

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Acuicultura**

**Aplicación de la tecnología de biofloc (BFT) al cultivo de
*Totoaba macdonaldi***

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Andrés Octavio Amparo Venegas

Ensenada, Baja California, México
2019

Tesis defendida por
Andrés Octavio Amparo Venegas

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Mónica Hernández Rodríguez
Codirectora de tesis

Dr. Benjamín Barón Sevilla
Codirector de tesis

Dra. Patricia Juárez Camacho

Dr. Juan Pablo Lazo Corvera



Dra. Fabiola Lafarga De la Cruz
Coordinadora del Posgrado en Ciencias en Acuicultura

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Andrés Octavio Amparo Venegas © 2019

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Andrés Octavio Amparo Venegas** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

Aplicación de la tecnología de biofloc (BFT) al cultivo de *Totoaba macdonaldi*

Resumen aprobado por:

Dra. Mónica Hernández Rodríguez
Codirectora de tesis

Dr. Benjamín Barón Sevilla
Codirector de tesis

La totoaba (*Totoaba macdonaldi*) es un pez marino, carnívoro, endémico del Golfo de California, México. Se ha sobreexplotado como resultado de la demanda de su vejiga gaseosa. La investigación y el desarrollo de su cultivo han mostrado un gran potencial, ya que tiene buena tasa de crecimiento y se adapta al cautiverio. Actualmente, una empresa la cultiva a escala comercial en jaulas marinas, pero también se tiene el interés de desarrollar su cultivo en estanques. La tecnología del biofloc se caracteriza por el desarrollo de comunidades microbianas que utilizan los desechos nitrogenados del medio y transforman la materia orgánica en biomasa bacteriana, lo que reduce el uso de grandes volúmenes de agua y minimiza el impacto ambiental, promoviendo el desarrollo sustentable de la acuicultura. Los estudios sobre la aplicación del biofloc en especies marinas carnívoras son escasos, posiblemente porque estos sistemas mantienen una concentración de sólidos suspendidos que no pueden ser utilizados como alimento por los peces cultivados y podrían ocasionar daños en las branquias y afectaciones en los parámetros productivos. El objetivo de este estudio fue evaluar diferentes concentraciones de biofloc y un tratamiento con sistema de recirculación (T_{RAS}) para el cultivo de juveniles de totoaba y su efecto en los parámetros productivos y cambios tisulares en las branquias e hígado. Se utilizaron 72 organismos con peso promedio inicial de 469 g, distribuidos en 12 tanques. Se evaluaron 6 tratamientos por duplicado (5 con flóculos y 1 en sistema de recirculación convencional). Diariamente se midieron el oxígeno disuelto, pH, salinidad, temperatura y supervivencia. Dos veces a la semana se midieron nitrógeno amoniacal total (NAT), nitritos y nitratos. Los sólidos suspendidos totales (SST), sólidos volátiles totales, volumen de biofloc, transparencia y alcalinidad se midieron semanalmente. Quincenalmente se registró el peso y la longitud patrón. Después de 89 días de cultivo, se sacrificaron los peces, se tomaron muestras de branquias e hígado y estas fueron procesadas con la técnica histológica estándar y se tiñeron con Hematoxilina-Eosina. Después de 89 días de cultivo, las totoabas cultivadas en el T_{RAS} tuvieron un peso promedio final de 867.58 ± 96.91 g, siendo mayores en contraste con los tratamientos con biofloc ($p < 0.05$). En los SST entre los diferentes tratamientos no existieron diferencias significativas ($p > 0.05$). En los sistemas con biofloc, los filtros utilizados para controlar la concentración de SST fraccionaron los flóculos, y los microorganismos fueron regresados al tanque de cultivo, produciendo altas concentraciones de SST (4.56 g / L^{-1}). En T_{RAS} hubo un crecimiento importante de microalgas que produjo una concentración de SST de 2.58 g/L^{-1} . En cuanto a NAT, las concentraciones mínimas ($< 0.55 \text{ mg/L}$) se registraron en los tratamientos con biofloculados. En el tejido branquial se observaron daños tisulares en todos los tratamientos. Las lesiones más comunes en las muestras fueron: telangiectasia, hipertrofia de las células epiteliales, desprendimiento epitelial, la hiperplasia focal de las células epiteliales en lamelas y la fusión total de las lamelas. El HI fue mayor en T_{RAS} , comparado con los tratamientos de biofloc ($p < 0.05$) y se observaron alteraciones en el hígado, como diferencia en tamaño de hepatocitos siendo más grandes en T_{RAS} y con núcleo desplazado a la periferia del hepatocito.

Palabras clave: Biofloc, *Totoaba macdonaldi*, sólidos suspendidos, branquias.

Abstract of the thesis presented by **Andrés Octavio Amparo Venegas** a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture.

Biofloc technology (BFT) application on *Totoaba macdonaldi* culture

Abstract approved by:

Dra. Mónica Hernández Rodríguez
Codirectora de tesis

Dr. Benjamín Barón Sevilla
Codirector de tesis

Totoaba (Totoaba macdonaldi) is a carnivorous marine fish endemic of the Gulf of California, México. It has been overexploited because of the demand for its swim bladder. The research and development of its culture has shown great potential because it has a good growth rate and adapts to captivity. Today, one company cultivates totoaba on a commercial scale in marine cages, but also aqua farmers have the interest of the development of its culture in tanks. Biofloc technology is a method that is characterized by the development of microbial communities that use the nitrogenous waste and organic matter from the environment and transform it into bacterial biomass that reduces the use of large volumes of water and minimizes environmental impact. This technology promote the sustainable development of the aquaculture. Studies about the biofloc application on marine carnivorous species are scarce, possibly because these systems contain a high concentration of suspended solids that cannot be used as food by cultured fishes and could cause damage to the gills and affects the production parameters. The purpose of this study was to evaluate the effect of different biofloc concentrations on the juvenile totoabas productive parameters and its tissue effects on gills and liver. A total of 72 totoabas were used with an initial mean weight of 469 g, distributed in 12 tanks. Six treatments by duplicate (5 with biofloc and 1 with recirculation aquaculture system-RAS) were evaluated. Daily, dissolved oxygen, pH, salinity, temperature and survival were measured. Twice a week total ammonia nitrogen (TAN), nitrites and nitrates were measured. Once a week, total suspended solids (TSS), total volatile solids, biofloc volume, transparency and alkalinity were measured. Each two weeks, weight and standard length of fishes were registered. At the end of the study, after 89 days, the fish were sacrificed and gills and liver were sampled and processed with the standard histological technique and stained with Hematoxylin-Eosin. Totoabas cultivated in the T_{RAS} had a final average weight of 867.58 ± 96.91 g, higher than totoabas cultured with biofloc ($p < 0.05$). The TSS were not different between the treatments ($p > 0.05$). In the systems with biofloc, the filter used to control the concentration of TSS fractionated the flocs and the microorganisms were returned to the culture tank, producing high TSS concentrations (4.56 g / L^{-1}). In T_{RAS} treatment there was a significant growth of microalgae that produced a TTS concentration of 2.58 g / L^{-1} . The TAN minimum concentrations ($< 0.55 \text{ mg / L}$) were recorded in the treatments with biofloc. Gill tissue damage was observed in all treatments. In all the gills examined, lamellar telangiectasis, hypertrophy of respiratory epithelium, lifting of respiratory epithelial cells, fusion of the secondary lamellae and focal hyperplasia of epithelial cells were found. HI was higher in T_{RAS}, compared to biofloc treatments ($p < 0.05$) and morphological changes were observed in the liver, like the hepatocytes size and displacement of the nucleus to the hepatocyte periphery.

Keywords: Biofloc, *Totoaba macdonaldi*, suspended solids, gills.

Dedicatoria

A mis padres, Carmen y Dagoberto, por todo su apoyo, cariño y por impulsarme a ser mejor persona cada día, sin ellos esto no hubiera sido posible.

A mis hermanos, Oscar y Diego, por estar presentes en todo momento.

A ese hermano de cuatro patas, Bruno... siempre estarás en mi corazón.

A familiares y amigos, que siempre han creído en mí y me motivaron.

Agradecimientos

Al CICESE, por haberme aceptado para realizar mis estudios de maestría y permitido utilizar las instalaciones para llevar a cabo el experimento

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el programa de becas para poder realizar la maestría.

A la Empresa Biodiversidad Acuícola S.A. de C.V., por el financiamiento para el desarrollo de la tesis a través de los Convenios Específicos CICESE-Biodiversidad Acuícola 4S.2.1.16/2017 y 4S.4-04/2018.

Al Centro Reproductor de Especies Marinas del Estado de Sonora (CREMES) del Instituto de Acuicultura del Estado de Sonora (IAES) por la donación de las totoabas para este experimento.

A Dra. Mónica Hernández Rodríguez, codirectora de tesis, por su apoyo, así como su paciencia y llamadas de atención, enseñanzas y consejos durante el experimento, muchas gracias.

Al Dr. Benjamín Barón Sevilla, codirector de tesis, por su apoyo, motivación, paciencia, disposición de su tiempo, por compartir sus conocimientos y experiencia, por ser un buen profesor y sobre todo una gran persona.

A mis sinodales, Dra. Patricia Juárez y Dr. Juan Pablo Lazo, por sus observaciones y consejos durante el desarrollo de la tesis.

A los técnicos Luis Murillo y Jesús Mariscal, por su apoyo en la construcción de la infraestructura invernadero donde se llevó a cabo el trabajo, en el transporte de totoabas al invernadero y por tener la disposición de apoyar durante el desarrollo del trabajo.

A la técnica Biol. Claudia López por su apoyo en la elaboración de los inóculos de biofloc, en el conteo de sólidos suspendidos totales, medición de pH, así como atender a las llamadas de auxilio cuando se presentaba algún imprevisto durante el experimento.

Al técnico Abelardo Campos, por la disposición de su tiempo y apoyo en la lectura en el espectrofotómetro para medir el nitrógeno amoniacal total.

A la Dra. Beatriz Cordero, por prestarnos material del Laboratorio de microalgas (secadora, mufla, filtros, bomba de vacío), para el conteo de sólidos suspendidos.

A la técnica del Laboratorio de Biología y Patología de Organismos Acuáticos, M. en C. Yanet Guerrero Rentería, por su apoyo en la elaboración de las laminillas histológicas, cotización y compras de reactivos, así como sus enseñanzas en el proceso de fijación y descalcificación de las muestras histológicas.

Al Dr. Miguel Ángel De Rio, por compartir su conocimiento en SketchUp para ilustrar el sistema de cultivo.

A Candy, Eloy, Magda, Rosa, por su ayuda al termino del experimento para el sacrificio, disección y obtención de las muestras.

A Araceli, Antonio, Allan y Pao, compañeros de la vida, gracias por los momentos que pasamos juntos, por hacer que la estancia en Ensenada y CICESE haya sido de manera amena, por el apoyo en momentos difíciles, por la compañía en los momentos de fiesta, muchas gracias.

A Leydy, Cecy y Geraldo, por su apoyo y convivencia, fue un placer estar con ustedes en estos años.

Tabla de contenido

Resumen en español	ii
Resumen en inglés	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	ix
Lista de tablas	xi
Lista de acrónimos	xii
Capítulo 1. Introducción	
1.1. Sistemas en acuicultura.....	1
1.1.2. Sistemas de recirculación acuícola (RAS) y su comunidad bacteriana	2
1.1.3. Tecnología biofloc (BFT)	3
1.2. Antecedentes.....	7
1.2.1. Biofloc y sus posibles afectaciones tisulares en branquias e hígado	7
1.2.2. Cultivos en Biofloc	8
1.2.3. <i>Totoaba macdonaldi</i>	10
1.3. Justificación	11
1.4. Hipótesis.....	12
1.5. Objetivos	12
1.5.1. Objetivo general.....	12
1.5.2. Objetivos específicos.....	13
Capítulo 2. Metodología	
2.1. Obtención y mantenimiento de organismos	14
2.2. Diseño experimental	14
2.3. Parámetros de calidad del agua	19
2.3.1 Parámetros fisicoquímicos	19
2.4. Alimentación y monitoreo de totoabas	21
2.5. Obtención de muestras para establecer el estado de salud de las totoabas	23
2.5.1. Hematocrito	23
2.5.2. Índice hepatosomático (IH)	23
2.5.3. Muestras histológicas.....	23

2.6. Análisis estadístico	26
Capítulo 3. Resultados	
3.1. Parámetros fisicoquímicos	27
3.1.1 Nitrógeno Amoniacal Total, Nitritos y Nitratos.....	29
3.1.2. Mediciones del Biofloc	31
3.2. Caracterización de los cultivos	32
3.3. Índice hepatosomático.....	34
3.4. Análisis histológicos.....	35
3.4.1. Hígado	35
3.4.2. Branquias.....	36
3.6.2.1. Análisis en fresco.....	33
3.6.2.2 Histología de branquia.....	34
3.5. Crecimiento, supervivencia y FCA.....	40
3.6. Hematocrito	43
Capítulo 4. Discusión	44
Capítulo 5. Conclusiones	52
Literatura citada	53

Lista de figuras

Figura		Página
1	Microorganismos acompañantes en los floculados en un sistema de biofloc. (A) protozoos, (B) protozoos ciliados, (C) nematodos, (D) copépodos. (Tomada de Emerenciano <i>et al.</i> , 2013).....	4
2	Representación esquemática de la tecnología de biofloc. (Tomada de Crab <i>et al.</i> , 2012).....	5
3	Cálculo esquemático de la cantidad de carbono que deberá ser añadida para la remoción de compuestos nitrogenados en un cultivo con la tecnología de biofloc. (Tomada de De Schryver <i>et al.</i> , 2008).....	6
4	Cultivo de totoaba en jaulas marinas. (Imagen tomada por http://www.earthoceanfarms.com/es/).....	11
5	Diseño experimental del sistema de recirculación. a, salida del tanque; b, filtro mecánico; c, filtro biológico; d, tubo de entrada al tanque mediante bombeo de aire (airlift).....	17
6	Diseño experimental del sistema con biofloc. a, salida del tanque; b, filtro mecánico; c, tubo de entrada al tanque mediante bombeo de aire (airlift).....	18
7	Concentración promedio del nitrógeno amoniacal total (NAT) durante el cultivo de totoaba en los diferentes tratamientos con biofloc.....	30
8	Concentración promedio del nitrógeno amoniacal total (azul), nitritos (rojo) y nitratos (verde) durante el cultivo de totoaba en el tratamiento con sistema de recirculación.....	30
9	Cono Imhoff con muestras reposadas durante una hora de los diferentes tratamientos a 85 días del cultivo. En T ₅₀ se observan flóculos sedimentables (flecha); en T ₀ se observan gránulos de biofloc, compactos y con una mayor tasa de sedimentación (punta de flecha).....	31

10	Características generales de los tratamientos. A) TRAS, coloración verde debido a la proliferación de microalgas; B) T75, coloración café claro y de consistencia viscosa; C) T0 coloración oscura, con gránulos bacterianos; D) Muestra de TRAS (100x), microalgas; E) Muestra del T75 (20x), flóculos; F) Muestra del T100 (20x), flóculos; G) Muestra del T75 (100x), ciliado; H) Muestra del T0 (4x), Gránulos bacterianos, copépodo (flecha); I) Muestra del T0 (40x), platelminto y nematodo (flecha).....	33
11	Muestras de hígado de dos ejemplares de diferentes tratamientos. A) Ejemplar de T _{RAS} se observa un hígado sano y con un tamaño normal (flecha). B) Ejemplar de T ₇₅ donde se observa el hígado reducido (circulo).....	34
12	Muestras histológicas de hígado de totoaba con la tinción de Hematoxilina-eosina. A) Hígado control (T _{RAS}), se observan los hepatocitos con vacuolas de lípidos, tejido pancreático (flecha) y un vaso con eritrocitos (cabeza de flecha); B) Hepatocitos con desplazamiento del núcleo hacia la periferia (flecha) en una totoaba de T _{RAS} ; C) Hígado de un organismo cultivado en biofloc (, se observa una disminución de tejido hepático por la disminución de tamaño de hepatocitos y se observa más tejido pancreático (flecha); D) Hepatocitos con núcleo central; E) Vaso sanguíneo con eritrocitos y leucocitos.	36
13	Muestras en fresco de branquias de totoaba observadas en el estereoscopio. A) Branquia sana de un ejemplar del T _{RAS} . B) Telangiectasias en las puntas de las lamelas (flecha) en una branquia en el T ₀ . C) Filamento branquial sin lamelas, con erosión lamelar, de un ejemplar del T ₇₅ . D) Branquia con un alto grado de alteraciones, con telangiectasia y lamelas con aparente rompimiento del epitelio de peces del T ₂₅	37
14	Muestras histológicas de branquia de totoaba con la tinción de Hematoxilina-eosina. A) Branquia sana; B) hipertrofia de células epiteliales (cabeza de flecha) y desprendimiento del epitelio respiratorio (flecha); C) ruptura del epitelio lamelar (flecha) e hiperplasia de la base de la mitad de la lamela (cabeza de flecha); D) hiperplasia focal de células epiteliales; E) fusión lamelar y de dos filamentos; F) hipertrofia de célula del cloro; G) telangiectasia (flecha); H) hemorragia con ruptura del epitelio (cabeza de flecha), eritrocitos (flecha); I) Parásito <i>Amyloodinium</i> (flecha) en el T ₅₀	39
15	Peso (g) promedio registrado a lo largo del cultivo de totoaba.....	41
16	Porcentaje de hematocrito registrado en el último día de cultivo de totoaba. Media \pm desviación estándar.....	43

