

TECNOLOGÍA BIOFLOC: ENGORDE DE LISAS

PROYECTO FISHFLOC



CONTENIDO

1. Introducción	3
2. Objetivos	3
3. Materiales y métodos.....	3
3.1. Peces	3
3.2. Sistema experimental	4
3.3. Activación y desarrollo del biofloc	4
3.4. Mantenimiento del sistema experimental	4
3.5. Alimentación y relación C:N	5
3.6. Parámetros físico-químicos del agua.....	5
3.7. Parámetros zootécnicos	6
3.8. Análisis microbiológico	6
4. Resultados y discusión	6
4.1. Parámetros físico-químicos del agua	6
4.2. Parámetros zootécnicos	9
4.3. Análisis microbiológico	10
5. Observaciones	10
5.1. Comportamiento de las lisas.....	10
6. Conclusión	10
7. Bibliografía.....	11
ANEXO I.....	12
Reportaje fotográfico	12

1. INTRODUCCIÓN

La Tecnología Biofloc (BFT, sus siglas en inglés) surgió como estrategia para la eliminación de compuestos nitrogenados tóxicos (amonio y nitrito fundamentalmente) producidos en acuicultura intensiva en tierra, como alternativa a la renovación de agua o a la utilización de biofiltros para potenciar el proceso de nitrificación en los sistemas de producción (Avnimelech, 1999). El sistema biofloc regulan la calidad de agua a través de la adición de carbohidratos al sistema, los cuales estimula el crecimiento y proliferación de bacteria heterótrofas que asimilan el amonio y lo transforman en proteína microbiana. Esta proteína microbiana, a su vez, constituye una fuente de alimento disponible para los peces en cultivo (Avnimelech, 1999). Los mugílidos o lisas son especies de interés económico y con elevado potencial para su cultivo debido a su hábito de alimentación omnívoro, a su tolerancia a la baja calidad del agua y a su naturaleza eurihalina y euriterma (Vinatea et al., 2018).

Con el objetivo de aportar más luz para dirimir la aplicabilidad de esta tecnología en la acuicultura de las lisas, dentro del proyecto FISHFLOC se ha abordado la realización de una prueba piloto para evaluar el cultivo de engorde de lisas con BFT.

2. OBJETIVOS

Estudiar la viabilidad del uso de la Tecnología Biofloc (BFT) para el cultivo de juveniles de lisas en fase de engorde en base a la calidad del agua del sistema, al crecimiento, conversión del alimento y estado de salud de los peces cultivados.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. PECES

Los juveniles de lisas (*Mugil cephalus* y *Liza aurata*) se obtuvieron del medio natural y se transportaron a los laboratorios húmedos de CTAQUA, con un peso medio de 109 ± 34 g. El lote de peces, tras su llegada, se mantuvo en un sistema de recirculación para su aclimatación durante 20 días. Tras un primer muestreo, donde se determinó el peso medio y la homogeneidad del lote, se sembraron un total de 34 peces en el tanque de cultivo con BFT, con una densidad de carga de $1,85 \text{ kg/m}^3$.

Previo a la siembra, se evaluó el comportamiento de las lisas y su grado de adaptación al sistema con BFT. Para ello se introdujeron en el tanque con BFT varios peces en una jaula de red y se observó su estado de salud y bienestar durante varios días.

El desarrollo de las actividades descritas se muestra en la **figura 1**.

3.2. SISTEMA EXPERIMENTAL

El sistema con BFT se desarrolló al aire libre en un tanque individual rectangular de 2200 L. El tanque estaba equipado con un tubo de nivel, una válvula de desagüe, y seis mangueras porosas de aireación conectadas a un soplante, ubicadas en la base y paralelas a la longitud del tanque. La superficie del tanque se cubrió con una red de plástico blanca plegable para generar sombra los días de calor y evitar el salto de los peces hacia fuera durante el cultivo.

El montaje del sistema experimental se muestra en la **figura 2**.

