



UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y
TECNOLÓGICAS

POSGRADO EN BIOCENCIAS

COMPOSICIÓN PROXIMAL DE LOS BIOFLÓCULOS
DESARROLLADOS EN UN CULTIVO DE TILAPIA
(*Oreochromis niloticus* x *O. mossambicus*) ALIMENTADO
CON DIFERENTE NIVEL DE SUSTITUCIÓN DE
HARINA DE PESCADO POR HARINA VEGETAL
EN SU DIETA.

TESIS

Para obtener el grado de:

MAESTRO EN BIOCENCIAS

Presenta:

ANGÉLICA MORENO ARIAS

Hermosillo, Sonora, México

16 de Agosto de 2013



UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS

POSGRADO EN BIOCIENCIAS

**COMPOSICIÓN PROXIMAL DE LOS BIOFLÓCULOS
DESARROLLADOS EN UN CULTIVO DE TILAPIA
(*Oreochromis niloticus* x *O. mossambicus*) ALIMENTADO CON
DIFERENTE NIVEL DE SUSTITUCIÓN DE HARINA DE
PESCADO POR HARINA VEGETAL EN SU DIETA**

T E S I S

Que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

MAESTRO EN BIOCIENCIAS

Presenta:

Angélica Moreno Arias

Hermosillo, Sonora

Agosto del 2013

**COMPOSICIÓN PROXIMAL DE LOS BIOFLÓCULOS DESARROLLADOS EN
UN CULTIVO DE TILAPIA (*Oreochromis niloticus* x *O. mossambicus*)
ALIMENTADO CON DIFERENTE NIVEL DE SUSTITUCIÓN DE HARINA DE
PESCADO POR HARINA VEGETAL EN SU DIETA**

T E S I S

**Que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRO EN BIOCENCIAS**

Presenta:

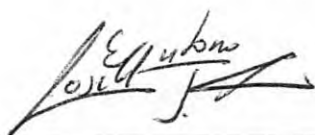
ANGÉLICA MORENO ARIAS

Hermosillo, Sonora

Agosto del 2013

APROBACIÓN

Los miembros del Comité designado para revisar la Tesis titulada COMPOSICIÓN PROXIMAL DE LOS BIOFLÓCULOS DESARROLLADOS EN UN CULTIVO DE TILAPIA (*Oreochromis niloticus* x *O. mossambicus*) ALIMENTADO CON DIFERENTE NIVEL DE SUSTITUCIÓN DE HARINA DE PESCADO POR HARINA VEGETAL EN SU DIETA, presentada por **Angélica Moreno Arias**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Biociencias con especialidad en acuicultura.



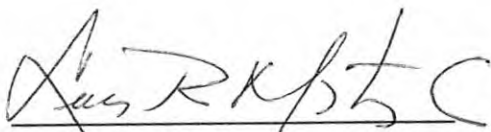
Dr. José Antonio López Elías

Co-Director de Tesis



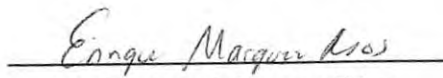
Dr. Anselmo Miranda Baeza

Co-Director de Tesis



Dr. Luis Rafael Martínez Córdova

Sinodal Secretario



Dr. Enrique Márquez Ríos

Sinodal

DEDICATORIA

A mi familia por su apoyo, especialmente a mis **papás** y **hermanas** quienes han estado a mi lado.

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad de Sonora** por aceptarme como su estudiante y permitirme continuar con mi desarrollo educativo en esta institución.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) por el apoyo brindado durante mis dos años de estudios.

Al Departamento de Investigación Científica y Tecnológica de la Universidad de Sonora (**DICTUS**) por la oportunidad de realizar mis estudios de maestría en Biociencias dentro de su programa de posgrado. Al **Laboratorio de análisis químico y microbiología** del DICTUS por abrirme las puertas y permitirme realizar los análisis de mis muestras.

A la Universidad Estatal de Sonora (**UES**) por facilitarme el uso de sus instalaciones para la realización del cultivo experimental en el **Laboratorio de Investigación** de la Unidad Navojoa.

Al Departamento de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad de Sonora por facilitarme el uso de sus instalaciones dentro del **Laboratorio de Investigación en Alimentos**, así como al Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (**DIPA**) por su apoyo.

A los miembros de mi comité de Tesis: **Dr. José Antonio López Elías**, **Dr. Anselmo Miranda Baeza**, **Dr. Luis Rafael Martínez Córdova** y **Dr. Enrique Márquez Ríos**, por su apoyo, su disposición, sus atinadas observaciones y sus comentarios que lograron enriquecer esta Tesis. Gracias por creer en mí y en este trabajo.

Al coordinador del programa de Posgrado en Biociencias, **Dr. Luis Ángel Medina Juárez**, así como a la **M.C. Dolores Vásquez Del Castillo**, por la atención y el apoyo brindado durante mi estancia en la maestría.

A mis maestros **Álvaro Murguía López** y **Lauro Mercado Castillo**, así como al **Dr. Luis Fernando Enríquez Ocaña**, por su esmero en apoyarme en todo momento.

A mis compañeros de laboratorio: **Diana Medina Félix**, **Diana Fimbres Olivarría**, **Ana Lucía Gómez Ramírez**, **David Paz Salcido**, **Iván González Vega** y **Javier Martínez Ochoa**, gracias amigos por todos los momentos que me brindaron su apoyo y compartieron su felicidad, gracias por crear ese ambiente de trabajo tan singular.

A mi compañera de generación **Perla Urquidez Bejarano**, por sus palabras, su amistad y su motivación, siempre muy significativas para mí.

A **Martín Rodrigo Acedo Valdez** por estar a mi lado en todo momento ayudándome a salir adelante, gracias por creer en mí y por ser mi compañero siempre.

A la **Dra. Martha Elisa Rivas Vega** de la UES por la formulación y elaboración del alimento utilizado en esta investigación, así como por su disposición para aclarar mis dudas.

A la **Dra. Ana Gloria Villalba Villalba** y al **Dr. Wilfrido Torres Arreola** del DIPA, por su excelente disposición en ayudarme con el procesamiento de mis muestras.

A los responsables del Laboratorio de Investigación en Alimentos: **Dr. Víctor Manuel Ocaño Higuera** y **Q.B. César Benjamín Otero León**, por abrirme las puertas de sus instalaciones; así como a los estudiantes de esa institución **Carmen López**, **María Jesús Moreno**, **Manuel Carretas** y **Claudia Murrieta**, por sus consejos, apoyo y amabilidad.

ÍNDICE GENERAL

| | PÁGINA |
|--|-----------|
| APROBACIÓN | i |
| DEDICATORIA | ii |
| AGRADECIMIENTOS | iii |
| ÍNDICE GENERAL | v |
| RESUMEN | vii |
| ABSTRACT | viii |
| ÍNDICE DE FIGURAS | ix |
| ÍNDICE DE TABLAS | xi |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| I. ANTECEDENTES | 3 |
| I.1. El desarrollo de la acuicultura en México | 3 |
| I.2. Formulación de alimentos balanceados para tilapia | 4 |
| I.3. ¿Qué es un bioflóculo? | 5 |
| I.4. Los bioflóculos como alimento vivo | 6 |
| II. HIPÓTESIS | 10 |
| III. OBJETIVO | 11 |
| III.2. Objetivos Particulares | 11 |
| IV. MATERIALES Y MÉTODOS | 12 |
| IV.1. Cultivo experimental | 12 |
| IV.2. Determinación de nitrógeno amoniacal total (NAT) | 13 |
| IV.3. Volumen de los bioflóculos | 13 |

| | |
|---|-----------|
| IV.4. Biomasa de los bioflóculos | 13 |
| IV.5. Composición química proximal de los bioflóculos | 14 |
| IV.6. Respuesta productiva de la tilapia | 14 |
| IV.7. Análisis estadístico | 14 |
| V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 16 |
| V.1. Nitrógeno amoniacal total (NAT) | 16 |
| V.2. Volumen de los bioflóculos | 16 |
| V.3. Biomasa de los bioflóculos | 19 |
| V.4. Composición química proximal de los bioflóculos | 31 |
| V.5. Respuesta productiva de la tilapia | 38 |
| VI. CONCLUSIONES | 42 |
| VII. RECOMENDACIONES | 43 |
| VIII. LITERATURA CITADA | 44 |
| Anexo I | 48 |
| Anexo II | 49 |
| Anexo III | 50 |
| Anexo IV | 52 |
| Anexo V | 54 |

RESUMEN

Los bioflóculos son agregados de organismos microscópicos que reciclan los compuestos tóxicos presentes en cultivos acuícolas, evitando el deterioro de la calidad del agua en sistemas de cero o mínimo recambio; además permiten la formación de biomasa que puede ser utilizada como alimento por organismos omnívoros en cultivo. Es por ello que el objetivo de este trabajo fue evaluar la composición proximal de los bioflóculos desarrollados en un cultivo de tilapia en agua de mar alimentado con diferentes niveles de sustitución de harina de pescado por de harina vegetal en su dieta. El diseño experimental consistió en cuatro tratamientos en los que se utilizó harina vegetal (mezcla de harina de maíz, trigo y sorgo) en lugar de harina de pescado en porcentajes de 0, 33, 67 y 100%. Las muestras de bioflóculos fueron colectadas periódicamente y analizadas para obtener contenido de sólidos suspendidos totales, materia orgánica y cenizas por diferencia de peso, así como contenido de proteínas y lípidos, por los micrométodos de Lowry y Pande, respectivamente, además de contenido de carbohidratos. Se determinó que la composición de los bioflóculos fue muy estable en función del tiempo (25% proteína, 35% carbohidratos y 3% lípidos) y se mantuvo independiente de la dieta introducida al sistema. Se encontraron tendencias que indican que la mayor sustitución de harina de pescado en la dieta promovió aumento en la biomasa microbiana y mejoró la supervivencia de la tilapia. Se concluye que es factible producir tilapia roja (*Oreochromis niloticus* x *O. mossambicus*) en sistemas de bioflóculos como un suplemento para la nutrición de la tilapia en sistemas alimentados con dietas carentes de harina de pescado.

ABSTRACT

Biofloc technology is based on microscopic organisms that recycle toxic compounds commonly found in aquaculture systems, avoiding the water quality deterioration in zero exchange water or minimal exchange water systems; also biofloc allows the formation of biomass that can be used as live food for those omnivorous organisms in culture. The objective of this study was to estimate the composition of biofloc produced in a tilapia seawater culture, fed with different fishmeal substitution levels by vegetable meal in the diet. The experimental design consisted of four treatments where fishmeal was substituted by vegetable meal (corn, wheat and sorghum meal mix) in percentages of 0, 33, 67 y 100%. The samples of biofloc were periodically collected and analyzed to obtain the amount of total suspended solids, organic matter and ash by weight difference, as well as protein and lipids content using Lowry and Pande micromethods, respectively, and also carbohydrate content was registered. There was found that biofloc composition was stable in function of time (25% protein, 35% carbohydrate and 3% lipids) and it was independent of the diet introduced to the system. A tendency to increase the microbial biomass by adding a major quantity of vegetable meal in the diet and to improve tilapia's survival, were observed. It is concluded that it is feasible to produce red tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. mossambicus*) in biofloc systems as a supplement for tilapia's nutrition in a fishmeal-free diet system.

ÍNDICE DE FIGURAS

| FIGURA | | PÁGINA |
|--------|---|--------|
| 1 | Niveles de producción de peces de agua dulce en territorio mexicano. | 4 |
| 2 | Concentraciones promedio de NAT durante el periodo de cultivo en los diferentes tratamientos. | 17 |
| 3 | Volumen promedio (mL L^{-1}) de los bioflóculos en los cuatro tratamientos y el control. | 18 |
| 4 | Volumen promedio (mL L^{-1}) de los bioflóculos en los cuatro tratamientos y el control en los días 0, 7, 21, 35 y 42 del cultivo experimental. | 20 |
| 5 | Sólidos suspendidos totales de los diferentes tratamientos durante el cultivo experimental. | 21 |
| 6 | Sólidos suspendidos totales promedio (mg L^{-1}) de los bioflóculos en los cuatro tratamientos y el control. | 22 |
| 7 | Sólidos suspendidos totales promedio (mg L^{-1}) de los bioflóculos en los cuatro tratamientos y el control en los días 0, 7, 21, 35 y 42 días del cultivo experimental. | 24 |
| 8 | Porcentaje promedio de cenizas de los bioflóculos en los cuatro tratamientos y el control. | 26 |
| 9 | Contenido promedio de cenizas (mg L^{-1}) de los bioflóculos en los cuatro tratamientos y el control en los días 0, 7, 21, 35 y 42 del cultivo experimental. | 27 |
| 10 | Porcentaje promedio de materia orgánica de los bioflóculos en los cuatro tratamientos y el control. | 29 |
| 11 | Contenido promedio de materia orgánica (mg L^{-1}) de los bioflóculos en los cuatro tratamientos y el control en los días 0, 7, 21, 35 y 42 del cultivo experimental. | 30 |
| 12 | Porcentaje promedio de proteínas totales de los bioflóculos en los cuatro tratamientos y el control. | 32 |

| | | |
|----|---|----|
| 13 | Contenido promedio de proteínas totales (mg L^{-1}) de los bioflóculos en los cuatro tratamientos y el control en los días 0, 7, 21, 35 y 42 del cultivo experimental. | 33 |
| 14 | Porcentaje promedio de carbohidratos totales de los bioflóculos en los cuatro tratamientos y el control. | 34 |
| 15 | Contenido promedio de carbohidratos totales (mg L^{-1}) de los bioflóculos en los cuatro tratamientos y el control en los días 0, 7, 21, 35 y 42 del cultivo experimental. | 36 |
| 16 | Porcentaje promedio de lípidos totales de los bioflóculos en los cuatro tratamientos y el control. | 37 |
| 17 | Contenido promedio de lípidos totales (mg L^{-1}) de los bioflóculos en los cuatro tratamientos y el control en los días 0, 7, 21, 35 y 42 del cultivo experimental. | 39 |
| 18 | Relación de la supervivencia de la tilapia con el contenido de harina de pescado en el alimento. | 40 |

ÍNDICE DE TABLAS

| TABLA | | PÁGINA |
|-------|--|--------|
| 1 | Cantidad de sólidos suspendidos totales, cenizas y materia orgánica presentes en los bioflóculos de los diferentes tratamientos. | 28 |
| 2 | Resumen de la composición porcentual de los bioflóculos en base seca para los cuatro tratamientos y el control. | 35 |
| 3 | Respuesta productiva del cultivo experimental de tilapia con diferentes inclusiones de harina vegetal en su dieta. | 38 |

INTRODUCCIÓN

La producción mundial de organismos acuáticos se ha mantenido en crecimiento en los últimos años debido fundamentalmente al incremento en de su cultivo, mientras que la captura ha llegado en la mayoría de las especies, a un rendimiento máximo desde los años 90's (FAO, 2012). Este crecimiento de la acuicultura, así como el estancamiento de la pesca ha traído como consecuencia una mayor demanda de productos capturados, de los cuales se obtiene harina y aceite para preparar alimentos que sirvan a los organismos de cultivo, una estrategia de alimentación muy poco sustentable que daña los recursos naturales (Watanabe, 2002).

Los alimentos balanceados son una fuente de contaminación tanto para los sistemas de cultivo como para los naturales, ya que es muy poco el porcentaje (15-30%) de los nutrientes que realmente es aprovechado por los organismos cultivados (Gross *et al.*, 2000), el resto se acumula en el agua y sedimento, generando desperdicios en forma de compuestos tóxicos y materia orgánica que dañan la calidad del sistema (Piedrahita, 2003). Este problema se vuelve más grave cuando es necesaria una alta tasa de recambio de agua para contrarrestar este efecto negativo, ya que esto implica mayores costos de operaciones así como una gran cantidad de contaminantes arrojados al ambiente natural.

La continua descarga y bombeo de agua hacia los sistemas de cultivo igualmente ha permitido el bajo aprovechamiento de nutrientes en el sistema, así como la introducción de agentes patógenos, por ello los sistemas de cero o mínimo recambio se propusieron para solucionar esta problemática (Avnimelech, 2007). Este tipo de sistemas minimiza gastos de energía, así como contaminantes introducidos y descargados, sin embargo la calidad del agua en el cultivo mismo, se ve afectada por la acumulación de compuestos nitrogenados. El uso de bioflóculos permite mejorar la calidad del agua, ya que estos agregados reciclan la materia orgánica acumulada (Ladino-Orjuela y Rodríguez-Pulido, 2009) y ésta puede ser reutilizada dentro del mismo sistema.

Los bioflóculos son conglomerados de organismos microscópicos (bacterias, fitoplancton, zooplancton y otros) que se encuentran asociados a un sustrato orgánico suspendido en la columna de agua del sistema de cultivo (Molina-Poveda, 2006). Estos agregados se han evaluado como fuente de alimento vivo dentro de los cultivos acuícolas permitiendo sustituir una parte del alimento balanceado (De Schryver *et al.*, 2008), sin embargo para que éstos agregados beneficien a la comunidad cultivada requieren mantener cierta calidad nutricia por lo que es necesario estudiar su composición durante todo el cultivo de crustáceos y peces.

I. ANTECEDENTES

I.1. El desarrollo de la acuicultura en México

La acuicultura en México se inició en los años 60's con una producción de 100 toneladas de peces dulceacuícolas, actualmente esta actividad reporta una producción total de hasta 150,000 toneladas que provienen en su mayoría de dos grupos: crustáceos (hasta 125,000 toneladas) y peces de agua dulce (hasta 20,000 toneladas). El cultivo de peces fue el primero en desarrollarse en México con especies de agua dulce como tilapia, carpas y bagres, actualmente se cultivan también peces diádromos y más recientemente se ha incursionado en el grupo de los peces marinos.

La tilapia al ser una especie con hábitos alimenticios omnívoros además de ser un organismo muy adaptable a diferentes ambientes, ha logrado ser objeto de múltiples investigaciones, captando el interés de productores y siendo la especie de pez más ampliamente cultivada en nuestro país (Figura 1), con 11,000 toneladas y lográndose introducir incluso a ambientes salobres y marinos (Álvarez Torres *et al.*, 1999; FAO, 2012).

