos minerales esenciales (Boyd, 1995). La mayoría de los elementos minerales necesarios están disponibles en el sustrato o suelo. Los principales nutrientes para las bacterias heterotróficas son carbón orgánico y nitrógeno. Una deficiencia en una de estas dos fuentes de nutrientes puede limitar el metabolismo y por ende, la respiración. Los microorganismos contienen por lo general un 5 a 10% de nitrógeno en base al peso seco, el cual debe ser suministrado por la concentración de N existente en el suelo o el sustrato orgánico a descomponer (Boyd, 1995).

2.2.2. Métodos para determinar la respiración de suelos

Existen varias metodologías para determinar la respiración de suelos, ya sea en el laboratorio o *in situ* en estanques llenos o vacíos. La técnica de respiración mas sencilla se conoce como respiración por sustrato inducido. En este método se adiciona glucosa para inducir una máxima respuesta respiratoria de la biomasa microbiana de los suelos, la cual es medida por la producción de CO_2 (Anderson y Domsch, 1978). Cheng y Coleman (1989) encontraron varios problemas técnicos asociados al método original del SIR. Este método fue diseñado para muestras de suelo con un rango estrecho de humedad, lo cual dificulta su aplicación en situaciones de campo. Adicionalmente el analizador de CO_2 "Wosthoff Ultragas 3" (Wosthoff Co., Alemania) de flujo no continuo utilizado por Anderson y Domsch (1978) presenta errores experimentales, especialmente cuando el valor del pH de la muestra del suelo es mayor a 6 (Martens, 1987). Sin embargo, para condiciones idénticas de incubación, el agua del suelo es uno de los factores críticos que puede ser determinado y controlado (Cheng y Coleman, 1989).

Modificaciones al método original SIR para solucionar el problema de la humedad de la muestra del suelo en la incubación fueron realizadas por West y Sparling (1986). El uso de un flujo de aire continuo en un sistema de medición de CO_2 ayuda a solucionar problemas de elevado error experimental debido a la distribución relativa de CO_2 entre la fase líquida (HCO_3^-) y la fase gaseosa (CO_2) para suelos con pH mayor a 6,5 (West y Sparling, 1986; Martens, 1987), reduciendo el peligro de una posible inhibición o estimulación de la SIR debido a una muy alta o muy baja concentración de CO_2 en el espacio vacío del incubador (Cheng y Coleman, 1989).

Boyd y Pippopinyo (1994) modificaron la técnica para determinación de la respiración de suelos *in situ* usada por Witkamp (1966) y Coleman (1973), encontraron que la pulverización del suelo aceleró la respiración en la cámara de aire y sugirieron que el arado del suelo incrementaría la respiración debido a que aceleraría la pérdida de agua del suelo por evaporación.

Shapiro y Zur (1981) reportaron el método de la columna, basado en la medición de la disminución en la concentración del oxígeno disuelto, en una muestra de agua del estanque incubada en una columna de PVC oscuro (100cm de largo x 5,65cm de diámetro) en contacto con el suelo. Las columnas (experimental y control) fueron llenadas con agua filtrada (malla de 50µ) saturadas con aire y cerradas con tapones (Shapiro y Zur, 1981). Las columnas fueron ubicadas en la piscina y la concentración de OD inicial fue medida a varias profundidades de la columna a las 24 horas (Shapiro y Zur, 1981). La concentración de OD en una columna control, sin contacto con el suelo del fondo fue medida para corregir la respiración en el agua (Shapiro y Zur, 1981).

Según Shapiro y Zur (1981), el rango de concentración de O_2 fue similar tanto en las columnas como en los estanques. A pesar de que Hargreves (1972) ha mencionado que por debajo de 6 mLO_2/L la tasa de concentración de O_2 decrece, el resultado experimental mostró que la tasa de consumo de O_2 permaneció igualmente constante por debajo de 3 mLO_2/L. Shapiro y Zur (1981) determinaron que la diferencia inicial de la concentración del OD encontrada en los estanques fue debido a la respiración de los peces y la diferencia entre las disminuciones de OD de los dos tratamientos es debido a la cantidad de plancton, MO y peces en el agua (Shapiro y Zur, 1981).

Los resultados de Shapiro y Zur (1981) indicaron que los cambios en la respiración del suelo pueden ser relacionados por la diferente tasa de alimentación en los estanques. El método debe ser aplicado en cuerpos de agua poco profundos no mayores de 180 cm. Debido a la presencia de algas bentónicas, la columna puede ser oscurecida para eliminar la fotosíntesis de estas algas. Este método *in situ* de determinación de la respiración bentónica sirve como herramienta para la investigación de las condiciones bio-físicas de los bentos.

Teichert-Coddington y Green (1993) modificaron la técnica de respiración bentónica elaborada por Shapiro y Zur (1981) al convertir el consumo de oxígeno en producción de CO_2 asumiendo un coeficiente respiratorio de 1,0. Ellos determinaron una tasa de respiración del suelo de fondo previo al drenado de varias piscinas entre 0,56 y 1,21 $gCO_2/m^2/d$ (Teichert-Coddington y Green, 1993). La tasa de respiración del suelo se incrementó luego de cosechadas la piscinas obteniendo valores máximos promedio entre 7,14 y 10,16 $gCO_2/m^2/d$ (Teichert-Coddington y Green, 1993). El contenido de humedad del suelo fue de 45,8% a 48,0%. A medida que progresaba el tiempo de secado, disminuyó la humedad y también la tasa de respiración, concluyéndose que el factor humedad influye directamente sobre la respiración de los micro-organismos (Teichert-Coddington y Green, 1993).

Welch (1968) adaptó el método del "agua libre" (el opuesto del método de la botella de incubación) para determinar la tasa de respiración en comunidades de aguas estancadas y observó un colapso en el OD durante un intervalo de tiempo que estuvo en función de la respiración del estanque y la difusión neta del oxígeno dentro del estanque.

Madenjian (1990) modificaron el procedimiento de Welch, mejorando la estimación del coeficiente de transferencia de oxígeno como una función de la velocidad del viento basada en la relación presentada por Banks y Herrera (1977). La tasa de respiración del estanque fue asumida como constante durante el intervalo de tiempo. Según estos autores, el coeficiente de respiración no cambia mayormente durante la noche (Banks y Herrera, 1977).