3.3. ACTIVACIÓN Y DESARROLLO DEL BIOFLOC

El tanque de cultivo se llenó con agua salada limpia y se mantuvo con aireación abundante. Se añadió 2,5mg/L de NH_4Cl como fuente de nitrógeno. Como fuente de carbono se añadió melaza en una cantidad sobreestimada (relación C:N superior a 20:1) repartida en tres días, y 100 g de sedimento seco de estero como aporte extra de materia orgánica y bacterias para acelerar la formación de los flóculos. Adicionalmente, se añadieron 3-4 litros de un cultivo auxiliar de biofloc, cultivado en un cubo con aireación tres semanas antes del inicio de la prueba. El fondo del tanque se removió diariamente de forma manual para resuspender en el agua las posibles partículas orgánicas sedimentadas. El sistema se mantuvo en desarrollo durante 20 días. Tras alcanzar valores de sólidos en suspensión (SS) y sólidos en suspensión totales (TSS) de 2 ml/L y 27 mg/L, respectivamente, se procedió a la siembra de las lisas. El cultivo de las lisas en el sistema BFT duró 32 días (del 26/04/21 al 28/05/21).

El desarrollo de las actividades descritas se muestra en la **figura 3**.

3.4. MANTENIMIENTO DEL SISTEMA EXPERIMENTAL

Diariamente se comprobó el estado de la aireación del sistema y se aseguró que el movimiento de la columna de agua fuera el adecuado para la suspensión de las partículas orgánicas, y evitar así su sedimentación y favorecer la actividad de las bacterias heterótrofas (Avnimelech, 2015).

Una vez por semana se procedió a la limpieza de los bordes del tanque para la retirada de los residuos orgánicos acumulados.

Cuando la pérdida de agua por evaporación superó el 5 -10% del volumen total, se procedió al llenado del tanque con agua salada limpia.

3.5. ALIMENTACIÓN Y RELACIÓN C:N

Durante el cultivo con BFT, las lisas fueron alimentadas 2 veces al día durante 6 días a la semana, con una ración diaria del 0,5 – 1 % del peso corporal. El pienso suministrado contuvo 51% de proteína (relación C:N en el pienso de 6,3:1) y el diámetro del pellet fue de 2mm.

La relación C:N en el sistema fue 20:1, adecuada para la producción de biofloc y el cultivo de lisas (Vinatea et al., 2018) . Para mantener esta relación C:N se empleó melaza (40% de C) como fuente de carbono extra. La cantidad de melaza diaria añadida al sistema se calculó aplicando la fórmula descrita por De Schryver et al. (2008). Adicionalmente, cuando el nivel de nitrógeno amoniacal total (TAN) alcanzó valores próximos a 0,5 mg/L se añadió una cantidad extra de melaza 20 veces superior a la de TAN (Avnimelch, 1999).

3.6. PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DEL AGUA

Diariamente se midió la temperatura (°C), el oxígeno disuelto (mg/L y % de saturación), salinidad (g/L), pH, niveles de TAN (mg/L) y Nitrito (mg/L), sólidos en suspensión (SS) (ml/L) y sólidos en suspensión totales (TSS) (mg/L). La medición de los parámetros se realizó generalmente a las misma hora del día (10 -11 am).

Para medir los SS se recogió 1000 ml de agua del tanque con un cono Imhoff y se obtuvo el volumen de sedimento tras 30 minutos en reposo (Avnimelech, 2007). Para la medición de TSS se tomó una muestra de 100 ml de agua removida del tanque y se filtró por un filtro Whatman GFC de 1,2 µm (Avnimelech, 2015 & Azim et al.,

2008). El filtro se pesó antes de su uso, y posteriormente se secó a 105°C durante 1 hora y se pesó de nuevo.

La muestra de agua filtrada se empleó para medir TAN, nitritos y nitratos, pH y salinidad. Para la medición de los compuestos nitrogenados se emplearon kits de test colorimétricos (MColortest™).

El desarrollo de las actividades descritas se muestra en la **figura 4**.

3.7. PARÁMETROS ZOOTÉCNICOS

Las lisas se pesaron individualmente al inicio y al final del cultivo con BFT. Los parámetros zootécnicos analizados fueron los siguientes:

Tasa de crecimiento específico (SGR) (%/ día) = $[(\ln \text{ peso final (g)} - \ln \text{ peso inicial (g)}) / \text{días}] * 100$

Factor de conversión (FCR) = $\text{Alimento ingerido (g)} / \text{Incremento de peso (g)}$

Incremento de peso (g) = $\text{Peso final (g)} - \text{Peso inicial (g)}$

Supervivencia (%) = $(\text{número de peces final} / \text{número de peces inicial}) * 100$

El desarrollo de las actividades descritas se muestra en la **figura 5**.

3.8. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

A lo largo del cultivo con BFT se tomaron dos muestras de agua para la observación al microscopio de la evolución y el desarrollo de la comunidad microbiana presente en los flóculos. Las muestras se tomaron 8 días previos a la siembra de las lisas (día - 8 de cultivo) y 15 días posteriores a la misma (día 15 de cultivo).