La tilapia ha cobrado mucha popularidad en los cultivos acuícolas por la gran aceptación de los consumidores, así como la plasticidad de la especie y su adaptación a diferentes condiciones de cultivo; más recientemente se han implementado nuevas técnicas de alimentación, así como la adaptación a ambientes salobres y salados para obtener cocultivos con especies marinas y mejorar así el aprovechamiento de nutrientes en los sistemas de cultivo (Martínez-Córdova *et al.*, 2010); gracias a sus hábitos alimenticios, tolerancia a bajas concentraciones de oxígeno disuelto y a altas cantidades de sólidos suspendidos en la columna de agua, este cíclido se posiciona como un gran candidato para cultivos en bioflóculos (Emerenciano *et al.*, 2013), de manera que la materia orgánica suspendida, detritos y restos de alimento que pudieran considerarse desechos o contaminantes para el organismo, sean retirados de la columna de agua y transformados en biomasa.

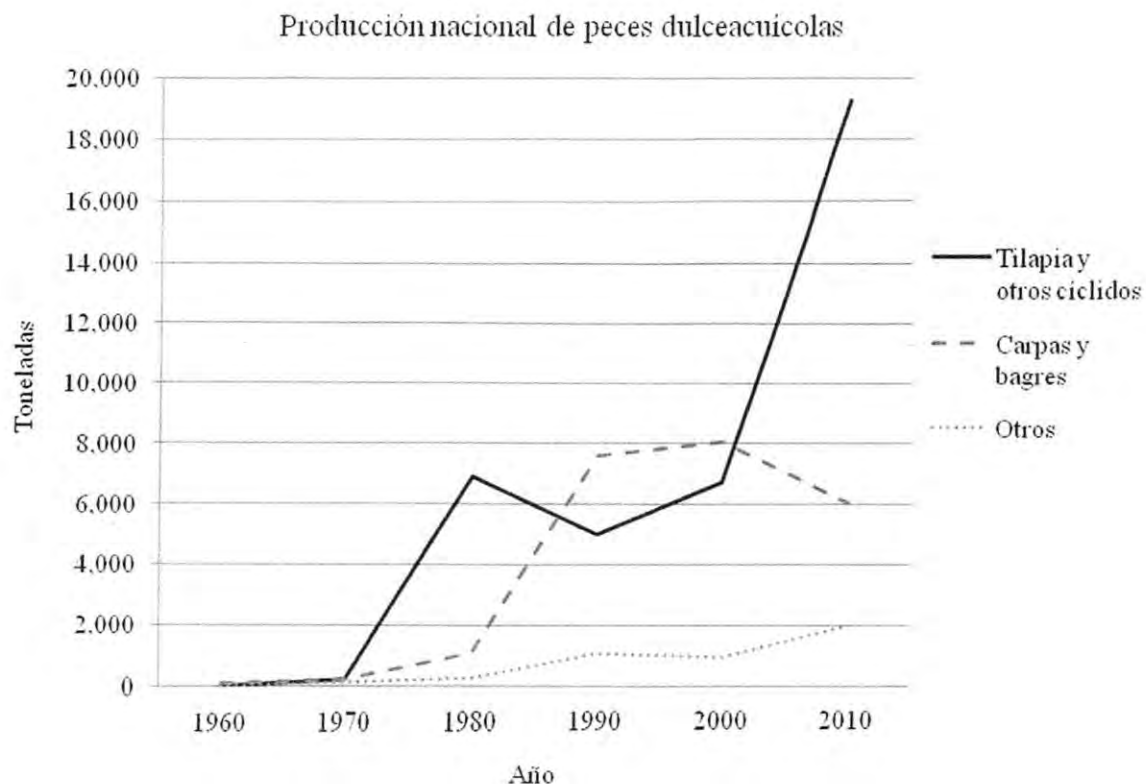


Figura 1. Niveles de producción de peces de agua dulce en territorio mexicano.

I.2. Formulación de alimentos balanceados para tilapia

La investigación relacionada con la formulación de dietas o alimento balanceado para tilapia se ha enfocado a la búsqueda de ingredientes que permitan la sustitución parcial o total de ingredientes de origen animal, como aceite y harina de pescado. Estos ingredientes incrementaron su costo en años recientes a raíz de la poca disponibilidad en el mercado. Esta serie de investigaciones han resultado en una lista de fuentes de proteína alternativas que permita suplir la harina de pescado sin comprometer el desempeño del cultivo (Nguyen *et al.*, 2009), entre ellos se encuentran ingredientes de origen vegetal, así como subproductos de origen animal y vegetal (El-Sayed y Tacon, 1997), con los cuales se busca el balance que permita cubrir los requerimientos nutricionales de la tilapia a un bajo

costo y sin arriesgar la producción, así como el bienestar del sistema y cuerpos de agua aledaños.

Estudios recientes se han enfocado a evaluar el aprovechamiento de todos los recursos disponibles en un cultivo, como los microorganismos desarrollados en su interior (Avnimelech *et al.*, 2008). Ya que estos pueden ser aprovechados como alimento vivo y como biofiltros, los resultados se han documentado ampliamente en cultivos de camarón y peces. Los camarones y algunos peces no pueden aprovechar los microorganismos directamente de la columna de agua, por lo que la mejor manera de hacerlo es cuando éstos se encuentran adheridos a una superficie (biopelículas) o en sustratos flotando en la columna de agua (bioflóculos).

I.3. ¿Qué es un bioflóculo?

Un bioflóculo se define como un conjunto de organismos generalmente microscópicos (bacterias, microalgas, protozoarios, entre otros) que forman agregados y se encuentran libremente en la columna de agua (Martínez-Córdova *et al.*, 2010), éstos pueden ser desarrollados bajo condiciones de cultivo controladas y permiten la formación de colonias gracias a sustancias que les sirven de sustrato (Crab *et al.*, 2009). Estos consorcios, además de ser aprovechados como alimento vivo funcionan como filtros biológicos para la remoción de compuestos tóxicos y reciclaje de nutrientes (Audelo Naranjo *et al.*, 2012). Debido a su contenido de nutrimentos, permiten sustituir una parte del alimento balanceado (Tacon *et al.*, 2002) reduciendo los costos de producción y minimizando la contaminación.

El principio de los sistemas de bioflóculos recae en la utilización de ciertos microorganismos vivos, primordialmente biomasa microbiana y materia orgánica particulada que se mantienen en la columna de agua para ayudar en la remoción de amonio vía fotosíntesis, así como el consumo y oxidación por parte de las bacterias nitrificantes que transforman el amonio a nitrito y subsecuentemente a nitrato (Castro-Nieto *et al.*, 2012 y Schrader *et al.*, 2011). En este tipo de sistemas el término “desperdicio” no existe, pues los desechos (alimento no consumido y heces) son reutilizados y convertidos en alimento vivo (Crab *et al.*, 2012) permitiendo mejorar la recuperación y eficiencia de utilización de nutrientes así como la intensificación del sistema de cultivo (Bosma y Verdegem, 2011). La

retención de los residuos del sistema de cultivo y su conversión en bioflóculos se logra con aireación constante y agitación de la columna de agua para mantener los nutrientes disponibles (Crab *et al.*, 2012), así como la adición de fuentes de carbono como sustrato para las bacterias heterótrofas que consumen la materia orgánica presente (Azim *et al.*, 2008).

Para inducir a la generación de bioflóculos se requiere conocer la relación de carbono y nitrógeno (C:N) presente en la columna de agua del cultivo, la cual está determinada por el alimento balanceado proporcionado a los organismos, la cantidad de compuestos nitrogenados presentes en el sistema (en el alimento y/o fertilizante, la biomasa de diversos organismos presentes en el cultivo, entre otros). El incremento de la relación C:N a partir de la adición de carbono reduce la presencia de compuestos nitrogenados tóxicos.

La relación de C:N puede ser modificada de dos maneras, mediante la adición de fuentes externas de carbono y mediante la reducción del contenido de proteína en el alimento. La relación de C:N de 10:1 o mayor es óptima para la producción de bioflóculos así como para maximizar la remoción de amonio (Azim *et al.*, 2008). La adición de fuentes de carbono al cultivo (azúcar, melaza, almidón) induce al crecimiento de bacterias heterótrofas y sus poblaciones son capaces de consumir el exceso de carbono y nitrógeno que provienen del alimento no consumido, así como de los desechos metabólicos, además de formar agregados con alto valor nutricional para los organismos en cultivo (Schneider *et al.*, 2005).

I.4. Los bioflóculos como alimento vivo

La calidad de los bioflóculos depende directamente de los organismos que se desarrollen en ellos y éstos a su vez dependen de las características del sistema de cultivo. La composición varía al modificar características del sistema como la intensidad del cultivo, la intensidad de la aireación, cantidad de oxígeno disuelto, la fuente de carbón disponible, la temperatura, la salinidad y el pH, así como la comunidad microbiana asociada al sistema (Avnimelech, 2007, De Schryver *et al.*, 2008), y al ser tantas las variables no ha sido posible describir estos bioflóculos por completo.

Los beneficios del uso de esta tecnología se documentan principalmente en cultivo de camarón y en menor medida en cultivos de peces. A nivel internacional se han realizado numerosos trabajos para evaluar el desarrollo y la respuesta productiva de estos cultivos al inducir la generación de bioflóculos: los organismos desarrollados resuelven el problema de difusión de nutrientes en el cultivo, al formar los agregados (bioflóculos) más fáciles de consumir por los organismos (De Schryver *et al.*, 2008) y de esta manera permiten que la recuperación de proteínas en sistemas de bioflóculos sea el doble que en los convencionales (de agua clara) (Bosma y Verdegem, 2011); sin embargo estos estudios se han limitado a calcular los beneficios en parámetros fisicoquímicos y de nutrientes (pH, oxígeno disuelto, nitrógeno amoniacal total) así como en la respuesta productiva de los organismos en cultivo (peso ganado, factor de conversión alimenticia, biomasa total, supervivencia, entre otros) y poco se conoce acerca de la variación en la composición de los bioflóculos en función de la dieta administrada y edad del cultivo.

En los bioflóculos se encuentran principalmente compuestos de materia orgánica (60-70%), en los cuales se puede observar una mezcla heterogénea de microorganismos benéficos (hongos, algas, protozoarios y rotíferos) que pueden favorecer y complementar la alimentación de los organismos cultivados; así como una mínima porción de materia inorgánica (30-40%) tales como coloides y polímeros orgánicos que logran tamaños de 1000 μm , formas irregulares y cuerpos porosos permitiendo el paso de fluidos (Castro-Nieto *et al.*, 2012).

Ballester *et al.* (2010), Emerenciano *et al.* (2011b), Kuhn y Boardman (2008) y Azim y Little (2008) son algunos autores que han documentado mejoras de cultivos de camarón (*Farfantepenaeus paulensis*, *F. brasiliensis* y *Litopenaeus vannamei*) y tilapia (*Oreochromis niloticus*) respectivamente: en todos ellos se reportan mejores factores de conversión alimenticia, mayor crecimiento y supervivencia. Los resultados de estos trabajos proponen esta tecnología como una manera práctica para suplementar la alimentación de los organismos y a la vez aprovechar mejor los nutrientes disponibles así como los desechos, tener cultivos más sustentables, reducir costos de producción, impacto ambiental así como reducir la dependencia de la harina de pescado (Moreira de Souza *et al.*, 2013).

En un estudio de Avnimelech (2007) se compararon dos cultivos experimentales de tilapia uno de ellos con alimento balanceado y otro que además incluía bioflóculos; se observó que la recuperación de proteína en el segundo era del doble y que en este tratamiento los organismos se encontraban consumiendo los bioflóculos constantemente. También se determinó que a pesar del consumo, la cantidad de bioflóculos en la columna de agua se mantenía constante, ofreciendo a los peces alimento vivo de forma permanente.

En otro estudio de Azim y Little (2008) se evaluó la calidad de los bioflóculos en un cultivo de tilapia con dos alimentos con diferente contenido de proteína (24% y 35%), observándose que en cuanto a la composición de lípidos y proteínas, así como en cantidad de energía, no hubo diferencia; concluyendo que la calidad de estos agregados es en cierta manera independiente de aquella presente en el alimento balanceado suministrado al sistema de cultivo. De igual manera, Megahed (2010) evaluó la calidad de los bioflóculos desarrollados en un cultivo de camarón (*Penaeus semisulcatus*) alimentado con diferentes niveles de proteína cruda en la dieta: 31.15, 21.6, 18.45 y 16.25%, sin encontrar diferencias en el contenido de proteína (19.9%) y lípidos (11.8%) promedio de los agregados desarrollados en los cuatro tratamientos.

En los cultivos acuícolas el alimento es una de las variables más importantes debido a que es un factor fundamental para el crecimiento de los organismos, pero a su vez representa una parte importante de los gastos de operación; asimismo, mediante el uso excesivo de alimentos balanceados se ha observado un acelerado deterioro de la calidad del agua en los sistemas de cultivo. Por ello, el uso de alimento vivo en estos sistemas es una alternativa que permite reducir costos así como el impacto ambiental, ya que además del importante aporte nutricional, el uso de estos agregados permite al sistema mantener una buena calidad de agua y sedimento en el sistema, así como un mayor control de contaminantes y patógenos.

Los sistemas de cultivo en bioflóculos son muy dinámicos, debido a la gran cantidad de procesos físicos, químicos y biológicos que se desarrollan de manera simultánea. La composición química proximal de los bioflóculos puede variar en función de la edad del cultivo, la dieta suministrada, el tipo de organismos en cultivo y las variables

ambientales, entre otras. Es por ello, que la realización de la presente investigación es relevante ya que permitirá conocer como varía la composición química proximal de los bioflóculos a través del cultivo y en función de la dieta suministrada a los organismos en cultivo; con ello se tendrán más y mejores bases científicas para un manejo adecuado de estos importantes componentes nutricionales en los nuevos sistemas de cultivo.

II. HIPÓTESIS

Dentro de un cultivo los bioflóculos se generan a partir de la materia orgánica (restos de alimento, heces, organismos muertos y consorcios microbianos), debido a la alta dinámica del cultivo, la composición química proximal de los bioflóculos desarrollados en un cultivo de tilapia alimentado con diferente nivel de sustitución de harina de pescado por harina vegetal en su dieta variará entre tratamientos y en función de la edad del cultivo.

III.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la composición química proximal de los bioflóculos desarrollados en un cultivo de tilapia alimentado con diferente nivel de sustitución de harina de pescado por harina vegetal en su dieta y su relación con los parámetros de producción de los peces, a través del tiempo de cultivo.

III.2. Objetivos Particulares

Analizar el contenido de nitrógeno amoniacal total (NAT) presente durante un cultivo de tilapia alimentada con cuatro dietas diferentes.

Determinar el volumen de los bioflóculos desarrollados en un cultivo de tilapia con cuatro dietas diferentes.

Determinar la biomasa (sólidos suspendidos totales, cenizas, materia orgánica) de los bioflóculos desarrollados en un cultivo de tilapia con cuatro dietas diferentes.

Analizar en función del tiempo, la composición de los bioflóculos (carbohidratos, proteínas, lípidos) desarrollados en un cultivo de tilapia con cuatro dietas diferentes.

Establecer la relación entre la composición de los bioflóculos y los parámetros productivos de la tilapia.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. Cultivo experimental

El cultivo experimental de tilapia se llevó a cabo en la Universidad Estatal de Sonora (UES) en el campus Navojoa durante los meses de abril y mayo de 2012.

Los organismos que se utilizaron para iniciar el cultivo fueron juveniles de la línea híbrida de tilapia roja del género *Oreochromis niloticus* x *O. mossambicus* con un peso individual aproximado de 16.2 gramos. Los organismos fueron sembrados a una densidad promedio de 24.6 juveniles/contenedor (123 organismos m^{-3}) con una biomasa de siembra de 0.4 kg/contenedor (2.0 kg m^{-3}) en unidades experimentales con una capacidad de 200 litros. Se mantuvieron condiciones de aireación constante con un soplador eléctrico (1/3 HP) y una salinidad de 35‰; no se realizaron recambios de agua y sólo se añadió agua de mar filtrada para sustituir la que se perdió por el efecto de la evaporación.

En esta investigación se evaluaron por triplicado durante 49 días 4 dietas experimentales isolipídicas e isocalóricas, con un contenido de proteína de 35%. Para preparar las dietas experimentales se incluyó harina de pescado en diferentes niveles: 0% (T0), 10% (T10), 20% (T20) y 30% (T30), para balancear y obtener el nivel de proteína deseado se utilizó harina vegetal (mezcla de harina de maíz, trigo y sorgo) (Tabla 1, anexo I). Como control se utilizó un alimento comercial para tilapia (Nutripec 3508 de Purina®).

Para la generación y maduración del bioflóculo el tanque de cultivo se inoculó con 1% de bioflóculo maduro. Durante los primeros 10 días se mantuvo una relación de carbono:nitrógeno de 20:1 (C:N = 20:1) para lo cual se realizaron las estimaciones con base en la relación C:N del alimento y se complementó con azúcar sin refinar.

Posteriormente la relación C:N utilizada bajó a 10:1. Las mediciones de nitrógeno amoniacal total (NAT) cada dos días permitieron determinar si la cantidad de carbono adicional era suficiente.

IV.2. Determinación de nitrógeno amoniacal total (NAT)

Los muestreos se realizaron cada dos días, las muestras de agua se colocaron en frascos de plástico de 250 mL las cuales se filtraron con filtros de fibra de vidrio GFC de 47 mm de diámetro. Posteriormente se utilizó el método de salicilato (HACH: 8155) para determinar el NAT, la absorbancia fue medida con el espectrofotómetro HACH DR/2800.

La toma de muestras de bioflóculos se realizó en los días 1, 7, 21, 35 y 42 del cultivo; en cada unidad experimental se tomaron 500 mL de agua y se mantuvieron en condiciones de congelación a una temperatura de -80°C en un ultracongelador New Brunswick® (modelo U9270-0002) hasta el momento de su respectivo análisis.