2.3. PRINCIPIO QUIMICO DE MEDICION DEL CO_2

El CO_2 liberado durante la respiración aeróbica en suelos puede ser adsorbido en solución alcalina y medida como un índice de la tasa de respiración. La reacción en la cual el CO_2 es adsorbido es:

$$CO_2 + 2NaOH = Na_2CO_3 + H_2O$$

La cantidad de CO_2 adsorbido es equivalente a la cantidad de NaOH consumido. Para determinar esto, se precipita el carbonato (CO_3^{2-}) con $BaCl_2$ y se titula el remanente NaOH con HCl estándar. Las reacciones son:

$$Na_2CO_3 + BaCl_2 = 2NaCl + BaCO_3\downarrow$$

$$NaOH + HCl = NaCl + H_2O$$

La cantidad de NaOH inicialmente presente, menos la cantidad remanente al final del período de incubación, se utiliza para computar la cantidad de CO_2 involucrado por el suelo, que entra en la solución y reacciona con el NaOH.

3. MATERIALES Y METODOS

El trabajo para la determinación de la producción de CO_2 fue dividido en dos etapas. La primera etapa estuvo constituida por la construcción y evaluación del funcionamiento del equipo experimental. En la segunda etapa se realizaron varios experimentos para la calibración de la metodología propuesta. En esta etapa experimental se probaron básicamente diferentes concentraciones de carbón orgánico y tiempos de medición, los cuales serán descritos detalladamente más adelante.

3.1. CONSTRUCCION Y EVALUACION DEL EQUIPO EXPERIMENTAL

El equipo experimental fue construido en el laboratorio húmedo del laboratorio de calidad de agua y suelos del CENAIM, donde se habilitó un mesón para su instalación.

3.1.1. Descripción de los métodos

El equipo experimental fue construido basándose en la modificación de métodos ya existentes para la determinación de la producción de CO_2 en suelos de acuicultura, que serán descritos a continuación.

3.1.1.1. Descripción del aparato de aireación continua

El aparato de aireación continua ilustrado en la Fig. 1, funciona a partir de un flujo de aire que pasa por una solución altamente alcalina (NaOH 5N) a través de una piedra difusora cúbica (Sweetwater) ubicada en el fondo del recipiente. El CO_2 del aire es retenido en este filtro, pasando O_2 únicamente a los frascos de incubación. Las muestras fueron incubadas en fiolas de 500 mL y el aire fue suministrado continuamente con una tasa de flujo de 20 mL/min.

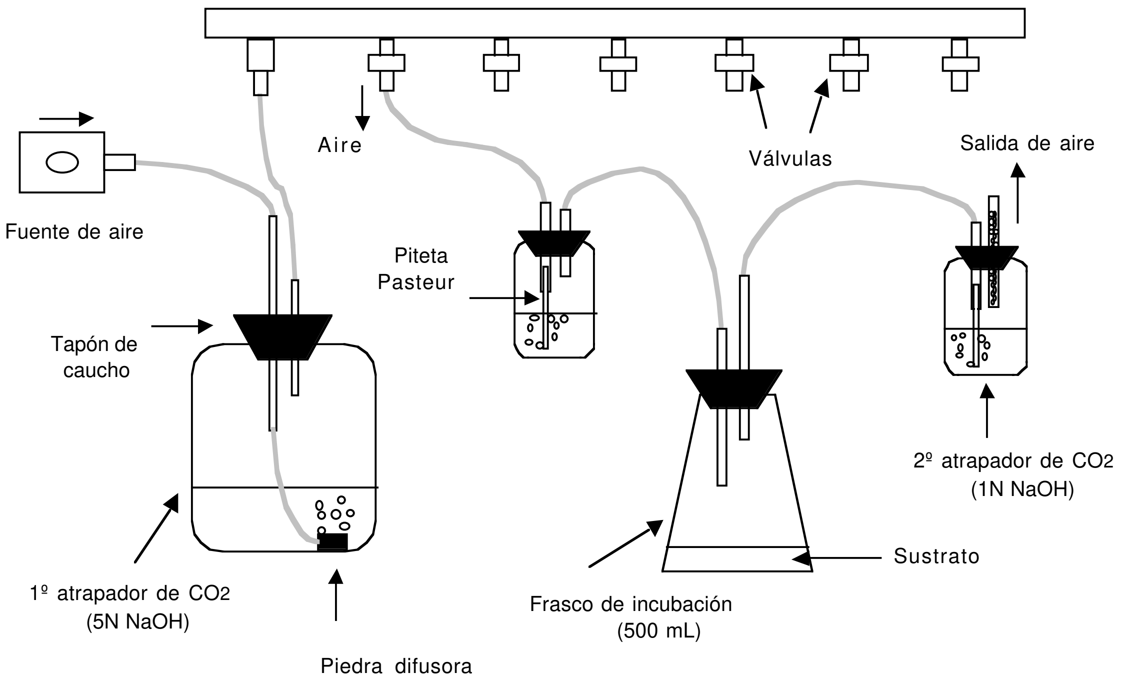


Figura 1: Esquema del aparato de aireación continua.

El CO_2 producido por la incubación fue llevado a través de una pipeta Pasteur hasta el recipiente final conteniendo 40 mL de solución de NaOH (1N). Después de un período predeterminado de exposición (24, 48, 72, y 96 h) en el recipiente final de CO_2, la pipeta de salida conteniendo perlas de vidrio fue lavada con 5 a 10 mL de H_2O para reducir las pérdidas. Se precipitó el carbonato con $BaCl_2$, se vertió el contenido remanente en un frasco cónico y se centrifugó a 3.300 RPM durante 10 min. Se recuperó el sobrenadante, que fue titulado con HCl (1N), usando fenolftaleína como indicador. La cantidad de CO_2 involucrada fue calculada por diferencia en consumo de

HCl de la titulación entre la muestra de suelo y el blanco (un frasco de incubación sin sustrato).

El flujo de aire de 20mL/min (Cheng y Coleman, 1989) fue medido con flujómetro (MFR1 – Air Flow Meter, Acrylic, 0,1-1,0 CFH). Cada unidad del sistema fue controlada con una válvula plástica de 4,76mm ∅ (3/16”).

