



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Politécnica Superior de Gandia

Estructura de la Comunidad de Eucariotas del Biofloc  
asociada al cultivo de *Penaeus vannamei* Boone, 1931

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Evaluación y Seguimiento Ambiental de  
Ecosistemas Marinos y Costeros

AUTOR/A: Garcés Cabezas, Camila Colomba

Tutor/a: Rodilla Alamá, Miguel

Cotutor/a externo: GOMEZ AGUILERA, JAVIER

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

## Resumen

Se estudió la comunidad de eucariotas asociada al cultivo del langostino *Penaeus vannamei* de un sistema con tecnología biofloc (BFT) iniciado desde cero, con el fin de analizar su dinámica con el tiempo y la carga másica del sistema y comparar entre tres tratamientos basado en tres fuentes de carbono diferentes: melaza de caña (fuente de carbono más utilizada en BFT), sacarosa con levadura de cerveza y glucosa con poli- $\beta$ -hidroxibutírico (PHB) (mezcla de fuente de carbono soluble e insoluble). Se instalaron nueve tanques de 70L en el Laboratorio de Acuicultura de la Universidad Politécnica de Valencia. Con una biomasa de  $18,0 \pm 0,4$  g de langostinos por tanque. La identificación y cuantificación de eucariotas se realizó una vez a la semana durante 10 semanas, mediante técnicas de microscopía y consulta de literatura especializada.

Los resultados estadísticos mostraron similitudes entre la comunidad de eucariotas de los tres tratamientos al inicio y al final del estudio, y diferencias en los periodos de acumulación de amonio y nitrito. Además, otorgaron información sobre la evolución de la comunidad en función de la carga másica, el tiempo del biofloc y la maduración del sistema, donde destacaron organismos significativamente asociados a las diferentes variables.

*Palabras clave:* biofloc, carga másica, BFT, protozoos, metazoos.

## Abstract

The eukaryotic community associated with the cultivation of *Penaeus vannamei* shrimp in a zero-start Biofloc Technology (BFT) system was studied to analyze its dynamics over time and in response to the system's mass loading. A comparative investigation was conducted among three treatments based on different carbon sources: sugar beet molasses (the most commonly used carbon source in BFT), sucrose with brewer's yeast, and glucose with poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) (a mixture of soluble and insoluble carbon sources). Nine 70L tanks were set up at the Aquaculture Laboratory of the Universitat Politècnica de València, each stocked with shrimp biomass of  $18.0 \pm 0.4$  g. Eukaryotic identification and quantification were performed weekly over a 10-week period using microscopy techniques and reference to specialized literature.

Statistical results revealed similarities in the eukaryotic community among the three treatments at the study's initiation and conclusion, with differences observed during periods of ammonia and nitrite accumulation. The findings provided insights into the community's evolution based on mass loading, biofloc age, and system maturation, highlighting organisms significantly associated with these variables.

*Keywords:* biofloc, mass loading, BFT, protozoa, metazoa.

## **Agradecimientos**

Muy contenta de todo lo que ha sido este largo pero a la vez muy corto camino de estudiar en el MEMIC, le quiero agradecer a todas las personas que fueron parte, cada una de diferente modo. Gracias a todo el equipo de investigación en el biofloc de la UPV que me recibieron y me enseñaron un montón, en especial a mi tutor Miguel que siempre estuvo con gran disposición para enseñar y resolver todas las dudas, y a Silvia, que si bien no fue mi tutora, también siempre pude contar con ella con un gran recibimiento.

Por sobre todo quiero agradecer a mi familia que a pesar de los miles de km que nos separaban, nunca se sintió la distancia. Gracias mamá por apoyarme siempre, a pesar de todas las dificultades, gracias a mi hermano Joaco, futuro profe de biología que me ayudaste mucho en esta área tan desconocida para mí, gracias a mi papá, mi hermano Isa, mi tía Jacko y la Tsunade que me han acompañado cada día cada uno a su modo. Gracias a todos ustedes cada día me llevo grandes aprendizajes y momentos de esta vida.

Y, por supuesto que no puede faltar, gracias al gran y hermoso océano con todos los seres que lo habitan, son mi mayor fuente de inspiración y motivación.

## Índice

<b>Resumen.....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>2</b>
<b>Índice de tablas.....</b>	<b>5</b>
<b>Índice de figuras.....</b>	<b>6</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>7</b>
<b>2. Materiales y métodos.....</b>	<b>11</b>
2.1. Configuración experimental.....	11
2.2. Calidad del agua.....	15
2.3. Parámetros zootécnicos.....	17
2.4. Comunidad de eucariotas.....	17
2.5. Análisis estadístico.....	20
<b>3. Resultados.....</b>	<b>22</b>
3.1. Calidad del agua.....	22
3.1.1. Resumen estadístico.....	22
3.1.2. ANOVA y Kruskall Wallis.....	25
3.2. Parámetros zootécnicos.....	30
3.3. Comunidad de eucariotas.....	30
3.3.1. Abundancia de organismos.....	30
3.3.2. Análisis de agrupamientos.....	36
3.3.3. Análisis de correspondencias canónicas.....	38
<b>4. Discusión.....</b>	<b>43</b>
4.1. Calidad del agua y parámetros zootécnicos.....	43
4.2. Comunidad de eucariotas.....	45
<b>5. Conclusiones.....</b>	<b>49</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>51</b>

## Índice de tablas

Tabla 1. Datos fuentes de carbono.....	13
Tabla 2. Rangos operacionales de los parámetros fisicoquímicos.....	16
Tabla 3. Características de la cámara de sedimentación.....	19
Tabla 4. Resumen estadístico de los parámetros fisicoquímicos.....	22
Tabla 5. Resultados Prueba de Kruskal-Wallis en temperatura y salinidad.....	26
Tabla 6. Resultados ANOVA / Kruskal-Wallis por semana en oxígeno disuelto.....	26
Tabla 7. Resultados ANOVA / Kruskal-Wallis por semana en porcentaje de oxígeno disuelto....	27
Tabla 8. Resultados ANOVA / Kruskal-Wallis por semana en amonio.....	27
Tabla 9. Resultados ANOVA / Kruskal-Wallis por semana en nitrito.....	28
Tabla 10. Resultados ANOVA / Kruskal-Wallis por semana en pH.....	28
Tabla 11. Resultados ANOVA / Kruskal-Wallis en por semana alcalinidad.....	29
Tabla 12. Resultados ANOVA / Kruskal-Wallis por semana en SST.....	29
Tabla 13. Parámetros zootécnicos del experimento.....	30
Tabla 14. Abundancia de organismos en el tratamiento con glucosa (n° ind/mL).....	32
Tabla 15. Abundancia de organismos en el tratamiento con melaza (n° ind/mL).....	33
Tabla 16. Abundancia de organismos en el tratamiento con sacarosa (n° ind/mL).....	34
Tabla 17. Abundancia de organismos en los tanques del invernadero (n° ind/mL).....	35
Tabla 18. Resultados del ANOVA al modelo de correspondencias canónicas.....	38

## Índice de figuras

Figura 1. Fotografías de los tanques.....	12
Figura 2. Langostinos introducidos y tanque de origen.....	14
Figura 3. Cámara de sedimentación.....	18
Figura 4. Variación en el tiempo de los parámetros fisicoquímicos.....	23
Figura 5. Variación de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> y SST a lo largo del tiempo.....	24
Figura 6. Fotografías de observaciones en el microscopio.....	31
Figura 7. Dendrograma basado en la abundancia de los microorganismos.....	37
Figura 8. Matriz de correlación entre las variables de estudio.....	39
Figura 9. Diagrama del análisis de correspondencias canónicas.....	41
Figura 10. Acercamiento en el diagrama del análisis de correspondencias canónicas.....	42

## 1. Introducción

La tecnología biofloc (BFT) surgió en las últimas décadas como un sistema de cultivo acuícola sostenible y rentable respecto a su costo-eficiencia (Bagi et al., 2023). Los sistemas tradicionales de acuicultura suelen presentar problemas ambientales relacionados a la generación excesiva de materia orgánica por heces y alimento no consumido, a la adición de medicamentos que son utilizados para controlar enfermedades y parásitos, al exceso de nutrientes inorgánicos en el agua, a la dispersión de patógenos y fugas, además de los problemas de bienestar animal. Para enfrentar estos desafíos, gracias a los esfuerzos de investigación y mejoras tecnológicas se desarrolló la BFT (Bagi et al., 2023).

En este sistema se realizan mínimos, o incluso nulos, intercambios de agua, donde se estimula el crecimiento de comunidades microbianas que contribuyen al mantenimiento de la calidad del agua, influyen positivamente en el sistema inmunológico y sirven como una fuente de alimento complementaria para los animales cultivados. El camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) y la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) son las principales especies cultivadas en sistemas BFT debido a sus características altamente compatibles con estos (Sgnaulin et al., 2021).

El funcionamiento del sistema BFT se basa en la generación de bioflóculos. Los bioflóculos son formaciones de partículas suspendidas y de comunidades de microorganismos unidos en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares. La formación de esta matriz se produce, a través de una serie de procesos físicos, químicos y biológicos, cuando hay suficientes fuentes de carbono y nutrientes disponibles, por lo que este proceso se facilita con la adición de una fuente de carbono externa en el agua de crianza. La composición de los bioflóculos depende

de las especies microbianas, las fuentes de carbono y de nitrógeno disponible y de los parámetros ambientales (Bagi et al., 2023). En general, están compuestos por bacterias heterótrofas, algas (dinoflagelados y diatomeas), hongos, ciliados, flagelados, rotíferos, nematodos, metazoos y detritos que llevan a cabo procesos simbióticos para cumplir las funciones clave del sistema (Manan et al., 2016).

Los microorganismos en BFT desempeñan tres roles principales: (i) asegurar la calidad del agua al consumir compuestos nitrogenados, (ii) proporcionar una fuente de alimento para las especies cultivadas, y (iii) competir contra patógenos y crear propiedades probióticas (Khanjani et al., 2022). Por un lado, organismos procariontes, las bacterias, son los más importantes en el mantenimiento de la calidad del agua, ya que eliminan la mayor parte de los compuestos nitrogenados presentes en la columna de agua (Llario et al., 2019), mediante la transformación de las formas dañinas de nitrógeno, amonio y nitrito, proveniente de restos de animales, alimento, heces, urea, etc. a formas no dañinas (Bagi et al., 2023). Donde las bacterias heterótrofas, a diferencia de las autótrofas, son las que eliminan de manera más eficiente estos compuestos (Llario et al., 2019). El éxito del sistema depende mayoritariamente de la maduración del biofloc (Bagi et al., 2023).

El proceso de maduración consta de dos etapas, un estado inmaduro, que se caracteriza por la ausencia de una comunidad bacteriana y la acumulación de amonio y nitrito, y un estado maduro, cuando se desarrolla la comunidad bacteriana y el amonio y nitrito se oxidan rápidamente (Llario et al., 2019). Por otro lado, son variados los organismos importantes en proporcionar una fuente de alimento para las especies cultivadas, tanto procariontes como eucariotas, pero especialmente la presencia de ciliados y nematodos, puede hacer que las proteínas, lípidos y vitaminas estén disponibles para las especies cultivadas. Esto promueve el

crecimiento de los animales y reduce la necesidad de estos compuestos en los piensos comerciales (Khanjani et al., 2022), disminuyendo los costos de los cultivos asociados a la alimentación.

La mayor parte de la literatura de BFT está dedicada a los microorganismos procariotas, sin embargo, los eucariotas también son parte de la comunidad de los bioflóculos y cumplen múltiples funciones importantes dentro del sistema. Tal como se mencionó, otorgan una fuente de alimento para las especies cultivadas, pero también, destaca el rol que desempeñan en la dinámica del nitrógeno, los flujos de energía y las interacciones tróficas (Bagi et al., 2023). Algunos microorganismos eucariotas destacan como agentes biorremediadores del agua al transformar los nutrientes provenientes de los residuos de alimento no consumido y las heces de los animales cultivados. Entre ellos, los ciliados, vorticelas, euplotes y paramecios, son clasificados como protozoos saprófitos, ya que absorben la materia orgánica a través de su pared celular para obtener alimento (Manan et al., 2016).