IV.3. Volumen de los bioflóculos

Para determinar el volumen de bioflóculos en el agua de cultivo la muestra se vertió en un cono Imhoff con capacidad de un litro y se dejó reposar durante 45 minutos, posteriormente los sólidos depositados en las paredes se removieron cuidadosamente con una varilla de vidrio para permitir su sedimentación total durante 15 minutos más y se tomó la lectura del total en mL L^{-1} .

IV.4. Biomasa de los bioflóculos

El análisis de biomasa de los bioflóculos (Anexo II) se llevó a cabo en el Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora, DICTUS. Para determinar el contenido de biomasa en base seca las muestras se filtraron a través de filtros de fibra de vidrio y posteriormente se secaron en estufa (VWR® modelo E1305) a 75°C durante 12 horas, se enfriaron en desecador hasta peso constante y se pesaron en balanza analítica digital (OHAUS® Analytical Standard, modelo AS200). Para determinar el contenido de cenizas las muestras se incineraron en mufla (FELISA®, modelo 360D) a 480°C durante 8 horas, se enfriaron en desecador hasta peso constante y se pesaron en balanza analítica digital (OHAUS® Analytical Standard, modelo AS200).

La determinación de contenido de materia orgánica en los bioflóculos se realizó mediante el cálculo de la diferencia de peso entre sólidos suspendidos totales y contenido de cenizas.

IV.5. Composición química proximal de los bioflóculos

El análisis de la composición química proximal de los bioflóculos se llevó a cabo en el Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora, DICTUS.

Para determinar el contenido total de proteínas en la muestra (Anexo III), ésta fue tratada con una solución de hidróxido de sodio (NaOH 0.1 N) para extraer las proteínas (López-Elías *et al.*, 1995); posteriormente se procedió según el método de Lowry *et al.* modificado por Malara, G. y Charra, R. (López-Elías *et al.*, 1995) utilizando albúmina de bovino como estándar (100, 75, 50, 25 y 0 g mL⁻¹) y la lectura se realizó por espectrofotometría (Milton Ray® Spectronic 20D+) a una longitud de onda de 750 nm.

Para determinar el contenido total de lípidos en la muestra (Anexo IV), ésta fue tratada con una mezcla de cloroformo, metanol y agua para extraer los lípidos mediante el método en frío de Bligh y Dyer modificado por Chiaverini, J. (López-Elías *et al.*, 1995); posteriormente se procedió según el método de Pande *et al.* (descrito por López-Elías *et al.*, 1995), utilizando tripalmitina como estándar (1, 0.8, 0.4, 0.25 y 0 mg mL⁻¹) y la lectura se realizó por espectrofotometría (Milton Ray®, Spectronic 20D+) a una longitud de onda de 590 nm.

La determinación del contenido total de carbohidratos (Anexo V) se realizó por diferencia de peso entre el contenido de materia orgánica y la suma de proteínas y lípidos totales.

IV.6. Respuesta productiva de la tilapia

La respuesta productiva de los organismos fue evaluada mediante biometrías (peso promedio al inicio y final del cultivo) y estudios poblacionales (total de organismos), así como la determinación del factor de conversión alimenticia (FCA) de cada tratamiento, el cual se determinó dividiendo el alimento suministrado entre la biomasa cosechada.

IV.7. Análisis estadístico

El desarrollo de los bioflóculos en el tiempo fue descrito gráficamente con los datos promedio de volumen de bioflóculos, la materia total particulada (sólidos suspendidos

totales, cenizas y materia orgánica) y composición química proximal (carbohidratos, proteínas, y lípidos totales) de los bioflóculos. Los datos de volumen, materia total particulada y composición de los bioflóculos de los diferentes tratamientos se compararon con un análisis de varianza de una vía ($\alpha= 0.05$) y se les aplicó un análisis a posteriori mediante la prueba de Tukey HSD con el software Statistica v. 7.0 (StatSoft, Inc. 2000) para determinar diferencias significativas entre medias. En caso de no encontrarse diferencias entre tratamientos se aplicó un análisis de varianza de una vía (Kruskal-Wallis) y una prueba a posteriori (Método de Dunn).

Los parámetros de producción de la tilapia se compararon con los valores de biomasa y composición de los bioflóculos utilizando el software JMP v.10.0.0 (SAS®) para determinar correlación entre ambos resultados.

V. RESULTADOS Y DISCUSION

V.1. Nitrógeno amoniacal total (NAT)

En este experimento el NAT tuvo niveles bajos, el máximo registrado fue 0.63 mg L⁻¹ en el tratamiento control, mientras que el más bajo fue 0.40 mg L⁻¹ en el tratamiento T30. Sin embargo el ANOVA de una vía no indicó diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 2).

En los cultivo basados en bioflóculos, el NAT además de ser un producto del metabolismo de la tilapia, es resultado de la degradación de la materia orgánica. Lim y Webster (2006) mencionan que la tilapia sometida por varios días a niveles de NAT superiores a 2 mg L⁻¹ presenta mortalidades masivas. En este estudio los niveles se mantuvieron muy por debajo del límite crítico. La adición de fuentes de carbono para tener una razón de C:N de 20:1 al inicio del cultivo y posteriormente de 10:1 fue suficiente para mantener niveles de NAT adecuados en el cultivo de tilapia.

V.2. Volumen de los bioflóculos

Una forma práctica de estimar el contenido de sólidos suspendidos en el cultivo de bioflóculos es determinar el volumen que ocupan los bioflóculos en el agua; en éste estudio dicha variable presentó diferencia significativa entre los tratamientos T0 y T30 ($p < 0.05$), con un promedio de 9.22 mL L⁻¹ para el tratamiento T0, 8.67 mL L⁻¹ para el tratamiento T10, 6.78 mL L⁻¹ para el tratamiento T20 y 4.22 mL L⁻¹ para el tratamiento T30; mientras que el tratamiento control se mantuvo en 5.56 mL L⁻¹. Se observó una marcada tendencia de incremento en el volumen del bioflóculo al incluir una menor cantidad de harina de pescado y mayor cantidad de harina vegetal en la dieta de la tilapia (Figura 3). Esto puede ser debido a que la digestibilidad del alimento con harina vegetal es menor, lo cual da origen a una mayor cantidad de material floculado no digerido, lo cual concuerda con lo reportado por Soltan *et al.* (2008), quienes determinaron que al sustituir más de 45% de

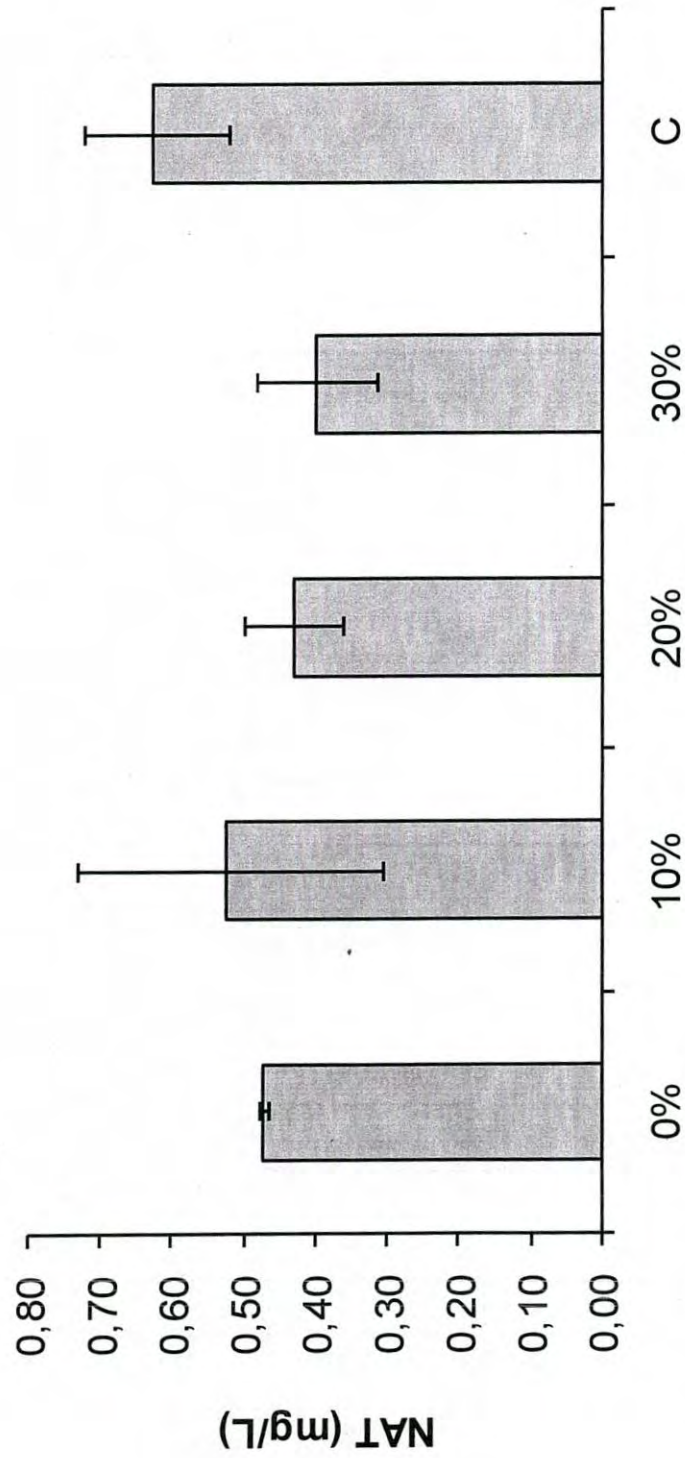


Figura 2. Concentraciones promedio de NAT durante el periodo de cultivo en los diferentes tratamientos.

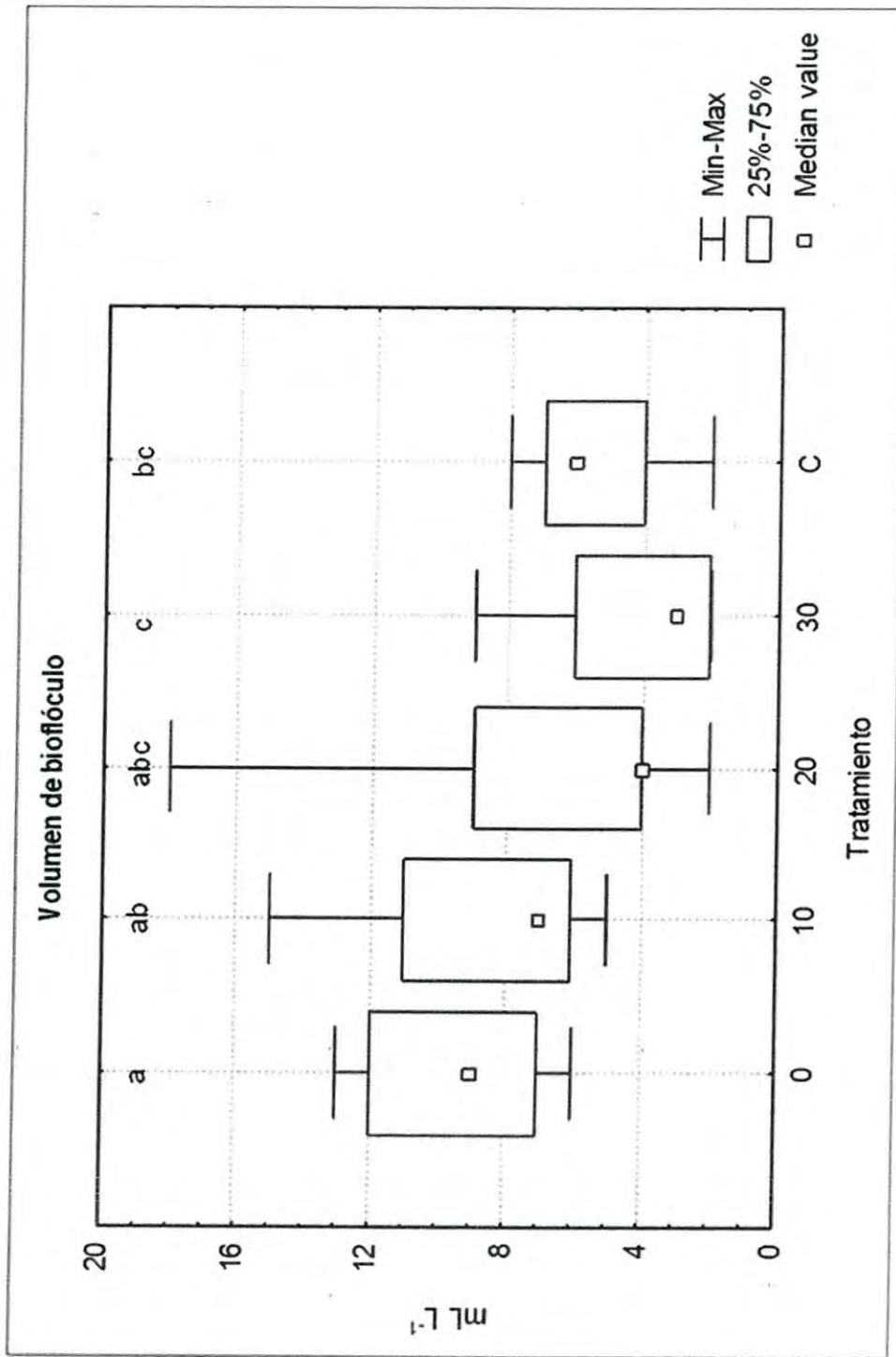


Figura 3. Volumen promedio (mL L^{-1}) de los biofóculos en los cuatro tratamientos y el control. Letras diferentes establecen diferencias estadísticas entre valores de cada tratamiento.

harina de pescado con mezcla de harinas vegetales (semilla de algodón, girasol, canola, ajonjolí y linaza) disminuía significativamente el coeficiente de digestibilidad aparente del alimento consumido por la tilapia desde 81% hasta 73%.

Los volúmenes del bioflóculo variaron durante el transcurso del experimento mostrando un incremento durante los primeros días de cultivo en todos los tratamientos. El incremento estuvo relacionado con el contenido de harina de pescado en la dieta, ya que el tratamiento T0 mostró el mayor incremento de volumen (de 3 a 19 mL L⁻¹) y el tratamiento T30 mostró el menor incremento (de 1.3 a 5.6 mL L⁻¹) (Figura 4). Tanto el volumen de los bioflóculos como los sólidos suspendidos totales se encontraron en mayor cantidad en los tratamientos con menor cantidad de harina de pescado; en el tratamiento T0 se observó un incremento de ambos parámetros durante el transcurso del experimento. Esta metodología de medición del volumen del bioflóculo resulta más práctica, por lo que podría ser una útil herramienta para el monitoreo y control de materia suspendida dentro del cultivo.

Coincidiendo con estos resultados Avnimelech (2007) reportó una disminución en el volumen de bioflóculos (de 40 a 20 mL L⁻¹) durante los primeros 6 días en los cuales los organismos (*Oreochromis niloticus*) fueron privados de alimento exógeno; la tendencia en los días siguientes fue a incrementar este volumen a un valor promedio de 27 mL L⁻¹ sin mostrar diferencia significativa hasta el final del experimental (día 12); valores similares a los encontrados en el presente estudio.

V.3. Biomasa de los bioflóculos

El promedio de sólidos suspendidos totales de los bioflóculos fue de 537.33 mg L⁻¹ para el tratamiento T0, 351.36 mg L⁻¹ para el tratamiento T10, 402.35 mg L⁻¹ para el tratamiento T20, 404.04 mg L⁻¹ para el tratamiento T30 y 354.69 mg L⁻¹ para el tratamiento control (Tabla 1, Figura 5).

El análisis estadístico mostró que fue significativamente mayor el contenido de sólidos suspendidos totales del tratamiento T0 que el resto de los tratamientos (Figura 6) ($p < 0.05$). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Scopel *et al.* (2011), quienes observaron un incremento de sólidos suspendidos totales en el sistema alimentado con harinas de origen vegetal en comparación con otros sistemas que incluían harina de pescado

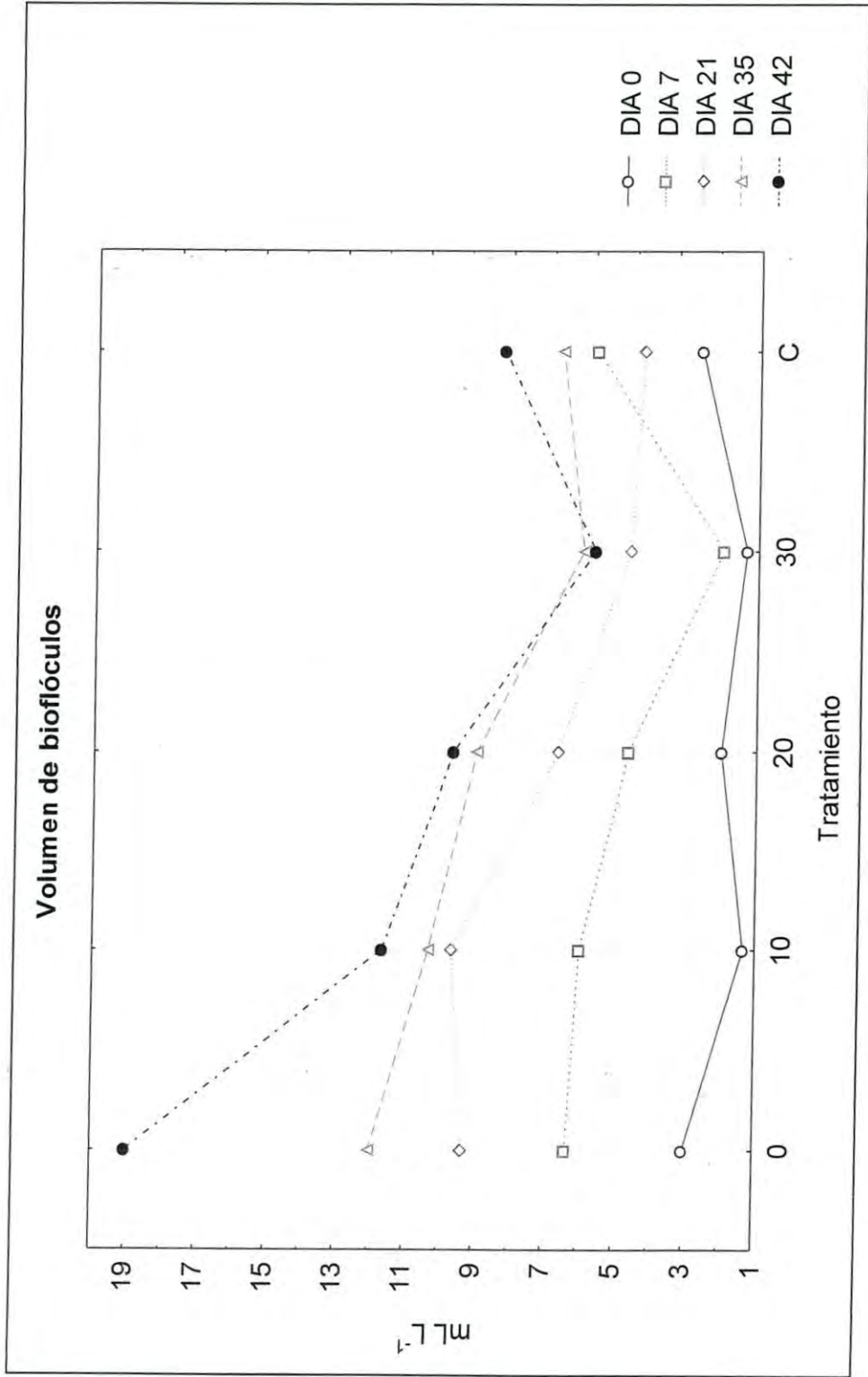


Figura 4. Volumen promedio (mL L⁻¹) de los bioflóculos en los cuatro tratamientos y el control en los días 0, 7, 21, 35 y 42 del cultivo experimental.