3.1.1.2. Descripción de la cámara de respiración estática

Esta técnica fue utilizada con el propósito de comprobar la técnica de la aireación continua. El método utilizado fue una modificación de la técnica de la cámara de aire, ilustrado en la Fig. 2, descrita por Witkamp (1966), Coleman (1973) y Page *et al.* (1982).

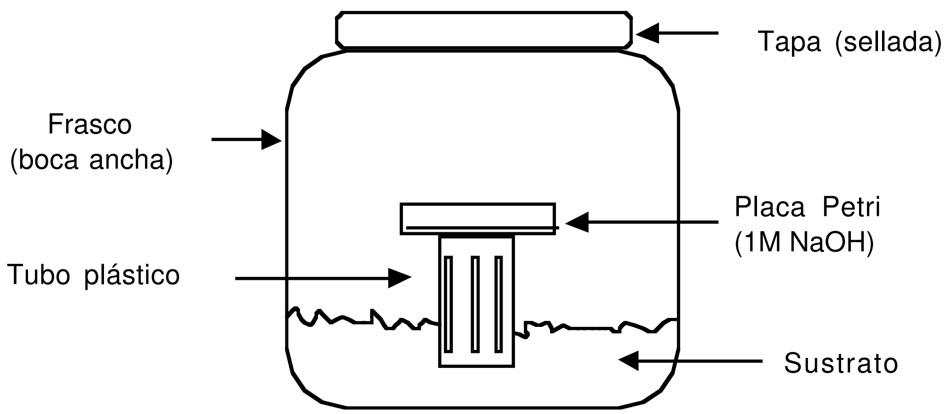


Figura 2: Esquema del aparato de la cámara de aire.

Esta técnica consiste en atrapar el CO_2 involucrado durante la respiración de una muestra de suelo, en una solución de NaOH ubicada dentro de la cámara de aire. Un frasco cúbico de boca ancha con 16 cm de lado, fue usado como cámara de incubación, mientras una placa de Petri plástica fue usada como contenedor del NaOH.

Una vez que las muestras fueron depositadas en una capa de 5 cm en la cámara de incubación, un tubo de PVC con 5 cm de diámetro fue instalado verticalmente dentro del suelo para soportar la placa de Petri. Se hicieron huecos a través del tubo para permitir la libre circulación del CO_2 dentro de la cámara. La tapa fue cubierta con parafina inmediatamente después de que 10 mL de NaOH 1N fueron vertidos dentro de la placa de Petri.

3.1.2. Preparación del sustrato experimental

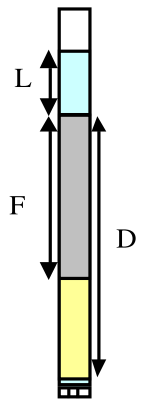
Para la preparación del sustrato experimental, se optó por la recolección de arena de playa por su fácil disponibilidad y por ser un suelo poco cohesivo, con adecuada aireación y poco poder retentivo de agua. El humedecimiento del sustrato fue realizado a partir de la CC de cada sustrato en particular. Como suministro de nitrógeno se usó un nutriente comercial estándar. Se utilizó un lote de bacterias estándar por ser un producto formulado, usando una gama de microorganismos naturales no patógenos, no modificados genéticamente y considerados no tóxicos. Como fuente de carbón se utilizó la sacarosa debido a su disponibilidad en el laboratorio. A continuación se describe cada uno de los puntos para la elaboración del sustrato experimental.

3.1.2.1. Selección del sustrato

El sustrato seleccionado tiene características de textura arenosa, fue obtenido de la playa frente a las instalaciones del CENAIM. El sustrato fue depositado en gavetas plásticas y lavado con agua dulce corriente para eliminar impurezas, posteriormente fue secado al aire por 48-96h y almacenado en recipientes plásticos cerrados.

<u>3.1.2.2. Determinación de la capacidad de campo del sustrato</u>

Para la determinación de la CC se colocó una cantidad de arena gruesa (W), previamente secada dentro de una columna de vidrio (Fig. 3) con el fondo de malla 50µ. Se marcó en la columna, el tope del suelo y se midió la columna (D). Se añadió suficiente agua para humedecer entre 50 y 100% de la columna y se midió esta columna (L). Se cubrió la columna para prevenir la evaporación, y se dejó drenar el agua por 48 h. Se marcó donde el frente húmedo se detuvo y se midió la altura de la columna de suelo humedecido (F).



,Figura 3: Aparato para determinación de la CC en las muestras de suelo.

Se calculó la CC del suelo con la siguiente ecuación:

$$CC = \frac{LD}{FW} \times 100$$

Donde: W = Peso del suelo (g);

D = Altura de la columna del suelo seco (cm);

L = Agua añadida en el suelo (mL);

F = Distancia entre el frente húmedo y la altura inicial del suelo (cm).

Para determinar el volumen a agregarse en el frasco de incubación se usaron las siguientes ecuaciones:

$$X = \frac{WF}{D} \qquad\qquad Y = \frac{150L}{X}$$

Donde: X = volumen del frente húmedo;

Y = volumen a agregarse en los frascos de incubación.

Un suelo alcanza la CC cuando el agua que se pierde por gravedad ha sido drenada. Se usó este parámetro para permitir tener un valor fijo de humedad en los ensayos.

3.1.2.3. Solución de nutrientes

La solución de nutrientes fue preparada de acuerdo a las instrucciones recomendadas por el fabricante (HACH®), que consiste en diluir una cápsula (BOD Nutrient Buffer Pillows) en 300 mL de agua destilada.

3.1.2.4. Suspensión bacteriana

La suspensión bacteriana fue preparada de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Polyseed – Interbio®), la cual consiste en la adición de una cápsula en 500 mL de agua destilada. Se efectuó la viabilidad de las bacterias mediante cultivos de la solución bacteriana en agar marino. Para la preparación de las muestras de bacterias se siguió el protocolo descrito por Solis (1996).

3.1.2.5. Fuente de carbón

La cantidad de sacarosa (Wako Pure Chemical Industries, LTD. Ref. 196-00015, Lote nº. PTF 0547) a ser agregada para alcanzar una concentración determinada de carbono fue calculada en función al peso del sustrato y porcentaje de carbono contenido en la sacarosa. Así por ejemplo, para obtener una concentración de 4% de C se adicionó 14,24 g de sacarosa.