Como se mencionó, los eucariotas desempeñan un papel importante dentro del funcionamiento integral del sistema BFT, no obstante, la escasa atención dedicada a la investigación de eucariotas bajo este contexto, destaca la importante necesidad de extender y profundizar en el análisis de estos microorganismos. Estudiar su estructura puede entregar conocimientos que permitan ajustar los métodos y prácticas de esta tecnología para lograr un aumento en la producción y una reducción en la huella ambiental (Khanjani et al., 2022). La comprensión de la abundancia y diversidad de especies, así como sus roles en la comunidad ecológica se ha identificado como crucial para una gestión adecuada del sistema en BFT (Khanjani et al., 2022).

En este sentido, resulta de gran interés conocer las condiciones más favorables para el desarrollo de la comunidad de eucariotas, su evolución y dinámica a través de la relación entre los diferentes organismos con las variables del sistema. Con el motivo de conocer la estructura de la comunidad de eucariotas del biofloc asociado al cultivo del langostino *Penaeus vannamei* (Boone, 1931), se llevó a cabo este estudio, cuyos objetivos son:

- I. Identificar y cuantificar los eucariotas presentes en el agua y fangos del sistema BFT.
- II. Establecer diferencias de los sistemas en función de la fuente de carbono administrada.
- III. Establecer la evolución temporal de la comunidad de eucariotas en función de la edad de los flóculos y de la carga másica presente en el sistema.

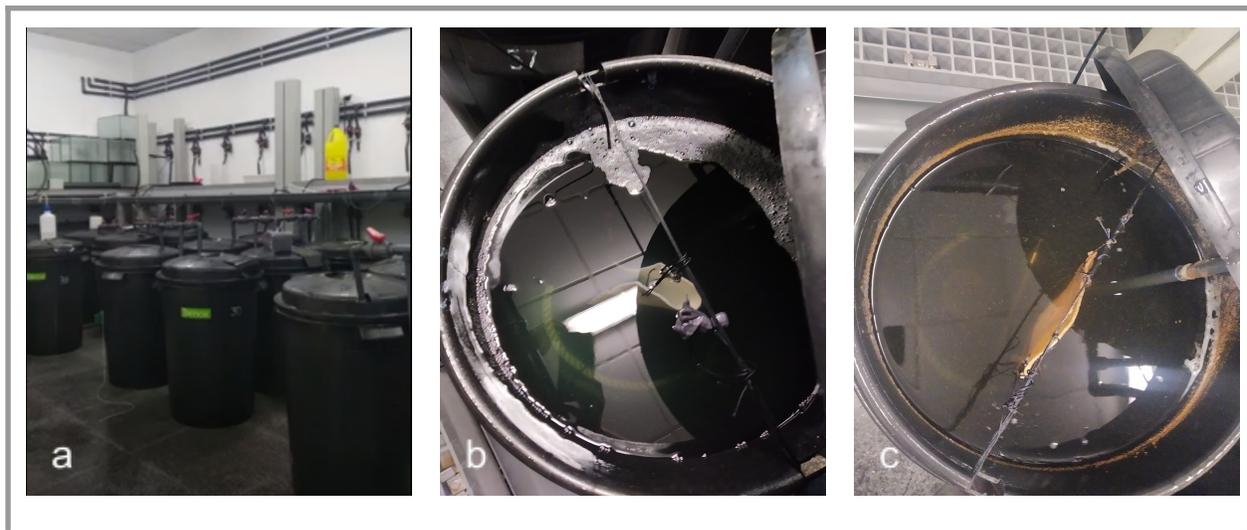
## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Configuración experimental

Se realizó una experiencia práctica con langostinos *P. vannamei* en tanques de agua desinfectada con el propósito de iniciar la formación de biofloc desde cero.

El experimento incluyó tres tratamientos distintos basados en tres fuentes de carbono: melaza de caña (la fuente de carbono más comúnmente utilizada en BFT), sacarosa con levadura de cerveza, y glucosa con poli- $\beta$ -hidroxibutírico (PHB) (mezcla de fuente de carbono soluble e insoluble).

Esta experiencia se desarrolló en el laboratorio de acuicultura de la EPSG de la Universidad Politécnica de Valencia desde el 22 de junio hasta el 3 de septiembre de 2023. Para llevar a cabo el experimento se instalaron nueve tanques, correspondientes a los tres tratamientos con tres réplicas por cada uno (Figura 1). Cada tanque tenía un volumen de 70 litros y una superficie de 0,13 m<sup>2</sup>. Se distribuyeron de tal manera que cada grupo de tratamiento se encontraba aislado del resto y de igual modo cada tanque dentro del grupo era independiente de los otros. Los tanques estaban completamente cubiertos sin permitir la entrada de luz, se les incorporó un sistema de aireación constante, calentadores que se ajustaron a 26°C y nedlonas de 15x15 cm, para aumentar la superficie del sistema favoreciendo el desarrollo de microorganismos.

**Figura 1.** Fotografías de los tanques

En las fotografías, a. configuración de los tanques, b. interior del tanque al comienzo del experimento, y c. interior del tanque al final del experimento. Elaboración propia.

Previamente al inicio del experimento se realizaron meticulosos procedimientos de limpieza y desinfección de los tanques y materiales utilizados, para eliminar posibles residuos y microorganismos presentes. Los tanques se llenaron con agua de mar (20,0 salinidad) que se desinfectó con la adición de lejía en la proporción de 10 mg de cloro por cada litro de agua, luego que el cloro actuara durante tres días se aplicó 2 mg de ácido ascórbico por cada litro de agua, con el fin de eliminar el cloro residual de los tanques. Por otro lado, los materiales se desinfectaron en cubos con agua con lejía y luego se limpiaron con agua dulce.

Una vez acabado el proceso de desinfección y aclimatación de los tanques se añadió la fuente de carbono correspondiente a cada tratamiento:

1. Glucosa, más 500 mg del polímero poli- $\beta$ -hidroxibutírico (PHB). El polímero, como fuente de carbono insoluble, libera lentamente carbono al sistema.

2. Melaza de caña de azúcar
3. Sacarosa, más un inóculo inicial de 250 mg de levadura de cerveza. Esta última aporta carbono y nitrógeno al sistema.

La dosis requerida de fuente de carbono para cada tanque depende del contenido de carbono de cada fuente y el ratio Carbono/Nitrógeno (C:N) deseado. Se estableció una relación C:N del agua de 15:1, relación óptima para el éxito de las bacterias heterótrofas en la eliminación de los compuestos de nitrógeno tóxicos y para la menor dominancia de bacterias patógenas (Panigrahi et al., 2018). Por lo tanto, la dosis de cada fuente a administrar ( $D$ ), descrita en la ecuación (1), se calcula en función del ratio C:N, el porcentaje de carbono que contiene cada fuente (%C), el volumen del tanque ( $V$ ) y el contenido de nitrógeno de amonio ( $N$ ) en el agua, que en este caso se estableció en 1 mg/L.

$$D (g) = \frac{C:N \cdot (N (mg/L) / 1000)}{\%C / 100} \cdot V(L) \quad (1)$$

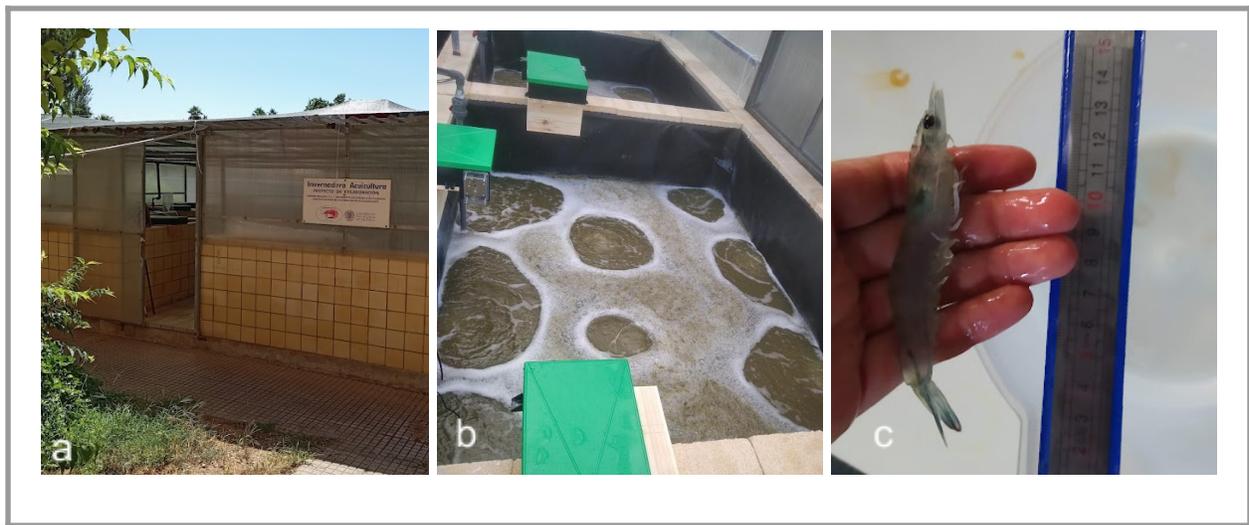
**Tabla 1.** Datos fuentes de carbono

Fuente de C	C:N	N-Amonio	%C de la fuente	Volumen tanque	Dosis requerida
Glucosa	15:1	1 mg/L	28,61	70 L	3,67 g
Melaza	15:1	1 mg/L	25,00	70 L	4,20 g
Sacarosa	15:1	1 mg/L	33,90	70 L	3,10 g

La medición del porcentaje de carbono que contiene cada fuente fue realizada por el Instituto de Ciencia y Tecnología Animal (ICTA). Elaboración propia.

Una vez finalizado el proceso de preparación del agua, se introdujeron los langostinos que provenían del tanque 5 del sistema de biofloc localizado en el invernadero de la EPSG. Este tanque de 2600 m<sup>3</sup> contaba con un biofloc maduro que se trató con melaza y en el que los animales llevaban cinco meses. Por cada tanque se introdujeron tres animales de  $6 \pm 0,1$  g cada uno (Figura 2), con una biomasa por tanque total de  $18,0 \pm 0,4$  g. Los tanques iniciaron con agua clara, por lo que los animales desempeñaron el rol de agentes inoculadores al introducir el inóculo de biofloc desde su sistema digestivo, permitiendo así la formación de este.

**Figura 2.** Langostinos introducidos y tanque de origen



En las fotografías, a. invernadero de acuicultura de la EPSG, b. tanque 5 del invernadero, y c. dimensión de los langostinos introducidos al inicio del experimento. Elaboración propia.

A los animales se les suministró alimento distribuido en dos raciones al día. En (2) se muestra la ecuación para calcular la ración diaria de alimento (A) administrada en cada tanque, para una biomasa (B) y una tasa de alimentación de 0,027 (Kureshy & Davis, 2002). La biomasa se estimó de acuerdo con las biometrías realizadas y el tiempo transcurrido entre ellas, para un incremento en peso de 0,75 g por semana.

$$A (g) = 0,027 \cdot B (g) \quad (2)$$

## 2.2. Calidad del agua

Durante el experimento se llevó a cabo un seguimiento y monitoreo de los parámetros fisicoquímicos del agua para mantener sus valores en el rango óptimo de operación. Se realizó un monitoreo diario de la temperatura (T), el oxígeno disuelto (OD), el porcentaje de oxígeno disuelto (%OD) y la salinidad (S) de los tanques; utilizando la sonda multiparamétrica ProODO - YSI para los tres primeros parámetros y Multi 340i - WTW para la medición de S. Los valores se registraron en planillas y las sondas se lavaban entre cada grupo de tratamiento.