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Flujos de los tratamientos experimentales durante el cultivo de totoaba.....	17
2	Lista de lesiones branquiales establecidas por Poleksic y Mitrovic-Tutundzic (1994).....	22
3	Parámetros de calidad de agua en los diferentes tratamientos del cultivo de <i>Totoaba macdonaldi</i> . Media \pm DS.....	25
4	Valores de mediciones del volumen de bioflóculos, transparencia, sólidos suspendidos totales (SST) y sólidos volátiles totales (SVT) en el cultivo de <i>Totoaba macdonaldi</i> . Media \pm DS. En SST y SVT se presentan los valores mínimos y máximos, que corresponden al inicio y al último día del cultivo.....	29
5	Valores promedio y desviación estándar del índice hepatosomático del cultivo de totoaba. En paréntesis se muestra el valor mínimo y máximo.....	31
6	Valores promedio y desviación estándar del índice de alteraciones en las branquias de totoaba cultivada en sistemas de recirculación y con diferentes concentraciones de bioflóculos. En paréntesis se muestra el valor mínimo y máximo.....	34
7	Valores promedio y desviación estándar de peso inicial (Pi), peso final (Pf), biomasa inicial (Bi), biomasa final (Bf), supervivencia, factor de conversión alimenticia (FCA) y tasa de crecimiento específica (TCE) de la totoaba cultivada durante 89 días en RAS y con diferentes concentraciones de biofloculados.....	38

Lista de acrónimos

BFT	Tecnología biofloc
C	Carbono
C:N	Relación carbono nitrógeno
C₅H₇O₂N	Producción de materia orgánica bacteriana
C₆H₁₂O₆	Glucosa
CaCO₃	Carbonato de calcio
CO₂	Dióxido de carbono
FCA	Factor de conversión alimenticia
H⁺	Hidrogeno
H₂O	Agua
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
HCO₃⁻	Bicarbonato
N	Nitrógeno
NAT	Nitrógeno amoniacal total (NH ₃ + NH ₄ ⁺)
NH₃	Amoniac
NH₄⁺	Amonio
NO₂⁻	Nitrito
NO₃⁻	Nitrato
O₂	Oxígeno
RAS	Sistema de recirculación acuícola
SEMARNAT	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
spp	Subespecie
SST	Sólidos suspendidos totales
SVT	Sólidos volátiles totales
TCE	Tasa de crecimiento específica
UMA	Unidad de manejo ambiental

Capítulo 1. Introducción

En las últimas décadas, la acuicultura se ha desarrollado hasta convertirse en una de las actividades más importantes por su capacidad de producir alimentos de excelente calidad nutricional y de generar ingresos para millones de personas en el mundo. Esta actividad presenta desde hace varios años un crecimiento acelerado (4.5% anual). Actualmente, casi el 88% de los productos pesqueros a nivel mundial están destinados a la alimentación, debido a la gran demanda del mercado por los productos acuáticos (FAO, 2016). Sin embargo, el crecimiento acelerado de la acuicultura ha ocasionado un impacto negativo en el ambiente, debido a que los efluentes de los sistemas de cultivo vierten grandes cantidades de compuestos orgánicos, contaminando los ecosistemas receptores de estas aguas residuales (James, 2009). Para amortiguar el impacto negativo de la acuicultura, se ha propuesto el desarrollo y la implementación de nuevas tecnologías acuícolas para el uso sustentable de los recursos (Martinez-Porchas y Martinez-Cordova, 2012).

1.1. Sistemas en acuicultura

Para el cultivo de organismos acuáticos se han utilizado dos tipos de sistemas: 1) abiertos: como son los extensivos, semi-intensivo y de flujo abierto (FAO, 2013); y 2) de ciclo cerrado: como es el sistema de recirculación acuícola (RAS, por sus siglas en inglés) y los cultivos con tecnología biofloc (BFT, por sus siglas en inglés) (Timmons y Ebeling, 2010; Avnimelech, 2015). Los primeros destacan por ser de bajo costo, por la poca inversión en infraestructura, bajo costos en suministro de alimento y porque los organismos cultivados aprovechan el alimento que en forma natural se produce en los cuerpos de agua, ya que estos cultivos se colocan cerca de las fuentes de agua naturales (FAO, 2013), sin embargo, estos cultivos suelen tener un impacto negativo sobre el ambiente si no se proporciona un tratamiento adecuado de las aguas residuales.

En el caso de los sistemas de ciclo cerrado, en las últimas décadas se han evaluado y aplicado en la acuicultura, por su capacidad de disminuir los impactos negativos al medio natural. Estos sistemas se basan en una reducción del uso del recurso hídrico y promueven un aumento en la densidad de los cultivos, ya que se tienen controladas las condiciones ambientales (Timmons y Ebeling, 2010; FAO, 2013). Otras de las características que distinguen a los sistemas cerrados es la baja o nula tasa de recambio de agua y la bioseguridad dentro del cultivo (Ahmad *et al.*, 2017). Los RAS y BFT se basan en el tratamiento y

reutilización del agua, aprovechando la capacidad de las comunidades bacterianas que oxidan y consumen los compuestos nitrogenados y la materia orgánica (Timmons y Ebeling, 2010; Jiménez-Ojeda *et al.*, 2018).

1.1.2. Sistemas de recirculación acuícola (RAS) y su comunidad bacteriana

La recirculación acuícola es una tecnología que se ha venido desarrollando e incorporando a la acuicultura comercial con éxito, uno de sus propósitos es evitar la contaminación de los cuerpos de agua mediante técnicas que permiten recuperar su calidad para un reuso inmediato. El sistema de recirculación está compuesto por varios elementos o procesos (Timmons y Ebeling, 2010). De manera general, en un RAS el agua circula a través del sistema que está compuesto por filtros externos (mecánico y biológico), a continuación es oxigenada o aireada constantemente antes de ser regresada al tanque de cultivo. En el filtro mecánico los desechos sólidos son retenidos y retirados del cultivo, el objetivo es el aclaramiento del agua; el filtro biológico o biofiltro, en el cual se fijan bacterias nitrificantes reductoras de NH_3 y NO_2^- , se encarga de la conversión biológica del nitrógeno amoniacal a nitratos mediante el proceso de nitrificación, de esta forma es posible reducir el recambio de agua al mínimo (menor al 10%) (Tidwell, 2012). Para que estos procesos se lleven a cabo de manera eficiente en los filtros, es necesario dimensionar su tamaño y la cantidad de medio filtrante, así como el flujo de agua, siempre tomando en consideración parámetros como la densidad de organismos en el cultivo y la tasa de alimentación. Estas condiciones determinan la eficiencia del proceso de filtración. En el filtro mecánico se asegura la máxima retención de los sólidos suspendidos y en el filtro biológico se define el tiempo de contacto adecuado entre los desechos (nitrógeno amoniacal) y las bacterias nitrificantes, siempre en condiciones aeróbicas, ya que este grupo de bacterias son aerobios obligados (Timmons *et al.*, 2002).

La conversión biológica del nitrógeno amoniacal a nitratos está dada por bacterias quimioautótrofas que se desarrollan de manera natural en este tipo de sistema. Las bacterias del género *Nitrosomonas* spp., llevan a cabo el primer paso en la nitrificación, al oxidar el nitrógeno amoniacal para transformarlo en nitrito. Mientras que las bacterias del género *Nitrobacter* spp., continúan con el proceso de la nitrificación oxidando los nitritos para transformarlos en nitratos; todo el proceso se desarrolla bajo condiciones aeróbicas y en ausencia de luz (Timmons y Ebeling, 2010).

La ecuación estequiométrica del proceso de nitrificación se puede representar como sigue:



Para que la nitrificación se lleve a cabo en un RAS recién instalado, se requieren alrededor de cuatro semanas para la maduración del biofiltro, durante este periodo las bacterias nitrificantes colonizan el medio filtrante, que en forma común consiste de partículas de plástico (Avnimelech, 2015). El tiempo de la maduración del biofiltro está influenciada por varios factores, como la temperatura, el pH y la concentración de compuestos nitrogenados, que están relacionados en forma directa con la biomasa del cultivo (Bregnballe, 2015). Durante la primera etapa de maduración del biofiltro, se incrementa la concentración de nitrógeno amoniacal, lo que promueve el crecimiento de las bacterias *Nitrosomonas* y la acumulación de nitritos. Una vez que las concentraciones de nitritos aumentan dentro del cultivo, se empezarán a desarrollar las bacterias *Nitrobacter*, que oxidan los nitritos, las cuales debido a su baja tasa de crecimiento, tardan aproximadamente dos semanas en desarrollarse (Avnimelech, 2015). Durante el tiempo en que aparecen las *Nitrobacter* spp., los niveles de nitrógeno amoniacal disminuyen, sin embargo, las concentraciones de nitritos aumentan, y al igual que el nitrógeno amoniacal, estos metabolitos en concentraciones altas pueden ser tóxicos para los organismos en cultivo. Al final de la maduración del biofiltro, las concentraciones de nitrógeno amoniacal y nitritos son mínimas, sin embargo, las concentraciones de nitratos, que en general son menos tóxicas, aumentan y son un nutriente clave para la proliferación de microalgas (Timmons y Ebeling, 2010).

Los costos de los sistemas de recirculación son elevados, tanto en la inversión como en el modo operativo, además su operación es compleja (Avnimelech, 2006). En las últimas dos décadas, se ha estado desarrollando la tecnología de Biofloc (BFT, por sus siglas en inglés), la cual ofrece la posibilidad de mantener una buena calidad del agua dentro de los sistemas acuícolas (De Schryver *et al.*, 2008), reduciendo los costos de inversión y operativos (Avnimelech, 2006).

1.1.3. Tecnología biofloc (BFT)

El biofloc es un agregado de algas, bacterias y otro tipo de microorganismos, asociados a la materia orgánica particulada como heces y alimento no consumido, los cuales forman flóculos (Crab *et al.*, 2007; Hargreaves, 2013; Avnimelech, 2015; Ahmad *et al.*, 2017). Los floculados pueden contener organismos microscópicos (Figura 1) como protozoarios, rotíferos, hongos, oligoquetos y nematodos (Kubitza, 2011; Hargreaves, 2013). El estudio de esta tecnología fue desarrollado por Azam *et al.* (1983), al describir el

papel de las bacterias libres en la columna de agua, que aprovechan el carbono disponible como fuente de energía en condiciones de abundancia de nitrógeno, el cual utilizan para la síntesis de proteínas que sustentan el crecimiento de su biomasa (Collazos-Lasso y Arias-Castellanos, 2015).

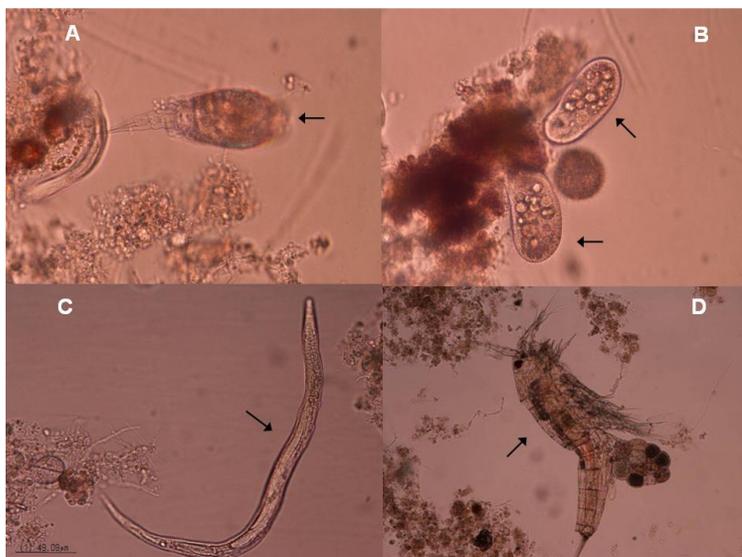


Figura 1. Microorganismos acompañantes en los floculados en un sistema de biofloc. (A) protozoos, (B) protozoos ciliados, (C) nematodos, (D) copépodos. (Tomada de Emerenciano *et al.*, 2013).

La aplicación de este principio a la acuicultura, consiste en el control de las proporciones de carbono y nitrógeno (C:N), lo que en forma común conlleva la adición de alguna fuente de carbono al cultivo (Figura 2) (Avnimelech, 1999). Bajo estas condiciones, se promueve 1) la remoción de nutrientes del agua (de los cuales, de los cuales el nitrógeno es particularmente importante para la salud de los organismos cultivados por sus efectos nocivos cuando se alcanzan concentraciones elevadas) y 2) el crecimiento de la biomasa microbiana, con un importante contenido de proteínas, que puede ser utilizada como una fuente adicional de alimento para peces y camarones (Dibello y Doassans, 2013). El beneficio de este último proceso es la reducción de cantidad de alimento necesario para que los organismos cultivados crezcan adecuadamente (Avnimelech, 2007). Los estudios de Ekasari *et al.* (2014), Brú-Cordero (2016) y Ahmad *et al.* (2017), mencionan que una proporción de 15:1 a 20:1 de C:N es ideal para que las bacterias heterotróficas consuman el nitrógeno del agua de manera eficaz.

Para aumentar la proporción de C:N en los sistemas con BFT, se utilizan diferentes fuentes de carbono, las más comunes son la melaza, almidón, glucosa y harinas de maíz y trigo, entre otras (Avnimelech, 1999; Hari *et al.*, 2004; Avnimelech, 2007; Crab *et al.*, 2010; Emerenciano *et al.*, 2013; Serra *et al.*, 2015).

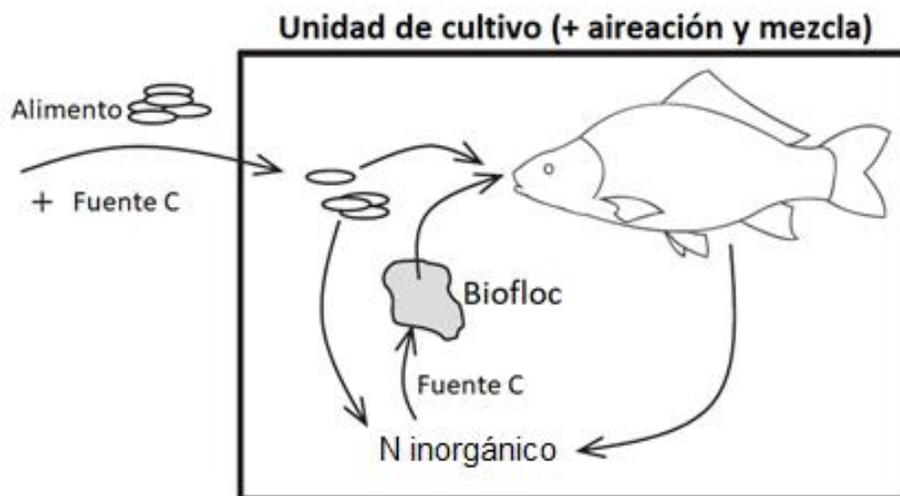


Figura 2. Representación esquemática de la tecnología de biofloc. (Tomada de Crab *et al.*, 2012).

En los cultivos acuícolas, generalmente hay altas concentraciones de nitrógeno en el medio, causadas por el porcentaje de proteína incluida en el alimento, por lo que sus relaciones C:N suelen ser menores a 8:1. Como se mencionó anteriormente, la relación adecuada sugerida para un aprovechamiento adecuado del nitrógeno por las bacterias es una relación C:N mayor (15-20:1). Para aumentar la relación C:N del alimento, es necesario añadir una fuente externa de carbono. En el cálculo de la cantidad de carbono se toman en consideración diferentes variables (De Schryver *et al.*, 2008), entre las que se incluyen la proporción de alimento que los peces consumen diariamente con respecto a su peso corporal, los contenidos de proteína y nitrógeno en la dieta, así como la proporción de N del alimento que termina en el agua. El resultado de esta estimación se corrige considerando la cantidad de carbono que contiene la fuente de carbono que se añadirá al sistema.