3.1.2.6. Preparación de los reactivos

Se prepararon y calibraron las diferentes soluciones de acuerdo a APHA (1992).

3.1.3. Corrida de calibración del equipo experimental

Esta etapa consistió en efectuar algunas corridas para verificar el funcionamiento del equipo experimental. La respiración del sustrato se determinó durante un período de incubación de 0 a 24 h, con mediciones a intervalos de 2, 4, 8, 12 y 24 h. En cada frasco de incubación se utilizó 150 g de arena como sustrato; con sacarosa al 1% - 2%; la humedad fue ajustada de acuerdo con la CC; el nutriente y las bacterias fueron suministrados en forma líquida de acuerdo a la humedad requerida. Los datos de esta etapa no fueron considerados en los resultados, debido a que sirvieren sólo para la calibración del equipo.

3.2. ETAPA EXPERIMENTAL

La etapa experimental fue dividida en tres ensayos. En los ensayos 1 y 2 fueron efectuadas tres corridas y en el ensayo 3 sólo una. A continuación se explica cada uno de los ensayos:

3.2.1. Ensayo 1

El primer experimento consistió en determinar el tiempo requerido por el sistema de respiración para alcanzar una medición cuantificable y consistente de CO_2. Se efectuó la preparación de un sustrato con arena gruesa, lavada y secada a la sombra. Se usó como fuente de carbono la sacarosa a una proporción de 2% en función del peso seco de la muestra de arena. Se añadió 15 mL de la solución nutritiva con bacterias en la proporción de una cápsula para cada 500 mL, a cada frasco de incubación. La cantidad de solución fue determinada en función del resultado de la CC del sustrato. El diseño se basó en evaluar la respiración del sustrato a 24, 48, 72, y 96 h de incubación, con tres réplicas por tratamiento con sus respectivos blancos. Para esta evaluación fueron efectuadas tres corridas del tiempo inicial cero al tiempo final 96 h.

3.2.2. Ensayo 2

El segundo ensayo consistió en determinar la concentración de carbono requerida por el sistema para cuantificar el CO_2. El sustrato utilizado fue arena gruesa, lavada y secada a la sombra. Como fuente de carbono, se usó sacarosa al 1, 2, 4 y 8%. La solución nutritiva y la suspensión bacteriana fue suministrada del mismo modo como lo especificado en el ensayo 1. Fueron efectuadas tres corridas, donde se evaluó la respiración a las 96 y 120 h de incubación, con tres réplicas por tratamiento y sus respectivos blancos.

3.2.3. **Ensayo 3**

Este ensayo consistió en comparar el comportamiento del sustrato estándar con 0%, 1%, y 5% de carbono proveniente de la sacarosa y un sustrato arenoso de una camaronera comercial ubicada frente a la costa de la localidad de Palmar, Cantón Santa Elena, Provincia del Guayas. Se utilizaran tres réplicas por tratamiento. La muestra de suelo de camaronera fue obtenida a una profundidad de 0 – 5 cm. Posteriormente fue llevada al laboratorio y depositada en un recipiente por 48 h para que el exceso de agua se filtre y escurra, dejando al suelo alcanzar la humedad de la CC.

Con el fin de obtener un valor referencial de humedad del sustrato utilizado en todos los ensayos, fue necesario determinar previamente la capacidad de campo del sustrato estándar.

Fueron usadas dos técnicas distintas para determinación de la respiración del suelo: el método de aireación continua y el método de la cámara de incubación. Posteriormente a cada corrida de los ensayo, se determinó la producción de CO_2 en Kg/ha/d, modificando la ecuación publicada por Page *et al.* (1982), de la siguiente forma:

$$CO_2(\text{kg/ha/d}) = \frac{22N(B-V)}{AT} \times 2400$$

Donde: B = Ácido requerido para titular el blanco (mL);

V = Ácido requerido para titular la muestra (mL);

N = Normalidad del ácido;

A = Superficie del suelo en la incubadora cm^2;

T = Tiempo (h);

22 = Peso equivalente del CO_2;

2.400 = Factor de corrección de unidades.

3.3. ANALISIS ESTADISTICO

Se usó el coeficientes de variación para comparar las variabilidades de dos conjuntos de valores en cada uno de los ensayos.

En el tercer ensayo se realizó un análisis de varianza de una vía para comparar la producción de CO_2 entre dos sistemas de respiración incubados con diferentes sustratos. Se realizó un análisis post-hoc de rangos múltiples de Scheffé a un nivel de confianza de 95% (α=0,05). Las herramientas utilizadas para estos análisis fueron el Super ANOVA 1.01 y el Statistica 4.1.

4. RESULTADOS

4.1. CONSTRUCCION Y EVALUACION DEL EQUIPO EXPERIMENTAL

4.1.1. Determinación de la capacidad de campo del sustrato

La CC del sustrato experimental estándar seleccionado fue de 9,0 % (w/w) con un coeficiente de variación de 1,6% (4 réplicas).

4.1.2. Determinación de la viabilidad de las bacterias

El promedio de la concentración de bacterias inoculado en los distintos ensayos fue de 6,25 x 10^4 UFC/mL con un CV de 39,8%. A pesar de esta variabilidad haber sido elevada, la concentración de bacterias estuvo dentro del rango estimado por la casa comercial.

4.2. ETAPA EXPERIMENTAL

4.2.1. Ensayo 1

La producción de CO_2 registrada en el primer ensayo, se presenta en la Tabla 3. La respiración del sustrato entre las corridas del ensayo 1 fue altamente variable. En las corridas 2 y 3 se registró un pico de respiración a las 24 h. La disminución en la respiración en la corrida 3 entre las 48 y 96 h se explica por una menor respiración con respecto a las respiraciones acumuladas de las horas anteriores. La disminución en la respiración registrada a las 24 h de la corrida 1 se genera al presentar el valor del blanco control una mayor concentración de CO_2 atrapado en la solución alcalina que la concentración del tratamiento. Este resultado implicaría absorción en lugar de producción de CO_2 en la muestra, condición no factible bajo las condiciones experimentales y podría explicarse sólo por una fuga de aire antes de llegar al colector alcalino, o error de lectura, este último menos probable por la baja variabilidad de lectura entre las réplicas de la muestra.