Dos veces por semana se recolectaron muestras de agua para la medición de SST, alcalinidad, pH, amonio y nitrito. Las muestras primero se filtraban con un sistema de presión de vacío a través de filtros de microfibra de vidrio MFVL8 de 0,5  $\mu\text{m}$  de retención. Luego los filtros se colocaban en horno durante 24 horas a 80°C para medir los sólidos suspendidos totales en balanza de precisión. Con el agua ya filtrada se medía el resto de los parámetros, la alcalinidad con tester Hannah, el pH con pHmetro XS Instruments pH50 y en el caso del amonio y nitrito las mediciones se realizaban por colorimetría utilizando la metodología descrita por Koroleff (1969) y Benschneider & Robinson (1952), respectivamente, con espectrofotómetro Jenway 6300.

Durante las primeras cuatro semanas, el biofloc estaba en un estado inmaduro, por lo que se requería monitorear diariamente los niveles de amonio y nitrito. Este seguimiento tenía como objetivo corregir las subidas de amonio para evitar alcanzar niveles tóxicos de este nutriente, y mantener un control adecuado del nitrito. Por lo tanto, durante este tiempo las mediciones de estos nutrientes se realizaron diariamente, hasta que el biofloc llegó a su estado maduro y con

ello los niveles de amonio y nitrito se estabilizaron, después de ello las mediciones semanales disminuyeron hasta dos veces por semana.

**Tabla 2.** Rangos operacionales de los parámetros fisicoquímicos

<b>Parámetro</b>	<b>Rango operacional establecido</b>
Temperatura	26 - 28 °C
Oxígeno disuelto	> 6 mg/L
Porcentaje de oxígeno disuelto	> 90 %
Salinidad	20,0 - 20,5
N de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	< 1 mg/L
N de NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	< 12 mg/L
pH	8
Alcalinidad	200 - 300
Sólidos suspendidos totales	< 450

Elaboración propia.

En aquellos momentos que los valores de los parámetros se salieron de los rangos preestablecidos se llevaron a cabo las correcciones apropiadas con el fin de preservar la calidad del agua y favorecer las condiciones óptimas para el desarrollo de los langostinos y del biofloc.

La corrección de la S consistió en la adición de agua dulce para recuperar la pérdida de agua debido a la evaporación en los tanques, la alcalinidad se corrigió con la adición de 1 g de bicarbonato por cada 100 L de agua y el pH con la administración de 2 g de cal por cada 100 L de agua. Para el amonio se añadía la dosis calculada de cada fuente de carbono; cuando el biofloc estaba inmaduro se corregía la relación C:N cuando el amonio alcanzaba los 0,5 mg/L, con el fin de evitar subidas muy altas de amonio entre una medición y la otra, mientras que cuando el

biofloc estaba maduro, las adiciones de carbono se realizarían cuando el amonio alcanzara 1 mg/L.

### 2.3. Parámetros zootécnicos

Al inicio y final del experimento se pesaron individualmente los animales de cada tanque para evaluar los siguientes parámetros zootécnicos: peso final (f), incremento de peso (i), ratio específico de crecimiento (REC) (3) y factor de conversión alimenticia (FCA) (4).

$$REC (\%día^{-1}) = 100 \cdot \frac{((\ln(\text{Peso final total}) - \ln(\text{peso total inicial}))}{\text{días de experimento}} \quad (3)$$

$$FCA = \frac{\text{alimento suministrado}}{\text{incremento de peso}} \quad (4)$$

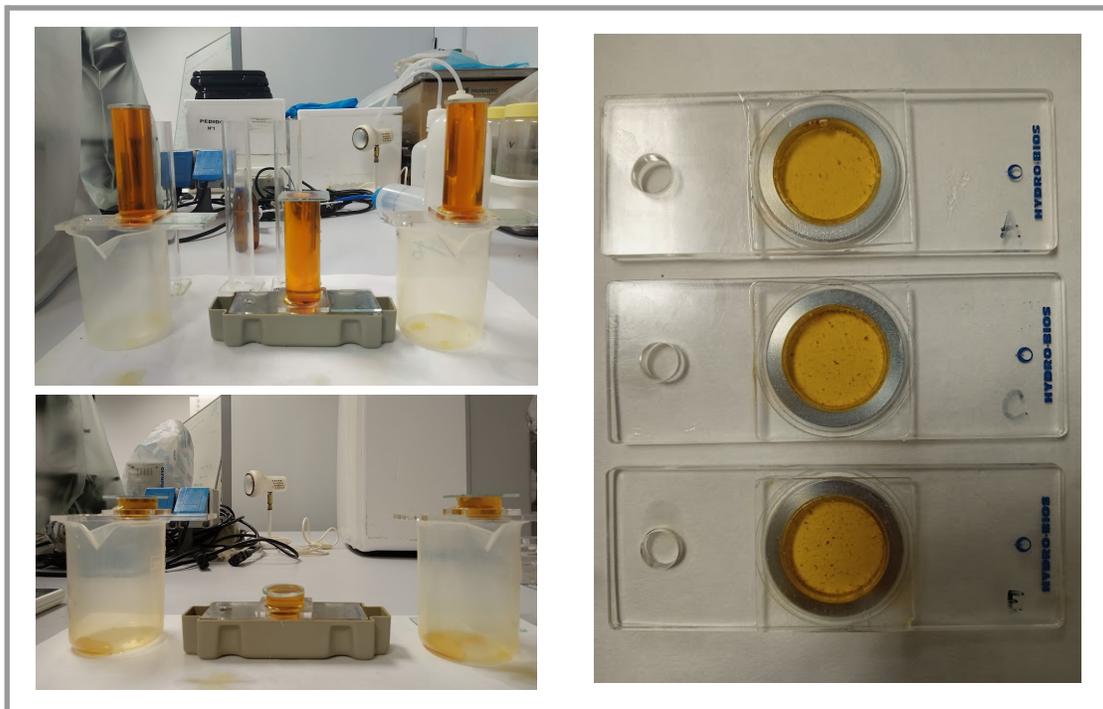
### 2.4. Comunidad de eucariotas

Una vez a la semana se recolectaron muestras de agua para la identificación y cuantificación de eucariotas. Esto se realizó por un periodo de 10 semanas a partir del cuarto día después de que se introdujeron los animales. Las muestras se recolectaron en botellas ámbar de 250 mL que luego se fijaron con la adición de 5 mL de Lugol al 5%. Para la preparación de lugol se disolvieron y mezclaron 10 g de KI en 100 mL de agua destilada y luego se añadieron 5 g de yodo.

Un volumen determinado de las muestras se colocaba durante 4,5 horas en las cámaras de sedimentación (Figura 3) con el método de Utermöhl (1958); inicialmente se utilizaron cámaras de 100 mL, pero con el tiempo la densidad de microorganismos y de fango aumentaba por lo que

se requería disminuir el volumen de las cámaras de sedimentación, empezando por 50 mL y luego diluyendo a 30 mL, 25 mL y 20 mL. Además, durante las últimas dos semanas se contaron los microorganismos presentes en muestras de los tanques T3, T4, T5 y T8, del sistema de biofloc ubicado en el invernadero de acuicultura de la EPSG. Para estas muestras solamente se añadían entre 1 y 2 mL de muestra en la cámara de sedimentación.

**Figura 3.** Cámara de sedimentación



Elaboración propia.

Una vez transcurridas las 4,5 horas en que los microorganismos sedimentaron, las muestras fueron examinadas en microscopio invertido LEICA DM IL. Se contabilizaron 10 campos al azar por cada muestra con objetivo 63X y 5 campos al azar por cada muestra con

objetivo 20X. Aquellas muestras que no se analizaron el mismo día se conservaron fijadas en nevera a 4°C.

**Tabla 3.** Características de la cámara de sedimentación

<b>Campo</b>	<b>Diámetro (mm)</b>	<b>Superficie (mm<sup>2</sup>)</b>
63x	0,3175	0,025
20x	1	0,7854
Cámara	26	530,66

Elaboración propia.

El número de individuos identificados por mL en cada muestra se calculó en función del número de organismos observados (n), el volumen de la cámara de sedimentación (V), el radio de la cámara de sedimentación (R), el campo observado (i), el número de campos contabilizados (m) y la superficie del campo (C). La ecuación (5) muestra el número de individuos por mL en función del campo i y (6) indica el número de individuos por mL para todo el tanque.

$$\frac{n^{\circ} \text{ individuos}}{\text{mL}}_i = \frac{n_i}{C_i (\text{mm}^2)} \cdot \frac{\pi \cdot (R (\text{mm}))^2}{V (\text{mL})} \quad (5)$$

$$\frac{n^{\circ} \text{ individuos}}{\text{mL}} = \left( \frac{\sum_{i=1}^m n^{\circ} \text{ individuos/mL}_i}{m} \right) \quad (6)$$

Los microorganismos fueron identificados hasta el último nivel taxonómico posible con el apoyo de las guías “The Illustrated Guide to the Protozoa”, “A Guide to Testate Amoebae with the Keys to Genera”, “Identification key to the genera of marine rotifers worldwide” y el libro “Marine Plankton”.

## 2.5. Análisis estadístico

Los datos recopilados fueron analizados mediante el uso del software R - versión 4.2.3. El conjunto de datos contiene, para cada tanque por cada día, los valores de las variables fisicoquímicas registradas y la abundancia de los diferentes organismos identificados, durante todo el periodo de estudio.

Primero se realizó estadística descriptiva a los parámetros de calidad del agua para obtener los valores medios con su desviación estándar, máximos y mínimos, para cada grupo de tratamiento. Luego, para la comparación de estos parámetros, entre los tres tratamientos, se realizaron análisis de varianza unidireccional (ANOVA), verificando normalidad y homocedasticidad de los datos. En aquellos datos que no siguen una distribución normal se aplicó el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis. Las pruebas mencionadas se realizaron de manera independiente para cada semana, con excepción de la T y S que se aplicó una comparación general para todo el periodo de estudio. Todos los datos se analizaron a un nivel de significancia del 5%.

Con el fin de estudiar la evolución de la comunidad de eucariotas y comparar entre los diferentes tratamientos, se llevó a cabo un análisis de agrupamiento, con la construcción de un dendrograma con distancia Chi-cuadrado y método de Ward.

Por otro lado, se realizó un análisis de correspondencias canónicas, pero previo a este, se estudiaron las correlaciones ( $c$ ) entre las variables de la calidad del agua, mediante el análisis de correlación de Spearman. Cuyo fin es disminuir la dimensionalidad del análisis de correspondencias canónicas excluyendo aquellas variables altamente correlacionadas ( $|c| > 0,6$ ).

El análisis de correspondencias canónicas permite establecer vínculos entre la comunidad de eucariotas, las muestras y las variables fisicoquímicas. Para este análisis, se incluyeron datos recolectados de los tanques T3, T4, T5 y T8 provenientes del sistema de biofloc del invernadero de acuicultura de la EPSG. La inclusión de esta información resulta fundamental para los objetivos del estudio, ya que estos sistemas contienen un biofloc maduro con altos niveles de SST. Este es un parámetro indicador de la carga másica del sistema, que aporta información importante para analizar la evolución de este.

Además, para la realización del análisis de correspondencias canónicas se agrupó a aquellos organismos que pertenecen a un mismo grupo taxonómico y presentaron una abundancia similar en cada una de las semanas de estudio. También, se seleccionaron exclusivamente aquellos que contaron con más de una observación y aquellos que no fueran fotoautótrofos. Los organismos fotoautótrofos estaban presentes únicamente en las muestras de los tanques incorporados posteriormente al estudio, ya que estos estaban expuestos a luz natural, a diferencia de los tanques con los tratamientos, que estaban completamente sellados sin exposición a la luz.