Al final del cultivo se realizó un recuento de bacterias en placa con TSA. La muestra de agua se filtró por un filtro GFC y se sembraron tres diluciones (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}). Las placas se incubaron a 25°C durante 24 horas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DEL AGUA

Todos los valores de los parámetros analizados se muestran en la **tabla 1**.

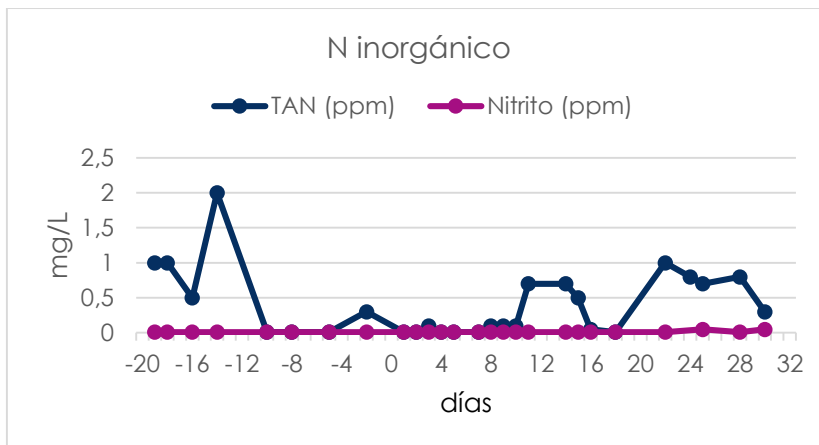
Tabla 1. Valores de los parámetros físico – químicos durante el cultivo de mújoles con BFT.

Parámetros	Cultivo de lisas
Temperatura (°C)	19,64±2,24
Oxígeno disuelto (mg/L)	7,32±0,48
Oxígeno disuelto (% de saturación)	98,80±4,37
pH	8,06±0,06
Salinidad (g/L)	42,38±1,45
TAN (mg/L)	0,32±0,35
Nitrito (mg/L)	0,02±0,01
Nitrato (mg/L)	0,01±0,00
Sólidos en suspensión (ml/L)	11,70±6,75
Sólidos totales en suspensión (mg/L)	139,50±72,90

Los valores se representan como media \pm desviación típica.

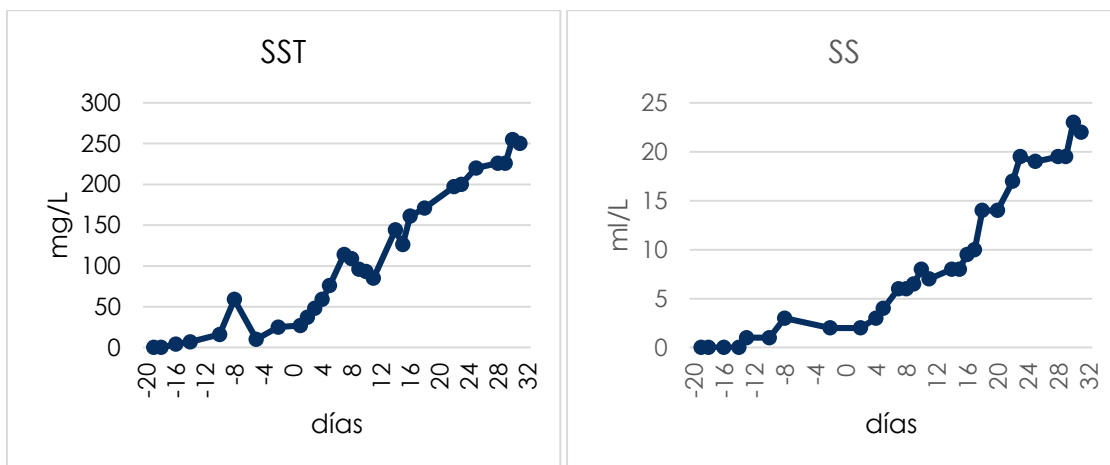
La temperatura del agua se mantuvo relativamente constante a lo largo de la prueba, aunque en ocasiones hubo fluctuaciones de 2-3 grados a lo largo del día según las condiciones del tiempo. La salinidad aumentó conforme avanzó la prueba a causa de la evaporación y fue necesario añadir periódicamente agua de mar limpia y en ocasiones diluirla con agua dulce para mantener el nivel cercano a 40 g/L. El pH y el oxígeno disuelto también mostraron valores estables y adecuados para el cultivo, y no se vieron afectados de forma significativa por el aumento del volumen de flóculos y la actividad bacteriana.