Tabla 3. Producción acumulada de CO_2 en Kg/ha/d durante 96h de incubación en las corridas del primer ensayo.

Tiempo (h)	Corridas					
	1		2		3	
	$\bar{x}$	CV	$\bar{x}$	CV	$\bar{x}$	CV
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
24	- 10,08	6,64	11,17	5,91	29,33	17,32
48	3,14	75,16	17,09	19,25	34,71	13,57
72	7,77	6,69	18,55	12,13	25,42	27,73
96	10,08	13,29	25,20	5,87	24,93	12,84

$\bar{x}$ = Promedio
CV = Coeficiente de variación (%)

4.2.2. Ensayo 2

Este ensayo fue diseñado para determinar el contenido de carbón orgánico que permita obtener una respiración de mayor amplitud y menor variabilidad. La producción de CO_2 medido a las 96 h fue inversamente proporcional al contenido de carbón adicionado en el sustrato en forma de sacarosa (Fig. 4). El incremento de sacarosa redujo la respiración hasta inhibirla completamente en el tratamiento de 8% a las 96 h. En este tratamiento el valor de CO_2 del blanco fue mayor que el del tratamiento en mención.

Las lecturas de CO_2 correspondiente a las 120h no presentan sin embargo, la relación inversa registrada a las 96h. Para este conjunto de lecturas de CO_2 no se aprecia relación definida con un incremento de carbón en el sustrato (Fig. 4), aunque la concentración de

CO_2 correspondiente al contenido del carbón de 1% es mayor en promedio a las concentraciones superiores de carbón. En la corrida 1 correspondiente a las lecturas de 120h a pesar de que se observan valores promedios consistentes, hubo una elevada variabilidad en las lecturas correspondientes a los datos de respiración.

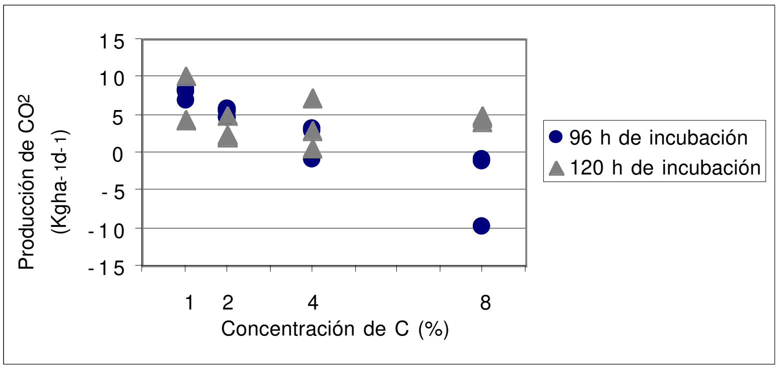


Figura 4: Respiración del sistema de incubación con diferentes concentraciones de carbón orgánico medido a 96h y 120h.

4.2.3. **Ensayo 3**

En esta etapa del trabajo se comparó el método de flujo continuo de aire en la cámara de respiración con el método estático de incubación. Para la comparación de los dos métodos se utilizó sustrato de camaronera y sustrato artificial con concentraciones de carbón de 0%, 1% y 5%, durante un periodo de 120 h de incubación. Las respiraciones registradas luego de 120 h de incubación en ambos sistemas aparecen en la Tabla 4.

La respiración del suelo de camaronera no fue significativamente diferente entre métodos de incubación. Por otro lado, la respiración entre ambos métodos de incubación para diferentes concentraciones de C en sustrato artificial fueron en promedio diferentes para la concentración al 1% de C, sin embargo, dada la elevada variabilidad, no se registra diferencia significativa en las concentraciones de 0% y 5%. El método estático presenta la menor variabilidad y reporta respuesta consistente con el aumento del contenido de C en el sustrato. El método de flujo continuo por el contrario presenta una respiración superior al 1% de C (Fig. 5).

Tabla 4. Producción de CO_2 promedio en Kg/ha/d después de 120h de incubación, registrado en los sistemas de incubación por flujo continuo y estático.

% C	Técnicas de Respiración			
	Flujo continuo		Estático	
	$\bar{x}$	CV	$\bar{x}$	CV
SC	7,63 [a]	1,83	5,08 [a]	12,60
0%	5,28 [a]	56,71	1,97 [a]	5,58
1%	23,91 [a]	9,03	2,61 [b]	4,98
5%	9,50 [a]	27,79	4,50 [a]	4,22

SC – Suelo de camaronera
$\bar{x}$ = Promedio
CV = Coeficiente de variación (%)
Valores con letras iguales en un misma fila no son diferentes estadísticamente (p>0,05)

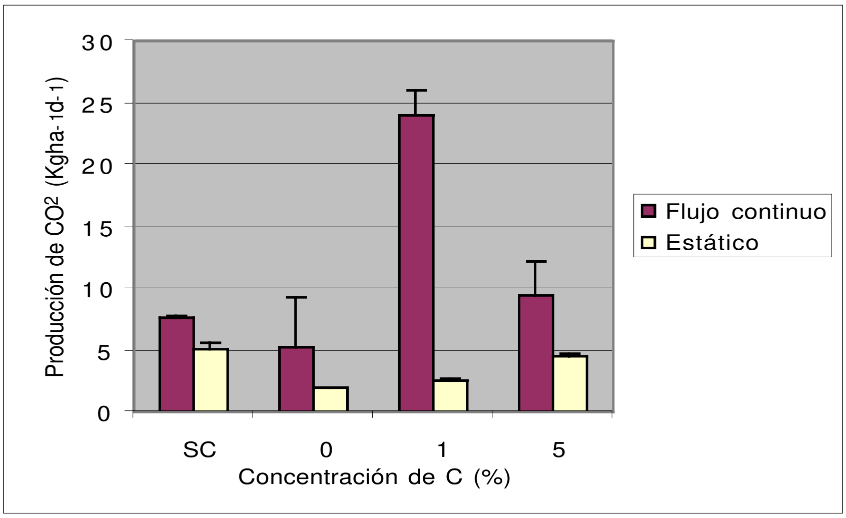


Figura 5: Comparación de métodos para medición de respiración de sustratos.