### 3. Resultados

#### 3.1. Calidad del agua

##### 3.1.1. Resumen estadístico

En la Tabla 4 se presentan los resultados obtenidos del resumen estadístico de cada una de las variables de la calidad del agua monitoreadas, T, OD, OD%, S,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ , pH, alcalinidad y SST. Donde  $X \pm s$  es el valor medio, para todo el periodo de estudio, con su desviación estándar y, Mín y Máx son los valores mínimos y máximos observados. Entre ellos, los SST variaron entre los 70 y 320 mg/L. El  $\text{NH}_4^+$  alcanzó un máximo de 1,52 mg/L en el tratamiento con glucosa, 1,07 mg/L en el tratamiento con melaza y 1,73 en el tratamiento con sacarosa. Del mismo modo, el  $\text{NO}_2^-$  alcanzó un máximo de 5,43 mg/L en el tratamiento con glucosa, 4,34 mg/L en el tratamiento con melaza y 6,01 mg/L en el tratamiento con sacarosa.

**Tabla 4.** Resumen estadístico de los parámetros fisicoquímicos

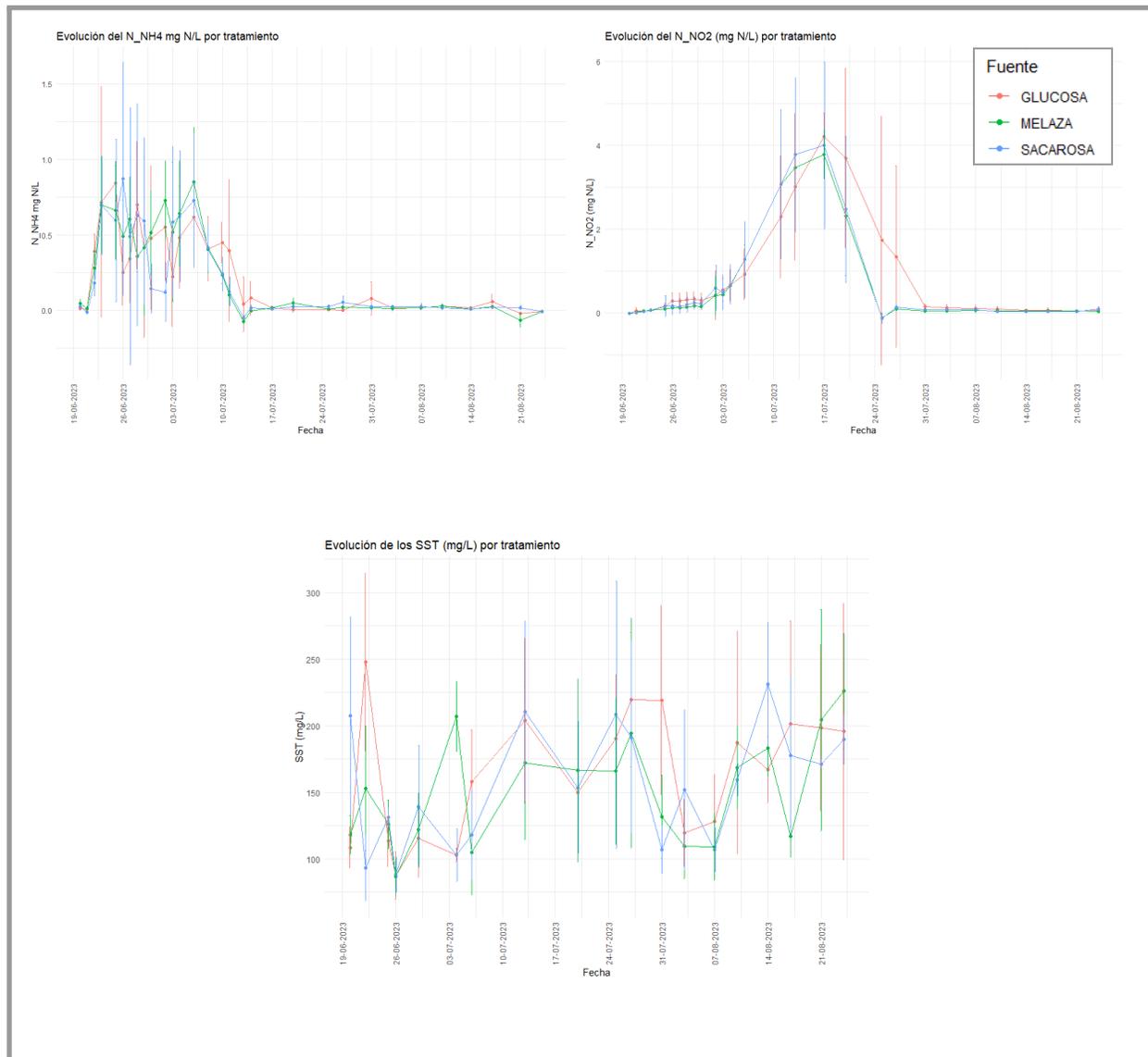
	Glucosa			Melaza			Sacarosa		
	X ± s	Mín	Máx	X ± s	Mín	Máx	X ± s	Mín	Máx
Temperatura (°C)	26,9 ± 0,6	25,4	28,2	26,8 ± 0,6	25,7	28,0	26,9 ± 0,6	25,9	28,0
Oxígeno disuelto (mg/L)	7,05 ± 0,08	6,82	7,25	7,05 ± 0,08	6,90	7,23	7,04 ± 0,08	6,83	7,22
Porcentaje de OD (%)	107,7 ± 0,4	106,2	108,8	107,8 ± 0,3	107,0	108,8	107,7 ± 0,5	106,4	110,0
Salinidad	20,2 ± 0,2	19,8	20,6	20,2 ± 0,2	19,9	20,6	20,2 ± 0,2	19,9	20,5
Amonio (mg N- $\text{NH}_4^+$ /L)	0,25 ± 0,34	0,001	1,52	0,25 ± 0,32	0,001	1,07	0,24 ± 0,39	0,001	1,73
Nitrito (mg N- $\text{NO}_2^-$ /L)	0,76 ± 1,38	0,00035	5,43	0,60 ± 1,13	0,00035	4,34	0,65 ± 1,31	0,00035	6,01
pH	8,22 ± 0,11	7,92	8,42	8,25 ± 0,12	7,93	8,41	8,26 ± 0,13	7,91	8,49
Alcalinidad (mg/L)	180 ± 17	132	209	179 ± 15	142	202	180 ± 16	154	208
SST (mg/L)	164 ± 64	70	320	151 ± 54	73	300	155 ± 59	73	285

**Figura 4.** Variación en el tiempo de los parámetros fisicoquímicos



La Figura 4 muestra una serie de gráficos que ilustran la variación a lo largo del tiempo de T, OD, %OD, S, alcalinidad y PH, organizados por tratamiento y acompañados de su respectiva desviación estándar. Del mismo modo, la Figura 5 muestra la variación de  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$  y SST.

**Figura 5.** Variación de  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$  y SST a lo largo del tiempo



De particular interés son los comportamientos que se observan en el gráfico de  $\text{NH}_4^+$  y de  $\text{NO}_2^-$  de la Figura 5, donde es posible notar una acumulación inicial de  $\text{NH}_4^+$  en las primeras cuatro semanas, que luego alcanza valores mínimos y estables. Cabe destacar que las bajadas repentinas y temporales de amonio, que se observan en el gráfico durante el periodo de acumulación de este, son por la adición externa de carbono orgánico. Inmediatamente posterior a la disminución gradual del  $\text{NH}_4^+$  se presenta una acumulación de  $\text{NO}_2^-$ , el que, a su vez, con el tiempo también se estabiliza en valores mínimos.

Por otra parte, también es importante destacar el gráfico de la evolución de los SST de la Figura 5, ya que este es el parámetro indicador de la carga másica del sistema. Sin embargo, los resultados no entregan información concluyente, se observa una importante variabilidad sin un patrón claro.

### **3.1.2. ANOVA y *Kruskall Wallis***

Las pruebas de comparación aplicadas a los parámetros fisicoquímicos muestran que, para un nivel de confianza del 95%, los valores medios de T (Tabla 5), S (Tabla 5),  $\text{NH}_4^+$  (Tabla 8),  $\text{NO}_2^-$  (Tabla 9), pH (Tabla 10) y alcalinidad (Tabla 11), fueron similares en los tres tratamientos para cada una de las semanas de todo el periodo estudiado.

Por otro lado, se observaron diferencias de OD (Tabla 6) en la semana 4, 5 y 6, de OD% (Tabla 7) en las semanas 1, 5 y 6, y de SST (Tabla 12) en la semana 1.

**Tabla 5.** Resultados Prueba de Kruskal-Wallis en temperatura y salinidad

	Df	Chi-cuadrado	Valor p
Temperatura	2	0,508	0,078
Salinidad	2	3,013	0,222

**Tabla 6.** Resultados ANOVA / Kruskal-Wallis por semana en oxígeno disuelto

OD	ANOVA		P. Kruskal-Wallis	
Fecha	Suma de cuadrados	Pr (>F)	Chi-cuadrado	Valor p
22-06-2023	0,0008	0,492	-	-
29-06-2023	0,0038	0,289	-	-
06-07-2023	0,0001	0,967	-	-
13-07-2023	0,0050	0,035*	-	-
20-07-2023	0,0045	0,012*	-	-
27-07-2023	0,0111	0,002*	-	-
03-08-2023	0,0003	0,850	-	-
10-08-2023	0,0019	0,647	-	-
17-08-2023	0,0043	0,281	-	-
24-08-2023	-	-	4,207	0,122

\* Diferencias significativas con un nivel de confianza del 95%.

**Tabla 7.** Resultados ANOVA / Kruskal-Wallis por semana en porcentaje de oxígeno disuelto

OD%	ANOVA		P. Kruskal-Wallis		
	Fecha	Suma de cuadrados	Pr (>F)	Chi-cuadrado	Valor p
22-06-2023	-	-	-	6,880	0,032*
29-06-2023	0,240	0,230	-	-	-
06-07-2023	0,009	0,761	-	-	-
13-07-2023	-	-	-	4,830	0,089
20-07-2023	0,496	0,003*	-	-	-
27-07-2023	0,249	0,024*	-	-	-
03-08-2023	0,029	0,487	-	-	-
10-08-2023	0,087	0,414	-	-	-
17-08-2023	0,247	0,331	-	-	-
24-08-2023	0,002	0,985	-	-	-

\* Diferencias significativas para un nivel de confianza del 95%.

**Tabla 8.** Resultados ANOVA / Kruskal-Wallis por semana en amonio

Amonio	ANOVA		P. Kruskal-Wallis		
	Fecha	Suma de cuadrados	Pr (>F)	Chi-cuadrado	Valor p
22-06-2023	0,0655	0,152	-	-	-
29-06-2023	0,0617	0,900	-	-	-
06-07-2023	0,0809	0,709	-	-	-
13-07-2023	-	-	-	2,000	0,368
20-07-2023	0,0029	0,202	-	-	-
27-07-2023	0,0040	0,102	-	-	-
03-08-2023	0,0003	0,530	-	-	-
10-08-2023	0,0002	0,630	-	-	-
17-08-2023	0,0023	0,317	-	-	-
24-08-2023	-	-	-	NA	NA

NA: no hay diferencias entre los valores de las muestras.