El nivel de TAN se mantuvo bajo a lo largo de la prueba y no se detectaron niveles significativos de nitrito y nitratos. La evolución de TAN y nitrito durante la prueba se muestran en la **gráfica 1**.



Gráfica 1. Evolución de TAN y nitrito durante la prueba. El día 0 de cultivo corresponde al día de la siembra de las lisas en el sistema con BFT.

Los niveles de SS aumentaron gradualmente a lo largo de la prueba llegando a alcanzar volúmenes de 20 – 25 ml/L al final de la misma, siendo 25 ml/L el valor máximo de volumen de flóculos recomendado por Avnimelech (2015). Del mismo modo, los niveles de SST aumentaron alcanzando niveles de 225 mg/L, lejos de alcanzar los valores límite recomendados de 400-500 mg/L para cultivo de peces con BFT (Luo et al., 2014; Avnimelech, 2015). La evolución de SS y SST se muestran en la **gráfica 2**.



Gráfica 2. Evolución de SST y SS durante la prueba. El día 0 de cultivo corresponde al día de la siembra de las lisas en el sistema con BFT.

Todos los parámetros físico-químicos analizados alcanzaron valores semejantes a los obtenidos por Elhetawy et al. (2021) en cultivo de lisas (*Mugil cephalus*) con BFT en

agua salina, a excepción del nivel de nitrato, el cual alcanzó niveles de 9 mg/L en su estudio.

4.2. PARÁMETROS ZOOTÉCNICOS

Los valores de los parámetros zootécnicos y productivos analizados se muestran en la **tabla 2**.

Tabla 2. Parámetros productivos tras 32 días de cultivo de lisas con BFT.

Parámetros	Cultivo de lisas
Peso inicial (g/pez)	109,10±33,68
Peso final (g/pez)	127,73±36,62
Ganancia de peso (g/pez)	18,63
Tasa específica de crecimiento (SGR) %/día	0,49
Índice de conversión del alimento (FCR)	1,71
Supervivencia (%)	32,35

Los valores se representan como media ± desviación típica.

Tras la siembra de las lisas se registró una mortalidad de más del 50% de los peces en la primera semana de cultivo. La supervivencia al final de la prueba fue del 32%. Esta elevada mortalidad se asoció fundamentalmente al estrés ocasionado por el manejo de los peces durante el muestreo inicial de biomasa y posterior siembra. Las lisas supervivientes no mostraron signos de patologías que afectasen a su salud y bienestar durante el desarrollo de la prueba.

Los valores de SGR y de conversión del alimento fueron 0,49 %/día y 1,78, respectivamente. El valor de SGR obtenido fue bajo comparado con otros estudios realizados con mugílidos en cultivos experimentales con BFT (Vinetea et al., 2018; Legarda et al., 2019; Borges et al., 2020), sin embargo, la mayor parte de estos estudio fueron realizados con alevines con pesos iniciales muy inferiores. No obstante, los resultados del proyecto europeo DIVERSIFY mostraron valores de SGR en lisas en fase de engorde de 0,73 – 0,83 %/día en densidades de 0,5 y 1 pez/m² en tanques en tierra, respectivamente (Crosseti et al., s.f.). El valor de FCR obtenido fue adecuado y semejante al obtenido por Elhetawy et al. (2021) en cultivo en agua salina.

4.3. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Las imágenes tomadas al microscopio de las muestras de agua se muestran en las **figuras 6, 7 y 8**. En ellas se observó un incremento significativo de la densidad y la diversidad de comunidades microbianas presentes en el biofloc. Los microorganismos observados fueron: microalgas, protozoos, bacterias y nematodos. También se observó un aumento del tamaño de los flóculos, llegando a alcanzar tamaños en torno a 500µm.

El número total de bacterias contabilizadas al final de la prueba fue $4,8 \times 10^3$ UFC/ml, cantidad muy inferior a las densidades en el orden de 10^7 UFC/ml alcanzadas por Burford et al. (2003) en cultivos de langostino con BFT.

5. OBSERVACIONES

5.1. COMPORTAMIENTO DE LAS LISAS

Las lisas capturados en el medio natural (*Mugil cephalus* y *liza aurata*) resultaron ser muy sensibles al estrés causado por el manejo y se adaptaron con lentitud a las condiciones de cultivo en tanques. Fue por ello necesario mantenerlos un tiempo largo de aclimatación previo a la siembra en el cultivo con BFT.