En anexos se encuentran dos ilustraciones del aparato de aireación continua usado en el experimento.

5. DISCUSION

Uno de los principales problemas que enfrenta el acuicultor para determinar la calidad de suelo de sus estanques es la elección del método analítico que le permita establecer esta condición. Si bien es cierto que existen metodologías para determinar variables del suelo importantes para la salud del sistema de cultivo tales como: materia orgánica, potencial redox, acidez, entre otros, estas por lo general presentan limitaciones de interpretación en los resultados. Por un lado existen muy pocos estudios que liguen la producción acuícola o salud del sistema con rangos de variables químicas-físicas o biológicas del suelo, y por otro lado, para el caso de compuestos químicos, los métodos analíticos en su mayoría no miden las fracciones "biodisponibles" para procesos bioquímicos de importancia para la productividad y salud del estanque en su conjunto. Así por ejemplo, al determinar materia orgánica del suelo, se está midiendo todo el "pool" orgánico. Sin embargo, solo la fracción lábil o de fácil descomposición, tendrá implicaciones importantes en la calidad del agua, ya que esta fracción es mas reactiva ocasionando una mayor demanda de oxígeno y producción de metabolitos potencialmente tóxicos. Se requiere por lo tanto de un método analítico que integre respuestas biológicas con el entorno físico-químico.

La respiración o producción de dióxido de carbón, es la respuesta metabólica de las comunidades del suelo y su medición refleja la condición del entorno edáfico en el cual se desarrollan estas comunidades. Pero justamente de esta dependencia de respiración con factores físicos-químicos y biológicos del sistema se urge una estandarización del método de medición. En este trabajo se adoptó un método de respiración para estandarizar las variables de humedad del sustrato, siembra bacteriana y tiempo de incubación. Los distintos ensayos fueron realizados con un sustrato artificial consistente en arena con diferentes concentraciones de glucosa como fuente de carbón.

Los resultados de respiración obtenidos en toda la serie de ensayos realizados fueron poco consistentes y muy variables. La principal inconsistencia se registra en los resultados de respiración con concentraciones de glucosa añadido. Sospechamos que estas variaciones de respiración estuvieron asociadas al sistema de flujo de aire, específicamente al componente del sistema constituido por el primer filtro líquido alcalino responsable de retener el dióxido de carbono. Especulamos que el dióxido de carbono contenido en el flujo de aire no fue retenido completamente por el filtro alcalino contribuyendo a la lectura originada por la respiración del sustrato. Al comparar el método de flujo continuo adoptado en este estudio, con el método estático (ensayo 3), este último registró una respiración consistente con el aumento de glucosa. La falla del filtro alcalino pudo estar asociado a la concentración alcalina y/o al flujo de aire. El uso de un filtro alcalino en la determinación de la respiración puede generar una sobrestimación del resultado debido a la incompleta absorción de CO_2, concordando con Joergensen *et al.* (1995). Cheng y Colemann (1989) determinaron que la concentración del NaOH del segundo atrapador, entre 10 – 20 nM sería más aceptable para la mayoría de los suelos, debido que el porcentaje de pérdida de CO_2 es generalmente menor que el 5%. Basado en esto, los autores consideran que la concentración del NaOH en el atrapador final no debería ser menor que 8 nM y también observaron que la concentración del NaOH determina la magnitud del error experimental por efecto de la titulación y manipuleo de la muestra (Cheng y Colemann, 1989). En virtud de lo expuesto, se discuten algunos problemas reportados en otros trabajos de respiración.

El volumen del espacio restante en la cámara de incubación también tiene un efecto en la tasa de respiración. Trevors (1995) encontró que, aparentemente, la tasa de respiración se incrementa con el volumen del ensayo. De la misma manera, Van Clave *et al.* (1979) comentaron la necesidad de establecer una óptima relación entre muestras y volumen del contenedor, particularmente en un sistema cerrado, siendo crítico para una evaluación precisa de respiración. El uso del sistema de medición de CO_2 por flujo de aire continuo ayuda a resolver algunos problemas de error experimental, reduciendo el peligro de inhibición o estimulación de la respiración debido a muy alta o muy baja concentración de CO_2 en el espacio restante del incubador (West y Sparling, 1986; Martens, 1987; Cheng y Coleman, 1989). Priha y Smolander (1994) afirman que con la utilización de la técnica de aireación continua, para un exceso de fuente de energía, microorganismos en latencia pueden no ser incluidos en la medición.

El valor de la capacidad de campo determinado en este estudio estuvo dentro del rango reportado por Foth y Turk (1972) para la arena, rango que oscila entre el 3 y el 20%. Sonnenholzner y Lentz (1996) determinaron una CC de 9,84% para suelos tipo arenoso en Auburn, Alabama. La diferencia entre la CC determinada por Sonnenholzner y Lentz (1996) y el estudio en cuestión, posiblemente se debe al origen diferente del sustrato. Una CC de 9,0% para suelos de textura arenosa permite una situación muy favorable para el desarrollo de los cultivos, que encuentra en el suelo agua suficiente retenida al mismo tiempo que el suelo está lo suficientemente aireado para permitir la respiración por los microorganismos del suelo. La CC es útil para realizar cálculos prácticos de cantidades aprovechables de agua, pero debe considerarse como característica de las condiciones de campo y, por lo tanto, sólo se puede determinar con exactitud en el campo, tal como fue demostrado por Gavante (1972). West y Sparling (1986), Martens (1987) y Cheng y Colemann (1989) encontraron que el uso de la CC como una condición de humedad en el suelo estándar durante la incubación, adición de glucosa en forma líquida, y sistema de medición de CO_2 por flujo de aire continuo, ofreció beneficios para la determinación de la respiración en una variedad de suelos estudiados. Esta metodología presenta una adecuada precisión para el propósito de estadarización de medición de la respiración. Este bajo valor de CC refleja una elevada porosidad y baja capacidad retentiva de agua en comparación con suelos arcillosos con CC de 30 – 40%.