**Tabla 9.** Resultados ANOVA / Kruskal-Wallis por semana en nitrito

Nitrito	ANOVA		P. Kruskal-Wallis		
	Fecha	Suma de cuadrados	Pr (>F)	Chi-cuadrado	Valor p
22-06-2023	0,0004	0,431	-	-	-
29-06-2023	0,0370	0,438	-	-	-
06-07-2023	0,2573	0,755	-	-	-
13-07-2023	0,8970	0,820	-	-	-
20-07-2023	3,4570	0,611	-	-	-
27-07-2023	-	-	0,622	0,733	-
03-08-2023	0,0098	0,111	-	-	-
10-08-2023	0,0045	0,352	-	-	-
17-08-2023	0,0013	0,671	-	-	-
24-08-2023	0,0051	0,326	-	-	-

**Tabla 10.** Resultados ANOVA / Kruskal-Wallis por semana en pH

pH	ANOVA		P. Kruskal-Wallis		
	Fecha	Suma de cuadrados	Pr (>F)	Chi-cuadrado	Valor p
22-06-2023	0,0005	0,770	-	-	-
29-06-2023	0,0035	0,360	-	-	-
06-07-2023	-	-	5,581	0,061	-
13-07-2023	0,0022	0,162	-	-	-
20-07-2023	0,0007	0,256	-	-	-
27-07-2023	0,0042	0,125	-	-	-
03-08-2023	0,0038	0,069	-	-	-
10-08-2023	0,0078	0,145	-	-	-
17-08-2023	0,0076	0,211	-	-	-
24-08-2023	0,0211	0,095	-	-	-

**Tabla 11.** Resultados ANOVA / Kruskal-Wallis en por semana alcalinidad

Alcalinidad	ANOVA		P. Kruskal-Wallis	
Fecha	Suma de cuadrados	Pr (>F)	Chi-cuadrado	Valor p
22-06-2023	2,0	0,979	-	-
29-06-2023	28,7	0,492	-	-
06-07-2023	20,2	0,479	-	-
13-07-2023	49,6	0,615	-	-
20-07-2023	86,2	0,261	-	-
27-07-2023	54,0	0,494	-	-
03-08-2023	52,7	0,572	-	-
10-08-2023	0,2	0,998	-	-
17-08-2023	26,0	0,596	-	-
24-08-2023	14,0	0,824	-	-

**Tabla 12.** Resultados ANOVA / Kruskal-Wallis por semana en SST

SST	ANOVA		P. Kruskal-Wallis	
Fecha	Suma de cuadrados	Pr (>F)	Chi-cuadrado	Valor p
22-06-2023	36575,0	0,023*	-	-
29-06-2023	895,0	0,712	-	-
06-07-2023	4576,0	0,235	-	-
13-07-2023	2559,0	0,733	-	-
20-07-2023	443,0	0,934	-	-
27-07-2023	-	-	0,8	0,670
03-08-2023	2938,0	0,454	-	-
10-08-2023	1203,0	0,807	-	-
17-08-2023	11266,0	0,255	-	-
24-08-2023	2293,0	0,752	-	-

\* Diferencias significativas para un nivel de confianza del 95%.

### 3.2. Parámetros zootécnicos

La Tabla 13 muestra los resultados obtenidos para los diferentes parámetros zootécnicos. A lo largo del periodo de estudio los animales tuvieron un incremento en peso total entre 7,0 y 9,6 g. El REC obtenido se encuentra entre 1,02 y 1,29 %día<sup>-1</sup> y el FCA entre 1,95 y 2,66.

**Tabla 13.** Parámetros zootécnicos del experimento

	Peso medio inicial (g)	Peso medio final (g)	Incremento de peso (g)	Ratio específico de crecimiento	Factor de conversión alimenticia
<b>Glucosa</b>	6,1 ± 0,1	13,1 ± 2,6	7,0	1,02	2,66
<b>Melaza</b>	5,9 ± 0,1	15,4 ± 2,9	9,6	1,29	1,95
<b>Sacarosa</b>	6,1 ± 0,1	13,6 ± 1,9	7,5	1,07	2,47

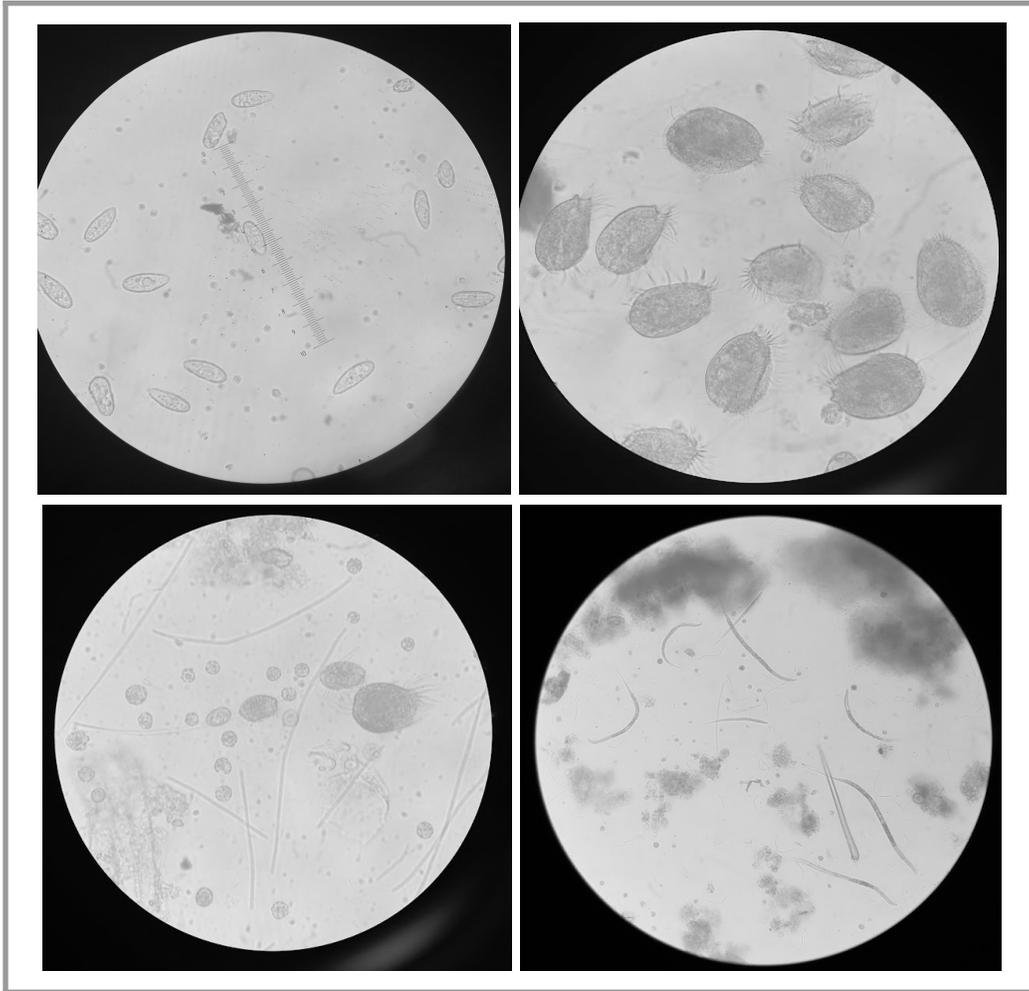
### 3.3. Comunidad de eucariotas

#### 3.3.1. Abundancia de organismos

En total, se identificaron 61 taxones distintos. Algunos organismos se presentan en la Figura 6, entre ellos es posible observar scuticociliados, euplotes, nematodos, spirotricos y miozoos.

A partir de los 61 taxones observados, los organismos se seleccionaron y clasificaron en 24 grupos, conforme se describe en la sección “Materiales y métodos”. Las Tablas 14, 15, 16 y 17 presentan los resultados de la abundancia semanal de cada organismo para el tratamiento con glucosa, melaza, sacarosa y los tanques del invernadero, respectivamente.

**Figura 6.** Fotografías de observaciones en el microscopio



**Tabla 14.** Abundancia de organismos en el tratamiento con glucosa (n° ind/mL)

	Semana									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Amoebozoa	-	-	-	1	-	4	-	-	35	3
Arcellinida	14	57	-	-	1	4	-	7	-	12
Choanoflagellata	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ciliophora	255	-	57	57	28	-	-	425	637	2454
Colurellidae	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
Cryptopharynx	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dinophyceae 1	-	1741	453	-	1954	-	-	35	35	-
Dinophyceae 2	-	864	3993	481	1770	14923	71	-	6194	-
Discosea	-	-	-	-	9	10	15	18	5	25
Euglenoidea	-	-	-	-	396	3879	2733	2230	496	354
Euglenozoa	-	-	28	-	-	-	-	-	-	-
Euplotes 1	-	255	42	170	14	87	-	-	5	-
Euplotes 2	-	-	85	28	524	453	1232	257	460	354
Gastrotricha	-	-	14	-	17	-	-	-	-	3
Heliozoa	-	-	-	-	57	-	28	-	71	-
Holacanthida	-	14	85	-	-	-	-	-	-	-
Myzozoa	-	3709	227	538	807	57	142	4743	5309	1935
Nematoda	-	-	-	-	5	24	30	47	59	137
Scuticociliatia	1699	127	552	142	42	28	396	71	849	165
Spirotrichea	-	-	42	85	42	37	57	18	43	-
Suctoria	-	-	-	-	-	-	-	-	2	3
Thecamoeba	-	-	-	-	-	2	4	2	16	26
Tubulinea	-	-	29	39	5	25	27	36	-	21
Vorticella	-	-	14	170	14	-	-	-	2	3

**Tabla 15.** Abundancia de organismos en el tratamiento con melaza (n° ind/mL)

	Semana									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Amoebozoa	-	-	-	15	8	2	-	2	-	-
Arcellinida	-	28	-	-	-	1	-	-	-	-
Choanoflagellata	-	-	28	-	-	-	-	-	-	-
Ciliophora	127	-	878	113	71	-	-	743	71	425
Colurellidae	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
Cryptopharynx	-	42	-	-	-	-	-	-	-	-
Dinophyceae 1	-	411	311	-	1019	-	-	-	71	-
Dinophyceae 2	-	156	580	85	467	4828	28	-	-	-
Discosea	-	42	14	-	4	3	1	73	2	3
Euglenoidea	-	-	-	-	14	127	425	673	1026	425
Euglenozoa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Euplotes 1	14	538	14	-	14	-	-	-	-	-
Euplotes 2	-	57	1458	793	255	156	340	1203	708	472
Gastrotricha	-	-	-	1	3	3	2	2	5	5
Heliozoa	-	-	-	-	-	-	142	496	-	-
Holacanthida	-	14	-	-	-	14	-	-	-	-
Myxozoa	-	1203	42	28	-	28	52	-	743	5286
Nematoda	-	14	2	3	5	14	26	50	52	86
Scuticociliatia	1246	198	99	85	1161	-	85	212	142	-
Spirotrichea	-	-	42	-	-	1	2	35	-	-
Suctoria	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Thecamoeba	-	-	-	-	-	3	6	20	16	20
Tubulinea	-	-	1	18	1	2	3	-	5	8
Vorticella	-	-	14	-	28	28	-	-	2	-

**Tabla 16.** Abundancia de organismos en el tratamiento con sacarosa (n° ind/mL)

	Semana									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Amoebozoa	-	-	-	-	-	-	3	2	11	6
Arcellinida	-	-	85	-	-	-	-	-	-	-
Choanoflagellata	14	28	14	28	-	-	-	-	-	-
Ciliophora	212	71	85	311	28	-	-	1487	142	94
Colurellidae	-	-	-	29	1	-	-	-	-	-
Cryptopharynx	-	28	99	57	-	-	-	-	-	94
Dinophyceae 1	-	481	99	-	1260	-	-	-	-	-
Dinophyceae 2	-	297	439	28	1812	6768	-	-	-	-
Discosea	-	-	14	1	5	2	1	-	-	6
Euglenoidea	-	-	-	-	28	142	1619	1310	708	2926
Euglenozoa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Euplotes 1	-	127	28	-	-	14	-	-	-	-
Euplotes 2	-	14	156	311	14	340	208	743	779	661
Gastrotricha	-	-	-	2	15	3	4	75	2	-
Heliozoa	-	-	-	-	-	-	42	-	177	-
Holacanthida	-	-	57	-	-	-	-	-	-	-
Myxozoa	-	1005	566	396	1826	99	585	460	248	2643
Nematoda	-	-	14	4	6	57	53	74	124	111
Scuticociliatia	2421	736	184	765	142	85	42	71	-	755
Spirotrichea	-	-	28	-	14	28	2	108	9	6
Suctoria	-	-	14	-	-	-	-	-	2	3
Thecamoeba	-	-	-	-	-	2	2	2	23	24
Tubulinea	-	-	72	96	16	14	2	7	14	-
Vorticella	-	-	28	1	-	-	-	-	5	-