En la figura 3 se ejemplifica el cálculo de la fuente de carbono para una dieta con un contenido de 55% de proteína.

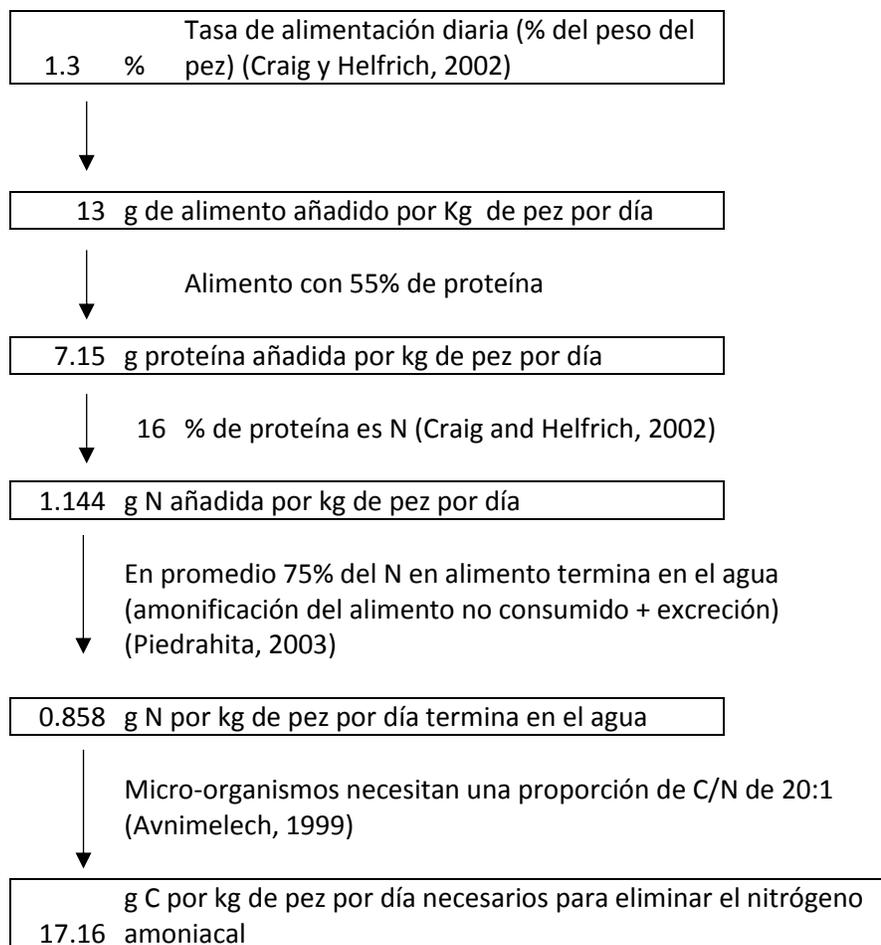
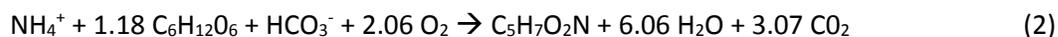


Figura 3. Cálculo esquemático de la cantidad de carbono que deberá ser añadida para la remoción de compuestos nitrogenados en un cultivo con la tecnología de biofloc. (Tomada de De Schryver *et. al.*, 2008).

Las proporciones de C:N pueden ser mejor entendidas mediante la siguiente relación estequiométrica de las vías metabólicas descrita por Timmons y Ebeling (2010), que considera la utilización del amoníaco por la actividad metabólica de las bacterias heterótrofas:



Esta ecuación señala que por cada gramo de amoníaco, se consumen 4.71 g de oxígeno disuelto, 3.57 g de alcalinidad y 15.17 g de carbohidratos; la biomasa microbiana producida es de 8.07 g y se liberan 9.65 g de CO_2 (Timmons y Ebeling, 2010). Si comparamos la ecuación estequiométrica de la nitrificación (ecuación 1) con la de las bacterias heterótrofas (ecuación 2), se observa que la cantidad de $\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$ que representa el crecimiento de biomasa bacteriana o incremento en el número de células, es 26 veces mayor que la

cantidad de células bacterianas producidas por la nitrificación. Por lo que la tasa de reproducción de las bacterias heterótrofas es mayor, con un periodo de duplicación de 30 minutos, en contraste con las 12 horas para la duplicación de las bacterias nitrificantes (Avnimelech *et al.*, 2015). Por lo que el control del nitrógeno en los cultivos acuícolas mediante las bacterias heterotróficas, es más eficaz que el control mediante la utilización de algas o por procesos de nitrificación (Hargreaves, 2013).

El nitrógeno retirado por la acción de las bacterias heterotróficas es incluido en la síntesis de proteínas para la formación de nuevas células bacterianas. Estas células pueden formar flóculos de diferentes tamaños (2 - >3000 μm) (Browdy, 2012), los cuales, dependiendo de la especie cultivada, pueden ser consumidos por los organismos cultivados. Estos flóculos tienen una calidad nutricional adecuada para el crecimiento y buen desarrollo, debido a su excelente composición nutricional, que puede fluctuar en diferentes porcentajes, que van desde 17.2 a 53.65% y 0.46 a 7.5% para proteínas y lípidos respectivamente (Tacon *et al.*, 2002; Ekasari *et al.*, 2014; Rajkumar *et al.*, 2015; Avnimelech, 2015).

El biofloc además de ser una fuente de nutrición suplementaria, tiene otros beneficios, como los efectos positivos en el sistema inmune de los organismos cultivados. En un medio con biofloc, que contiene una gran variedad de bacterias que están en contacto continuo con las especies cultivadas, hace suponer el aumento de la actividad inmunitaria de los organismos cultivados contra las enfermedades, debido a que el constante contacto promueve el reconocimiento de patrones y moléculas que conducen a la estimulación del sistema inmune (Avnimelech, 2015). Esta capacidad inmune aumentada se relaciona con el contenido de moléculas con actividad probiótica, que pueden tener un beneficio en la fisiología de los peces. Además, la proliferación de las bacterias del biofloc resulta en un efecto de exclusión competitiva sobre las bacterias patógenas (Cienfuegos *et al.*, 2017), por lo que la tecnología del biofloc actualmente se considera una estrategia para el control de patógenos, eliminando la necesidad de utilizar sustancias químicas y/o antibióticos.

1.2. Antecedentes

1.2.1. Biofloc y sus posibles afectaciones tisulares en branquias e hígado

Los cultivos con tecnología de biofloc se caracterizan por su turbiedad, debido a la materia orgánica que se encuentra suspendida en la columna de agua. Los niveles altos de sólidos suspendidos pueden tener un

efecto abrasivo en las branquias de los peces, causando cambios estructurales y estrés fisiológico, lo que conduce a fallas en los procesos de osmorregulación, excreción y transferencia de gases, lo que podría ocasionar la muerte de los peces (Lake y Hinch, 1999; Au *et al.*, 2004; Bilotta y Brazier, 2008). En un cultivo de tilapia en sistemas de biofloc se observó que a concentraciones mayores de 500 mg L⁻¹ de sólidos suspendidos, las branquias de los peces presentaron un engrosamiento en las extremidades distales de los filamentos branquiales, y un engrosamiento en las lamelas branquiales debido a la acumulación de sangre por la ruptura de las células pilares; esta patología se conoce como telangiectasis (Azim y Little, 2008). Los juveniles de salmón *Oncorhynchus kisutch*, expuestos a concentraciones mayores de 400 mg L⁻¹ de sólidos suspendidos, presentaron erosión en los filamentos branquiales, mientras que la mortalidad se presentó a concentraciones mayores a 1000 mg L⁻¹ (Lake y Hinch, 1999). Au *et al.* (2004), estudiaron el efecto de diferentes concentraciones de sólidos suspendidos en un cultivo de juveniles del mero, *Epinephelus coioides*, y observaron que a concentraciones de 200 mg L⁻¹ se presentaron las menores mortalidades (≈30%), además de documentar diferentes patologías en las branquias, tales como desprendimiento epitelial, adelgazamiento del grosor epitelial e hiperplasia.

Al igual que las branquias, el hígado es un órgano evaluado con gran frecuencia en varios estudios debido a que ambos son órganos en los que se refleja el efecto de la contaminación tanto física como química del agua, y por ende, evidencian el estado de salud de los peces. El hígado tiene la función de metabolizar sustancias que son transportadas por la sangre, por lo que la contaminación química se puede ver reflejada en este órgano. El hígado de los peces también funciona como un reservorio de energía, debido a que se almacena en forma de glucógeno o de lípidos, por lo que su tamaño y algún cambio histológico pueden reflejar el estado nutricional del pez. Najdegerami *et al.* (2016), realizaron un estudio en la carpa común (*Cyprinus carpio* L.) cultivada en biofloc y a diferentes tasas de alimentación diaria. En los tratamientos con bajas tasas de alimentación, se observaron alteraciones histológicas asociadas a cambios en la morfología de los hepatocitos, lo que dificultó su cuantificación, también se observó sangrado interno en el hígado, lo cual se atribuyó a la deficiencia de nutrientes esenciales.

1.2.2. Cultivos en Biofloc

La tecnología de biofloc ha sido aplicada comúnmente a los cultivos de camarón (Hari *et al.*, 2004; De Souza *et al.*, 2012; Khatoon *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2016) y se ha observado que los beneficios incluyen el

aumento de la producción, la reducción del costo de alimentación y la disminución de la concentración del nitrógeno inorgánico en el estanque (Hari *et al.*, 2004).

La aplicación de la BFT al cultivo de peces, se ha enfocado principalmente a la Tilapia (*Oreochromis spp.*) y la carpa común (*Cyprinus carpio*) por ser especies omnívoras. Se ha observado que con esta tecnología se genera una fuente de alimento potencial para estas especies, lo que se traduce en una reducción de la cantidad de alimento utilizado, además mejora el crecimiento y la producción de biomasa de los peces (Avnimelech, 2007; Azim y Little, 2008; Dibello y Doassans, 2013; Ogello *et al.*, 2014). El incremento en el rendimiento del cultivo se debe a la contribución nutricional de los flóculos en los estanques, ya que puede aportar cerca del 50% de las necesidades proteicas de algunas especies (Avnimelech, 2007).

Los estudios de la aplicación de la BFT en otros peces, como en *Piaractus brachipomous*, un pez amazónico que se alimenta de zooplancton, insectos y pequeños crustáceos y peces (FishBase, 2017), se han realizado con el objetivo de disminuir los altos costos de su producción (Brú-Cordero, 2016). La BFT en estos cultivos ha resultado en supervivencias y crecimientos aceptables, y aunque son menores que los reportados para esta especie en sistemas de cultivo convencionales y con sistemas de recirculación acuícola (RAS), las densidades evaluadas en los sistemas con BFT son mayores, triplicando la densidad de organismos por m³ (Brú-Cordero, 2016; Brú-Cordero *et al.*, 2017). Roa-Lázaro *et al.* (2017), estudiaron por primera vez el desempeño reproductivo del pez dulceacuícola *Prochilodus magdalenae* en sistemas de cultivo con biofloc y concluyeron que su desempeño reproductivo bajo estas condiciones fue bueno al producir gametos de buena calidad.

Pocos estudios se han realizado fuera del contexto de los peces dulceacuícolas y de hábitos omnívoros. El estudio de un organismo eurihalino, la lisa (*Mugil cephalus*), de hábitos omnívoros, cultivado en agua dulce en los dos sistemas, RAS y BFT, dio como resultado un crecimiento menor con la BFT; la explicación de esta respuesta se relacionó con las concentraciones subletales de NAT, lo que probablemente ocasionó estrés y mayores mortalidades (Vinatea *et al.*, 2018). Hasta donde se tiene conocimiento son pocos los estudios que se han realizado evaluando el efecto de la BFT en el cultivo de peces marinos. Kim *et al.* (2018), estudiaron el efecto del uso de esta tecnología en el lenguado asiático (*Paralichthys olivaceus*) y reportaron que los peces cultivados con BFT, tuvieron un mayor crecimiento comparado con los peces cultivados en RAS. También evaluaron el hematocrito para estimar el estado de salud de los peces y no encontraron diferencias significativas entre los dos tratamientos.

1.2.3. *Totoaba macdonaldi*

La totoaba, *T. macdonaldi* (Perciformes: Scianidae) es un pez marino endémico del Golfo de California (Arvizu y Chávez, 1972), de hábitos carnívoros, se alimenta principalmente de crustáceos y peces (De Anda-Montañez *et al.*, 2013). Es la especie de mayor tamaño de esta familia, puede alcanzar una longitud total de 2 metros (Fischer *et al.*, 1995) y pesar 137 kg (Cannon, 1966); es un organismo longevo, los registros evidencian la existencia de totoabas de hasta 24 años de edad (Román-Rodríguez y Hammann, 1997). La distribución de esta especie abarca desde la desembocadura del río Colorado hasta el río Fuerte, Sinaloa, en la costa oriental del Golfo de California y del río Colorado hasta Bahía Concepción, Baja California en la costa occidental (Arvizu y Chávez, 1972). Los juveniles de totoaba se distribuyen en la región del alto Golfo de California, que se caracteriza por una alta turbidez, producto de las corrientes en esta zona, en donde la visibilidad del disco Secchi, en el Delta del Río Colorado, es de 2 cm de profundidad durante mareas vivas y de 5 cm durante mareas muertas (Hernández-Ayón *et al.*, 1993; Valdez-Muñoz *et al.*, 2010).

La totoaba se ha sobreexplotado a través de los años. Alrededor de la década de los años 1920, la explotación comercial de este organismo estaba dirigida a la exportación de la vejiga gaseosa seca (conocida como “buche”), hacia China y Estados Unidos. Durante ese periodo, esta pesquería fue la principal causa del establecimiento y sustento de las comunidades que se dedicaron a su explotación en el Golfo de Santa Clara y Puerto Peñasco en Sonora y en San Felipe, Baja California (Flanagan y Hendrickson, 1976). Con el paso del tiempo, debido a la sobreexplotación y a la degradación de las zonas de crianza y desove, la población disminuyó. Por lo anterior, el gobierno mexicano estableció regulaciones para la administración de la pesquería y para proteger las poblaciones de totoaba. Entre 1950 y 1955, se aplicó una veda estacional en la desembocadura del río Colorado (zona de desove); posteriormente en 1974 se declaró la veda permanente y un año después, se catalogó como especie protegida y fue incluida como especie en peligro por Estados Unidos y la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, por sus siglas en inglés) (De Anda-Montañez *et al.*, 2013). Para evitar el comercio internacional, en 1976, se incluyó en la Convención Internacional del Tráfico de Especies Silvestres de flora y fauna en peligro (CITES) como especie en peligro de extinción (True, 2012); pero fue hasta 1994, que el Gobierno Mexicano catalogó a este organismo como especie en peligro de extinción (NOM-059-ECOL-2010) (Minjarez-Osorio *et al.*, 2012).

A partir de 1993, la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), inició las investigaciones sobre la biología de la totoaba para establecer las bases para su cultivo con fines de repoblación (True, 2012). Actualmente, la Dirección de Fauna Silvestre de la SEMARNAT tiene una

estrategia para el repoblamiento del Golfo de California con juveniles de esta especie, la cual está conformada por una red de centros de reproducción y crianza de totoaba, mediante la operación de Unidades de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA). El Centro Reprodutor de Especies Marinas del Estado de Sonora (CREMES) del Instituto de Acuicultura del Estado de Sonora, también desarrolla un programa para la reproducción de la totoaba y cuenta con una UMA desde el año 2012 para la reproducción, repoblación, investigación y aprovechamiento extractivo de la especie (Fuente: www.iaes.gob.mx).

Aparte de las dos UMA mencionadas anteriormente, existe otro criadero pero comercial, el cual también es una UMA de la empresa Earth Ocean Farms (EOF) en La Paz, la cual produce juveniles. Estos tres criaderos, en los últimos años, han liberado miles de juveniles de totoaba al Mar de Cortés. Otro gran porcentaje de los alevines son transportados a jaulas marinas (Figura 4) para su cultivo. En estas UMAs se aprovecha al máximo la producción de totoaba ya que también se donan a Centros de Investigación para su estudio, con los cuales se tienen convenios de colaboración. Los resultados de las UMA evidencian que en la actualidad, la producción de crías de totoaba está bien desarrollada.