La viabilidad de las bacterias empleadas en el experimento sirvió como herramienta para la determinación de la respiración de las muestras de suelo evaluadas. Visser y Parkinson (1992) enfatizaron la importancia de los microorganismos en la calidad del suelo, sin embargo constataron que una viabilidad inferior a 1,0 x 10^5 UFC/mL, probablemente habría afectado las pruebas realizadas, produciéndose bajos niveles de respiración debido a que existe una correlación positiva entre la respiración y la biomasa microbiana del suelo.

6. **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

La medición de dióxido de carbono presenta un gran potencial para caracterizar la calidad del suelo al integrar la respuesta metabólica de comunidades bentónicas con el entorno físico-químico en el cual estas se desarrollan.

No se logró estandarizar el método de respiración propuesto por inconsistencia en la concentración de dióxido de carbono generado con incremento de sustrato orgánico.

Se requiere de un estudio adicional para conducir al mejoramiento del sistema diseñado, para realizar los análisis por la técnica de aireación continua, lo que debe aumentar los conocimientos y mejorar las metodologías requeridas para alcanzar resultados de considerable beneficio para los productores de camarón.

7. BIBLIOGRAFIAS

American Public Health Association (APHA), American Water Works Association y Water Pollution Control Federation. 1992. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19^{th} ed. APHA, Washington, D.C., EE.UU.

Anderson, J. M. 1987. Production and decomposition in aquatic ecosystems and implication for aquaculture. In *Detritus and Microbial Ecology in Aquaculture*, D. J. W. Moriaty and R. S. V. Pullin, eds., pp.123 – 147. ICLARM Conference Proceedings 14, International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila, Phillipines.

Anderson, J. P. E. y K. H. Domsch. 1973. Quantification of bacterial and fungal contribution to a soil respiration. Arch. Microbial 93: 113-127.

Anderson, J. P. E. y K. H. Domsch. 1978. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soil. Soil Biology & Biochemistry 10:215-221.

Avnimelech, Y., y G. Zohar. 1986. The effect of local anaerobic conditions on growth retardation in aquaculture systems. Aquacult. 58: 167-174.

Ayub, M., C. E. Boyd, y D. Teichert-Coddington. 1993. Effects of urea application, aeration, and drying on total carbon concentrations in pond bottom soils. Prog. Fish-Cult. 55:210-213.

Banks, R. B., y F. F. Herrera. 1977. Effects of wind and rain on surface reaeration. J. Environ. Eng. Div. ASCE 103:489-504.

Bowman, G. T., y J. J. Delfino. 1980. Sediment oxygen demand techniques: A review and comparison of laboratory and *in situ* systems. Water Res. 14: 491-499.

Boyd, C. E. 1972. Sources of CO_2 for nuisance blooms of algae. Weed Science 20: 492-497.

Boyd, C. E. 1992. Shrimp ponds bottom soil and sediment management. Pages 166-181 in J. Wyban, editor. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA.

Boyd, C., y C. Tucker. 1992. Water quality and pond soil analyses for aquaculture. Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, Alabama. USA. pp. 46-171.

Boyd, C. E., y S. Pippopinyo. 1994. Factors affecting respiration in dry pond bottom soils. Aquaculture 120:283-293.

Boyd, C. E., y D. Teichert-Coddington. 1994. Pond bottom soil respiration during fallow and culture periods in heavily-fertilized tropical fish ponds. Journal of the World Aquaculture Society. 25 (3): 417-423.

Boyd, C. E., P. Munsiri, y B. F. Hajek. 1994a. Composition of sediment from intensive shrimp ponds in Thailand. The World Aquaculture 25 (3):53-55.

Boyd, C. E., M. E. Tanner, M. Madkour, y K. Masuda. 1994b. Chemical characteristics of bottom soils from freshwater and brackish water aquaculture Society 25: 517-534.

Boyd, C. E. 1995. Bottom soils, sediment and pond aquaculture. Chapman and Hall, New York, New York, EE.UU.

Boyd, C. E. 2003. Matéria Orgânica no sedimento de Leitos de viveiros. Retirado de la Revista de la ABCCam. Ed Gráfica. Jun 2003. Artículo original de The ADVOCATE abril 2003

Brady, N. C. 1989. Natureza e propriedades dos solos, "The nature and properties of soils". Trad. Antônio B. Neiva Figueiredo Fº. 7º ed. Rio de Janeiro. Ed. Freitas Bastos. Pp 277-279.

Catalan J. G. y J. M. Catalan. 1987. Ríos: caracterización y calidad de aguas. E.D. Dihidrox, Madrid.

Cheng, W. Y. B., y D. Coleman. 1989. A simple method for measuring CO_2 in a continuous air-flow systems: modification to the substrate-induced respiration technique. Soil Biochem. Vol. 21 No 3. pp. 385-388.

Chien, Y. H., H. T. Lai, y S. K. Chang. 1989. The effects of using steel-making waste slags as substrates on shrimp *Penaeus monodon* reared in aquaria. Asian Fisheries Science, 2: 147-161.

Coleman, D. C. 1973. Soil carbon balance in a successional grassland. Oikos, 24:195-199.

Cruz-Barreras, C. 1998. Efecto de la cal sobre la calidad de agua en un cultivo de camarón blanco *Penaeus vannamei* sobre bacterias que causan enfermedades. Instituto tecnológico de sonora. México.

Foth, H. D., y L. M. Turk. 1972. Fundamental of soil science. Fifth edition. John Wiley & Sons, Inc. USA. 454 pp.

Gavante, S. A. 1972. Física del Suelo. Principios y aplicaciones. Editorial Limusa – Wiley, S. A. México. Pp. 162-163.

Hargrave, B. T. 1972. A comparison of sediment oxygen take, hypolimnetic oxygen demand and primary production in Lake Esrom. Den. Verh. Int. Ver. Theor. Limnol. 18: 134-139.

Joergensen, R. G., T. H. Anderson, y V. Wolters. 1995. Carbon and nitrogen relationship in the microbial biomass of soils in beech (*Fagus sylvatica* L.) forests. Biol. Fertil. Soils 19:141-147.

Kristensen, E., S. I. Ahmed, y A. H. Deval. 1995. Aerobic and anaerobic decomposition of organic matter in marine sediment: which is fastest? Limnology and Oceanografy. 40:1,430-1,437.