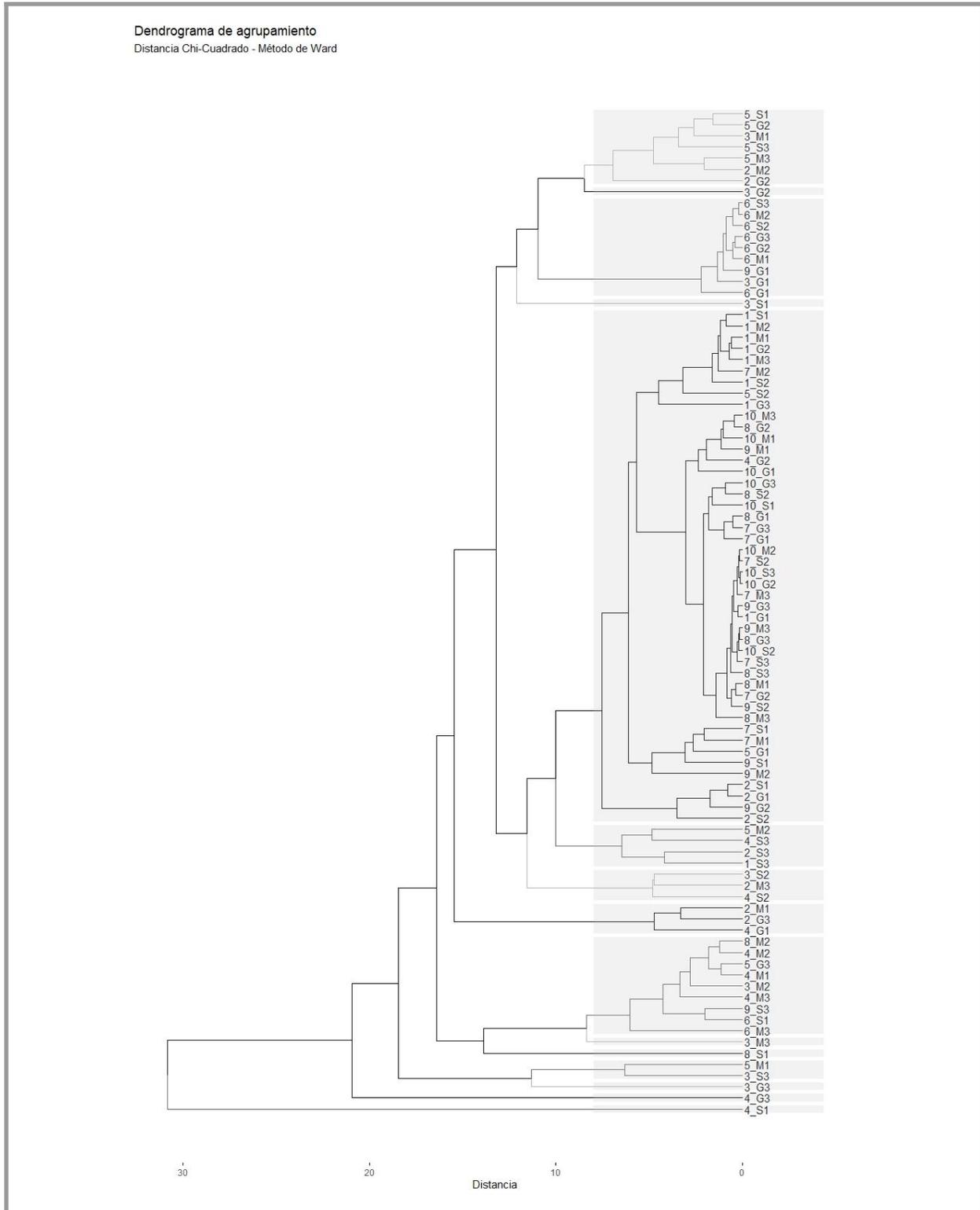
**Tabla 17.** Abundancia de organismos en los tanques del invernadero (n° ind/mL)

Tanque	T1	T5	T8	T1	T5	T1	T3	T4	T5
Semana	27	27	27	27,5	27,5	28	28	28	28
Amoebozoa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arcellinida	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Choanoflagellata	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ciliophora	2124	2124	-	-	4247	8495	-	-	-
Colurellidae	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cryptopharynx	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dinophyceae 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dinophyceae 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Discosea	-	-	-	-	-	-	-	90	-
Euglenoidea	4247	1062	5097	8495	8495	11326	2124	14158	16990
Euglenozoa	-	3186	849	-	-	-	-	90	5663
Euplotes 1	-	34	-	-	-	-	-	-	-
Euplotes 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gastrotricha	-	203	27	-	68	-	-	-	-
Heliozoa	4247	2124	-	-	-	5663	-	2832	-
Holacanthida	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Myzozoa	-	1062	2548	10619	10619	-	-	-	5663
Nematoda	-	-	297	-	-	90	135	-	-
Scuticociliatia	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Spirotrichea	-	-	-	68	-	2832	-	180	-
Suctoria	406	2191	-	-	135	-	2191	180	90
Thecamoeba	-	-	-	-	-	90	-	2832	-
Tubulinea	-	-	-	-	68	-	-	90	-
Vorticella	-	5343	-	270	270	2832	-	90	2832

### ***3.3.2. Análisis de agrupamientos***

El dendrograma construido (Figura 6), muestra importantes similitudes en las semanas 7, 8, 9 y 10, con presencia de los tres tratamientos. Las menores distancias, es decir, mayores similitudes, se encuentran principalmente en la semana 10. Este grupo de muestras presenta también importantes similitudes con la semana 1, conformando entre todos ellos el mayor grupo. Otro grupo que destaca por su alta similitud, es el de la semana 6, en el que también no se observan diferencias entre tratamientos. Además, se observan otros dos grandes grupos, pero con menores similitudes que los anteriores, uno de ellos conformado principalmente por muestras de la semana 5 y en menor medida de la 2, el otro, conformado por diferentes semanas pero principalmente por el tratamiento con melaza. El resto de muestras no presenta similitudes importantes con otras muestras, entre ellas se observan los tres tratamientos y en su mayoría corresponde con las semanas 2, 3 y 4 del periodo de estudio.

**Figura 7.** Dendrograma basado en la abundancia de los microorganismos



Las variables son las diferentes muestras, el primer número indica la semana de la muestra, G/M/S corresponde al tratamiento y el último número 1/2/3 es la réplica.

### 3.3.3. Análisis de correspondencias canónicas

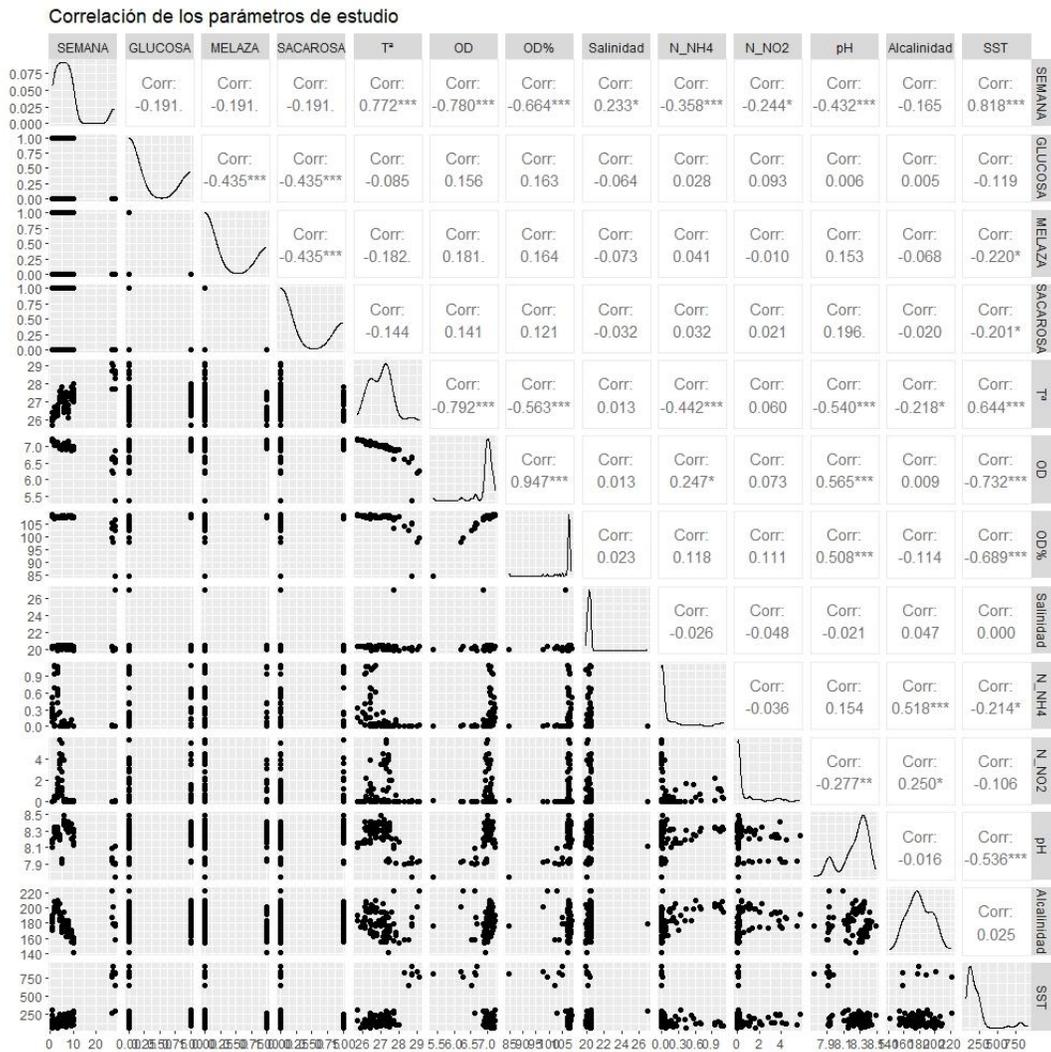
El análisis de correlación de Spearman entre las variables estudiadas (Figura 8), da a conocer una correlación significativa entre los SST con las variables OD ( $c = -0,73$ ), OD% ( $c = -0,69$ ), T ( $c = 0,64$ ) y semana ( $c = 0,82$ ). Por lo tanto, con el objetivo de reducir la dimensionalidad en el análisis de correspondencias canónicas, se ha optado por excluir las variables OD, OD% y T del estudio. Mientras que, por los objetivos inherentes del estudio, se decide mantener SST y semana.

El modelo del análisis de correspondencias canónicas desarrollado (Figura 9) presenta una relación estadísticamente significativa entre la comunidad de eucariotas y las variables estudiadas (Tabla 18).