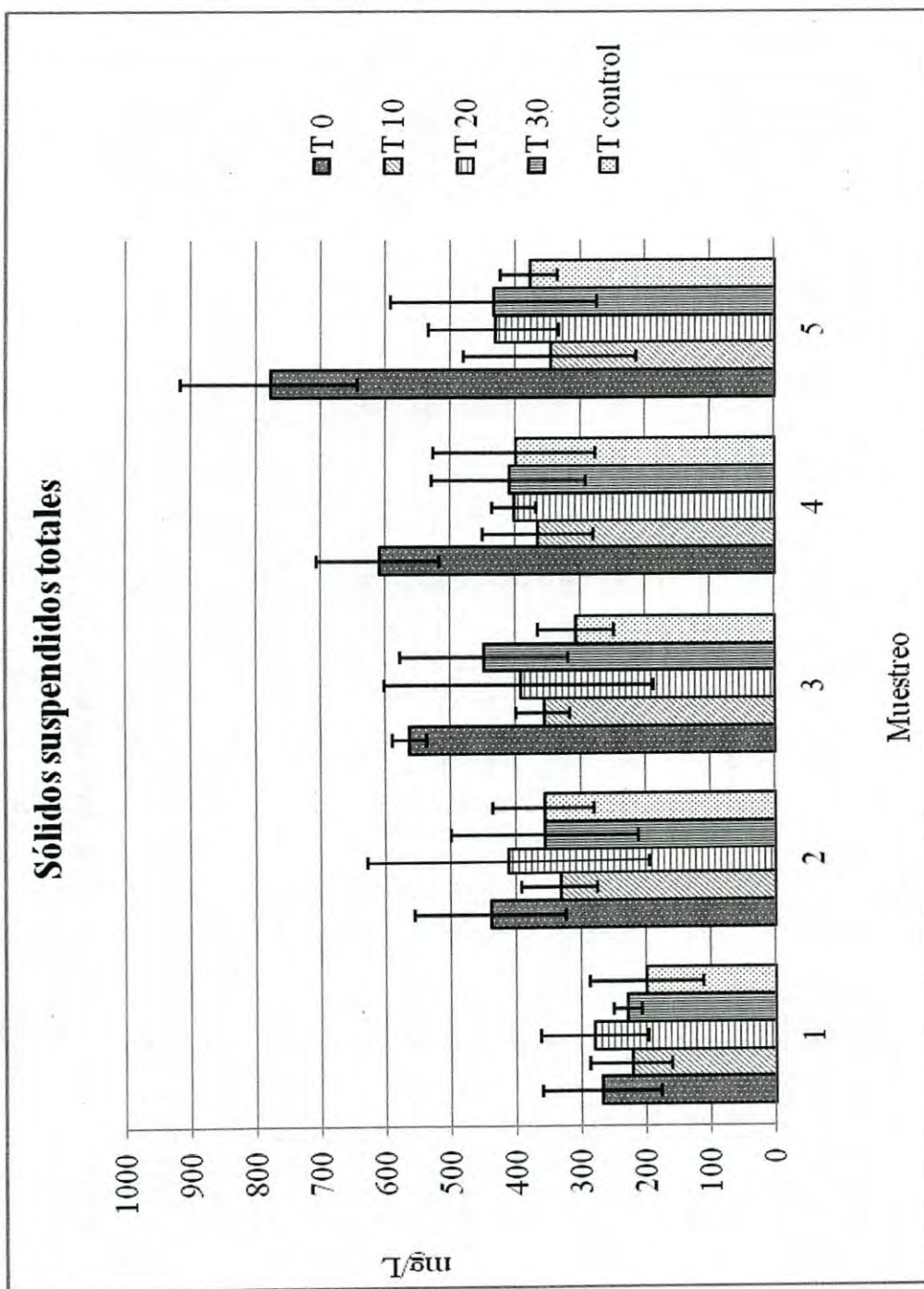


Figura 5. Sólidos suspendidos totales de los diferentes tratamientos durante el cultivo experimental (1=día 0, 2=día 7, 3=día 21, 4=día 35 y 5=día 42). Barras de error representan desviación estándar (n=3).

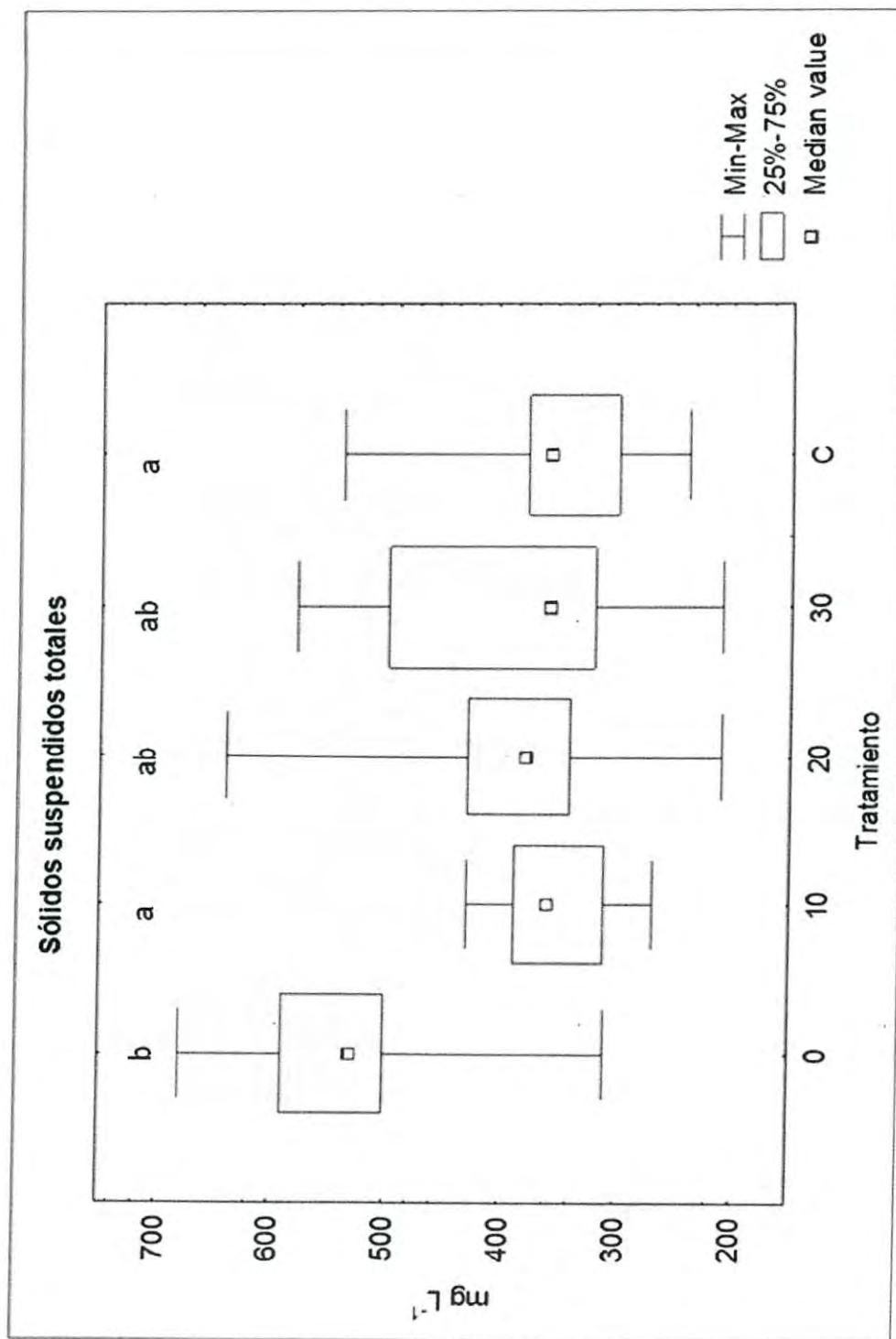


Figura 6. Sólidos suspendidos totales promedio (mg L⁻¹) de los bioflóculos en los cuatro tratamientos y el control. Letras diferentes establecen diferencias estadísticas entre valores de cada tratamiento.

en la composición de la dieta, discutiendo que hay menor digestibilidad en los ingredientes vegetales por los camarones.

Los valores de los tratamientos T10, T20, T30 y control se mantuvieron estables a través de las semanas de muestreo y sin diferencia significativa entre tratamientos ($p>0.05$), siendo el tratamiento T0 el que se mantuvo menos estable y con una mayor diferencia entre el primer y último muestreo sin diferencias estadísticas respecto al tiempo (Figura 7). En cultivos experimentales de tilapia, Azim y Little (2008) compararon sistemas con alimentos experimentales con un contenido de proteína de 35 y 24%, encontrando promedios similares de sólidos suspendidos totales con valores de 597 y 560 mg L^{-1} , respectivamente, sin embargo estos autores reportaron la dificultad de mantener dichos niveles cerca de 500 mg L^{-1} y lograron alcanzar los 1000 mg L^{-1} en los últimos dos muestreos (semana 11 y 12 del cultivo experimental de tilapia).

Avnimelech (2007) reportó valores de SST dentro de un rango similar al del presente estudio (460 a 643 mg L^{-1}) mostrando el valor mínimo durante el período sin alimentación y el máximo durante el resto de los días de cultivo experimental. Ray *et al.* (2010) compararon la producción de sólidos suspendidos totales al alimentar con harina de pescado y harinas vegetales y encontraron un promedio de 700 mg L^{-1} sin diferencia significativa entre los tratamientos; sin embargo en el sistema con alimento a base de harina de pescado se observaron valores más altos (512-979 mg L^{-1}) en comparación con el que alimento a base de harinas vegetales (303-616 mg L^{-1}), a diferencia de lo observado en el presente estudio. El aumento de los sólidos suspendidos totales en la columna de agua suele ser una problemática para la respiración de los organismos (obstrucción de branquias) así como para el control de oxígeno disuelto (Crab *et al.*, 2012 y Moreira de Souza *et al.*, 2013), sin embargo los valores encontrados en este cultivo experimental se consideran seguros (400 a 500 mg L^{-1}), ya que se recomienda mantener los valores de sólidos suspendidos totales en un promedio cercano a 450 mg L^{-1} para obtener los mejores resultados de producción (Ray *et al.*, 2010).

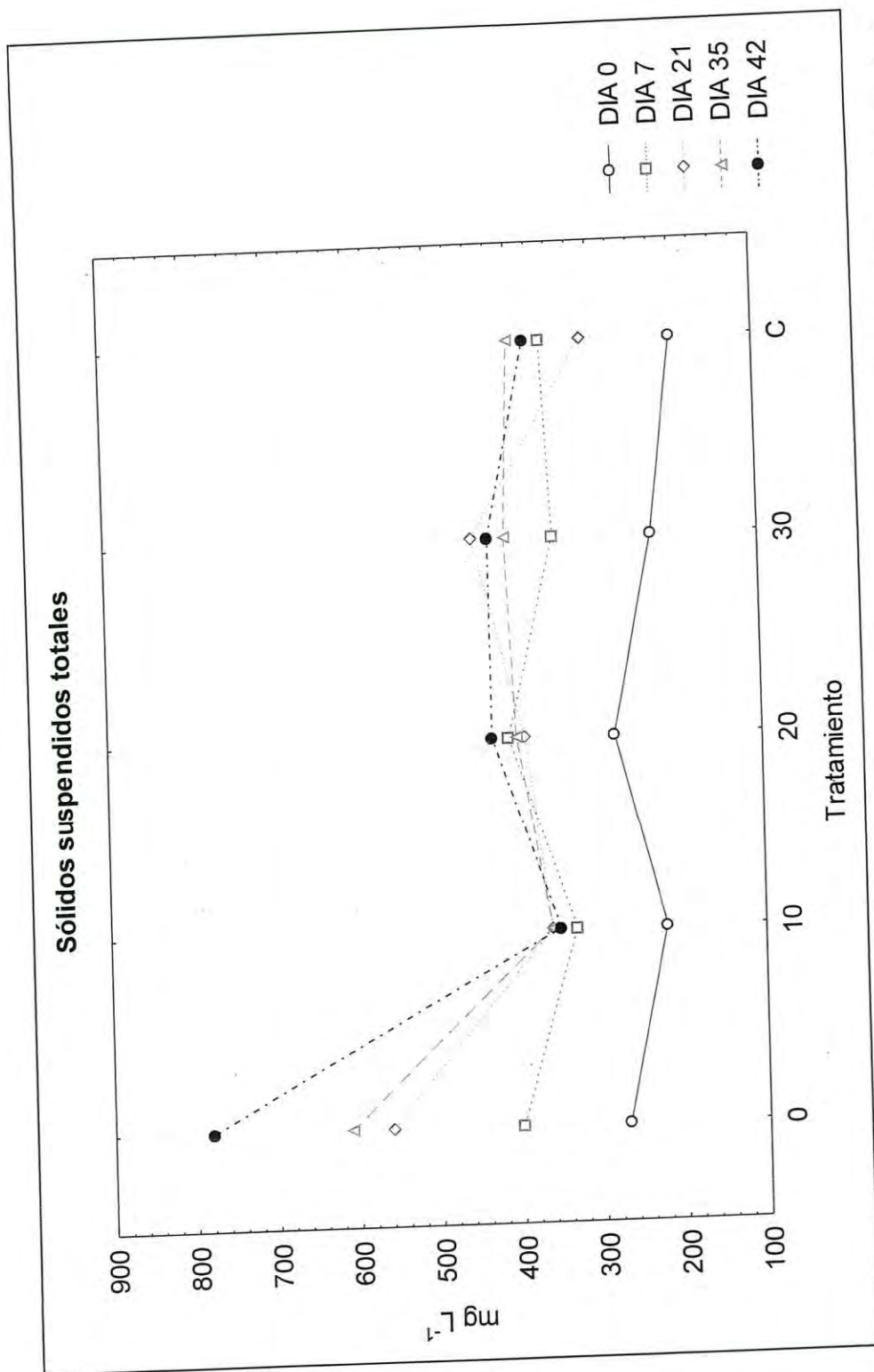


Figura 7. Sólidos suspendidos totales promedio (mg L^{-1}) de los bioflóculos en los cuatro tratamientos y el control en los días 0, 7, 21, 35 y 42 días del cultivo experimental.

En los cultivos con bioflóculos la cantidad de sólidos suspendidos puede variar en función de la edad del cultivo. En el presente estudio los niveles más bajos se registraron un día antes de la siembra (día 0) con un intervalo entre 200 y 300 mg L⁻¹, sin diferencias entre los tratamientos. Al día 7 se presentó un incremento de aproximadamente 100 mg L⁻¹ en todos los tratamientos, para ubicarse en un intervalo general de entre 300 y 400 mg L⁻¹, nuevamente sin diferencias entre los tratamientos. A partir del día 21 de cultivo, el tratamiento T0, presentó consistentemente la mayor concentración de sólidos en el agua (Figura 3), dicha variación se considera fue efecto de la composición de las dietas experimentales.

En reportes de cultivos experimentales con camarones se han encontrado valores menores: Ballester *et al.* (2010) observaron una cantidad promedio de sólidos suspendidos totales de 194.4 mg L⁻¹ durante el desarrollo de su experimento al usar diferentes cantidades de proteína en dietas experimentales para el camarón rosado *F. paulensis*, mostrando una gran fluctuación en los valores (de 79 a 437 mg L⁻¹) durante los 45 días del experimento. De igual manera Emerenciano *et al.* (2011a) obtuvieron un rango promedio de sólidos suspendidos totales de 181 mg L⁻¹; con valores de 449, 200, 150, 450, 150 y 400 mg L⁻¹ en los días 0, 3, 6, 9, 12 y 15 de cultivo, respectivamente.

Con el fin de mostrar la disponibilidad de sustancias nutritivas y no nutritivas (cenizas) en el agua, en este estudio se relacionó la concentración de éstos componentes en mg L⁻¹. El contenido de cenizas promedio de los bioflóculos fue de 157 mg L⁻¹ (36.8%) sin mostrar diferencia estadística significativa entre tratamientos ($p > 0.05$), en lo que respecta al porcentaje de cenizas en base a sólidos suspendidos totales (Tabla 2, Figura 8), coincidiendo con lo encontrado por Ballester *et al.* (2010) y Becerra-Dórame *et al.* (2012) con contenidos de 39.2% y 41.1% y 39.8%.