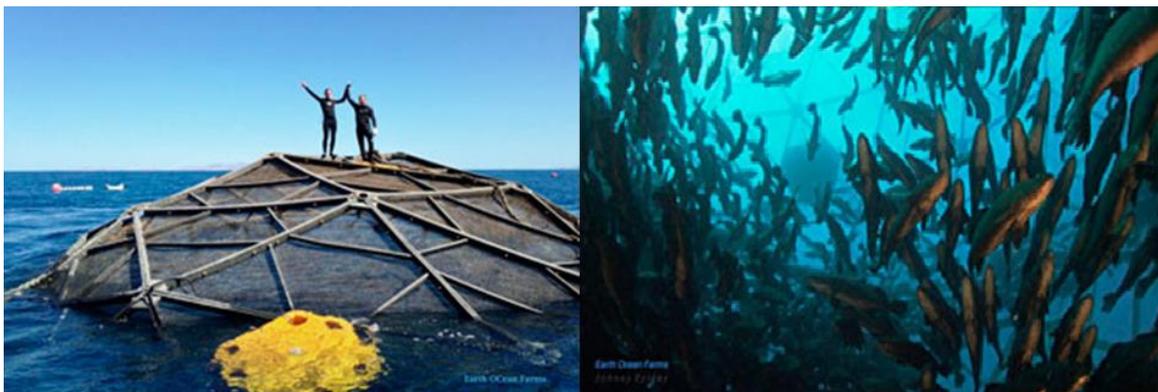


Figura 4. Cultivo de totoaba en jaulas marinas. (Imagen tomada por <http://www.earthoceanfarms.com/es/>)

1.3. Justificación

Para que la actividad acuícola reduzca sus impactos sobre el medio ambiente y se desarrolle de manera sustentable, es necesario la búsqueda de nuevas tecnologías, capaces de aminorar los costos de producción, sin disminuir la biomasa de organismos producidos en las granjas acuícolas, por lo que la implementación de un sistema económico, de pocos componentes, sencillos, accesibles y de fácil

operación, puede ayudar a reducir los costos de inversión y operativos. La tecnología de Biofloc ofrece una solución a estas dos problemáticas, sin embargo, se ha estudiado y aplicado principalmente para el cultivo de camarones peneidos y en algunos peces dulceacuícolas de hábitos omnívoros y detritívoros, mientras que en peces marinos hasta el momento solo se tiene un antecedente. La totoaba es un organismo marino con potencial para cultivo, debido a que presenta altas tasas de crecimiento y fácil adaptación al cautiverio. La totoaba hasta el momento solo se cultiva en jaulas marinas, una tecnología poco accesible para muchos productores acuícolas, por lo que la aplicación de la BFT puede ser una opción viable para su cultivo en las granjas que actualmente son utilizadas para la camaronicultura, actividad que en los últimos años se ha visto seriamente afectada por diversas patologías asociados a su cultivo, lo cual ha llevado a los camaronicultores a buscar alternativas de producción. Esto, aunado también al comercio potencial que presenta la totoaba en el mercado mexicano, norteamericano y asiático debido al gusto por su carne y por la vejiga gaseosa, que tiene un alto valor económico. Por lo anterior, este cultivo podría ser una buena alternativa al cultivo de camarón, no obstante, es un requisito evaluar si la totoaba se pueda cultivar en condiciones similares a las del camarón, en sistemas con alta turbiedad. Por lo que este estudio evaluó el efecto de la utilización de la tecnología de Biofloc en un cultivo de juveniles de totoaba con diferentes concentraciones de flóculos.

1.4. Hipótesis

A tasas de filtración mayores del 75% del flujo máximo del agua en el sistema ($330 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$) se producirán menores concentraciones de bioflóculos en los cultivos, los cuales mejorarán los parámetros productivos y no habrá afectaciones tisulares en las branquias de los juveniles de totoaba.

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de diferentes tasas de filtración (concentraciones de bioflóculos) en el cultivo de juveniles de totoaba (*T. macdonaldi*).

1.5.2. Objetivos específicos

- Evaluar el crecimiento en peso, la tasa de crecimiento específica, supervivencia, factor de conversión alimenticia, porcentaje de hematocrito e índice hepatosomático de los juveniles de totoaba cultivados con biofloc y diferentes tasas de filtración (330, 245, 160, 80 y 0 L•h⁻¹) y en un sistema de recirculación convencional.
- Analizar las concentraciones de nitrógeno amoniacal total, nitritos, nitratos, sólidos suspendidos totales, sólidos volátiles totales, pH, oxígeno disuelto y alcalinidad en los cultivos con biofloc y diferentes tasas de filtración (330, 245, 160, 80 y 0 L•h⁻¹) y en un sistema con recirculación convencional.
- Analizar el estado de salud de las branquias y del hígado de las totoabas cultivadas con diferentes tasas de filtración utilizando técnicas histológicas.

Capítulo 2. Metodología

2.1. Obtención y mantenimiento de organismos

Los juveniles de *T. macdonaldi* fueron donados por el Centro de Reproducción de Especies Marinas del Estado de Sonora (CREMES) del Instituto de Acuicultura del Estado de Sonora, ubicado en la bahía de Kino, Sonora, México, de acuerdo con el Convenio Específico CICESE-IAES. Los peces fueron trasladados al Laboratorio de Peces Marinos del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), en Ensenada, Baja California, México y se mantuvieron en un tanque rectangular de 9 m³ durante ocho meses. Una vez pesados y contados, 72 juveniles fueron trasladados a un invernadero en el cual se encontraba el sistema experimental, en donde se repartieron de manera aleatoria en 12 tanques, colocando seis peces por tanque. Su peso promedio inicial por organismo fue de 469 g.

2.2. Diseño experimental

El experimento se llevó a cabo en una instalación tipo invernadero el cual tenía como objetivo conservar la temperatura del agua de manera homogénea en los tanques. El sistema que se construyó constó de 12 tanques (Rotoplas®) de 750 litros en los que se dispusieron seis tratamientos por duplicado. Un tratamiento se realizó sin biofloc, utilizando un sistema de recirculación convencional, que contó con un filtro mecánico y uno biológico (Figura 5) con un volumen de 45 L cada uno, en el cual el agua se mantuvo sin materia residual del alimento o desechos de los organismos en el tanque y ayudó a regular las concentraciones tóxicas de los productos nitrogenados en el cultivo. Para dimensionar dichos filtros se siguieron las especificaciones de Timmons *et al.* (2009). Para la dimensión del filtro biológico se calculó la cantidad de nitrógeno amoniacal total (NAT) que se produciría en el tanque a partir de la biomasa y la tasa diaria de alimentación. Para este cálculo se estimó la biomasa final del cultivo el cual se estipuló en 5 Kg/m³, debido al peso y disponibilidad de organismos. El peso final por organismo se estimó en aproximadamente 850 g, y utilizando la tabla de alimentación de Orellana *et al.* (2014), se suministró una tasa de alimentación del 1.3% del peso total del organismo. Con esos datos se utilizó la siguiente formula:

$$P_{NAT} = f * PC * k * 10^6 \quad (3)$$

Donde,

P_{NAT} = Producción de nitrógeno amoniacal total (mg/L por día)

f = tasa de alimentación diaria ($Kg_{Alimento}/día$)

PC = Porcentaje de proteína cruda (55% en este experimento)

$k = 0.092$, es una constante

10^6 = conversión de Kg a mg

Una vez que se tenía calculada la producción de NAT se procedió a dimensionar el volumen del medio requerido para la remoción total de nitrógeno amoniacal total producido. En este caso se utilizó el medio Kaldness (K1, modelo BF150B, Pentair Aquatic Eco-systems®), con el cual se estimó la inclusión de 17 L de volumen de medio filtrante y calculado mediante la siguiente formula:

$$V_{medio} = \frac{P_{NAT}}{VTR} * 10^3 \quad (4)$$

Donde

V_{medio} = Volumen de medio (L)

VTR = Tasa volumétrica de remoción de NAT del medio, en este caso, el medio K1 es de 140,000 mg NAT/ m^3 por día (Pfeiffer y Wills, 2011)

10^3 = Convertir m^3 a L

Para el desarrollo del filtro mecánico se tomaron como base las proporciones de volumen de medio filtrante de un *PolyGeyser Bead Filter Model DF-6*, el cual contiene un 40% de medio filtrante, mientras que el 60% se encuentra libre para los retrolavados. Debido a que se utilizó un recipiente de plástico como filtro, cuyo volumen fue de 40 L, el medio filtrante de partículas de plástico usado fue de 15 L.

Se evaluaron cinco tratamientos con el sistema de biofloculados. Los cuales cada uno consistió de un tanque (Rotoplas®) de cultivo de 750 litros y un filtro mecánico de 55 L con un volumen de medio filtrante

15 L. Este sistema se manejó sin recambios de agua, solamente se agregó el agua perdida por la evaporación o por las pérdidas de agua producto de la eliminación de materia orgánica sedimentada en los filtros, ya que diariamente se realizó un retrolavado y se limpió el fondo de los tanques con un sifón. A los tratamientos con biofloc diariamente se les agregaron 200 mL de inóculo de bacterias y se les suministró alimento correspondiente dividido en tres raciones por día. La cepa de bacterias utilizada para inocular los tanques fue proporcionada por la empresa Biodiversidad Acuicola S. A. de C.V. Siguiendo sus recomendaciones se inocularon 100 ml de cepa bacteriana en 20 L de agua de mar filtrada, 2 L de melaza, 250 ml de vinagre de manzana, 6.20 g Urea al 46% y 2 ml de ácido sulfúrico al 96%.

Para mantener una proporción de C:N 20:1, se suministró la cantidad adecuada de azúcar como sustrato de carbón. La cantidad de azúcar que se añadió diariamente se calculó siguiendo el procedimiento esquematizado en la figura 3. Los sistemas del tratamiento con biofloc contaron con un filtro mecánico (Figura 6) que ayudó a remover fracciones de biofloculados. En estos tratamientos se manejaron cinco niveles de flujo, con lo que se esperaba que se crearan cinco niveles de concentración de bioflóculos, los cuales se definieron a partir de la capacidad máxima de flujo del sistema (≈ 330 L/h). La recirculación entre el filtro y el tanque fue promovido mediante el método airlift (bombeo con aire) (Figura 6).

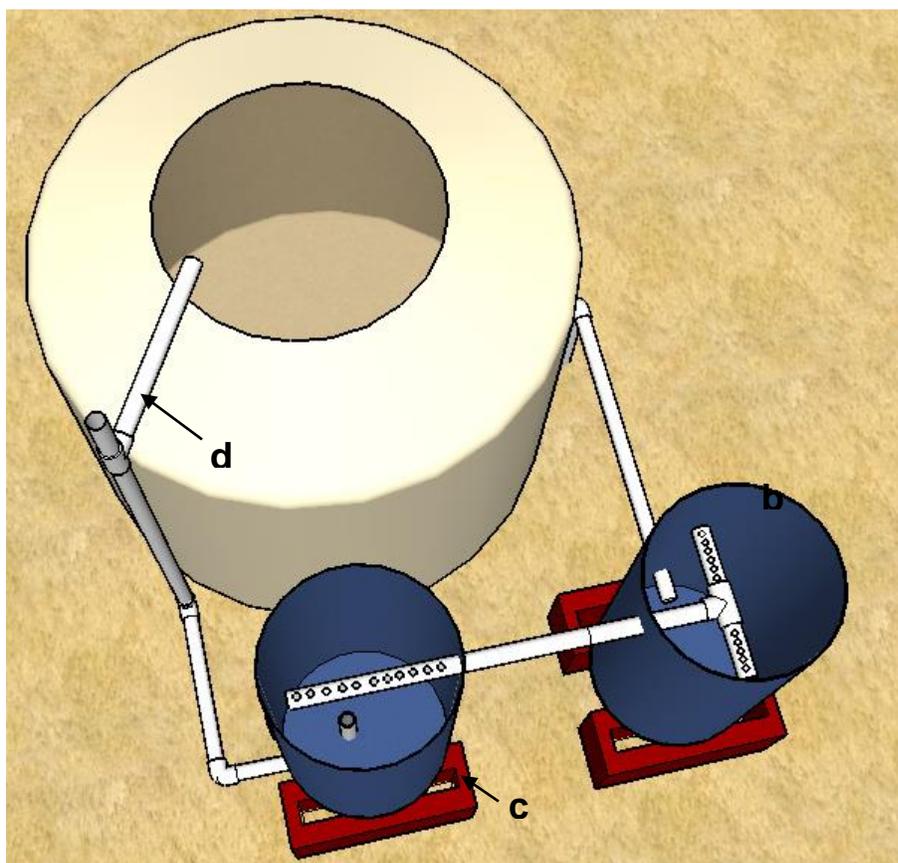
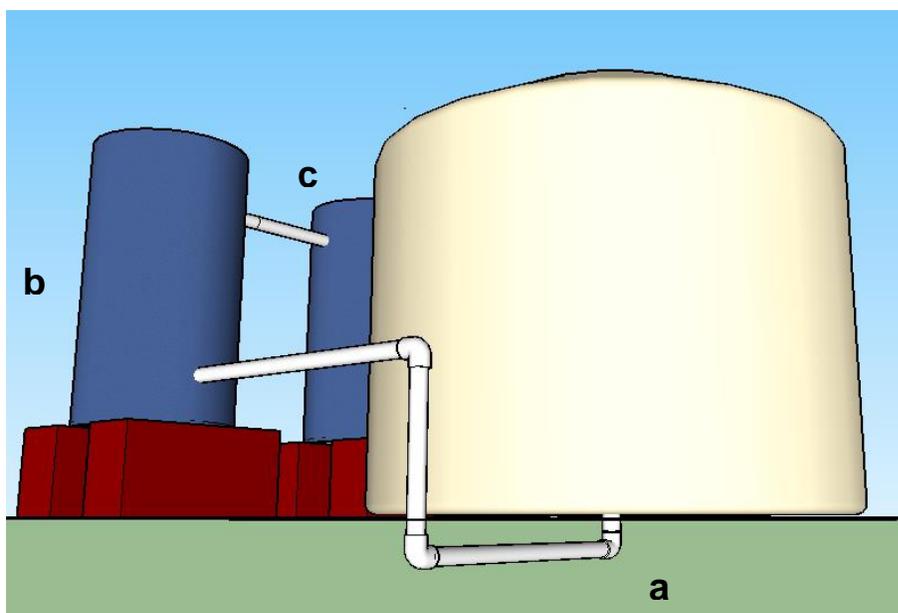


Figura 5. Diseño experimental del sistema de recirculación. a, salida del tanque; b, filtro mecánico; c, filtro biológico; d, tubo de entrada al tanque mediante bombeo de aire (airlift).

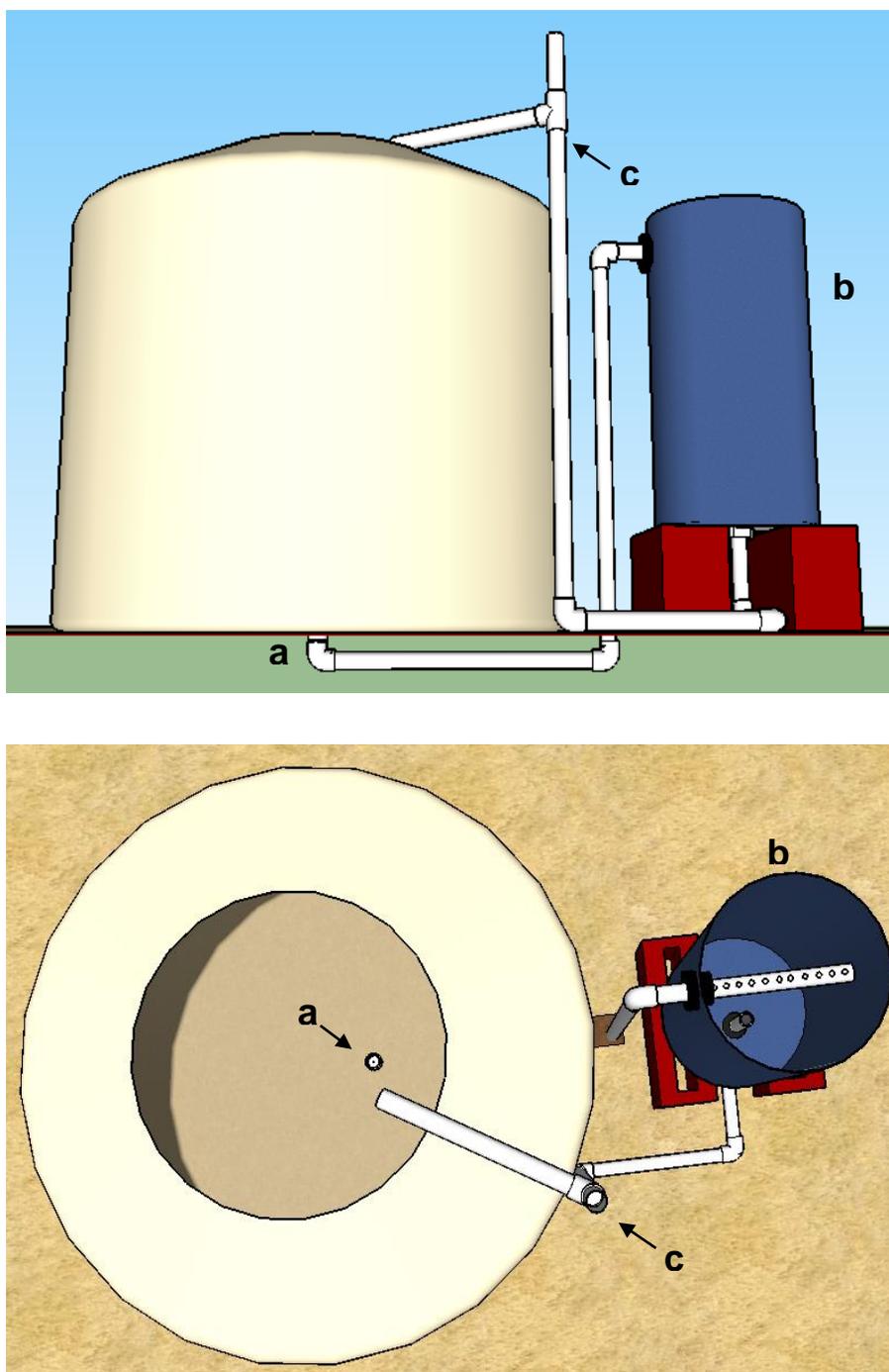


Figura 6. Diseño experimental del sistema con biofloc. a, salida del tanque; b, filtro mecánico; c, tubo de entrada al tanque mediante bombeo de aire (airlift).