**Tabla 18.** Resultados del ANOVA al modelo de correspondencias canónicas

	Df	Chi-cuadrado	F	Pr (>F)
<b>Modelo</b>	10	2,01	3,59	0,001
<b>Residuos</b>	88	4,91		

**Figura 8.** Matriz de correlación entre las variables de estudio

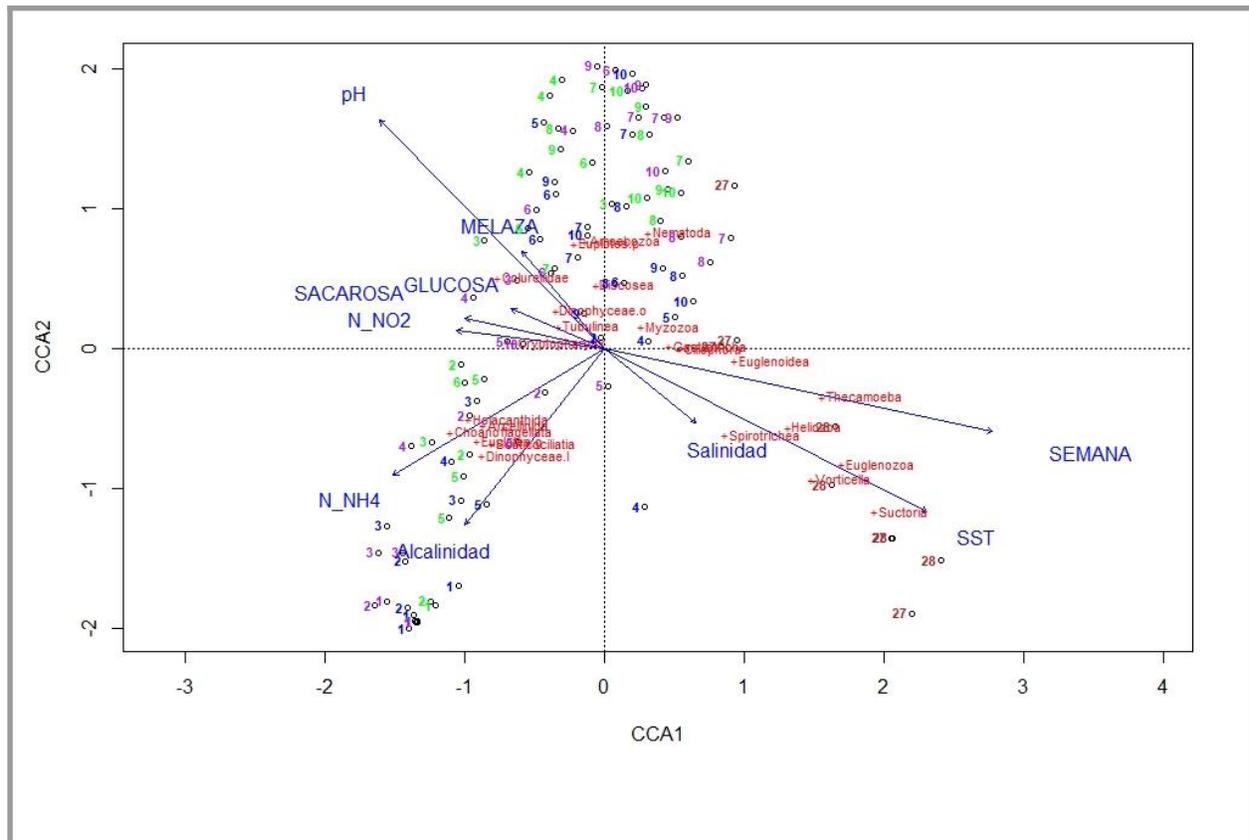


En el análisis de correspondencias canónicas (Figura 9 y 10) se pueden identificar cuatro grandes grupos de organismos con similitudes significativas. Entre ellos, un grupo de organismos estrechamente vinculados al  $\text{NH}_4^+$ , otro grupo al nivel de SST, algunos relacionados con la semana de estudio, y otro gran grupo de organismos relacionados entre sí, pero sin una variable aparente que los describa. Además, se observan algunos organismos que, individualmente o en grupos pequeños, se relacionan con el resto de variables.

Se observa una robusta asociación positiva de los suctores, vorticelas, euglenozoos, heliozoos y espirotricos con los SST. También destaca la relación de holacanthida, arcellinidas, coanoflagelados, euplotes, scuticociliados y dinofíceas con el amonio, estos dos últimos también relacionados con la alcalinidad. En cuanto a las semanas transcurridas, se observa una relación entre estas con eugleonideas, tecamebas, gastrotricos y ciliados. El organismo *Cryptopharynx sp.* con el  $\text{NO}_2^-$ , amebozoos tubulinea con el tratamiento con glucosa, y dinofíceas con el pH. Por otro lado, también se observan organismos sin relación aparente con alguna variable, entre ellos nematodos, otra especie de euplotes, amebozoos discosea y miozoos.

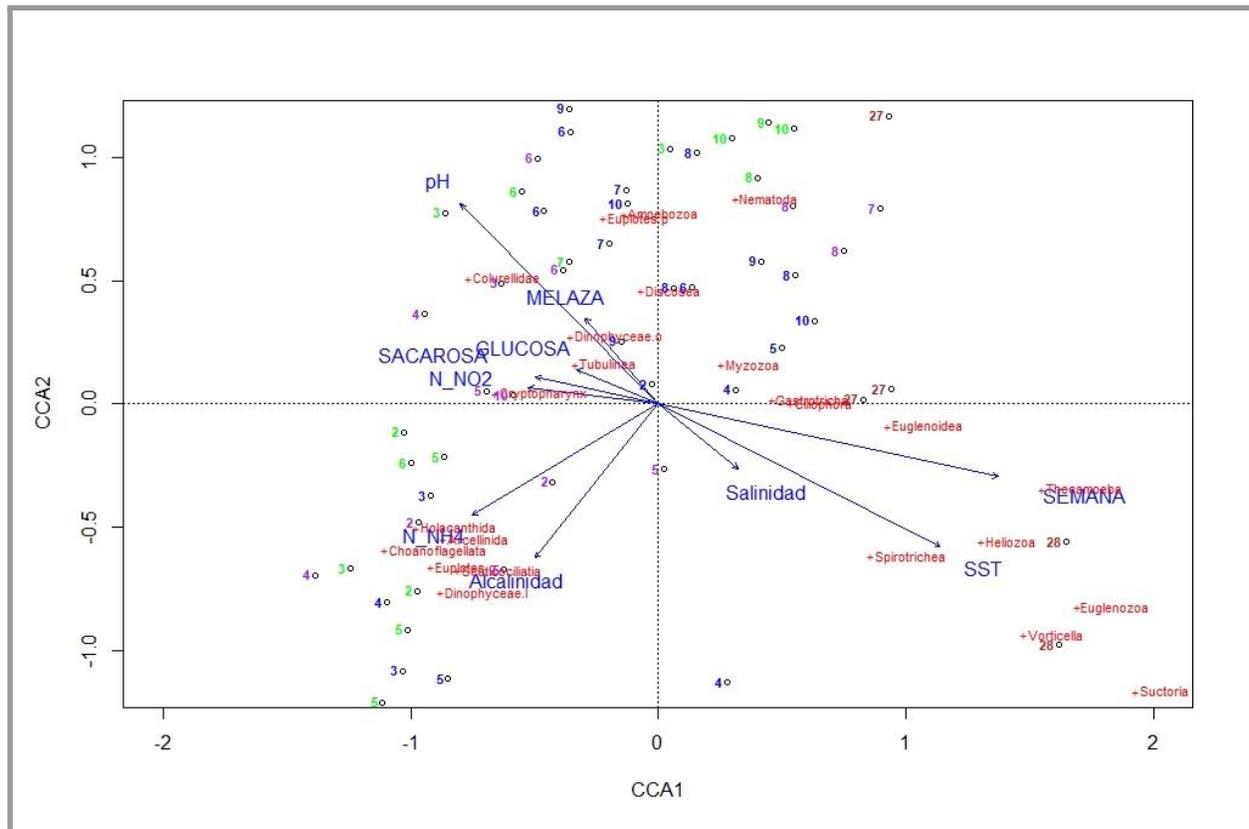
Respecto a las muestras, se presentan mayoritariamente las de las primeras semanas relacionadas con altos niveles de  $\text{NH}_4^+$  y alcalinidad, mientras que, opuestas a estas, se encuentran las muestras de las últimas semanas. Además, se observan similitudes por semana entre los tres tratamientos.

**Figura 9.** Diagrama del análisis de correspondencias canónicas



En las etiquetas de los diagramas los números de diferentes colores son las etiquetas de cada muestra, donde el número indica la semana, y el color depende del tratamiento, azul-glucosa, verde-melaza y morado-sacarosa.

**Figura 10.** Acercamiento en el diagrama del análisis de correspondencias canónicas



En las etiquetas de los diagramas los números de diferentes colores son las etiquetas de cada muestra, donde el número indica la semana, y el color depende del tratamiento, azul-glucosa, verde-melaza y morado-sacarosa.

## 4. Discusión

### 4.1. Calidad del agua y parámetros zootécnicos

Los parámetros de la calidad del agua siguieron el mismo comportamiento en los diferentes tratamientos, con ligeras variaciones no significativas, y se mantuvieron dentro de los rangos operacionales establecidos y aceptables para la BFT asociada al cultivo de *P. vannamei*. Una excepción temporal fue el nivel de  $\text{NH}_4^+$  que superó el 1 mg N- $\text{NH}_4^+$ /L en los tanques, sin embargo, esto era esperable porque ocurrió una vez cuando el biofloc estaba en proceso de maduración y aún así se controló y no alcanzó a ser un nivel tóxico para los animales.

La evolución del amonio y nitrito, descrito en los resultados y presentados en los gráficos de la Figura 5, se atribuye al proceso de nitrificación llevado a cabo por las bacterias, un hito crucial en BFT para el mantenimiento de la calidad del agua y el buen funcionamiento del sistema.

Inicialmente, se observa una acumulación de amonio, pero luego este es transformado en nitrito por la población de bacterias nitrosomonas. Esto resulta en la disminución del amonio y el aumento del nitrito. Luego, es posible notar que el nitrito disminuye, ya que las bacterias nitrobacter convierten este nutriente en nitrato. Esta dinámica permite conocer el periodo de maduración del biofloc, ya que indica cuando el biofloc es capaz de convertir todo el nitrógeno amoniacal producido en el sistema en nitrato, manteniendo los niveles de estos nutrientes óptimos para el cultivo.

No se encontraron diferencias estadísticas en los niveles de amonio y nitrito entre los tres tratamientos para cada una de las semanas, sugiriendo que el tiempo de maduración del biofloc y

la capacidad de asimilación es similar en los tres tratamientos. Sin embargo, el tratamiento con sacarosa alcanzó la concentración más alta de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_2^-$ , mientras que, el tratamiento con melaza presentó la menor concentración máxima alcanzada. Por otro lado, el tratamiento con glucosa fue el que en el proceso de maduración del biofloc presentó una disminución más gradual de estos nutrientes, mientras que en el tratamiento con melaza y sacarosa fue más rápido. Esto podría ser un indicador de que el tratamiento con melaza presenta mayor eficacia para controlar los niveles de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_2^-$ .

Por otro lado, la evolución observada en los SST no muestra claramente una acumulación de estos, como se esperaría. La introducción de alimento y fuentes de carbono en el sistema conlleva a un aumento en la materia orgánica de este y su carga másica, por ende se registraría un aumento en el nivel de SST con el tiempo. Sin embargo, este proceso no se pudo observar en el estudio, posiblemente porque el sistema desarrollado es pequeño y no permite que se obtengan valores representativos de los SST.

Respecto al manejo zootécnico, en comparación con los resultados de Llario et al. (2019), que muestran un manejo zootécnico eficiente con un FCA entre 1,81 y 1,96, es posible determinar que este estudio evidencia un manejo inadecuado, ya que los FCA registrados son notablemente superiores, entre 1,95 y 2,66. Este manejo inapropiado, posiblemente está asociado a la dificultad que se presentó al momento de controlar el sistema, debido a su reducido volumen y baja biomasa. Sin embargo, es importante señalar que los objetivos de este estudio no son valorar el manejo zootécnico, sino la comunidad de eucariotas asociada, y por lo tanto, los resultados del manejo no plantean inconvenientes para los objetivos de esta investigación.