Lange, W. 1967. Effect of carbohydrates on the symbiotic growth of planktonic blue-green algae with bacteria. Nature 215:1277-1278.

Lange, W. 1970. Cyanophita-bacteria systems: effects of added carbon compounds or phosphate on algal growth al low nutrient concentrations. J. Phycol. 6:230-234.

Linn, D. M., y J. W. Doran. 1984a. Aerobic and anaerobic microbial populations in no-till and plowed soil. Soil Science Society of America Journal 48: 794-799.

Linn, D. M., y J. W. Doran. 1984b. Effect of water-filled pore space on carbon dioxide and nitrous oxide production in tilled and nontilled soils. Soil Science Society of America Journal 48: 1257-1272.

Madenjian, C. P. 1988. Patterns of production and respiration in pond ecosystems. Ph.D. Thesis. University of Hawaii, Honolulu, HI. 191 p.

Madenjian, C. P. 1990. Estimation of whole pond respiration rate. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 47:682-686.

Martens, R. 1987. Estimation of microbial biomass in soil by the respiration method: importance of soil pH and flushing methods for the measurement of respired CO_2. Soil Biology & Biochemistry 19: 77-81.

Masuda, K., y C. E. Boyd. 1994. Chemistry of sediment pore water in aquaculture pond build on clayey, ultisols at Auburn, Alabama. Journal of World Aquaculture Society. 25:396-404.

Morales, J., M. Rodriguez, L. J. Gertrudix, y D. Berrocal. 1991. Evolution of some chemical characteristics in soils from commercial shrimp ponds. I. Metals. Pages 221-222 *in* N. De Pauw and J. Joyce, editors. Aquaculture and Environment, European Aquaculture Society Special Publication No. 14, Bredene, Belgium.

Moreira, M. M. S., y Siqueira, J. O, 2002. Microbiologia e bioquímica do solo. Ed. UFLA. Brasil.

Munsiri, P., C. E. Boyd, D. Teichert-Coddington, y B. F. Hajek. 1996. Texture and composition of soil from shrimp ponds near Choluteca, Honduras. Aquaculture International 4:157-168.

Odum, E. P. 1969. The strategy of ecosystem development. Science (Washington, DC) 164: 262-270.

Orchard, V. A., y F. J. Cook. 1983. Relationship between soil respiration and soil moisture. Soil Biology & Biochemistry 15: 447-454.

Page, A. L., R. H. Miller, y D. R. Keeney. 1982. Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties. Second edition. A. L. Page, R. H. Miller and D. R. Keeney, editors. American Sociaty of Agronomy, Inc. Madison, Wisconsin, USA.

Priha, L. y A. Smolander, 1994. Fumigation-extraction, and substrate-induced respiration derived, microbial biomass C, and respiration rate in limed soil of Scots pine sapling stands. Fertil. Soils 17: 301-308.

Ritvo, G., J. B. Dixon, A. L. Lawrence, T. M. Samocha, W. H. Neil, y M. F. Speed. 1998. Accumulation of chemical elements in Texas shrimp pond soils. Journal of the World Aquaculture Society 29:422-431.

Rouse, R. D. 1968. Soil testing theory and calibration for cotton, corn, soybean and coastal Bermuda grass. Alabama Agricultural Experimental Station Bulletin 375. Auburn University, Auburn, AL, USA. 68 pp.

Shapiro, J., y O. Zur. 1981. A simple *in situ* method for measuring benthic respiration. Water Research 15: 283-285.

Shigeno, K. 1978. Problems in prawn culture. Amerind Publishing Co., New Delhi, India. 103 pp.

Smith, J. L., R. I. Papendick, D. F. Bezdicek, y J. M. Lynch. 1993. Soil organic matter dynamics and crop residue management. *In Soil Microbial Ecology*, F. B. Metting, Jr., ed., pp 65 – 94. Marcel Dekker, New York.

Solís, P.A. 1996. Miniaturización y simplificación de pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias marinas asociadas al camarón. Tesis de Acuicultor, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador.

Sonnenholzner, S., y D. Lentz. 1996. Collecting soil solution by column displacement and centrifugation. Soil Chemistry AY 630.

Sonnenholzner, S., y C. E. Boyd. 2000a. Managing the accumulation of organic matter deposited on the bottom of shrimp pond. Do chemical and biological probiotics really work? World Aquaculture 24-28 pp.

Sonnenholzner, S. y C. E. Boyd. 2000b. Chemical and physical properties of shrimp pond bottom soil in Ecuador. J. Aquacul. Soc. Vol. 31(3).

Teichert-Coddington, D., y B. Green. 1993. Comparison of two techniques for determining community respiration in tropical fish ponds. Aquaculture 114:41-50.

Thamdrub, B. J. W. Hansen, y B. B. Jorgensen. 1998. Temperature dependence of aerobic respiration in a coastal sediment. Microbiology Ecology. 25:189-200.

Trevors, J. T. 1995. Oxygen consumption in soil: effect of assay volume. Soil Biol. Biochem. 17: 385-386.

Van Clave, K., P. I. Coyne, E. Goodwin, C. Johnson, y M. Kelley. 1979. A comparison of four methods for measuring respiration in organic material. Soil Biol. Biochem. 11: 237-246.

Visser, S., y D. Parkinson. 1992. Soil biological criteria as indicators of soil quality: Soil microorganisms. Am. J. Alternative Agric. 7:33-37.

Walsh, L. M., y J. D. Beaton. 1973. Soil testing and plant analysis. Soil Science Society of America, Madison, WI, USA. 491 pp.

Welch, H. E. 1968. Use of modified diurnal curves for the measurement of metabolism in standing water. Limnol. Oceanogr. 13:679-687.

West, A. W., y G. P. Sparling. 1986. Modifications to the substrate-induced respiration method to permit measurement of microbial biomass in soils of differing water contents. Journal of Microbiological Methods 5: 177-189.

Witkamp, M. 1966. Rates of carbon dioxide evolution from the forest floor. Ecology, 47:492-494.American Public Health Association (APHA), American Water Works Association y Water Pollution Control Federation. 1992. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19th ed. APHA, Washington, D.C., EE.UU.

ANEXOS

ANEXO 1

ANEXO 2