Para controlar la densidad de los biofloculados en los tratamientos experimentales con biofloc, se colocó un filtro de cama fija con capacidad para retener los sólidos suspendidos de un diámetro mayor a 50 μm . La cama de partículas de plástico fue dimensionada de la misma manera que se calculó para el sistema de recirculación, por lo que el filtro contenía 15 L de medio filtrante. Los flujos que se obtuvieron a partir del flujo máximo proporcionado por el sistema se muestran en la tabla 1. Para mantener en constante movimiento el agua de cultivo y evitar que se sedimentara la materia orgánica, cada tanque contaba con dos piedras difusoras de aire (modelo AS15s, Pentair Aquatic Eco-systems®). El bioensayo bajo estas condiciones tuvo una duración de 89 días.

Tabla 1. Flujos de agua en los tratamientos experimentales durante el cultivo de totoaba.

Tratamiento	Flujo (L/h)	No. de vueltas del Sistema / día
T _{RAS}	≈ 115	3.7
T ₁₀₀	≈ 330	10
T ₇₅	≈ 245	7.5
T ₅₀	≈ 160	5
T ₂₅	≈ 80	2.5
T ₀	Sin flujo	Sin filtración

2.3. Parámetros de calidad del agua

2.3.1 Parámetros fisicoquímicos

Diariamente se midió la concentración de oxígeno disuelto (mg/L), porcentaje de saturación de oxígeno disuelto, la temperatura (°C) y la salinidad con un analizador multiparámetro (YSI modelo 85) directamente en el tanque de cultivo. El pH se midió con un potenciómetro (ThermoOrion® modelo 230 021A).

Semanalmente se determinó la alcalinidad (mg/L CaCO₃) mediante la técnica de titulación descrita por APHA *et al.* (1995). Brevemente, se tomaron muestras de 35 ml de los diferentes tratamientos, a las cuales se les añadió 1 ml del indicador verde-bromocresol y rojo-metilo (50 mg de verde-bromocresol y 10 mg de rojo-metilo, diluidos en 50 mL de etanol al 95%). Una vez que la muestra tomó una coloración azul, se procedió a la titulación con ácido sulfúrico (H₂SO₄, 0.02 N) mediante goteo utilizando una bureta graduada;

se llevó un registro de la cantidad de ácido utilizado para posteriormente determinar la alcalinidad mediante la siguiente ecuación:

$$ALK = \frac{A*N*50\ 000}{mL\ muestra} \quad (5)$$

Donde,

ALK = Alcalinidad (mg/L de carbonato de calcio [CaCO₃])

A = mL del ácido usado en la muestra

N = Normalidad del ácido

Dos veces a la semana (martes y viernes) se cuantificó la concentración de compuestos nitrogenados en cada tanque. Para cuantificar el nitrógeno amoniacal total (NAT), se tomaron muestras de agua de cada tanque y con el objetivo de evitar interferencia en la medición por espectrofotometría, se centrifugaron 1.5 ml de cada muestra en una centrifuga (Modelo Galaxy 7D, marca VWR™) a 5,000 RPM durante cinco minutos para separar la muestra de agua de la materia suspendida (floculados). Las muestras de agua sin sólidos se analizaron siguiendo el método estándar de azul de indofenol descrito por Solorzano (1969), cuyo principio es que en un medio alcalino (pH 12) todo el amonio se convierte en amoniaco, obteniéndose un compuesto denominado azul de indofenol, la concentración de este producto se midió en un espectrofotómetro (modelo Varioskan Flash, marca Thermo Scientific) a una longitud de onda de 640 nm. Se cuantificaron los nitritos (NO₂⁻) y nitratos (NO₃⁻) mediante el kit comercial de la marca API (USA).

Para cuantificar los sólidos suspendidos totales (SST), se utilizó el método estándar de APHA *et al.* (1995). Se filtraron 15 mL de muestra de agua de los tanques de cultivo utilizando una bomba de vacío en filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/C) previamente incinerados y pesados. Estos filtros con la muestra se secaron en una estufa (modelo: oven series 9000, marca Thermolyne) a 105 °C. Los filtros se colocaron en un desecador para posteriormente ser pesados en una balanza analítica (modelo FR-200, marca AND) hasta obtener su peso constante. Los sólidos suspendidos totales fueron determinados con la siguiente fórmula:

$$SST = \frac{(A-B)*1000}{mL\ muestra} \quad (6)$$

Donde,

SST = Sólidos suspendidos totales (mg/L)

A = Peso del filtro + muestra seca (g)

B = Peso del filtro (g)

Los sólidos volátiles totales (SVT) se cuantificaron incinerando a 550 °C, las muestras (filtradas y secas) utilizadas anteriormente en los SST, en una mufla (modelo: F30430CM, marca: Thermolyne). Posteriormente se pesaron y por la diferencia con respecto al peso seco total (de SST) se obtuvo el peso de los SVT (APHA *et al.*, 1995).

Para medir volumétricamente el biofloc se utilizaron conos de Imhoff, en los cuales se tomó una muestra de 1 L de cada tratamiento y se dejó reposar por una hora, para después cuantificar el volumen de los sólidos sedimentables dentro del cono. Además, se observó y se cuantificó la transparencia del agua de cada tanque de cultivo introduciendo un disco de Secchi, con el que se midió la profundidad a la que el disco dejó de ser visible.

2.4. Alimentación y monitoreo de totoabas

Las totoabas fueron alimentadas con una dieta formulada para peces marinos de la marca Skretting, de 7 mm de diámetro y con 55% de contenido proteico. El alimento se pesaba antes de ser suministrado a los peces, y después de una hora se retiró el que no consumieron para llevar a cabo un mejor control de alimentación y poder calcular el factor de conversión alimenticia. Los organismos durante todo el periodo de cultivo se alimentaron tres veces al día.

El análisis biométrico de las totoabas se realizó cada 14 días, registrando el peso con una balanza Ohaus Adventurer Pro AV2101 y la longitud patrón se midió con un ictiómetro de Aquatic EcoSystems Inc. Con las medidas de la longitud total se describió el crecimiento, se calculó el incremento total de peso y longitud (ecuación 7) y se calculó la tasa específica de crecimiento en peso (ecuación 8), que corresponde

el aumento porcentual en tamaño o peso por día; este índice es útil cuando se comparan grupos de peces en experimentos a corto plazo (Lugert *et al.*, 2016). Se estimó el estado de condición de las totoabas mediante el índice de Fulton (K) (ecuación 9). La supervivencia se cuantificó diariamente restando el número de peces muertos del número de peces sembrados inicialmente en cada estanque (ecuación 10). El factor de conversión alimenticia aparente (FCA) de los juveniles de totoaba, se calculó como el cociente del alimento suministrado expresado en gramos y el peso ganado (ecuación 11).

Incremento de peso:

$$\text{Incremento de peso} = \text{Peso final} - \text{Peso inicial} \quad (7)$$

Tasa de crecimiento específico (TCE) en peso:

$$\text{TCE} = \frac{\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}}{\text{días de cultivo}} * 100 \quad (8)$$

Índice de condición:

$$K = 100 * \frac{\text{Peso (g)}}{\text{Longitud}^3 \text{ (cm)}} \quad (9)$$

Supervivencia:

$$\text{Supervivencia (\%)} = \frac{\text{No. Org. final}}{\text{No. Org. inicial}} * 100 \quad (10)$$

Factor de conversión alimenticia (FCA):

$$FCA = \frac{\text{Alimento consumido (g)}}{\text{Peso ganado (g)}} \quad (11)$$

2.5. Obtención de muestras para establecer el estado de salud de las totoabas

2.5.1. Hematocrito

Para conocer el estado de salud de los organismos y debido a que se observó un bajo consumo de alimento, se realizó un muestreo de sangre al finalizar el experimento (día 89). Se obtuvo una muestra de 1 ml de sangre de cada organismo, realizando una punción en la vena caudal del pez con una jeringa desechable (3mL) y aguja de 22Gx32 ml. Las muestras se colocaron en tubos microtainer pediátrico con anticoagulante (EDTA K₂), posteriormente se utilizaron tubos capilares para hematocrito, los cuales se llenaron hasta $\frac{3}{4}$ partes y se sellaron con plastilina en un extremo. Los capilares se colocaron en una centrifuga para microhematocrito (modelo CT-2900, marca Adams Clay), se centrifugaron durante 10 minutos y se procedió a leer en un lector para microhematocrito (modelo A-2970, marca Adams Clay). Los resultados se expresaron en porcentaje.

2.5.2. Índice hepatosomático (IH)

Al final del experimento, una vez que se pesaron y midieron los organismos, se realizó la disección de cada pez para extraer el hígado y obtener su peso en una balanza analítica (modelo FR-200, marca AND). El índice hepatosomático se utilizó como *proxí* para poder comparar las reservas de energía de los peces entre los tratamientos. Este índice se obtuvo con la siguiente ecuación:

$$IH = \frac{\text{Peso del hígado}}{\text{Peso corporal}} * 100 \quad (12)$$

2.5.3. Muestras histológicas

Las totoabas fueron sacrificadas siguiendo las especificaciones de bienestar animal de la OIE (2012). Posteriormente, se disecaron el primero y segundo arco branquial izquierdo y derecho de cada pez y se examinaron con la ayuda de un microscopio estereoscópico (Olympus, modelo SZ61), con un aumento de 40x para evaluar cualitativamente el daño físico de las branquias. A continuación la muestra de las branquias se colocaron en solución fijadora de Davidson. Una vez fijadas, fueron descalcificadas con una solución preparada con 100 mL de ácido fórmico y 50 mL de formaldehído, aforado a un litro. Este proceso

duró 10 días. Una vez descalcificadas, se colocaron en alcohol al 75% para su análisis histológico siguiendo la técnica estándar de inclusión en parafina. Se hicieron cortes de 5 μm de espesor en un micrótomo semi-motorizado (modelo RM2245, marca LEICA Microsystems) y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Las laminillas histológicas se observaron al microscopio compuesto (Olympus, modelo CX31) para evaluar y describir las alteraciones histológicas.

Para la evaluación semicuantitativa de las alteraciones histológicas se calculó un índice de daño en branquias utilizando el criterio de Poleksic y Mitrovic-Tutundzic (1994), en el cual se consideran 26 tipos de lesiones branquiales, a las cuales se les asigna un valor dependiendo de las diferentes etapas de la lesión (tabla 2). Estos valores se suman y agrupan de acuerdo a la etapa de la lesión, utilizando la siguiente fórmula:

$$I = \sum_{i=1}^{19} a_i + 10 \sum_{i=1}^5 b_i + 10^2 \sum_{i=1}^2 c_i \quad (13)$$

Donde,

I = Es el índice del grado de alteración en una branquia

a = Primera etapa de lesión

b = Segunda etapa de lesión

c = Tercera etapa de lesión

Una vez obtenido el índice del grado de alteración en la branquia (ecuación 13), se observa la escala para el valor del índice de alteraciones y se concluye. La escala de valores para el índice (I) y los efectos asociados es la siguiente:

Valores del índice	Efectos
0-10	Branquias funcionalmente normales
11-20	Branquias de leve a moderadamente dañadas
21-50	Branquias de moderado a fuertemente dañadas
>100	Branquias irreparablemente dañadas

En forma adicional, para cuantificar la intensidad de las alteraciones por organismo y de cada tratamiento, se seleccionaron al azar 10 campos en la laminilla histológica para cada muestra de branquia, y se registró el número total de alteraciones por campo.

Tabla 2. Lista de lesiones branquiales establecidas por Poleksic y Mitrovic-Tutundzic (1994).

	Etapa
a) Hipertrofia e hiperplasia del epitelio branquial	
Hipertrofia del epitelio respiratorio	I
Elevación de las células epiteliales respiratorias	I
Infiltración de leucocitos en el epitelio branquial	I
Adelgazamiento del epitelio branquial	I
Ruptura y descamación del epitelio lamelar	II
Hiperplasia focal de células epiteliales	I
Hiperplasia desde la base hasta aproximadamente la mitad de la longitud de las lamelas secundarias	I
Hiperplasia irregular de células epiteliales	I
Fusión de puntas de lamelas secundarias	I
Hiperplasia en células eosinofílicas	I
Fusión de puntas de laminillas primarias	I
Engrosamiento incontrolado de tejido epitelial	II
Fusión de varias lamelas secundarias	I
Acortamiento de lamelas secundarias	I
Fusión completa de todas las lamelas secundarias	II
(b) Cambios en células mucosas y/o células de cloruro	
Hipertrofia e hiperplasia de células mucosas	I
Células mucosas vacías o su desaparición	I
Hipertrofia e hiperplasia de células del cloruro	I
Células del cloruro presente en lamelas secundarias	I
(c) Cambios en los vasos sanguíneos	
Telangiectasis lamelar	I
Aumento de los vasos sanguíneos de filamento	I
Hemorragias con ruptura del epitelio	II
Estasis	II
(d) Presencia de parásitos	
	I
(e) Etapas terminales	
Tejido cicatrizado- fibrosis	III
Necrosis	III

2.6. Análisis estadístico

Para evaluar el efecto de los tratamientos sobre las diferentes variables de respuesta (crecimiento, supervivencia, TCE y FCA) de los juveniles de totoaba, se aplicó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$. Para identificar las diferencias entre tratamientos, se realizó una prueba a posteriori de Tukey. Los análisis se realizaron después de confirmar que los datos cumplían los supuestos de normalidad (prueba de Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianza (prueba de Levene). Los datos que no cumplieron con la normalidad y homogeneidad de varianza después de las transformaciones, se analizaron con un ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis. Los datos porcentuales se transformaron con la función arcoseno antes del análisis estadístico (Zar, 2010). Todos los análisis estadísticos se hicieron con el programa Statistica® 10.

Capítulo 3. Resultados

3.1. Parámetros fisicoquímicos

El oxígeno no presentó grandes variaciones en cada tratamiento (tabla 3) durante los días del cultivo. Las diferencias significativas ($p < 0.05$) se encontraron entre los tratamientos con el sistema de recirculación y los tratamientos con biofloc. El tratamiento con la mayor concentración promedio de oxígeno fue el de recirculación (T_{RAS}), con 5.45 ± 0.69 mg/L. Entre los tratamientos con biofloc no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$).

La temperatura se mantuvo en las condiciones adecuadas para el crecimiento de la totoaba, sin embargo, se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los diferentes tratamientos. En el tratamiento T_{RAS} , T_{75} y T_{25} se registraron las temperaturas más bajas, con 23.85 ± 1.61 , 23.97 ± 1.52 y 24.35 ± 1.57 °C, respectivamente. El tratamiento que registró la temperatura más alta fue el T_0 con 25.74 ± 1.41 °C (tabla 3).