## 4.2. Comunidad de eucariotas

El dendrograma mostró que para los diferentes tratamientos, la comunidad de eucariotas es similar al principio y al final del estudio. Las diferencias se presentaron entre la semana 2 y 5. Esto puede ser consecuencia de que los primeros organismos en establecerse en el sistema no tienen preferencia por una de las tres fuentes de carbono administradas. Luego las diferencias se pueden explicar por la variabilidad del sistema durante el proceso de maduración del biofloc, asociado a la acumulación de amonio y nitrito, como también a la adición de una fuente de carbono externa. Lo que afecta a la actividad microbiana cambiando su abundancia y diversidad. Pero luego, una vez que el sistema se estabiliza, nuevamente no se observan diferencias entre los tratamientos. Por lo tanto, también es posible inferir que las diferencias observadas entre la semana 2 y 5, son como consecuencia de la variabilidad mencionada y no del tratamiento, ya que además, en el dendrograma no es posible notar similitudes en esas semana entre las réplicas del mismo tratamiento.

Además, la comunidad de eucariotas mostró diferencias en su diversidad y abundancia de especies con respecto a las variables estudiadas. Estos cambios pueden estar determinados por la disponibilidad de nutrientes y materia orgánica, tipo de alimentación, ausencia-presencia de luz, tiempo del biofloc, entre otros. Pero, en general, el diagrama muestra una evolución temporal de

la comunidad de eucariotas descrito principalmente por el nivel de  $\text{NH}_4^+$ , de SST y las semanas transcurridas.

En el diagrama, es posible asociar la comunidad de eucariotas al proceso de maduración del biofloc. Por un lado, se tiene un biofloc inmaduro, con altos niveles de  $\text{NH}_4^+$ , al que la mayor parte de las muestras de las semanas iniciales se encuentran asociadas, y donde predominan los organismos holacanthida, coanoflagelados, amebas arcellas, coanoflagelados, euplotes, scuticociliados y dinofíceas. Luego, con la disminución del  $\text{NH}_4^+$  y el aumento del  $\text{NO}_2^-$ , destaca el organismo *Cryptopharynx sp.* Además, inmediatamente previo al estado maduro del biofloc, se observa el rotífero Colurellidae, dinofíceas y amebas tubulinea. Por otro lado, se identifican los organismos asociados a un biofloc maduro, que corresponde con las últimas semanas de estudio, donde significativamente vinculados a estas se encuentran nematodos, amebozoos, euplotes y miozoos. Además, en este periodo de un biofloc maduro, pero significativamente asociado a un alto nivel de SST, destacan los suctores, vorticelas, euglenozoos, heliozoos y spirotricos, y significativamente relacionado con las semanas transcurridas destacan gastrotricos, ciliados, euglenoideos y tecamebas.

En cuanto a los organismos altamente asociados al nivel de SST, suctores, vorticelas, espirotricos, euglenozoos y heliozoos. Es importante destacar que los dos primeros son organismos sésiles que viven anclados al fango, lo que explica su alta relación con esta variable. Además, la disponibilidad de alimento, relacionada con los SST, tanto por la materia orgánica, como por la comunidad microbiana que habita en ellos, puede condicionar su población, al igual que con los espirotricos, euglenozoos y heliozoos.

Por otro lado, heliozoos Holacanthida, amebas arcellas, coanoflagelados, euplotes, scuticociliados y dinofíceas, que se relacionaron con los niveles de  $\text{NH}_4^+$ . Estos organismos alcanzaron el peak de su población dentro de las tres primeras semanas. Semanas en las que ocurrió la acumulación de  $\text{NH}_4^+$  y se añadió carbono orgánico disuelto de las diferentes fuentes de tratamiento. Por lo que la relación entre estos organismos y el nutriente, puede deberse a la preferencia o compatibilidad de estos organismos con esta fuente de nitrógeno y/o de carbono. Un ejemplo de esto lo describe Hattenrath-Lehmann et al. (2021), donde muestra que la dinofícea mixotrofa *Dinophysis acuminata* presenta las tasas de absorción y los coeficientes de afinidad más altos con el amonio, a diferencia del nitrato, con el que de hecho no se observó crecimiento en esta especie. Esto podría destacar a los heliozoos, amebas, coanoflagelados, euplotes y dinofíceas, como indicadores de altos niveles de  $\text{NH}_4^+$ , ya que su población sufrió un fuerte descenso al mismo tiempo que disminuyó el nivel de este nutriente. Mientras que, en el caso de los scuticociliados, estos estuvieron presente a lo largo de todo el periodo de estudio. Por lo que, su relación con el  $\text{NH}_4^+$  puede más bien ser explicada por el tiempo del biofloc. Estos organismos fueron los pioneros en la colonización de los tanques, los primeros en observarse y los dominantes durante la primera semana, prácticamente los únicos presentes en este periodo, donde alcanzaron su mayor población. Es posible que la ausencia de depredadores y organismos competidores como también la disponibilidad de alimento, con el crecimiento de la población de bacterias, hayan favorecido esta dinámica.

El organismo *Cryptopharynx sp.* se observó principalmente en el tratamiento con sacarosa, su población estuvo presente mayoritariamente entre las semanas 2 y 4, con un fuerte descenso después de esto. Por lo que, al igual que la relación entre el  $\text{NH}_4^+$  con los organismos mencionados en el párrafo anterior, *Cryptopharynx sp.* puede presentar una preferencia o

compatibilidad con el nitrógeno en forma de  $\text{NO}_2^-$ , mostrando ser un posible indicador de altos niveles de este.

## 5. Conclusiones

Tanto el tiempo de maduración del biofloc, como la estructura de la comunidad de eucariotas al inicio y final del estudio, no mostraron diferencias significativas respecto a las tres fuentes de carbono evaluadas. Sin embargo, se observaron diferencias en las semanas intermedias de estudio, durante el proceso de maduración del biofloc. A modo general, la comunidad de eucariotas pionera no presenta preferencias por una fuente de carbono particular, luego la comunidad se ve afectada por la variabilidad del sistema con la adición de carbono y acumulación de nitrógeno, alterando la actividad microbiana y favoreciendo las diferencias entre tratamientos, pero luego, con las variables estables, la comunidad de eucariotas alcanza el equilibrio y no difiere entre tratamientos.

Las principales variables que describen la evolución de la comunidad de eucariotas, son el proceso de maduración del biofloc, la carga másica del sistema y el tiempo de los flóculos.

Durante el estado inmaduro del biofloc, destacan los organismos heliozoos Holacanthida, amebas arcenas, coanoflagelados, euplotes, scuticociliados y dinofíceas. Además, se identifican organismos relacionados a un alto nivel de carga másica en el sistema, suctores, vorticelas, spirotricos, euglenozoos y heliozoos. Y otros estrechamente vinculados a un mayor tiempo del biofloc, gastrotricos, euglenoideos y tecamebas.

Con el estudio se lograron los objetivos de conocer la evolución de la comunidad de eucariotas, relacionado a la carga másica y el tiempo de los flóculos. Además, se identificó una fuerte relación con el nivel de amonio, que permite explicar la estructura de la comunidad de eucariotas en el proceso de maduración del biofloc.

Las principales limitaciones enfrentadas para el estudio se produjeron por la dificultad en obtener resultados representativos de la carga másica del sistema. A pesar de ello, se obtuvieron resultados interesantes que se pueden mejorar con un sistema BFT de mayor volumen y con una mayor biomasa de animales.

En conclusión, la comunidad de eucariotas mostró una evolución característica descrita por el estado de maduración del biofloc, la carga másica del sistema y el tiempo de los flóculos. Con ello, se destaca la importancia de desarrollar más estudios relacionados a la caracterización de la comunidad que puedan proporcionar conocimientos valiosos para obtener el máximo provecho de BFT.

## Referencias

- Bagi, A., Poersch, L. H., & Ravagnan, E. (2023). *A desktop study on biofloc technology*. NORCE Climate and Environment. ISBN 978-82-8408-300-1
- Bendschneider, K., & Robinson, R. J. (1952). A New Spectrophotometric Method for the Determination of Nitrite in Sea Water. *Journal of Marine Research*, *11*, 87-96.
- Emerenciano, M., Ballester, E. L. C., Cavall, R. O., & Wasielesky, W. (2011). Biofloc technology application as a food source in a limited water exchange nursery system for Pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817). *Aquaculture Research*, *43*(3), 447 - 457. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2011.02848.x
- Hattenrath-Lehmann, T. K., Nanjappa, D., Zhang, H., Yu, L., Goleski, J. A., Lin, S., & Gobler, C. J. (2021). Transcriptomic and isotopic data reveal central role of ammonium in facilitating the growth of the mixotrophic dinoflagellate, *Dinophysis acuminata*. *Harmful Algae*. DOI: 10.1016/j.hal.2021.102031
- Khanjani, M. H., Mohammadi, A., & Coelho Emerenciano, M. G. (2022). Microorganisms in biofloc aquaculture system. *Aquaculture Reports*, *26*. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101300>
- Koroleff, F. (1969). Direct Determination of Ammonia in Natural Waters as Indophenol Blue. *ICES*, *3*, 10-230.
- Kureshy, N., & Davis, D. (2002). Protein requirement for maintenance and maximum weight gain for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, *204*, 125-143. DOI: 10.1016/S0044-8486(01)00649-4
- Llario, F., Falco, S., Sebastiá-Frasquet, M.-T., Escrivá, J., Rodilla, M., & Poersch, L. H. (2019). The Role of *Bacillus amyloliquefaciens* on *Litopenaeus vannamei* During the Maturation

- of a Biofloc System. *Marine Sciencia and Engineering*, 7(228).  
[doi.org/10.3390/jmse7070228](https://doi.org/10.3390/jmse7070228)
- Manan, H., Zhong Moh, J. H., Kasan, N. A., Suratman, S., & Ikhwanuddin, M. (2016). Identification of biofloc microscopic composition as the natural bioremediation in zero water exchange of Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*, culture in closed hatchery system. *Applied Water Sciencie*, 7(5). DOI: 10.1007/s13201-016-0421-4
- Panigrahi, A., Saranya, C., Sundaram, M., Vinoth Kannan, S. R., Das, R. R., Satish Kumar, R., Rajesh, P., & Otta, S. K. (2018, Octubre). Carbon: Nitrogen (C:N) ratio level variation influences microbial community of the system and growth as well as immunity of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in biofloc based culture system. *Fish & Shellfish Immunology*, 81, 329-337. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.07.035>
- Sgnaulin, T., Pinho, S. M., Durigon, E. G., Thomas, M. C., de Mello, G. L., & Coelho Emerenciano, M. G. (2021). Culture of pacu *Piaractus mesopotamicus* in biofloc technology (BFT): insights on dietary protein sparing and stomach content. *Aquacult Int*, 29, 2319–2335. DOI: 10.1007/s10499-021-00748-9
- Utermöhl, H. (1958). Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitt. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol.*, 9(1), 1-38. DOI: 10.1080/05384680.1958.11904091



**ANEXO I. Relación del trabajo  
con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la Agenda 2030**

**Anexo al Trabajo de Fin de Grado y Trabajo de Fin de Máster**  
Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030

Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS)

<b>Objetivos de Desarrollo Sostenibles</b>	<b>Alto</b>	<b>Medio</b>	<b>Bajo</b>	<b>No procede</b>
ODS 1. Fin de la pobreza				X
ODS 2. Hambre cero		X		
ODS 3. Salud y bienestar			X	
ODS 4. Educación de calidad				X
ODS 5. Igualdad de género				X
ODS 6. Agua limpia y saneamiento		X		
ODS 7. Energía asequible y no contaminante				X
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico			X	
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras	X			
ODS 10. Reducción de las desigualdades				X
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles				X
ODS 12. Producción y consumo responsables	X			
ODS 13. Acción por el clima				X
ODS 14. Vida submarina	X			
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres				X
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas				X
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos				X

**Descripción de la alineación del TFG/TFM con los ODS con un grado de relación más alto**

La tecnología biofloc es un sistema innovador de producción acuícola sostenible, su impacto en el medio ambiente es considerablemente menor que los sistemas de producción acuícola tradicionales. Disminuye los vertidos en el mar por lo que disminuye el daño a la vida submarina.