Durante el cultivo con BFT, las lisas no presentaron síntomas de patología en la piel, aletas y branquias, y mostraron una coloración y un comportamiento normal (**figura 9**). No obstante, debido a la elevada turbidez del agua, el control del estado de salud y bienestar de los peces fue complicado. También fue difícil el control de la ingesta diaria debido a la poca actividad de los individuos en la superficie.

La abundancia de heces observadas tras casi dos semanas de cultivo y el color verdoso de las mismas fueron indicativos de la adaptación de los peces al medio de cultivo con BFT y del uso de los flóculos como alimento (**figura 10**).

6. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos demuestran la viabilidad del cultivo de lisas (*Mugil cephalus* y *Liza aurata*) en fase de engorde en sistemas con BFT con escasa renovación de agua.

7. BIBLIOGRAFÍA

Avnimelech, Y. (1999). Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture*, 176(3-4), 227-235

Avnimelech, Y. (2007). Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. *Aquaculture*, 264(1-4), 140-147.

Avnimelech, Y. (2015). *Biofloc technology: a practical guide book*. World Aquaculture Society.

Azim, M. E., & Little, D. C. (2008). The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 283(1-4), 29-35.

Borges, B. A. A., Rocha, J. L., Pinto, P. H. O., Zacheu, T., Chede, A. C., Magnotti, C. C. F., ... & Arana, L. A. V. (2020). Integrated culture of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and mullet *Mugil liza* on biofloc technology: Zootechnical performance, sludge generation, and *Vibrio* spp. reduction. *Aquaculture*, 524, 735234.

Burford, M. A., Thompson, P. J., McIntosh, R. P., Bauman, R. H., & Pearson, D. C. (2003). Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize. *Aquaculture*, 219(1-4), 393-411.

Crosetti, D., Sadek, S., Vallainc, D., IOLR, I., Israeli, M. D., Gisbert, E., & Rosa, A. (s.f.). Technical leaflet-Flathead grey mullet (*Mugil cephalus*).

De Schryver, P., Crab, R., Defoirdt, T., Boon, N., & Verstraete, W. (2008). The basics of bio-flocs technology: the added value for aquaculture. *Aquaculture*, 277(3-4), 125-137.

Elhetawy, A. I., El-Dahhar, A. A., Elebiary, E. H., Abo El-Wafa, M. A., Lotfy, A. M., & Emelianova, N. (2021). Effect of biofloc system at different salinities and crude protein levels on water quality, growth performance, and survival rate of flathead grey mullet (*Mugil cephalus*). *Egyptian Journal for Aquaculture*, 41-67.

Legarda, E. C., Poli, M. A., Martins, M. A., Pereira, S. A., Martins, M. L., Machado, C., ... & do Nascimento Vieira, F. (2019). Integrated recirculating aquaculture system for mullet and shrimp using biofloc technology. *Aquaculture*, 512, 734308.

Luo, G., Gao, Q., Wang, C., Liu, W., Sun, D., Li, L., & Tan, H. (2014). Growth, digestive activity, welfare, and partial cost-effectiveness of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in a recirculating aquaculture system and an indoor biofloc system. *Aquaculture*, 422, 1-7.

Vinatea, L., Malpartida, J., Carbó, R., Andree, K. B., Gisbert, E., & Estévez, A. (2018). A comparison of recirculation aquaculture systems versus biofloc technology culture system for on-growing of fry of *Tinca tinca* (Cyprinidae) and fry of grey *Mugil cephalus* (Mugilidae). *Aquaculture*, 482, 155-161.