La salinidad se mantuvo alrededor de 35 ups (tabla 3), sin embargo, existieron diferencias entre los tratamientos ($p < 0.05$). El tratamiento con la salinidad promedio más alta fue el T_0 , el cual registró una salinidad de 36.02 ± 0.86 ups, mientras que los tratamientos con las salinidades promedio más bajas fueron el T_{RAS} y T_{75} con 35.23 ± 0.57 y 35.1 ± 0.55 ups, respectivamente.

El pH se mantuvo estable en cada uno de los tratamientos durante todo el cultivo (tabla 3), sin embargo, entre el tratamiento de recirculación y los tratamientos con biofloculados hubieron diferencias significativas ($p < 0.05$). En el T_{RAS} se registró el mayor pH promedio, con un valor de 7.97 ± 0.14 . Los tratamientos con biofloc no tuvieron diferencias ($p > 0.05$) entre ellos, el intervalo registrado de pH fue de 7.36 a 8.15.

La alcalinidad también se mantuvo constante en los diferentes tratamientos, y como era de esperarse las concentraciones más bajas de carbonatos se presentaron en el tratamiento con el sistema de recirculación (tabla 3), el cual tuvo una concentración promedio de 107.21 ± 7.70 ppm $CaCO_3$. Debido a que las concentraciones no fueron menores a 100 ppm $CaCO_3$, no fue necesaria la adición de carbonatos al sistema. La concentración de $CaCO_3$ en T_{RAS} fue diferente ($p < 0.05$) con respecto a los tratamientos con biofloc, donde las concentraciones fueron de 146.30 ± 4.32 , 133.93 ± 4.89 y 145.66 ± 3.17 ppm $CaCO_3$ para los tratamientos T_{100} , T_{75} y T_{25} , respectivamente. Los tratamientos con concentraciones mayores de alcalinidad fueron el T_{50} y T_0 con 164.2 ± 2.95 y 176.86 ± 9.49 ppm $CaCO_3$ respectivamente.

Tabla 3. Parámetros de calidad de agua en los diferentes tratamientos del cultivo de *Totoaba macdonaldi*. Media \pm DS.

	T_{RAS}	T₁₀₀	T₇₅	T₅₀	T₂₅	T₀
Oxígeno Disuelto (mg/L)	5.45 \pm 0.69 ^a	4.87 \pm 0.57 ^b	5.04 \pm 0.62 ^b	4.91 \pm 0.62 ^b	4.84 \pm 0.68 ^b	4.86 \pm 0.52 ^b
% SAT Oxígeno Disuelto	81.08 \pm 9.61 ^a	73.74 \pm 7.66 ^b	74.6 \pm 8.18 ^b	74.8 \pm 8.6 ^b	71.94 \pm 9.13 ^b	74.96 \pm 7.44 ^b
Temperatura (°C)	23.85 \pm 1.61 ^a	24.92 \pm 1.51 ^b	23.97 \pm 1.52 ^a	25.16 \pm 1.39 ^b	24.35 \pm 1.57 ^a	25.74 \pm 1.41 ^c
Salinidad (ups)	35.23 \pm 0.57 ^a	35.73 \pm 0.57 ^{bc}	35.1 \pm 0.55 ^a	35.59 \pm 1.09 ^b	35.92 \pm .84 ^{bc}	36.02 \pm 0.86 ^c
pH	7.97 \pm 0.14 ^a	7.76 \pm 0.15 ^b	7.78 \pm 0.18 ^b	7.83 \pm 0.14 ^{ab}	7.73 \pm 0.18 ^b	7.68 \pm 0.19 ^b
Alcalinidad	107.21 \pm 7.70 ^a	146.30 \pm 4.32 ^b	133.93 \pm 4.89 ^b	164.2 \pm 2.95 ^c	145.66 \pm 3.17 ^b	176.86 \pm 9.49 ^c
NAT (mg/L)*	2.34 \pm 0.51 ^a	0.32 \pm 0.37 ^b	0.44 \pm 0.43 ^b	0.36 \pm 0.46 ^b	0.59 \pm 0.61 ^b	0.99 \pm 0.67 ^b
NAT (mg/L)**	0.35 \pm 0.14 ^b	0.21 \pm 0.13 ^b	0.11 \pm 0.11 ^b	0.20 \pm 0.19 ^b	0.43 \pm 0.32 ^b	1.45 \pm 0.69 ^a
NO₂ (mg/L)***	1.45 \pm 0.86 ^a	0.0 \pm 0.0 ^b	0.0 \pm 0.0 ^b	0.0 \pm 0.0 ^b	0.0 \pm 0.0 ^b	0.0 \pm 0.0 ^b
NO₃ (mg/L)****	717.86 \pm 166.90 ^a	0.0 \pm 0.0 ^b	0.0 \pm 0.0 ^b	0.0 \pm 0.0 ^b	0.0 \pm 0.0 ^b	0.0 \pm 0.0 ^b

* Promedio antes de la maduración del biofiltro del sistema de recirculación cerrado (antes de la semana 7).

** Promedio después de la semana 7 de cultivo, una vez que aparecieron las bacterias oxidantes del NAT (biofiltro maduro).

*** Promedio de la semana 7 a la 9, después de la aparición de las bacterias *Nitrosomonas* y antes de la colonización de las *Nitrobacter*.

**** Promedio calculado a partir de la semana 8, donde se incrementa las concentraciones de NO₃⁻ debido a la maduración del biofiltro.

3.1.1 Nitrógeno Amoniacal Total, Nitritos y Nitratos

En el tratamiento con el sistema de recirculación se mantuvieron elevadas las concentraciones de nitrógeno amoniacal total (NAT) en las primeras semanas de cultivo, debido a que el biofiltro no tuvo un periodo de maduración necesario (i.e., ocho semanas) previo al experimento. El cálculo del promedio de la concentración del NAT para este factor se dividió en dos periodos: 1) Antes de la maduración del biofiltro, donde aún no se desarrollaban las bacterias *Nitrosomonas* que oxidan el nitrógeno amoniacal (NA) a nitritos (NO_2^-), 2) Después de la fijación de las *Nitrosomonas*, el NAT disminuyó y aumentó la concentración de NO_2^- .

La concentración promedio de NAT en el T_{RAS} , durante las primeras siete semanas de cultivo (periodo anterior a la maduración) fue de 2.34 ± 0.51 mg/L de NH_4^+ , siendo mayor que en los tratamientos con biofloculados ($p < 0.05$) (tabla 3). Las concentraciones de NAT en los tratamientos con biofloc, durante el mismo periodo no presentaron diferencias ($p > 0.05$) y los valores fueron de 0.32 ± 0.37 , 0.44 ± 0.43 , 0.36 ± 0.46 , 0.59 ± 0.61 y 0.99 ± 0.67 mg/L de NAT, para T_{100} , T_{75} , T_{50} , T_{25} y T_0 respectivamente.

En el periodo posterior a la maduración del biofiltro del T_{RAS} , la concentración de NAT de los tratamientos disminuyó. Las concentraciones para los tratamientos T_{RAS} , T_{100} , T_{75} , T_{50} y T_{25} fueron de 0.35 ± 0.14 , 0.21 ± 0.13 , 0.11 ± 0.11 , 0.20 ± 0.19 y 0.43 ± 0.32 mg/L de NH_4^+ , respectivamente, los cuales no presentaron diferencias ($p > 0.05$). Sin embargo, la concentración de NAT en el tratamiento T_0 fue mayor ($p < 0.05$), con una concentración de 1.45 ± 0.69 mg/L (Figura 7).

En los tratamientos con biofloculados no se detectaron concentraciones de nitritos y nitratos. En el T_{RAS} , los NO_2^- se registraron entre las semanas 3 y 4 de cultivo, con la máxima concentración en la semana 6 (2.29 mg/L de NO_2^-), posterior a esa semana y hasta el final del cultivo, la concentración disminuyó a 0.34 ± 0.19 mg/L de NO_2^- . Una vez que la concentración de NO_2^- disminuyó en la semana 6, se pudo cuantificar la presencia de nitratos (NO_3^-), los cuales aumentaron hasta alcanzar una concentración de 800 mg/L de NO_3^- (Figura 8).

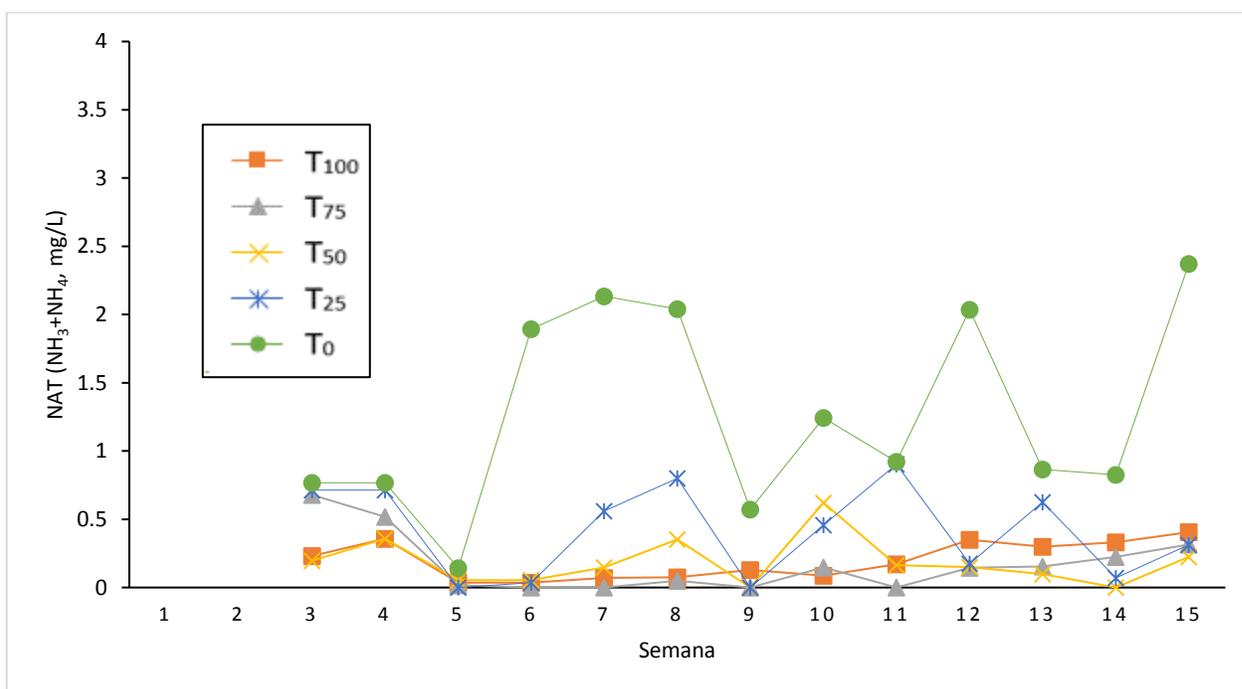


Figura 7. Concentración promedio del nitrógeno amoniacal total (NAT) durante el cultivo de totoaba en los diferentes tratamientos de tasa de filtración con el biofloc.

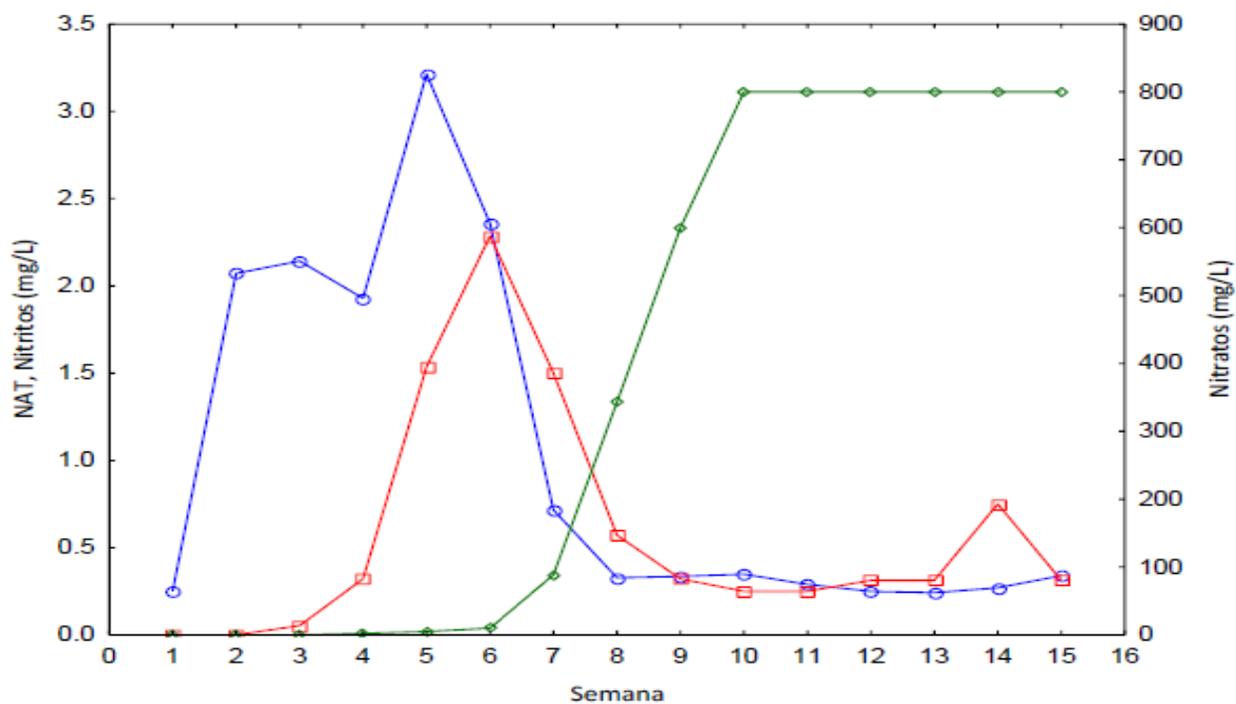


Figura 8. Concentración promedio del nitrógeno amoniacal total (azul), nitritos (rojo) y nitratos (verde) durante el cultivo de totoaba en el tratamiento con sistema de recirculación.

3.1.2. Mediciones del Biofloc

La cuantificación volumétrica de los sólidos suspendidos y/o biofloculados realizada con el cono Imhoff (Figura 9), mostró que no estuvieron presentes en el tratamiento con el sistema de recirculación convencional. Los tratamientos T_{100} y T_{75} con biofloculados no tuvieron diferencias ($p > 0.05$) con respecto al T_{RAS} , el volumen fue de 0.06 ± 0.17 y 0.08 ± 0.25 ml/L respectivamente. El mayor volumen de biofloculados se observó en el T_{50} , con 344.67 ± 24.36 ml/L, el cual fue diferente estadísticamente del resto de los tratamientos ($p < 0.05$) (Tabla 4).

En cuanto a la transparencia medida por medio del disco Secchi, el T_{RAS} presentó la mayor transparencia, con 51.78 ± 6.41 cm, la cual difiere significativamente del resto de los tratamientos ($p < 0.05$). Los tratamientos con biofloculados no presentaron diferencias entre ellos ($p > 0.05$), con una transparencia de 8.81 ± 6.41 , 11.19 ± 4.43 , 12.00 ± 4.24 , 13.47 ± 1.98 y 10.94 ± 4.39 cm para los tratamientos T_{100} , T_{75} , T_{50} , T_{25} y T_0 , respectivamente.