El contenido de sólidos inorgánicos (cenizas) en los tratamientos T10, T20, T30 y control se mantuvieron en niveles estables a lo largo del experimento, sin cambio significativo con relación a la edad del cultivo; nuevamente el tratamiento T0 mostró los más altos niveles de cenizas ($p > 0.05$) (Figura 9). En un estudio de Maica *et al.* (2011) se

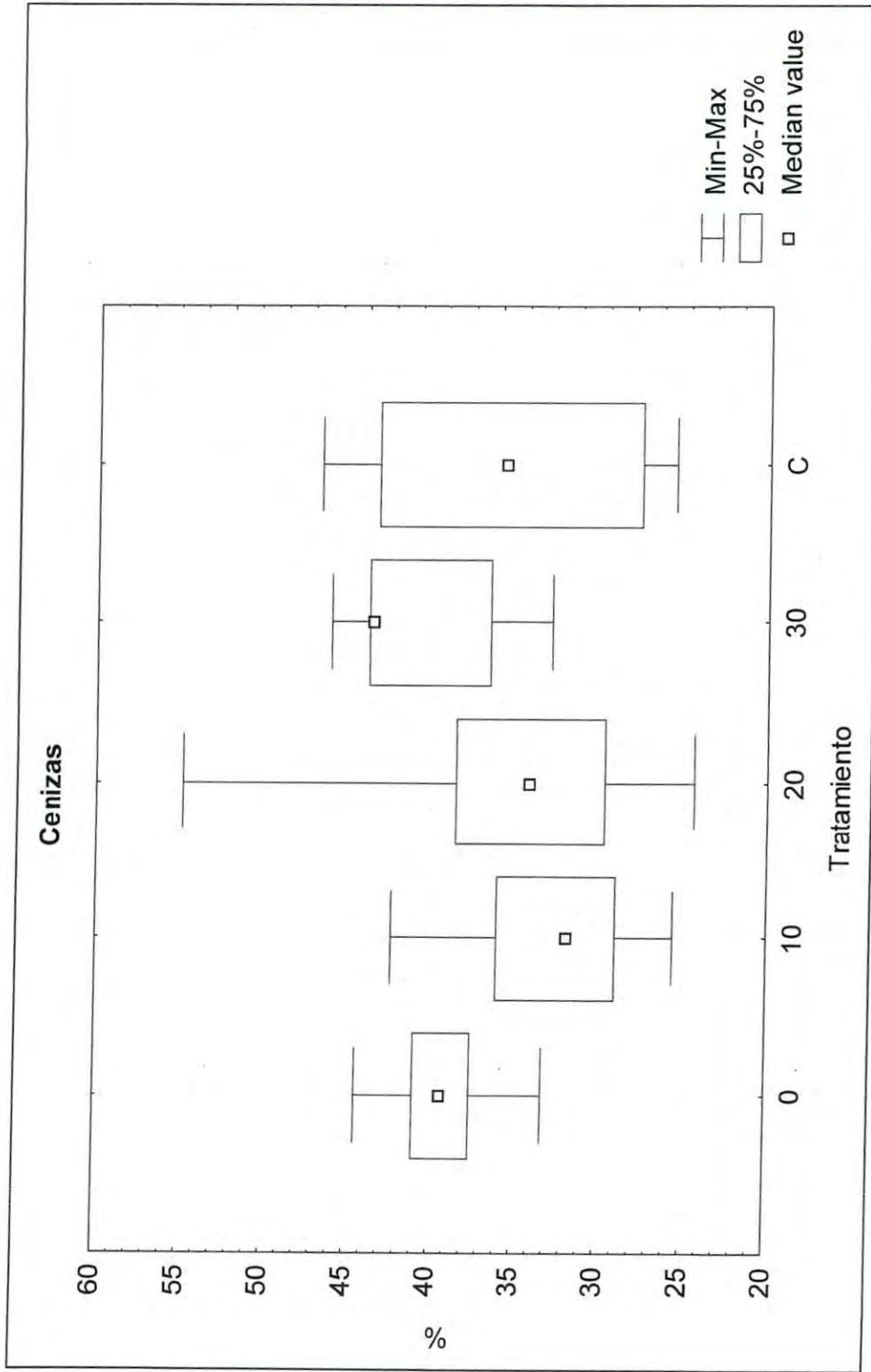


Figura 8. Porcentaje promedio de cenizas de los biofloculos en los cuatro tratamientos y el control.

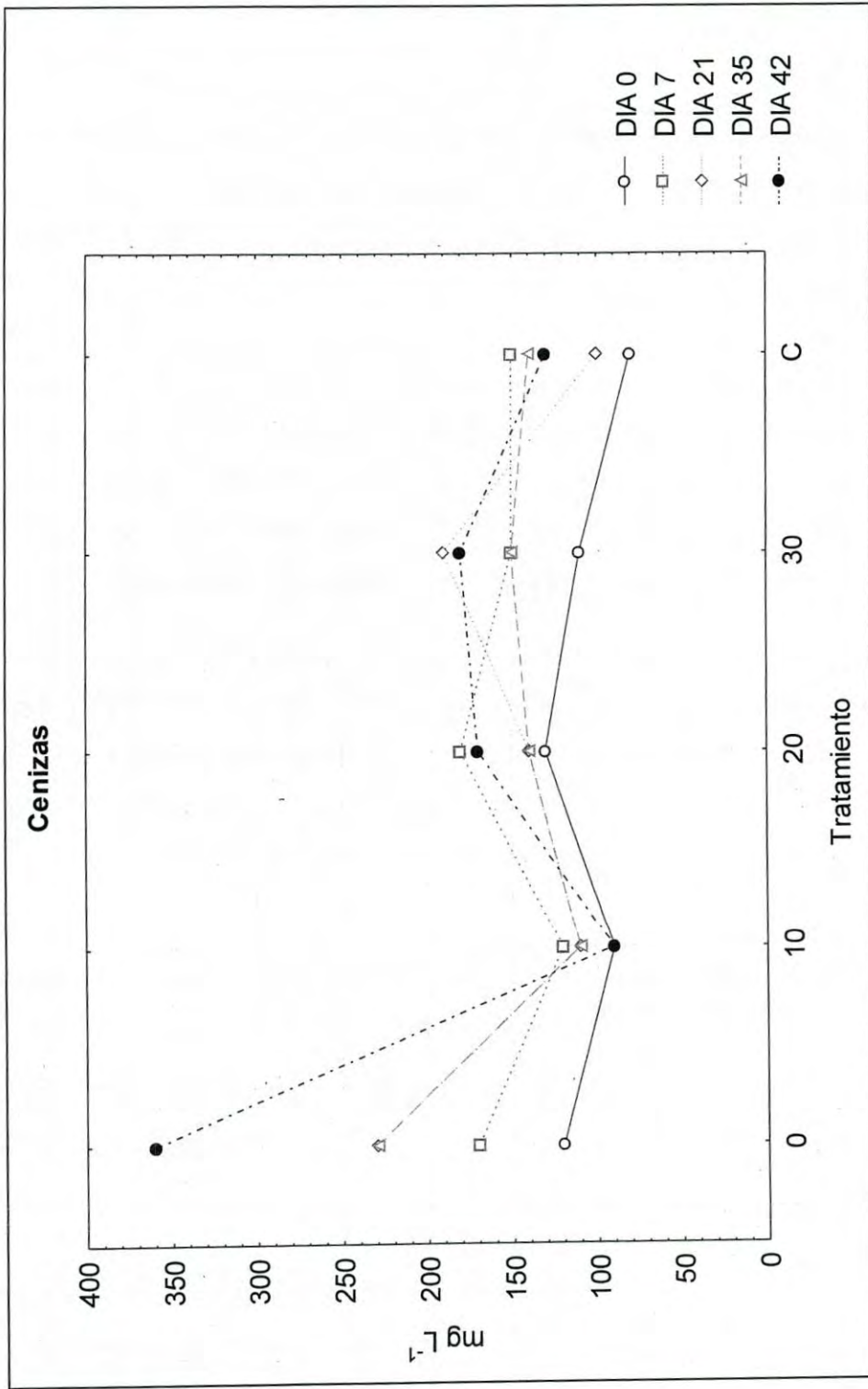


Figura 9. Contenido promedio de cenizas (mg L^{-1}) de los bioflóculos en los cuatro tratamientos y el control en los días 0, 7, 21, 35 y 42 del cultivo experimental.

demonstró la tendencia del incremento de contenido porcentual de cenizas en los bioflóculos al incrementar la salinidad del medio, con valores promedio de 22.12, 26.73 y 42.19%, a salinidades de 2, 4 y 25‰, respectivamente.

El contenido de materia orgánica promedio de los bioflóculos fue de 252.8 mg L⁻¹ (63%) sin mostrar diferencia estadística significativa entre tratamientos ($p > 0.05$) en lo que respecta a los valores porcentuales en base a sólidos suspendidos totales (Tabla 2, Figura 10). El contenido de materia orgánica en los bioflóculos varió entre experimentos y se han reportado contenidos desde 57% hasta 79% dentro de la misma investigación (Maica *et al.*, 2011). Estas variaciones se deben básicamente a que es un parámetro que depende de diversos factores, tales como la salinidad del medio, el alimento introducido así como la especie cultivada. En investigaciones de Kuhn *et al.* (2009 y 2010) con bioflóculos se han obtenido contenidos de materia orgánica de 86, 75 y 88%, al analizar la harina obtenida de estos bioflóculos como ingrediente para producción de alimentos balanceados.

A partir de la segunda semana de muestreo la cantidad de materia orgánica en función del tiempo se mantuvo estable en los tratamientos T10, T20, T30 y control, mientras que en el tratamiento T0 se encontró la mayor cantidad en los bioflóculos ($p > 0.05$) (Figura 11). La mayor cantidad de materia orgánica estuvo relacionada con la mayor concentración de sólidos suspendidos totales y de cenizas obtenidas en el mismo tratamiento.

Tabla 1. Cantidad de sólidos suspendidos totales, cenizas y materia orgánica presentes en los bioflóculos de los diferentes tratamientos.

| | 0% | 10% | 20% | 30% | C |
|--|--------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| SST (mg L ⁻¹) | 537.33 ^b (108.1) | 351.36 ^a (57.7) | 402.35 ^{ab} (151.2) | 404.04 ^{ab} (120.4) | 354.69 ^a (88.9) |
| Cenizas (mg L ⁻¹) | 213.06 ^b (50.1) | 116.91 ^a (31.1) | 156.17 ^{ab} (102.1) | 167.01 ^{ab} (63.9) | 132.35 ^{ab} (60.6) |
| Materia orgánica (mg L ⁻¹) | 324.27 ^b (63.0) | 234.44 ^a (38.3) | 246.17 ^a (59.6) | 237.04 ^a (59.6) | 222.35 ^a (36.4) |

SST: sólidos suspendidos totales. Valores por tratamiento: mg L⁻¹ (desviación estándar). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

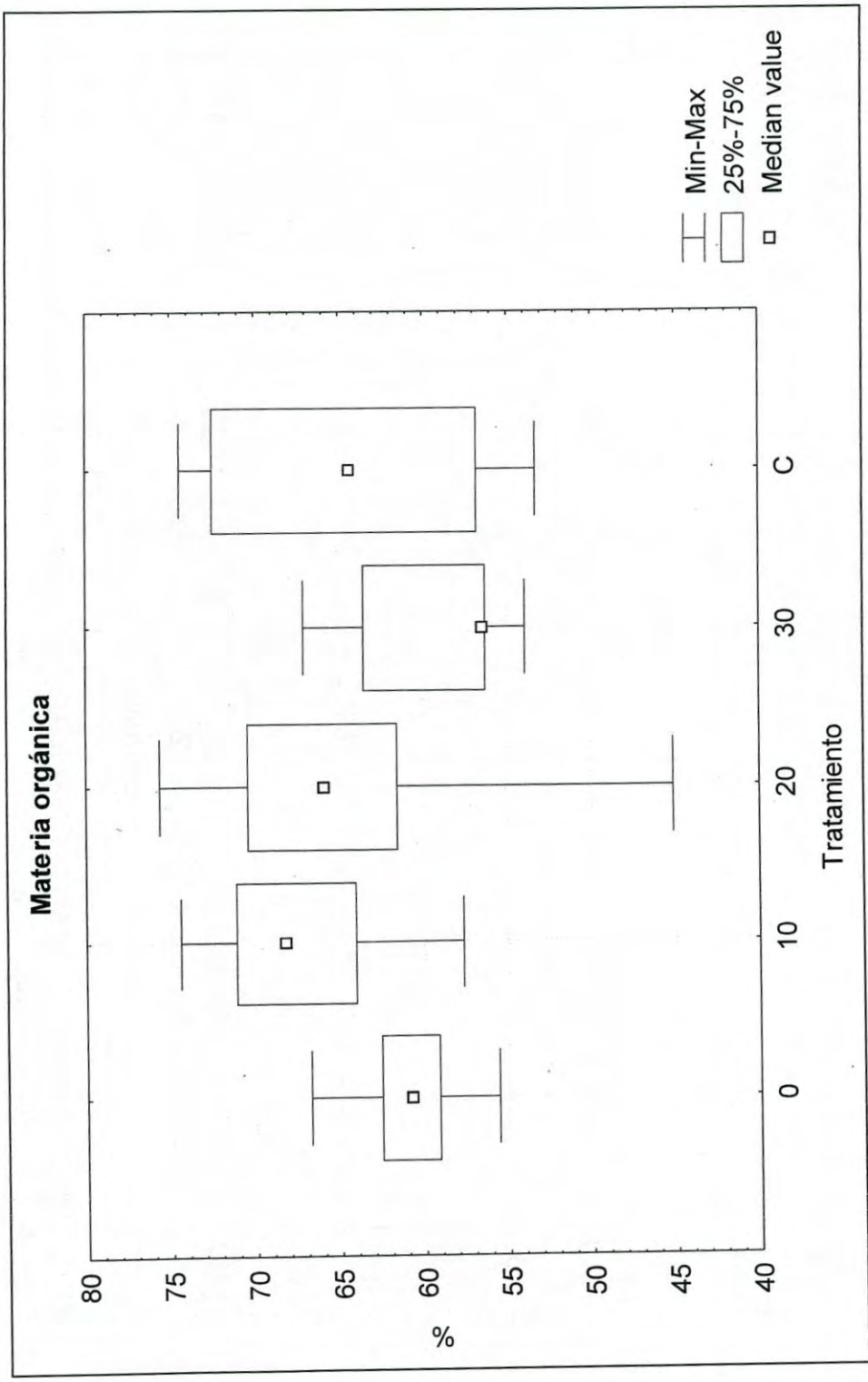


Figura 10. Porcentaje promedio de materia orgánica de los bioflóculos en los cuatro tratamientos y el control.

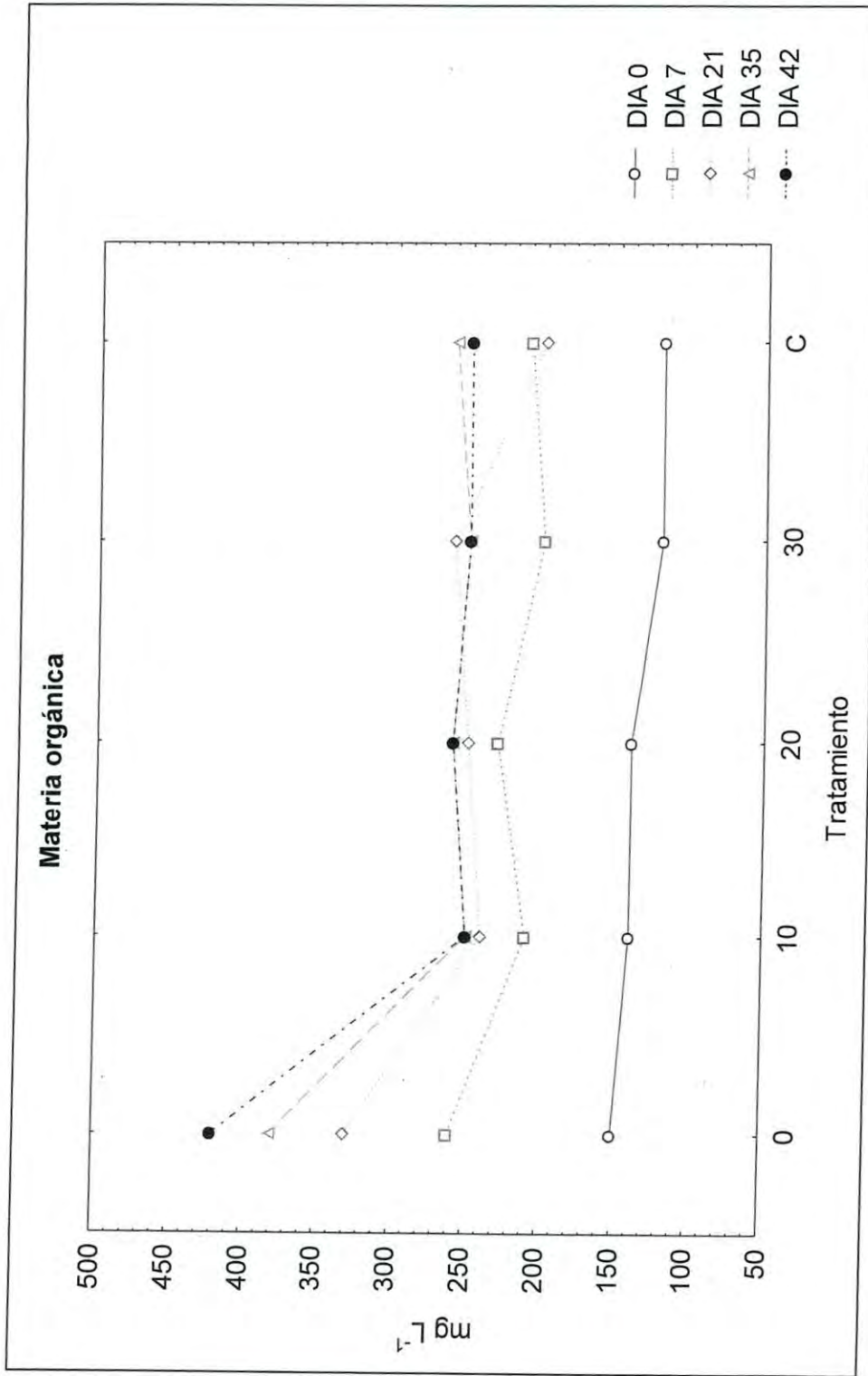


Figura 11. Contenido promedio de materia orgánica (mg L^{-1}) de los bioflóculos en los cuatro tratamientos y el control en los días 0, 7, 21, 35 y 42 del cultivo experimental.