ANEXO I

REPORTAJE FOTOGRÁFICO

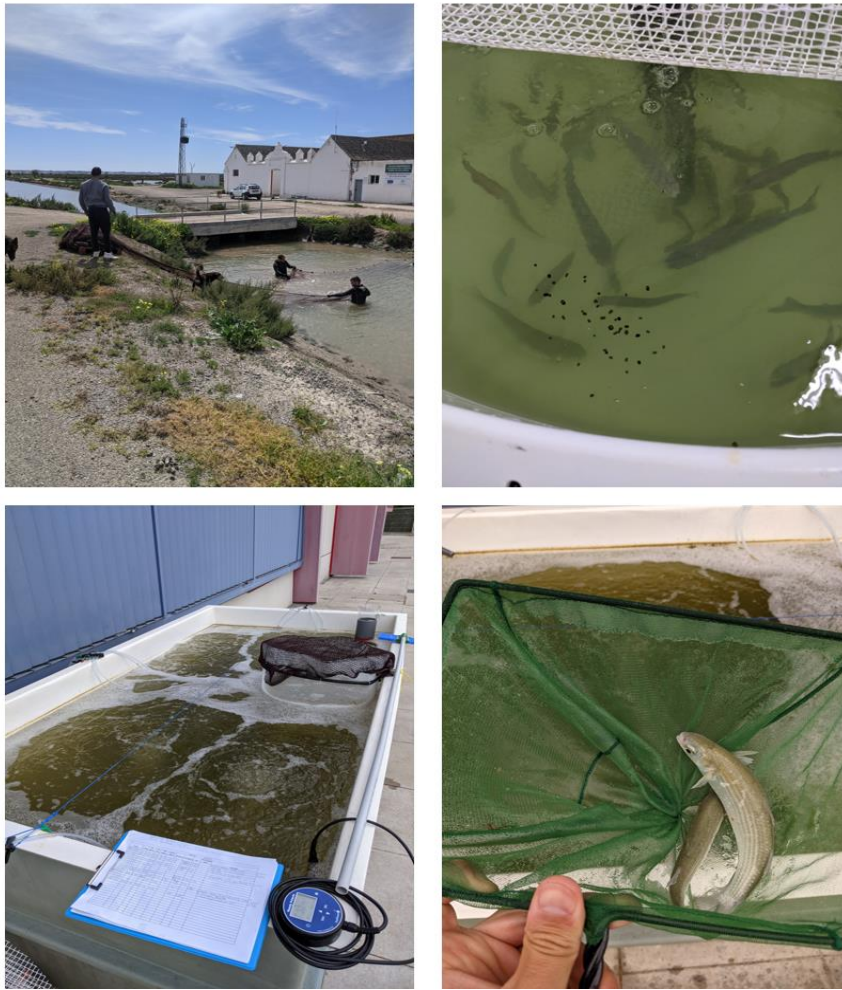


Figura 1. (a) Pesque de las lisas en el medio natural (Trebujena, Cádiz). (b) Juveniles de lisas en aclimatación en las instalaciones de CTAQUA. (c) Jaula instalada en el tanque con BFT para evaluar el comportamiento de las lisas previo a la siembra. (d) Lisas pescadas tras varios días en la jaula instalada en el tanque con BFT.



Figura 2. (a) Instalación de las mangueras difusoras de aire en la base del tanque de cultivo. (b) Llenado del tanque de cultivo con agua de mar limpia.