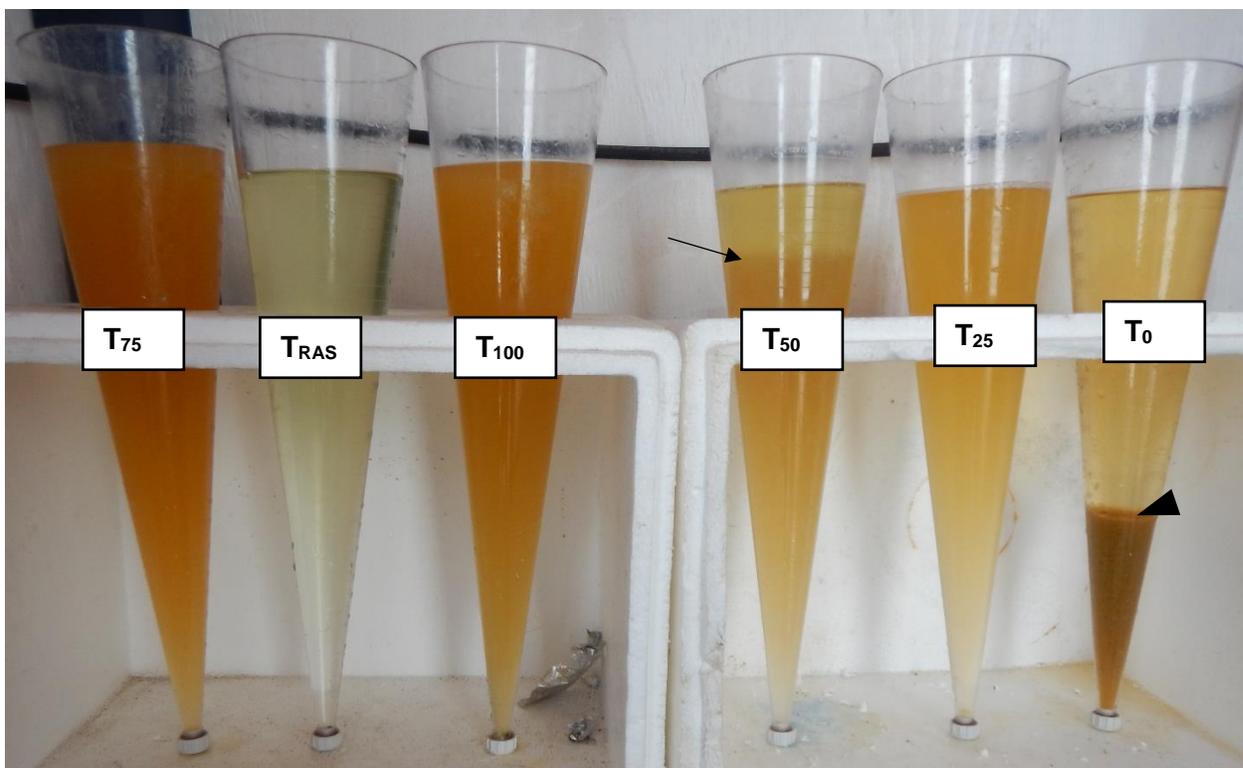


Figura 9. Cono Imhoff con muestras reposadas durante una hora de los diferentes tratamientos a 85 días del cultivo. En T_{50} se observan flóculos sedimentables (flecha); en T_0 se observan gránulos de biofloc, compactos y más densos (punta de flecha).

Tabla 4. Valores promedio de las medidas del volumen de bioflóculos, transparencia, sólidos suspendidos totales (SST) y sólidos volátiles totales (SVT) en el cultivo de *Totoaba macdonaldi*. Media \pm DS. En SST y SVT se presentan los valores mínimos y máximos que corresponden al inicio y al último día del cultivo.

	T_{RAS}	T₁₀₀	T₇₅	T₅₀	T₂₅	T₀
Volumen de bioflóculos (ml/L)	0.0 \pm 0.0 ^a	0.06 \pm 0.17 ^a	0.08 \pm 0.25 ^a	344.67 \pm 24.36 ^d	3.64 \pm 1.08 ^b	113.11 \pm 38.8 ^c
Transparencia (cm)	51.78 \pm 6.41 ^a	8.81 \pm 6.41 ^b	11.19 \pm 4.43 ^b	12.00 \pm 4.24 ^b	13.47 \pm 1.98 ^b	10.94 \pm 4.39 ^b
SST (g/L)	1.66 \pm 0.85	2.74 \pm 0.95	2.91 \pm 1.4	2.65 \pm 1.83	2.16 \pm 0.69	2.87 \pm 1.28
(min.-máx.)	(0.25-2.58)	(0.91-3.82)	(0.85-4.56)	(0.82-5.36)	(0.60-2.84)	(0.75-4.40)
SVT (g/L)	0.87 \pm 0.56	1.55 \pm 0.73	1.77 \pm 1.19	1.66 \pm 1.25	1.20 \pm 0.57	1.90 \pm 1.08
(min.-máx.)	(0.10-1.66)	(0.39-2.50)	(0.31-3.17)	(0.56-3.26)	(0.38-1.94)	(0.42-3.46)

3.2. Caracterización de los cultivos

Diariamente los tratamientos con biofloc eran inoculados con bacterias heterótrofas, sin embargo, a través del tiempo, los tratamientos fueron desarrollando diferentes características en cuanto a los flóculos, potencialmente influenciado por los diferentes flujos que se fijaron en cada tratamiento.

En el tratamiento T_{RAS} se presentó un afloramiento de microalgas (Figura 10 A), se tomó una muestra de agua y se observaron microalgas con un tamaño entre 1 y 2 μ m (Figura 10 D). En cuanto a T₁₀₀, T₇₅ y T₅₀ el proceso de sedimentación indicó que en esos tres tratamientos no se formaron flóculos sedimentables, el agua de esos tratamientos solo mostraba la coloración marrón del biofloc (Figura 10 B), de estos tanques se observaron muestras de agua al microscopio y se observaron flóculos pequeños (Figura 10 E y F). También se encontraron microorganismos en estos tratamientos, principalmente ciliados (Figura 10 G). Estos tratamientos se caracterizaron tanto al tacto, como en forma visual, ya que el agua tenía una apariencia viscosa. En T₂₅ y T₀, se formaron flóculos sedimentables, como se observa en los conos Imhoff (Figura 9), la apariencia del agua no era viscosa y se observaba de una coloración marrón oscuro (Figura 10C). Las observación al microscopio de estas muestras de agua reveló la presencia de gránulos bacterianos, con flóculos de mayor densidad y una mayor biodiversidad de microorganismos, con una gran variedad de ciliados, nematodos, amibas y platelmintos, entre otros (Figura 10 H e I).

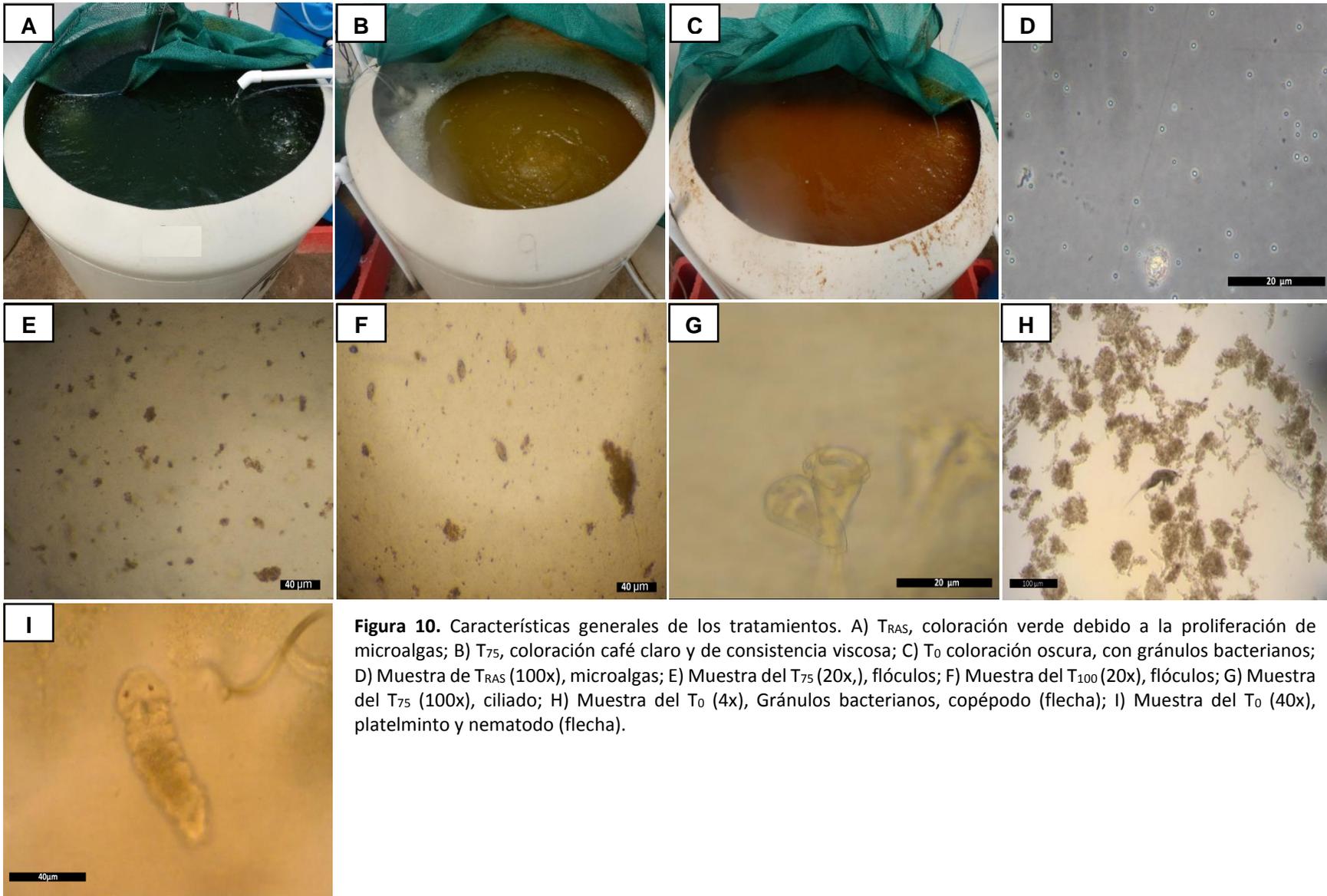


Figura 10. Características generales de los tratamientos. A) T_{RAS} , coloración verde debido a la proliferación de microalgas; B) T_{75} , coloración café claro y de consistencia viscosa; C) T_0 coloración oscura, con gránulos bacterianos; D) Muestra de T_{RAS} (100x), microalgas; E) Muestra del T_{75} (20x), flóculos; F) Muestra del T_{100} (20x), flóculos; G) Muestra del T_{75} (100x), ciliado; H) Muestra del T_0 (4x), Gránulos bacterianos, copépedo (flecha); I) Muestra del T_0 (40x), platelminto y nematodo (flecha).

3.3. Índice hepatosomático

Para calcular el índice hepatosomático, las muestras del hígado se obtuvieron al final del experimento, una vez que se sacrificaron los peces (en T₅₀ no había organismos vivos). El índice hepatosomático fue mayor en el T_{RAS}, ($p < 0.05$) con respecto a los tratamientos con biofloc, mientras que entre estos últimos no se observaron diferencias (tabla 5). En la figura 11 se observa la diferencia del tamaño del hígado entre un organismo del T_{RAS} y un ejemplar de los tratamientos con biofloc (T₇₅), donde se observa una marcada reducción del tamaño de este órgano en los peces que fueron cultivados con biofloc.

Tabla 5. Valores promedio y desviación estándar del índice hepatosomático de las totoabas cultivadas con biofloc y en un sistema de recirculación convencional. En paréntesis se muestra el valor mínimo y máximo.

T _{RAS}	T ₁₀₀	T ₇₅	T ₅₀	T ₂₅	T ₀
0.83±0.24 ^a	0.53±0.11 ^b	0.53±0.09 ^b	SD	0.60±0.14 ^b	0.60±0.16 ^b
(1.35-0.60)	(0.71-0.37)	(0.60-0.41)		(0.83-0.42)	(0.93-0.37)

SD, Sin dato

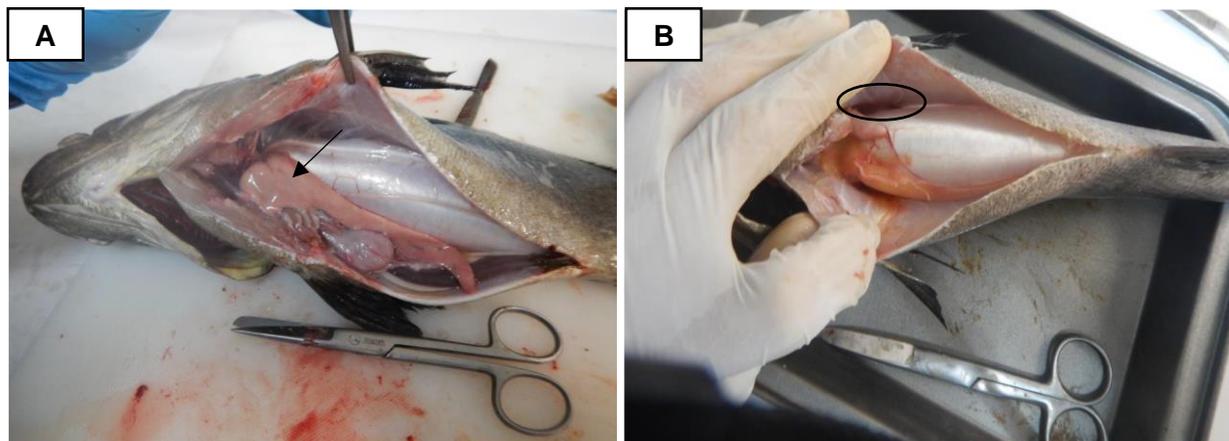


Figura 11. Muestras de hígado de dos ejemplares de diferentes tratamientos. A) Ejemplar de T_{RAS} se observa un hígado sano y con un tamaño normal (flecha). B) Ejemplar de T₇₅ donde se observa el hígado reducido (circulo).

3.4. Análisis histológicos

3.4.1. Hígado

El hígado de los peces cultivados en T_{RAS} se consideró como un control para establecer el estado de salud del órgano con respecto a las totoabas cultivadas con biofloc. En el hígado de las totoabas en T_{RAS}, los hepatocitos tenían un mayor tamaño, eran redondos, y tenían vacuolas de lípidos (Figura 12A). Además se observó el desplazamiento del núcleo de los hepatocitos hacia la periferia (Figura 12B).

En las muestras de los hígados de los organismos cultivados en biofloc se observó una reducción de tamaño de los hepatocitos, en los cuales no se observaron depósitos de lípidos (Figura 12 C y D) y el núcleo se ubicó en el centro del hepatocito (Figura 12D). Fue evidente la disminución del área de tejido hepático y el aumento de la proporción del tejido pancreático (Figura 12C).

En los vasos sanguíneos del hígado de los peces de T_{RAS} se observó un predominio de eritrocitos, mientras que los hígados de los organismos cultivados con biofloc, mostraron células con un núcleo teñido intensamente (Figura 12E), lo que podría indicar un aumento de leucocitos en la sangre y una respuesta del sistema inmune.

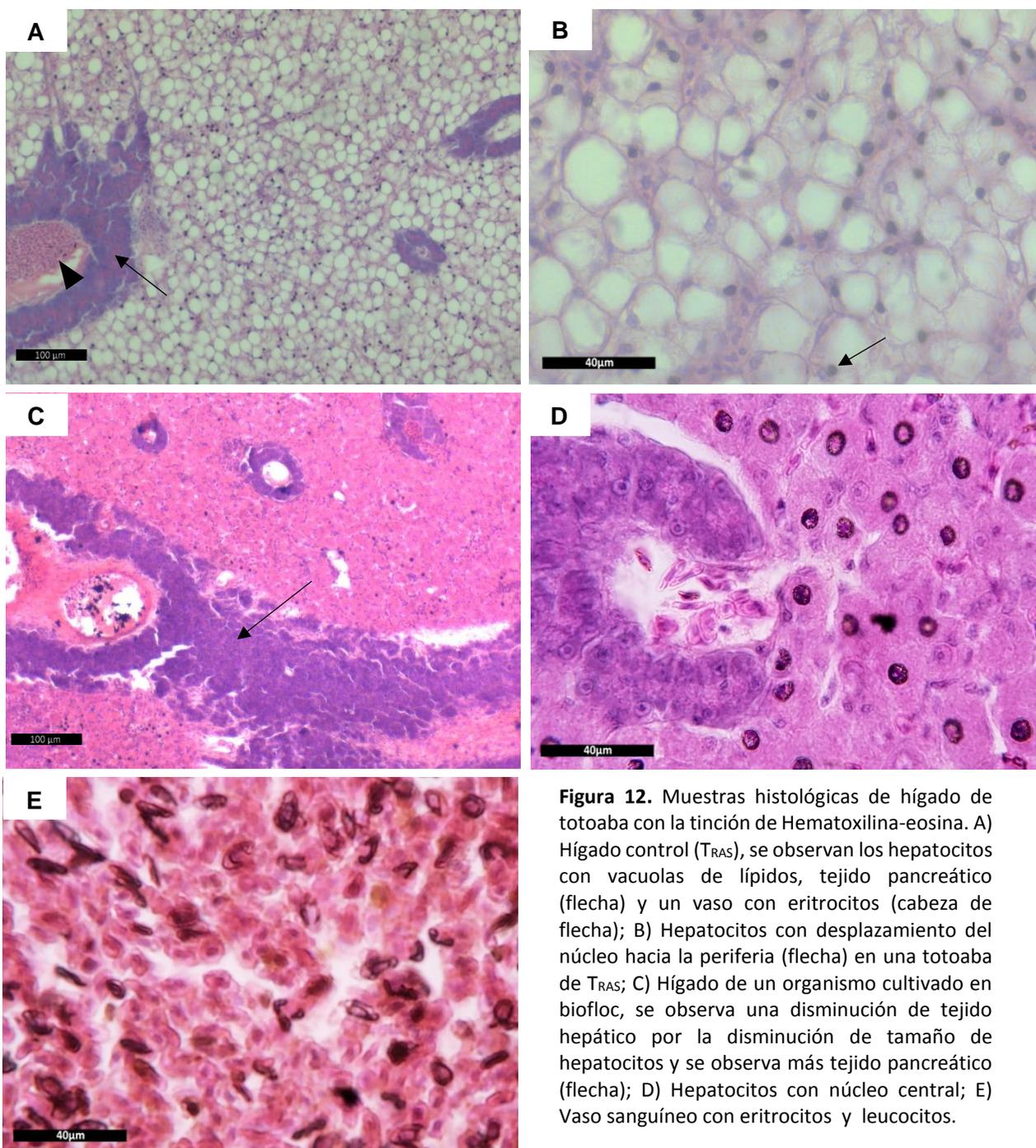


Figura 12. Muestras histológicas de hígado de totoaba con la tinción de Hematoxilina-eosina. A) Hígado control (TRAS), se observan los hepatocitos con vacuolas de lípidos, tejido pancreático (flecha) y un vaso con eritrocitos (cabeza de flecha); B) Hepatocitos con desplazamiento del núcleo hacia la periferia (flecha) en una totoaba de TRAS; C) Hígado de un organismo cultivado en biofloc, se observa una disminución de tejido hepático por la disminución de tamaño de hepatocitos y se observa más tejido pancreático (flecha); D) Hepatocitos con núcleo central; E) Vaso sanguíneo con eritrocitos y leucocitos.