V.4. Composición química proximal de los bioflóculos

El contenido promedio de proteínas totales de los bioflóculos fue de 99.8 mg L^{-1} (24.3%) y no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en lo que respecta al porcentaje en base a sólidos suspendidos totales (Tabla 2, Figura 12). Los valores de proteína encontrados en el presente estudio fueron similares a los reportados por Becerra-Dórame *et al.* (2012), Ekasari *et al.* (2010), Emerenciano *et al.* (2011a), y Azim y Little (2008) quienes encontraron valores de 17.5 a 11.5, 28 a 31, 30.4, 37.9 y 38.4%, respectivamente.

Los valores de los tratamientos T0, T10 y control se mantuvieron estables a partir de la segunda semana de muestreo y sin diferencias significativas entre el resto de los muestreos de cada tratamiento, siendo los tratamientos T20 y T30 los que se mantuvieron con mayor variabilidad ($p > 0.05$) (Figura 13).

Al analizar el contenido de proteína en función del tiempo, se observó que un día antes de la siembra (día 0), el tratamiento T0 presentó la mayor concentración de proteína (70 mg L^{-1}) y que a medida que aumentaba el contenido de harina de pescado en la dieta, ésta tendió a disminuir, llegando hasta 40 mg L^{-1} en los tratamientos T30 y control. En las muestras del día 7, la concentración de proteína en relación al volumen fue de 110 mg L^{-1} en el T0, y en el resto de los tratamientos estuvo cercana a 80 mg L^{-1} . Durante los muestreos de los días 21 y 35 la cantidad de proteína continuó aumentando y al día 42 se registró una disminución significativa en todos los tratamientos, excepto en el T0 (Figura 10).

El contenido de carbohidratos totales promedio de los bioflóculos fue de 142.5 mg L^{-1} (35.2%) y no se encontraron diferencias significativa entre tratamientos en cuanto al porcentaje en base a sólidos suspendidos totales (Tabla 3, Figura 14). Resultados similares han sido reportados por Emerenciano *et al.* (2011a) y Becerra-Dórame *et al.* (2012) con contenidos porcentuales de 29.1%, 34.9 y 35.4%, respectivamente.

Al analizar el contenido de carbohidratos en función del tiempo, se observó que todos los tratamientos registraron valores similares durante el día 0, con niveles de entre 70

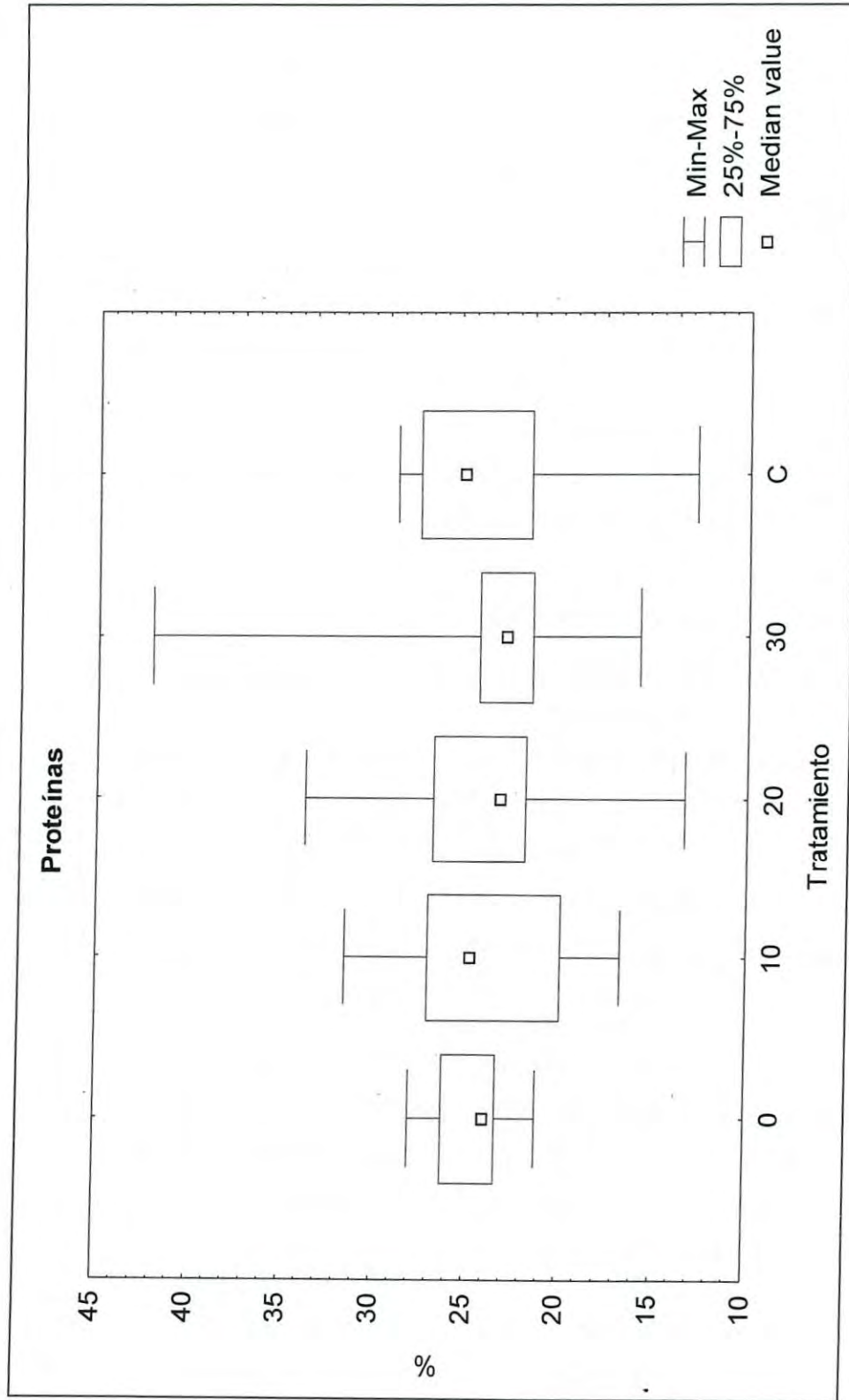


Figura 12. Porcentaje promedio de proteínas totales de los bioflóculos en los cuatro tratamientos y el control.

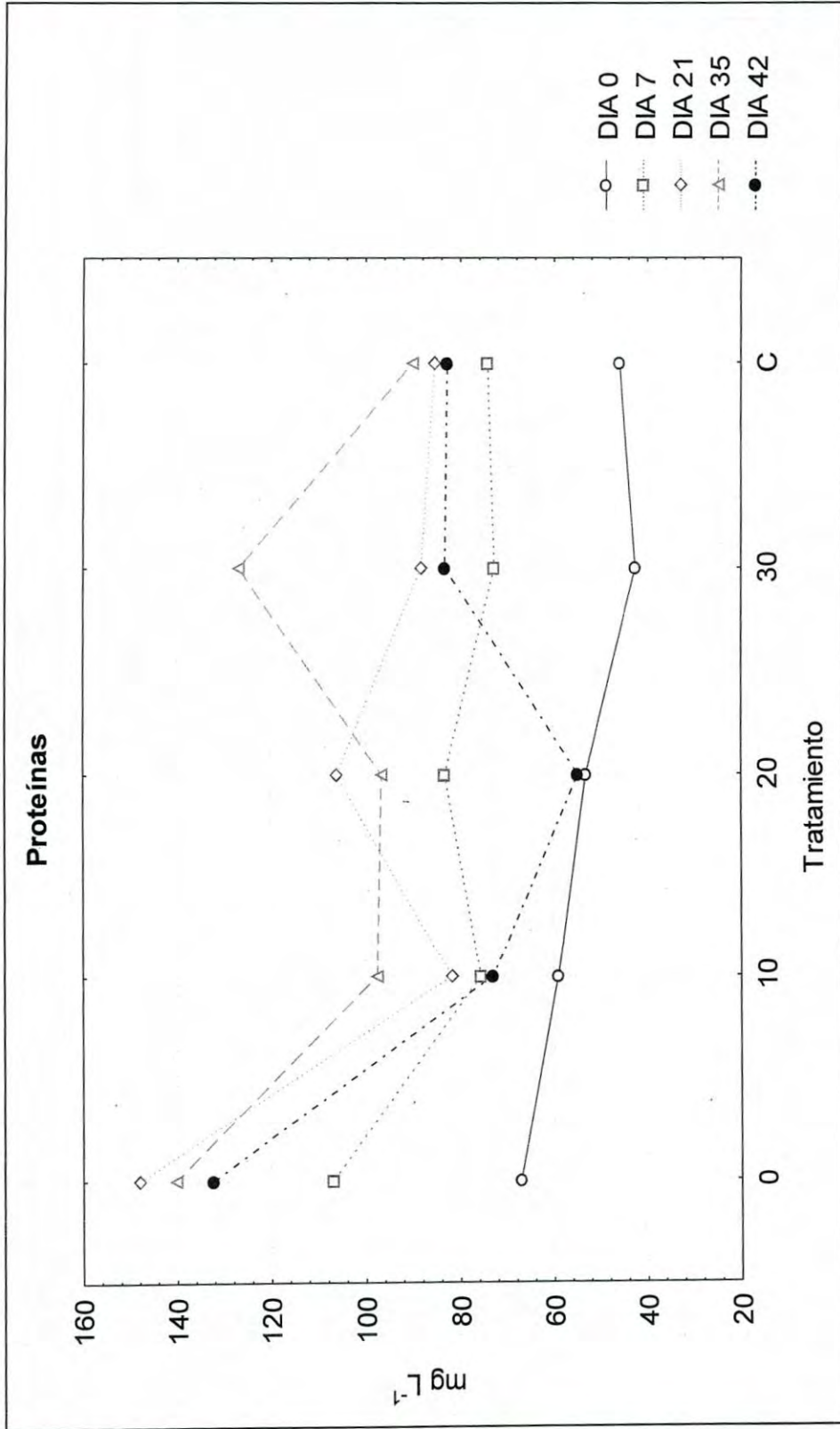


Figura 13. Contenido promedio de proteínas totales (mg L^{-1}) de los bioflóculos en los cuatro tratamientos y el control en los días 0, 7, 21, 35 y 42 del cultivo experimental.

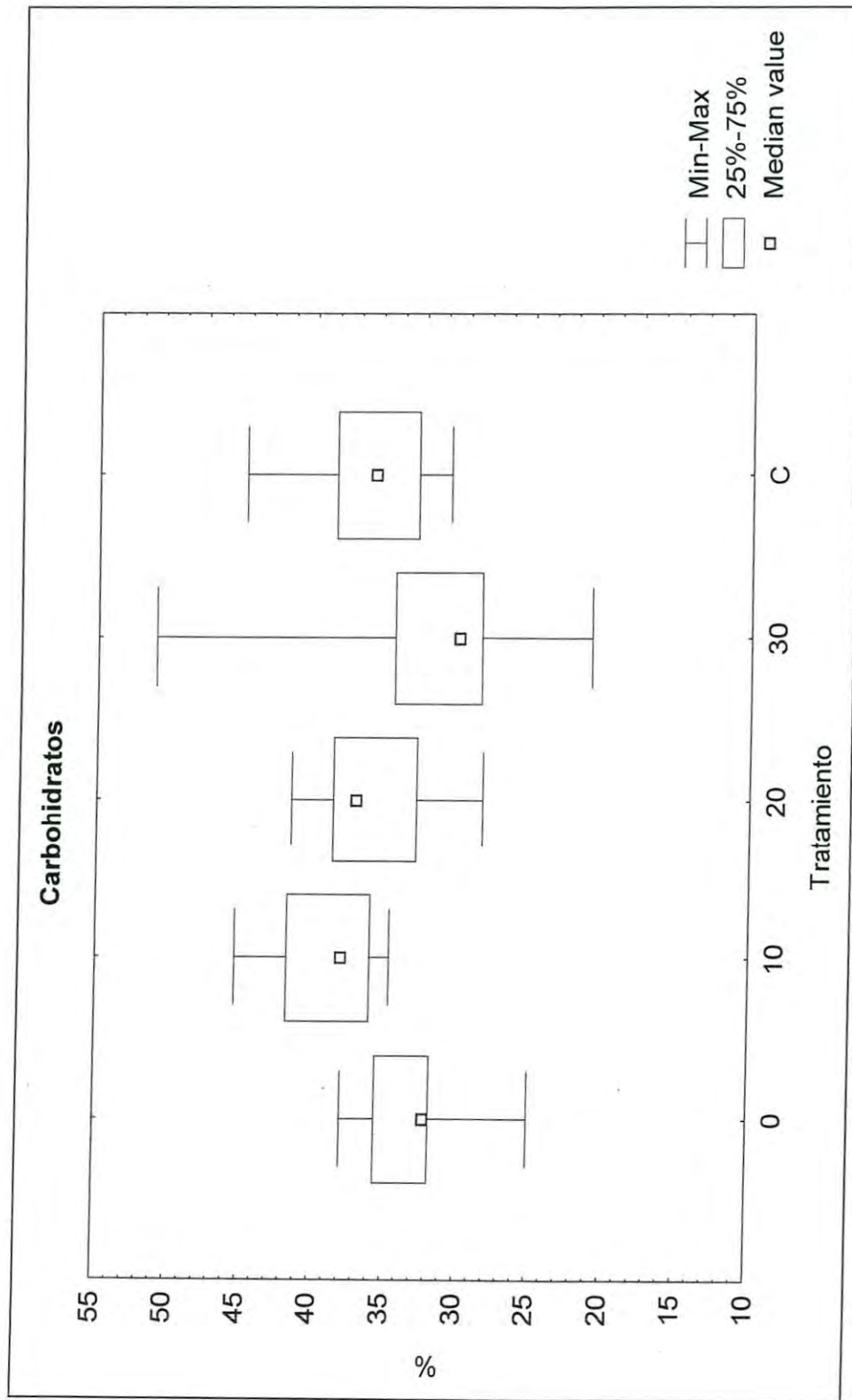


Figura 14. Porcentaje promedio de carbohidratos totales de los bioflóculos en los cuatro tratamientos y el control.

y 80 mg L⁻¹; mientras que al día 7 se alcanzaron valores entre 120 y 150 mg L⁻¹. Durante los muestreos del día 35 y 42, la diferencia entre el tratamiento T0 y el resto, se hizo más evidente (Tabla 2, Figura 15).

Al comparar el contenido de proteína y de carbohidratos totales registrados en el último muestreo (día 42), se observó que mientras que el contenido de proteína en los bioflóculos mostró una caída considerable, el nivel de carbohidratos se mantuvo en aumento.

El contenido de lípidos totales de los bioflóculos fue de 14.04 mg L⁻¹ (2.6%) para el tratamiento T0, 12.43 mg L⁻¹ (3.5%) para el tratamiento T10, 11.40 mg L⁻¹ (2.8%) para el tratamiento T20, 13.10 mg L⁻¹ (3.2%) para el tratamiento T30 y 10.41 mg L⁻¹ (2.9%) para el tratamiento control; se encontraron diferencias significativas en el porcentaje en base a sólidos suspendidos totales, siendo el valor más alto el del tratamientos T10 y el menor el del tratamiento T0 (p<0.05) (Tabla 2, Figura 16). Los valores encontrados en esta investigación fueron similares a los reportados por Azim y Little (2008), Ekasari *et al.* (2010) y Becerra-Dórame *et al.* (2012) con valores de 3.16 a 3.2, 6 y 9%, y 6.5%, respectivamente.

Tabla 2. Resumen de la composición porcentual de los bioflóculos en base seca para los cuatro tratamientos y el control.

| | 0% | 10% | 20% | 30% | C |
|----------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Cenizas (%) | 39.3 ± 3.6 | 33.0 ± 5.4 | 35.8 ± 10.1 | 40.4 ± 4.9 | 35.9 ± 8.3 |
| Materia orgánica (%) | 60.6 ± 3.6 | 66.9 ± 5.4 | 64.1 ± 10.1 | 59.5 ± 4.9 | 64.0 ± 8.3 |
| Carbohidratos (%) | 33.0 ± 3.9 | 39.0 ± 3.7 | 35.5 ± 4.7 | 32.2 ± 8.9 | 36.5 ± 5.2 |
| Proteínas (%) | 24.5 ± 2.3 | 24.1 ± 5.3 | 23.7 ± 5.5 | 25.4 ± 9.3 | 23.9 ± 5.3 |
| Lípidos (%) | 2.6 ^a ± 0.3 | 3.5 ^b ± 0.6 | 2.8 ^{ab} ± 0.7 | 3.2 ^{ab} ± 0.8 | 2.9 ^{ab} ± 0.5 |

Valor en porcentual ± desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos.