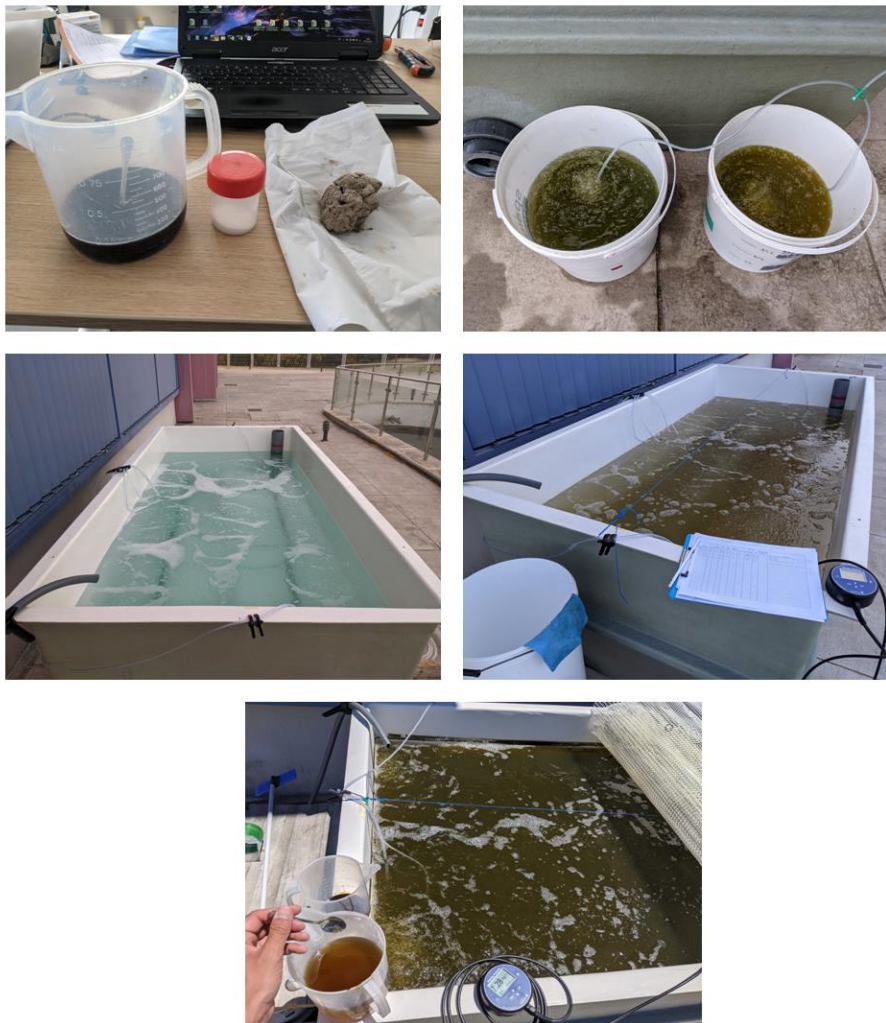


Figura 3. (a) Melaza, Cloruro de sodio y tierra seca de estero para la activación del biofloc. (b) Cultivos auxiliares de biofloc en cubos con aireación. (c) (d) y (e) Estados de desarrollo y maduración del biofloc.



Figura 4. (a) Volumen de flóculos en cono Imhoff al principio de la prueba. (b) Volumen de flóculos maduros en cono Imhoff durante el cultivo de las lisas. (c) Muestra de agua con flóculos en suspensión. (d) Medición de los sólidos en suspensión totales con un filtro GFC.



Figura 5. (a) Set-up del muestreo inicial para la siembra de las lisas en el tanque de biofloc. (b) Pesaje de una lisa durante el muestreo inicial. (c) Set-up de muestreo final. (d) Observación de una lisa durante el muestreo final.

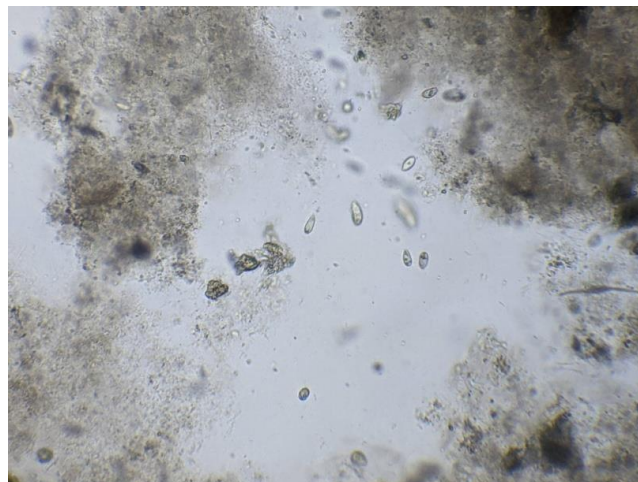


Figura 6. Flóculos observados al microscopio durante el periodo de maduración del sistema BFT, previo a la siembra de las lisas. En la imagen se observan diversos protozoos ciliados (x10).