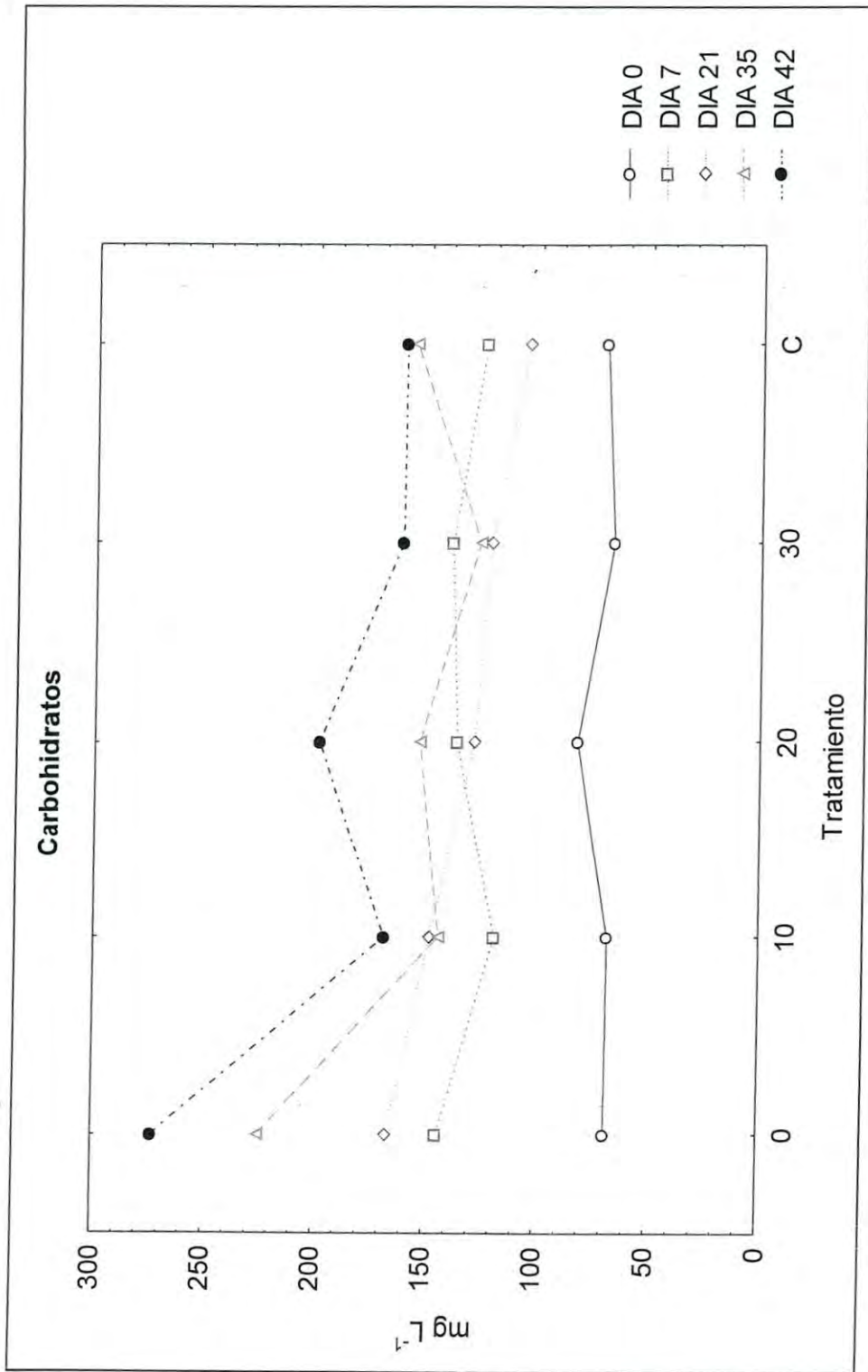


Figura 15. Contenido promedio de carbohidratos totales (mg L^{-1}) de los biofloculos en los cuatro tratamientos y el control en los días 0, 7, 21, 35 y 42 del cultivo experimental.

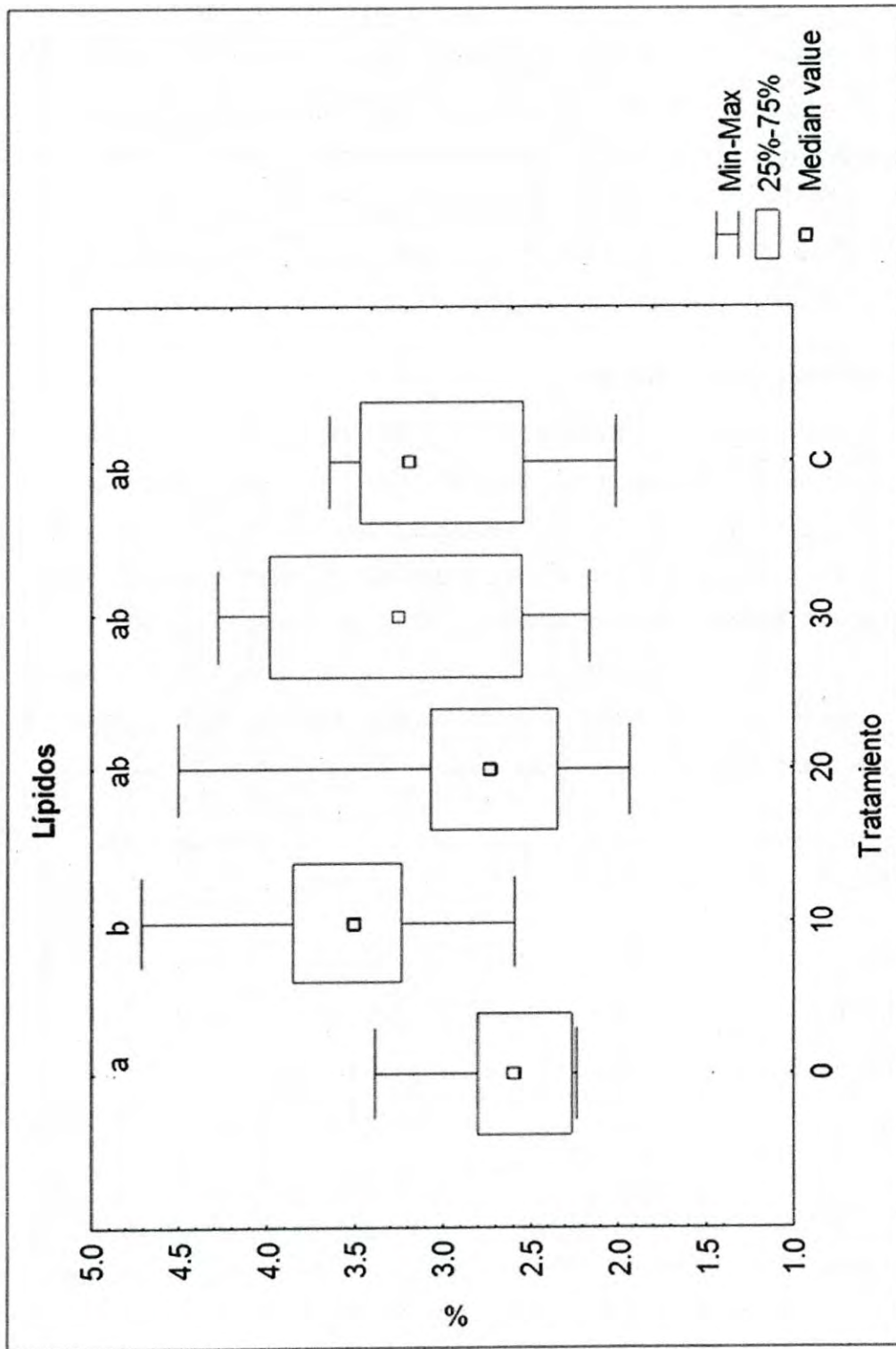


Figura 16. Porcentaje promedio de lípidos totales de los bioflóculos en los cuatro tratamientos y el control. Letras diferentes establecen diferencias estadísticas entre valores de cada tratamiento.

Al analizar el contenido de lípidos en función del tiempo (Figura 17), se observó que en el día 0 todos los tratamientos registraron los menores niveles, sin embargo el tratamiento T0 fue ligeramente superior al resto con cerca de 10 mg L⁻¹. A partir del día 7 se observó en general un incremento en todos los tratamientos y sin una tendencia clara a incrementar conforme a la edad del cultivo, a diferencia de lo ocurrido con los carbohidratos (Figura 14). La prueba de ANOVA indicó que hubo diferencia significativa en el contenido de lípidos durante el experimento.

V.5. Respuesta productiva de la tilapia

La supervivencia de los organismos no mostró diferencia significativa entre los tratamientos ($p>0.05$), sin embargo mostró una tendencia a ser mayor en los tratamientos con menor cantidad de harina de pescado en la dieta, con un promedio de 100% para el tratamiento T0 y el tratamiento T10, 91% para el tratamiento T20, 83% para el tratamiento T30 y 90% para el tratamiento control. La correlación de los valores de supervivencia en relación con el contenido de harina vegetal en la dieta fueron explicados en un 89% (Figura 18). Similarmente los tratamientos con menor contenido de harina de pescado fueron los que produjeron mayor cantidad de sólidos suspendidos totales y volumen de bioflóculos.

Tabla 3. Respuesta productiva del cultivo experimental de tilapia con diferentes inclusiones de harina vegetal en su dieta.

| | 0% | 10% | 20% | 30% | C |
|---------------------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-------------------------|------------------------|
| Supervivencia (%) | 100±0 | 100±0 | 91±16 | 83±10 | 90±16 |
| Peso individual final (g) | 45.0±1.5 ^a | 53.5±5.6 ^{ab} | 64.1±1.9 ^b | 57.4±18.7 ^{ab} | 53.1±5.1 ^{ab} |
| Biomasa inicial (kg m ⁻³) | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 |
| Biomasa final (kg m ⁻³) | 6.0±0.7 | 7.1±0.1 | 6.8±1.4 | 5.8±1.0 | 6.3±0.5 |
| FCA | 1.5±0.3 | 1.2±0.0 | 1.4±0.5 | 1.7±0.5 | 1.5±0.2 |

Valor en promedio ± desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos.

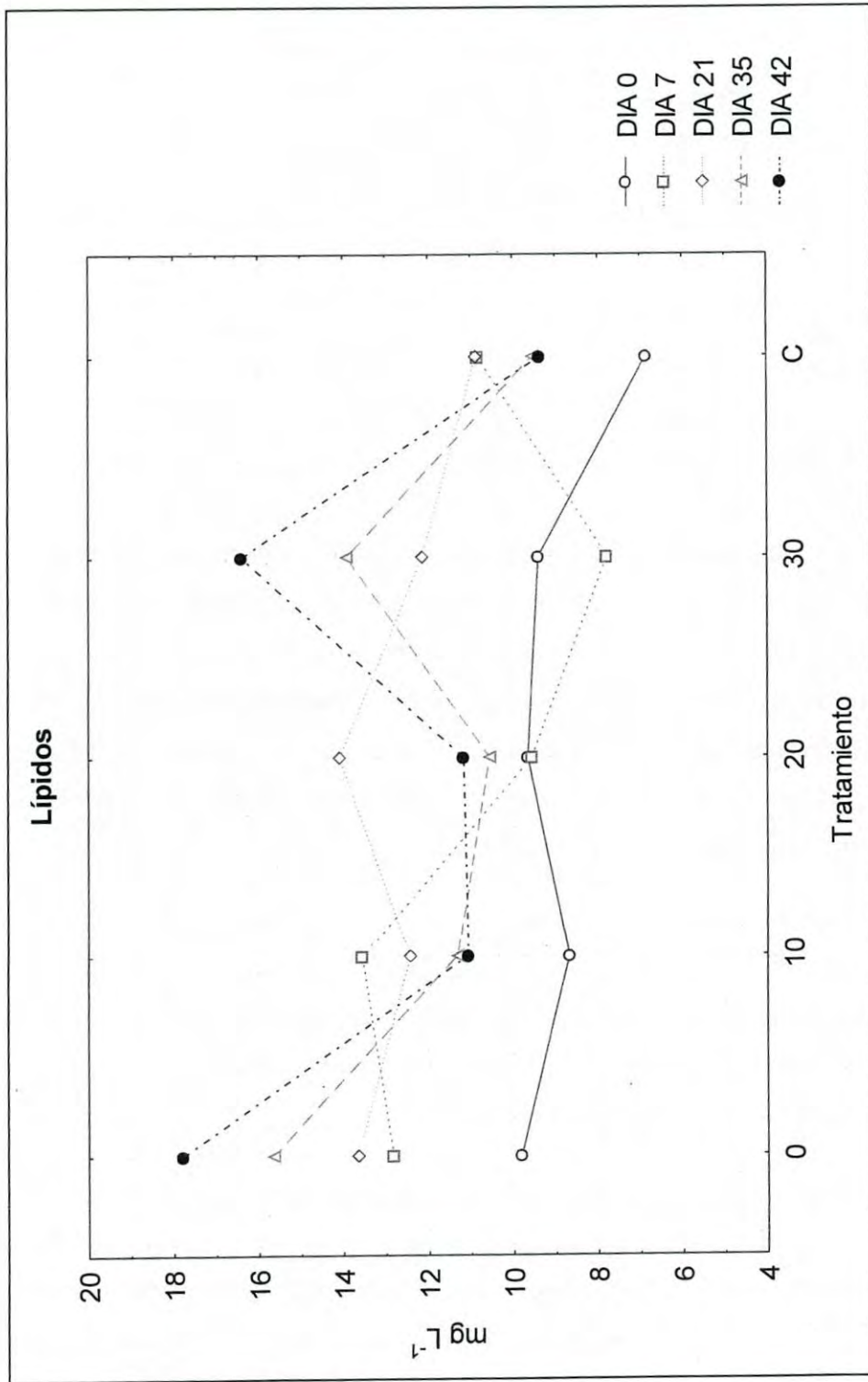


Figura 17. Contenido promedio de lípidos totales (mg L^{-1}) de los bioflóculos en los cuatro tratamientos y el control en los días 0, 7, 21, 35 y 42 del cultivo experimental.

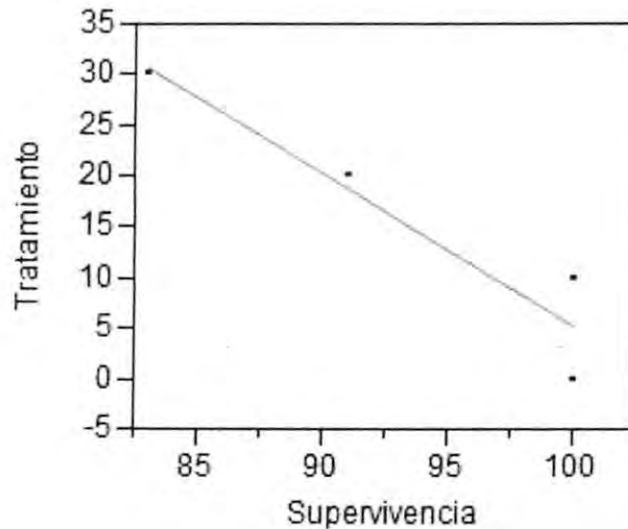


Figura 18. Relación de la supervivencia de la tilapia con el contenido de harina de pescado en el alimento.

El peso individual final promedio mostró diferencia estadística significativa entre los tratamientos T0 y T20, con valores de 45.0 y 64.1 g. respectivamente, sin diferencia entre el resto de los tratamientos. Al igual que la supervivencia, la biomasa final (6.4 kg m^{-3}) y el factor de conversión alimenticia (1.4) tampoco mostraron diferencia significativa entre los tratamientos ($p > 0.05$) (Tabla 3), concordado con los resultados reportados por Scopel *et al.* (2011) al sustituir harina de pescado por harinas vegetales en dietas experimentales para cultivo de camarón con bioflóculos.

Resultados similares en términos de respuesta productiva fueron reportados en un estudio de Azim y Little (2008), quienes no encontraron diferencia en supervivencia, peso ganado y FCA para tilapia cultivada en bioflóculos desarrollados en dos sistemas con dietas de diferente contenido de proteína, mostrando una ganancia individual en peso de un 45% mayor al compararlo con un sistema sin bioflóculos.

Becerra-Dórame *et al.* (2012) encontraron una supervivencia de *Litopenaeus vannamei* significativamente mayor en sistemas de preengorda basados en microorganismos autotróficos y heterotróficos (68% y 68.4%) en comparación con un sistema tradicional de agua clara (39.6%), así mismo se observó un menor FCA en los sistemas donde se indujo la producción de bioflóculos y biopelículas. Similares resultados

fueron observados por Emerenciano *et al.* (2011b) quienes obtuvieron mayor peso y longitud final así como ganancia en peso de *Farfantepenaeus paulensis*, en un tratamiento que complementó el alimento balanceado con bioflóculos, en comparación con otros dos en los que el camarón únicamente fue alimentado con bioflóculos o con alimento balanceado; la biomasa final y la supervivencia también se vieron beneficiadas al resultar significativamente mayores en los tratamientos con bioflóculos que aquel en el que se utilizó agua clara.

Los resultados de este estudio indican que en cultivos con bioflóculos, la sustitución de harina de pescado por harina vegetal en el alimento de la tilapia, no tiene efectos adversos en la respuesta productiva. Por el contrario la ausencia de harina de pescado promovió una mayor concentración de sólidos suspendidos totales en el agua, incrementando la disponibilidad de los componentes nutritivos como carbohidratos, proteínas y lípidos. Los beneficios del cultivo con bioflóculos son muchos, ya que además de que complementar la nutrición de los organismos cultivados, pueden favorecer la asimilación de los compuestos nutritivos y promover mejores condiciones de salud (Avnimelech, 2009).

VI. CONCLUSIONES

El incremento de harinas vegetales en las dietas experimentales mostró una relación positiva con el contenido de bioflóculos (sólidos suspendidos totales y volumen) desarrollados en el cultivo.

El porcentaje de sustitución de harina de pescado por harina vegetal en las dietas experimentales no produjo cambio significativo en la composición química (cenizas, proteínas, carbohidratos, lípidos) de los bioflóculos.

La calidad nutricional de los bioflóculos no presentó cambios significativos debido a la edad del cultivo.

La sustitución de harina de pescado por harina vegetal en las dietas experimentales, solo produjo cambios significativos en el peso individual de la tilapia, mientras que el resto de los parámetros productivos (supervivencia, biomasa y FCA) fueron estadísticamente similares.

La composición química proximal de los bioflóculos sugiere que representan fuente adicional de nutrientes (carbohidratos, proteínas y lípidos) para los organismos cultivados.

VII. RECOMENDACIONES

Las recomendaciones que surgen a partir de la realización de esta investigación sugieren que futuros estudios se enfoquen en:

Realizar nuevas investigaciones con un enfoque ecológico, para determinar los organismos presentes en los bioflóculos, así como las relaciones que existen entre ellos, de esta manera se puede entender la dinámica interna y su efecto en la calidad nutricional de los bioflóculos generados a partir de distintas dietas.