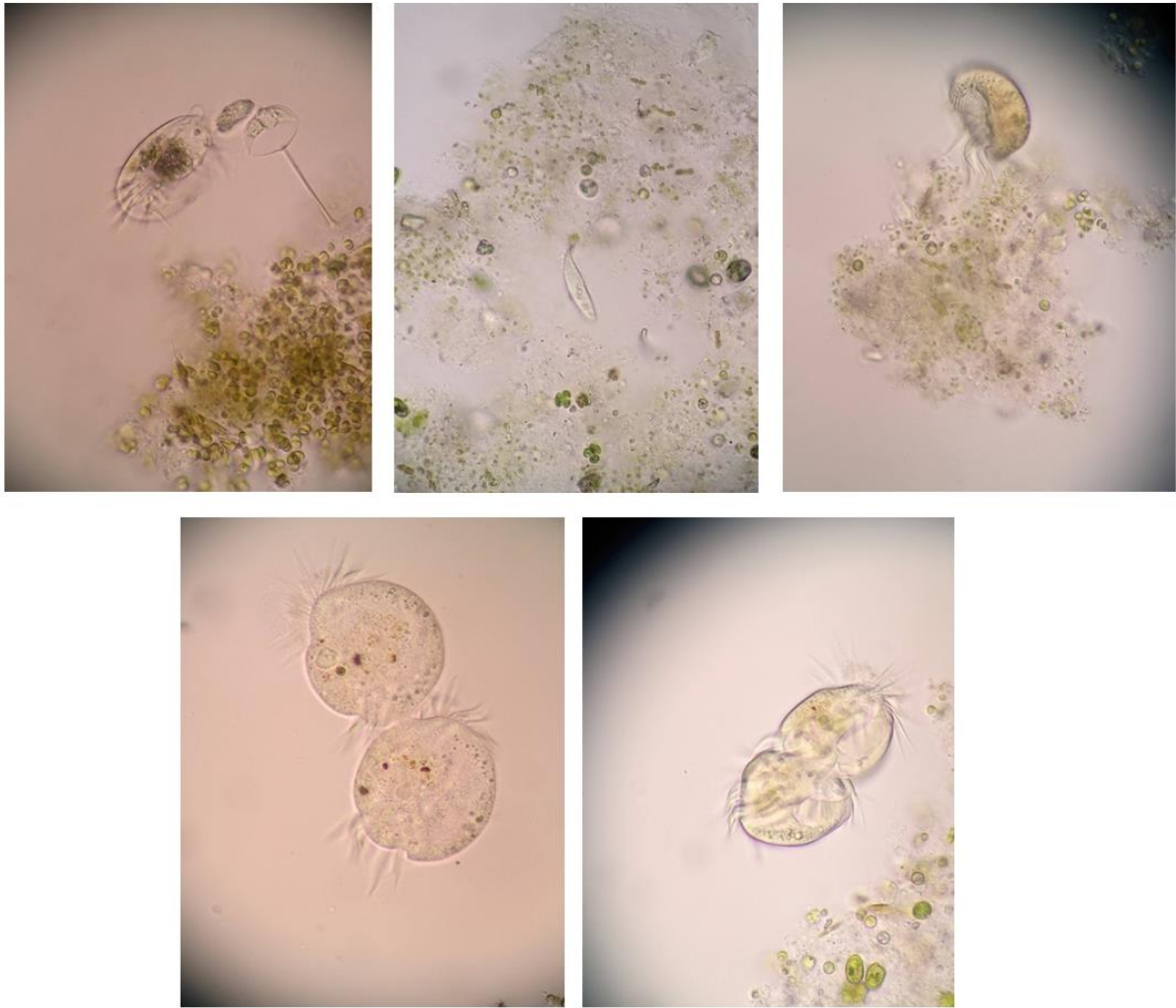


Figura 7. Flóculos observados al microscopio durante el cultivo de lisas en el sistema BFT (día 15 de cultivo). En las imágenes se observan diferentes protozoos ciliados (x40).

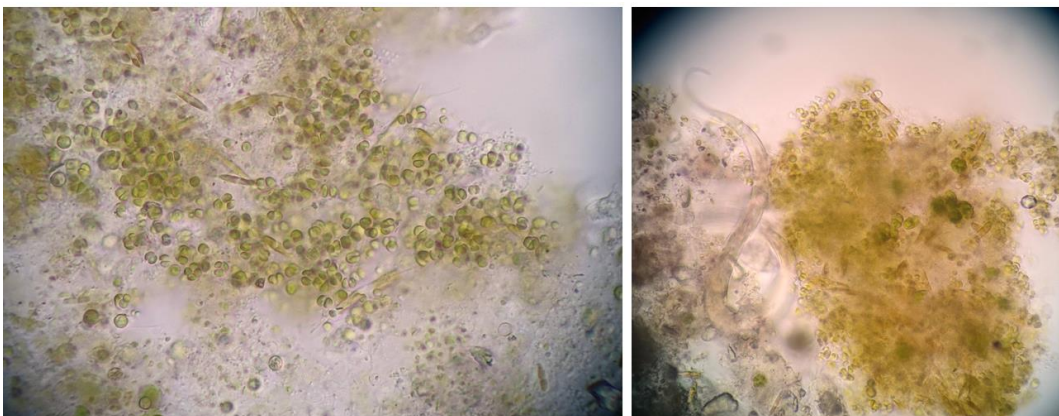


Figura 8. Flóculos observados al microscopio durante el cultivo de lisas en el sistema BFT (día 15 de cultivo). En las imágenes se observan (a) microalgas verdes (x40) y (b) nematodos (x10).



Figura 9. Lisas durante el muestreo final de peso.



Figura 10. Heces y restos de materia orgánica sedimentados en el tanque.