Conocer el efecto de la sustitución de harina de pescado por harina vegetal en la composición del tejido del pez (textura, apariencia, contenido de ácidos grasos y aminoácidos).

Estudiar el efecto de las dietas de bajo contenido de harina de pescado en los bioflóculos a nivel de ácidos grasos, aminoácidos, así como la presencia de microorganismos con actividad probiótica.

Realizar análisis del consumo de bioflóculos por la tilapia (volumen de bioflóculos, contenido del tracto digestivo, actividad enzimática) en condiciones de cultivo para conocer el efecto en la alimentación cuando se utilizan dietas con sustitución de harina de pescado.

Analizar los posibles impactos económicos que tendría un cultivo de tilapia con bioflóculos, alimentado con menor cantidad de harina de pescado en su dieta.

Analizar qué otros organismos pueden considerarse posibles candidatos para ser cultivados con bioflóculos, ya que hasta el momento únicamente se han investigado cultivos de camarones y tilapias.

VIII. LITERATURA CITADA

- Álvarez Torres, P.; Ramírez Martínez, C.; Orbe Mendoza, A. 1999. Desarrollo de la acuicultura en México y perspectivas de la acuicultura rural. Taller ARPE, FAO-UCT.
- Audelo Naranjo, J.M.; Martínez-Córdova, L.R.; Gómez Jiménez, S. y Voltolina, D. 2012. Intensive culture of *Litopenaeus vannamei* without water Exchange and with an artificial substrate. *Hidrobiológica* 22 (1): 1-7.
- Avnimelech, Y. 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bioflocs technology ponds. *Aquaculture*. 264:140-147.
- Avnimelech, Y.; Verdegem, M.C.J.; Kurup, M. y Keshavanath, P. 2008. Sustainable land-based aquaculture: rational utilization of water, land and feed resources. *Mediterranean aquaculture journal* 1(1); 45-55.
- Avnimelech, Y. 2009. *Biofloc Technology- A Practical Guide Book*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United States, 181p.
- Azim, M.E. y Little, D.C. 2008. The biofloc technology (BFT) in indoors tanks: Water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 283: 29-35.
- Azim, M.E.; Little, D.C.; Bron, J.E. 2008. Microbial protein production in activated suspension tanks manipulating C:N ratio in feed and the implications for fish culture. *Bioresource Technology*. (2008) 3590-3599.
- Ballester, E.L.C.; Abreu, P.C.; Cavalli, R.O.; Emerenciano, M.; Abreu, L.; Wasielesky, W. 2010. Effect of practical diets with different protein levels on the performance of *Farfantepenaeus paulensis* juveniles nursed in a zero exchange suspended microbial floc intensive system. *Aquaculture nutrition* 16 (163-172).
- Becerra-Dórame, M.J.; Martínez-Porchas, M.; Martínez-Córdova, L.R.; Rivas-Vegas, M.E.; López-Elías, J.A.; Porchas-Cornejo, M.A. 2012. Production response and digestive enzymatic activity of the pacific White shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) intensively pregrown in microbial heterotrophic and autotrophic-based systems. *The Scientific World Journal*. p. 1-6.

- Bosma, R.H. y Verdegem, M.C.J. 2011. Sustainable aquaculture in ponds: principles, practices and limits. *Livestock science*. 139: 58-68.
- Castro-Nieto, L.M.; Castro-Barrera, T.; De Lara-Andrade, R.; Castro-Mejía, J. y Castro-Mejía, G. 2012. Biofloc system: a technological breakthrough in aquaculture. *Electronic Journal of El hombre y su ambiente Department*. Vol.1 (1): 1-5.
- Crab, R.; Kochva, M.; Verstraete, W. y Avnimelech, Y. 2009. Bio-flocs technology application in over-wintering of tilapia. *Aquacultural Engineering*. 40 105–112.
- Crab, R.; Defoirdt, T.; Bossier, P.; Verstraete, W. 2012. Biofloc technology in aquaculture: beneficial effects and future challenges. *Aquaculture*. p. 351-356.
- De Schryver, P.; Crab, R.; Defoirdt, T.; Boon, N. y Verstraete, W. 2008. The basics of bio-floc: the added value of aquaculture. *Aquaculture*. 277: 125:137.
- Ekasari, J.; Crab, R.; Verstraete, W. 2010. Primary nutritional content of bio-flocs cultured with different organic carbon sources and salinity. *HAYATI Journal of biosciences*. 17: 125-130.
- El-Sayed, A.F.M. y Tacon, A.G.J. 1997. Fishmeal replacers for tilapia: a review. In Tacon A.G.J. (ed.), Basurco B. (ed.) *Feeding tomorrow's fish*. Zaragoza: CIHEAM. p. 205-224 (Cahiers Options Mediterraneennes; n. 22).
- Emerenciano, M.; Ballester, E.L.C.; Cavalli, R.O.; Wasielesky, W. 2011a. Biofloc technology application as a food source in a limited water exchange nursery system for pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817). *Aquaculture research* (1-11).
- Emerenciano, M.; Ballester, E.L.C.; Cavalli, R.O.; Wasielesky, W. 2011b. Effect of biofloc technology (BFT) on the early postlarval stage of pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis*: growth performance, floc composition and salinity stress tolerance. *Aquacult Int*.
- Emerenciano, M.; Gaxiola, G. y Cuzon, G. 2013. Biofloc technology (BFT): a review for aquaculture application and animal food industry. p. 301-328. En: *Biomass now: cultivation and utilization*. Darko Matovik, M. InTech. Canada.
- FAO, 2012. Página Oficial de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación: departamento de pesca y acuicultura. (www.fao.org/fishery/statistics/es).
- Gross, A.; Boyd, C.E. y Wood, C.W. 2000. Nitrogen transformations and balance in channel catfish ponds. *Aquacult. Eng.* 24:1-14.

- Kuhn, D.D y Boardman, G.D. 2008. Use of microbial flocs generated from tilapia effluent as nutritional supplement for shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in recirculating aquaculture systems. Journal of the World Aquaculture Society. Vol. 39 (72-82).
- Kuhn, D.D.; Boardman, G.D.; Lawrence, A.L.; Marsh, L. y Flick, G.J. 2009. Microbial floc meal as a replacement ingredient for fish meal and soybean protein in shrimp feed. Aquaculture. 296. p. 51-57.
- Kuhn, D.D.; Lawrence, A.L.; Boardman, G.D.; Patnaik, S.; Marsh, L. y Flick, G.J. 2010. Evaluation of two types of bioflocs derived from biological treatment of fish effluent as feed ingredients for Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture. 303. p. 28-33.
- Ladino-Orjuela, G. y Rodríguez-Pulido, J.A. 2009. Efecto de *Lactobacillus casei*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodopseudomonas palustris* (microorganismos eficientes em) y melaza en la ganancia de peso de tilapias (*Oreochromis* sp.) en condiciones de laboratorio. Orinoquia, vol. 13, núm. 1, 2009, pp. 31-36.
- Lim, C. y Webster, C.D. 2006. Tilapia: biology, culture, and nutrition. New York, Food Products Press.
- López-Elías, J.A., Báez-Dueñas M. del C. y Huerta-Aldaz N. 1995. Manual de técnicas analíticas aplicadas al cultivo de microalgas. DICTUS. México. 47 pp.
- Maica, P.F.; Borba, M.R.; Wasielesky, W. 2011. Effect of low salinity on microbial floc composition and performance of *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles reared in a zero-water-exchange super-intensive system. Aquaculture research. p. 1-10.
- Martínez-Córdova, L., *et al.* 2010. Alimento natural en acuicultura: una revisión actualizada. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villareal-Cavazos, D.A., Gamboa-Delgado, J. (Eds), Avances en nutrición acuícola X – Memorias del X Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 8-10 de noviembre, San Nicolás de los Garza, N.L., México. ISBN 978-607-433-546-0. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 668-699.
- Megahed, M.E. 2010. The effect of microbial biofloc on water quality, survival and growth of the green tiger shrimp (*Penaeus semisulcatus*) fed with different crude protein levels. Journal of the Arabian aquaculture society. Vol.5 No. 2. p. 119-142.
- Molina-Poveda, C., Martínez-Córdova, L.R. & Quadros-Seiffert, W. 2006. Alimentación y manejo de la productividad natural. En: Rosas C, O Carrillo, R Wilson & E Andreatta (eds). Estado actual y perspectivas de la nutrición de los camarones peneidos cultivados en Iberoamérica, pp. 229-274. CYTED, México.

- Moreira de Souza, D., Godoy, L., Wasielesky, W. y Ballester, E.L.C. 2013. Contribución de los microorganismos en ambientes acuáticos y en sistemas de cultivo. p. 1 – 24. En: Alimento natural en acuicultura. Martínez-Córdova, L.R. y Martínez-Porchas, M. AGT Editor. México.
- Nguyen, T.N.; Davis, D.A. y Saoud, I.P. 2009. Evaluation of alternative protein sources to replace fish meal in practical diets for juvenile Tilapia, *Oreochromis* spp. Journal of the World Aquaculture Society. Vol. 40, No. 1.
- Piedrahita, R.H., 2003. Reducing the potential environmental impact of tank aquaculture effluents through intensification and recirculation. Aquaculture 226 (1–4), 35–44.
- Ray, A.J.; Lewis, B.L.; Browdy, C.L.; Leffler, J.W. 2010. Suspended solids removal to improve shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and an evaluation of a plant-based feed in minimal-exchange, superintensive culture systems. Aquaculture. 299 (89-98).
- Scopel, B.R.; Schweitzer, R.; Seiffert, W.Q.; Pierri, V.; Arantes, R.F.; Vieira, F.N. y Vinatea, L.A. 2011. Substitution of fish meal in diets for marine shrimp grown in a biofloc system. Pesq. Agropec. Bras., Brasília, v.46, n.8. p. 928-934.
- Schneider, O., Sereti, V., Eding, E.H., Verreth, J.A.J., 2005. Analysis of nutrient flows in integrated intensive aquaculture systems. Aquacultural Engineering. 32, 379–40.
- Schrader, K.K, Green, B.W., Perschbacher, P.W. 2011. Development of phytoplankton communities and common off-flavors in a biofloc technology system used for the culture of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Aquacultural Engineering. 45: 118-126.
- Soltan, M.A.; Hanafy, M.A. y Wafa, M.I.A. 2008. Effect of replacing fish meal by a mixture of different plant protein sources in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) diets. Global veterinaria 2 (4): 157-164.
- Tacon, A. G. J.; Cody, J.; Conquest, L.; Divakaran, S.; Forster, I. P.; Decamp, O. 2002. Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. Aquaculture Nutrition, v. 8,n. 2, p. 121-137.
- Watanabe, T., 2002. Strategies for further development of aquatic feeds. Fish. Sci. 68 (2), 242–252.

ANEXO I

Tabla 1. Formulación de los alimentos balanceados experimentales.

| Ingredientes g kg ⁻¹ de alimento | Dietas (% de harina de pescado) | | | |
|--|---------------------------------|-------|-------|-------|
| | 30% | 20% | 10% | 0% |
| Pasta de soya | 200.0 | 373.9 | 549.8 | 725.0 |
| Harina de sardina | 300.0 | 200.0 | 100.0 | 0.0 |
| Harina de maíz | 376.1 | 150.0 | 114.5 | 150.0 |
| Harina de trigo | 50.0 | 150.0 | 150.0 | 50.0 |
| Harina de sorgo | 10.3 | 51.5 | 10.0 | 5.0 |
| Aceite de sardina | 32.5 | 43.5 | 44.6 | 38.9 |
| Lecitina de soya | 10.0 | 10.0 | 10.0 | 10.0 |
| Premezcla vitaminas | 8.0 | 8.0 | 8.0 | 8.0 |
| Premezcla minerales | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 |
| Fosfato dibásico sodio | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 |
| Cloruro de colina | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 |
| Vitamina C | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| BHT | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 |
| Composición química proximal (% en base seca) | | | | |
| Proteína cruda | 35 | 35 | 35 | 35 |
| Lípidos crudos | 7 | 8 | 8 | 7.196 |
| Fibra | 3.128 | 3.526 | 4.157 | 4.996 |
| Cenizas | 2.31 | 2.497 | 2.768 | 3.16 |

ANEXO II

Determinación de biomasa

Filtrado de muestras

Filtrar al vacío con un filtro de fibra de vidrio (25 mm o 47 mm de diámetro, según sea necesario) un volumen conocido de la muestra (30-50 mL para determinación de sólidos suspendidos totales, 30-40 mL para determinación de lípidos y 5-10mL para determinación de proteínas), lavar el filtro con solución de formiato de amonio (5%) para eliminar las sales de la muestra. Colocar el filtro dentro de un sobre de papel aluminio etiquetado y conservarlo en congelación (-80°C) hasta el momento de la determinación.

Los filtros utilizados para las muestras de determinación de sólidos suspendidos totales y cenizas deben enjuagarse con agua destilada y luego secarse en mufla a 480°C durante 4 horas, enfriar en desecador por 30 minutos o hasta peso constante y pesar 3 veces en balanza analítica digital. Guardar en sobres de aluminio y marcarse individualmente, conservar en desecador hasta el momento de su uso.

Determinación de sólidos suspendidos totales

Secar las muestras filtradas en la estufa a 75°C durante 24 horas. Enfriar en el desecador por 30 minutos o hasta peso constante y pesar en balanza analítica digital.

Determinación de cenizas

Incinerar los filtros con la muestra utilizados para determinación del peso seco colocándolos en mufla a 480°C por 8 horas. Enfriar en el desecador por 30 minutos o hasta peso constante y pesar en balanza analítica digital.

Determinación de materia orgánica

Se realiza con el siguiente cálculo:

$$\text{MATERIA ORGÁNICA} = \text{SÓLIDOS SUSPENDIDOS TOTALES} - \text{CENIZAS.}$$

ANEXO III

Determinación de proteínas totales (método de Lowry)

Proteínas

Lavar todo el material con jabón y enjuagar con alcohol, secar en la estufa a 45°C.

Preparar soluciones A, B1 y B2, según lo menciona el método de Lowry, las soluciones C y D se prepararán al momento de la determinación.

Soluciones:

Hidróxido de sodio 0.1N

A: Carbonato de sodio anhidro al 2% en solución de hidróxido de sodio 0.1N

B1: Sulfato de cobre (0.5%)

B2: Tartrato de sodio y potasio (1%)

C: 100 mL de solución A+ 1 mL de solución B1 + 1 mL de solución B2

D: Agua destilada + reactivo de Folin Ciocalteu (1:1)

Extracción de proteínas para determinación

En un tubo de ensaye para centrifuga colocar el filtro con la muestra y 1mL de solución de NaOH 0.1N y con una varilla de vidrio macerar el filtro y su contenido. Agregar 4 mL más de la solución para lavar las paredes del tubo y la varilla.

Cubrir la boca del tubo con parafilm y colocar a baño maría a 100°C durante 15 minutos.

Enfriar los tubos bajo el chorro del agua y colocarlos en la centrifuga a 4000 rpm durante 15 minutos.

Decantar a otro tubo y tomar 1 mL de la muestra en un tercer tubo; para el blanco colocar 1 mL de NaOH 0.1 N.

F-160194

Determinación de proteínas

Colocar 5 mL de la solución C a cada tubo y esperar 10 minutos.

Agregar 0.5 mL de la solución D a cada tubo, agitar bien y esperar 1:30 horas.

Encender el espectrofotómetro y calibrar con el blanco a 750 nm de longitud de onda. Leer la absorbancia cada muestra.

Curva de calibración

Preparar solución de albumina al 0.1% y con ella hacer diluciones con agua (0:20, 5:15, 10:10, 15:5, 20:0) para la curva de calibración de absorbancia del espectrofotómetro (colorímetro). Proceder según el método de Lowry para la determinación y lectura de absorbancia.

ANEXO IV

Determinación de lípidos totales (método de Pande)

Lípidos

Lavar todo el material con jabón y enjuagar con alcohol, secar en la estufa a 45°C.

Preparar la solución de dicromato de potasio al 2% con ácido sulfúrico.

Extracción de lípidos para determinación

En un tubo de ensaye para centrifuga colocar el filtro con la muestra y 2 mL de solución de metanol y con una varilla de vidrio macerar el filtro y su contenido. Agregar 2 mL más de metanol para lavar las paredes del tubo y la varilla; posteriormente agregar 2 mL de cloroformo y 0.8 mL de agua destilada.

Colocarlos en la centrifuga a 4000 rpm durante 30 minutos.

Decantar todo el líquido a otro tubo, agregar 2 mL de cloroformo y 2 mL de agua destilada (en este punto deben formarse dos fases); cubrir con parafilm y refrigerar hasta que las dos fases estén completamente definidas, aproximadamente 24 horas.

Eliminar la capa superior con ayuda de una pipeta Pasteur y colocar los tubos en estufa a 45°C por 2 días o hasta que el solvente se haya evaporado completamente.

Determinación de lípidos

Colocar 3 mL de la solución de dicromato de potasio con ácido sulfúrico a cada tubo.

Calentar los tubos a baño maría por 15 minutos.

Enfriar los tubos y agregar 4.5 mL de agua destilada, agitar bien y enfriar nuevamente.

Encender el espectrofotómetro y calibrar con el blanco a 590 nm de longitud de onda. Leer la absorbancia cada muestra.

Curva de calibración

Preparar solución de tripalmitina con cloroformo a una concentración de 1 mg/mL y con ella hacer diluciones (0.8 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.25 mg/mL y 0 mg/mL) para la curva de

calibración de absorbancia del espectrofotómetro (colorímetro). Proceder según el método de Pande para la determinación y lectura de absorbancia.

ANEXO V

Determinación de carbohidratos totales

Se realiza con el siguiente cálculo:

$$\text{CARBOHIDRATOS} = \text{MATERIA ORGÁNICA} - (\text{PROTEÍNA TOTAL} + \text{LÍPIDO TOTAL})$$