3.4.2. Branquias

3.4.2.1. Análisis en fresco

De manera general, las branquias de las totoabas cultivadas en los tratamientos con biofloc (Figura 13 B, C y D) se encontraban con un mayor grado de alteración en comparación con las branquias de las totoabas

del T_{RAS} (Figura 13 A). Entre las alteraciones más conspicuas en los peces cultivados con biofloc, se observó telangiectasia branquial (Figura 13 B, C y D), filamentos erosionados (ausencia de lamelas) e inclusive de manera visual se apreciaba disminución del tamaño del filamento branquial (Figura 13C).

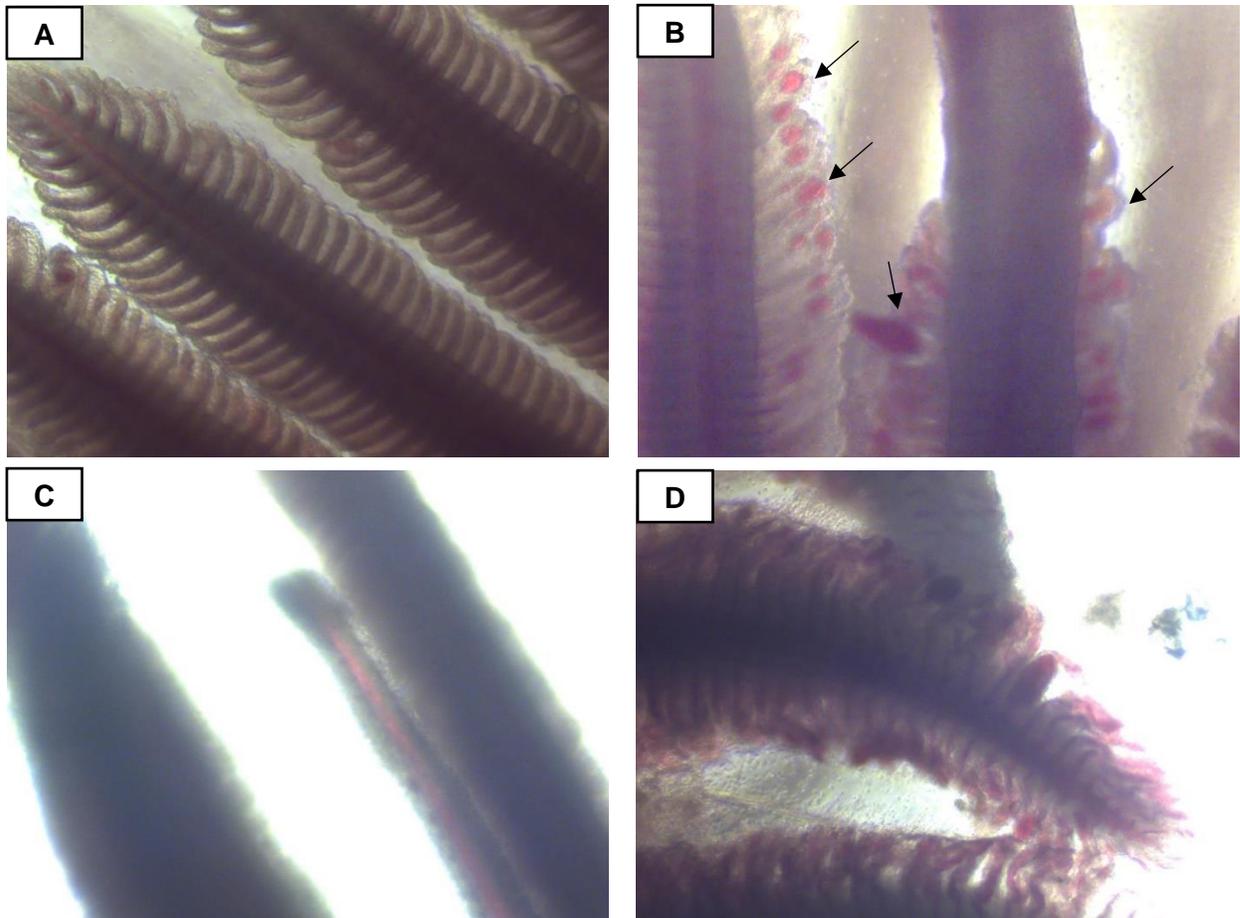


Figura 13. Muestras en fresco de branquias de totoaba observadas en el estereoscopio. A) Branquia sana de un ejemplar del T_{RAS}. B) Telangiectasias en los extremos de las lamelas (flecha) en una branquia en el T₀. C) Filamento branquial de un ejemplar del T₇₅ sin lamelas, con erosión lamelar. D) Branquia con un alto grado de alteraciones, con telangiectasia y lamelas con aparente rompimiento del epitelio de peces del T₂₅.

3.4.2.2. Histología de branquia

En el presente estudio se identificaron 18 tipos diferentes de alteraciones en las branquias de las totoabas, de las cuales 14 fueron alteraciones en la primera etapa y 4 fueron alteraciones de la segunda etapa con base en la clasificación propuesta por Poleksic & Mitrovic-Tutundsic (1994). Las alteraciones más comunes en las muestras fueron: telangiectasia, hipertrofia de las células epiteliales, desprendimiento epitelial, la hiperplasia focal de las células epiteliales en lamelas y la fusión total de las lamelas (Figura 14 B, D, E y H).

En los peces del T_{RAS} se encontraron 7 alteraciones en la primera etapa, siendo telangiectasia la más común. En las branquias analizadas no se encontró tejido cicatricial ni fibrosis.

Utilizando los criterios descritos por Poleksic & Mitrovic-Tutundsic (1994), las branquias analizadas tenían alteraciones leves que posiblemente no comprometía su función. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en este índice de alteraciones, entre el T_{RAS} y los tratamientos con biofloculados (tabla 6). Sin embargo, en los tratamientos con biofloculados, las alteraciones se presentaron con una mayor incidencia a lo largo de toda la branquia, mientras que en los organismos de T_{RAS} el área alterada de la branquia era menor.

Las branquias de los peces del tratamiento T₅₀ que habían muerto se procesaron para histología y se encontraron varias de las alteraciones descritas para los otros tratamientos e incluso se observó necrosis, sin embargo, este tejido puede haberse deteriorado por el tiempo que llevaban los organismos muertos en el tanque por lo que no se consideró para el análisis estadístico. La mortalidad de este tratamiento se atribuye a la proliferación de un parásito del género *Amyloodinium* (Figura 14 I). Este parásito se observó también en el T₀.

Tabla 6. Valores promedio y desviación estándar del índice de alteraciones en las branquias de totoaba cultivada en sistemas de recirculación y con diferentes concentraciones de bioflóculos. En paréntesis se muestra el valor mínimo y máximo.

T _{RAS}	T ₁₀₀	T ₇₅	T ₅₀	T ₂₅	T ₀
6.0±1.0	13.33±6.81	13.33±7.57	SD	10.0±1.0	11.33±1.53
(5.0-7.0)	(8.0-21.0)	(8.0-22.0)		(9.0-11.0)	(10.0-13.0)

SD Sin dato.

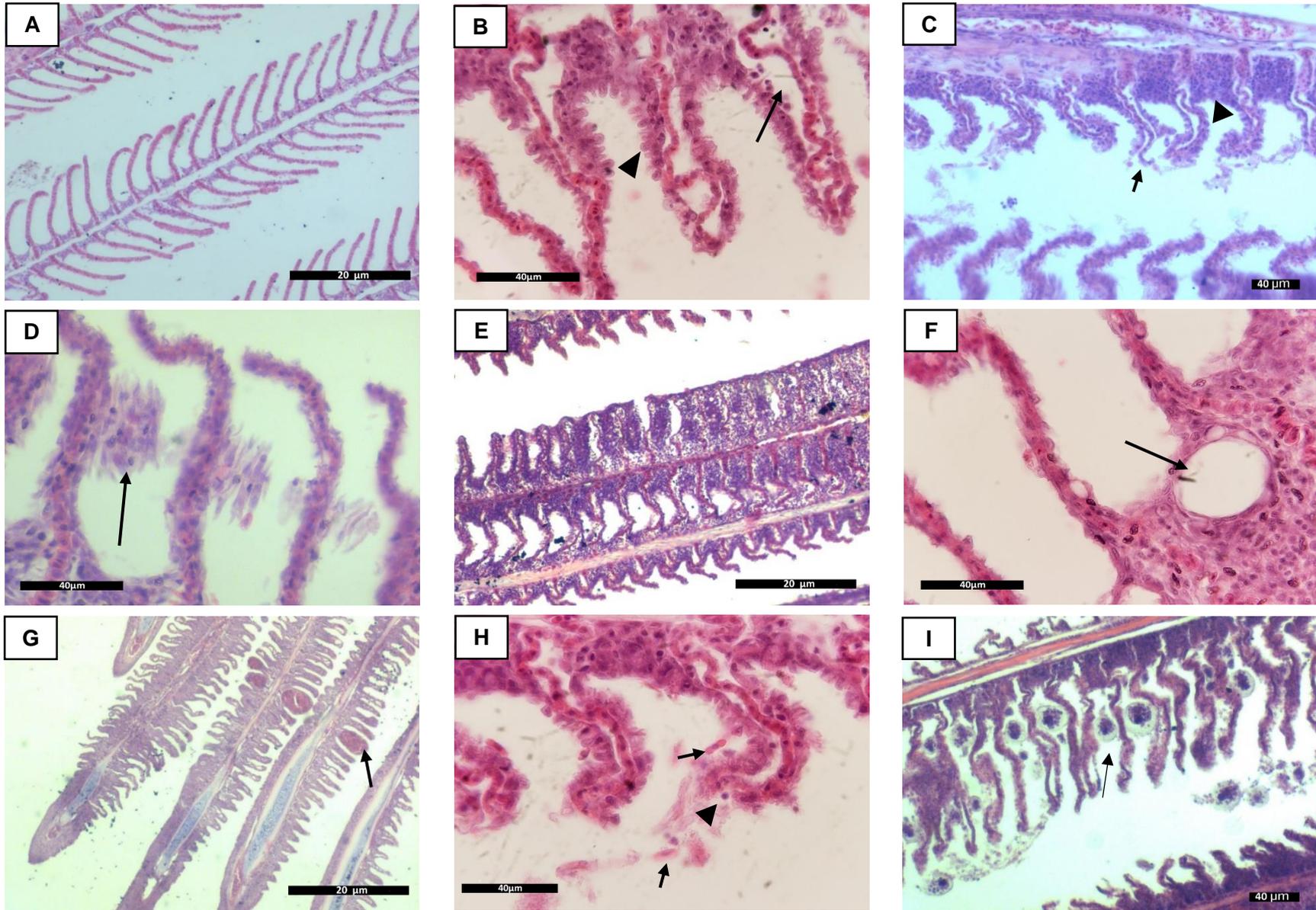


Figura 14. Muestras histológicas de branquia de totoaba con la tinción de Hematoxilina-eosina. A) Branquia sana (T_{RAS}); B) hipertrofia de células epiteliales (cabeza de flecha) y desprendimiento del epitelio respiratorio (flecha); C) ruptura del epitelio lamelar (flecha) e hiperplasia de la base de la mitad de la lamela (cabeza de flecha); D) hiperplasia focal de células epiteliales; E) fusión lamelar y de dos filamentos; F) hipertrofia de célula de cloruro; G) telangiectasia (flecha); H) hemorragia con ruptura del epitelio (cabeza de flecha), eritrocitos (flecha); I) Parásito *Amyloodinium* (flecha) en el T_{50} .

3.5. Crecimiento, supervivencia y FCA

El peso promedio inicial de las totoabas fue de 469.33 ± 66.31 g y durante el cultivo, el cual tuvo una duración de 89 días, los organismos tuvieron un crecimiento dependiente del tratamiento. Los peces del sistema de recirculación (T_{RAS}) tuvieron el mayor peso promedio de 867.58 ± 96.91 g y difiere significativamente ($p < 0.05$) del registrado en los organismos cultivados con Biofloc (Tabla 7).

Entre los tratamientos con Biofloc también se encontraron diferencias ($p < 0.05$) en el peso promedio final de los peces. En el tratamiento con la tasa máxima de recambio (T_{100}) se obtuvo el menor crecimiento (492.70 ± 54.84 g), mientras que entre los tratamientos con biofloc T_{75} , T_{25} y T_0 , no se encontraron diferencias ($p > 0.05$) en el crecimiento de las totoabas, con pesos promedio de 510.75 ± 131.2 , 650.67 ± 44.63 y 586.58 ± 85.43 g respectivamente (Tabla 7).

En la figura 15 se muestra la tendencia del crecimiento en longitud para cada tratamiento, en la cual se observa que T_{RAS} tiene un crecimiento casi exponencial, mientras que los peces de los tratamientos con biofloculados, tuvieron el menor crecimiento durante los 89 días del cultivo comparado con el de recirculación. En el T_{50} se observó que antes de que los organismos murieran (día 74) existió una pérdida de peso que se registró después del día 56.

La mayor biomasa final se registró en el T_{RAS} , con 6.94 ± 0.43 kg/m³, siendo diferente a la obtenida en los tratamientos con biofloc ($p < 0.05$). Para los sistemas con biofloc se registraron biomásas de 3.62 ± 0.56 , 1.87 ± 1.84 , 2.60 ± 0.29 y 4.69 ± 0.29 Kg/m³ para los tratamientos T_{100} , T_{75} , T_{25} y T_0 respectivamente. La biomasa referida está influenciada por la supervivencia en cada tratamiento.

El índice de condición no presentó diferencias entre los tratamientos, aunque parece tener una tendencia en la cual el T_{RAS} es levemente mayor con un índice de 1.49 ± 0.11 , mientras que los tratamientos con biofloc son de 1.33 ± 0.15 , 1.46 ± 0.36 , 1.33 ± 0.12 y 1.34 ± 0.13 para T_{100} , T_{75} , T_{25} y T_0 , respectivamente.

En relación con la supervivencia, se observó que en el tratamiento T_{RAS} y T_0 fue del 100%; en los tratamientos T_{100} y T_{75} se obtuvo una supervivencia del 92 y 33% respectivamente, sin embargo, la mortalidad no se relacionó con el tratamiento, ya que los organismos saltaron fuera del tanque. En el tratamiento T_{50} las totoabas no sobrevivieron, sin embargo, el análisis histológico de sus branquias reveló la presencia de un parásito, que posiblemente contribuyó a la mortalidad de los peces. En T_{25} se registró una supervivencia del 50% (Tabla 7).

El factor de conversión alimenticia para el tratamiento con el sistema de recirculación fue la más baja con un FCA de 1.2, mientras que el índice más elevado fue de 12.1 para el T₁₀₀. En el resto de los tratamientos se tienen FCA de 2.2, 2.1 y 3.2 para los tratamientos de T₇₅, T₂₅ y T₀, respectivamente.

En la tasa de crecimiento específica (TCE), también se encontraron diferencias entre el grupo de tratamientos con biofloculados y el sistema de recirculación, en este último la TCE (0.60 ± 0.06) fue mayor, comparada con los tratamientos con diferentes concentraciones de biofloculados.

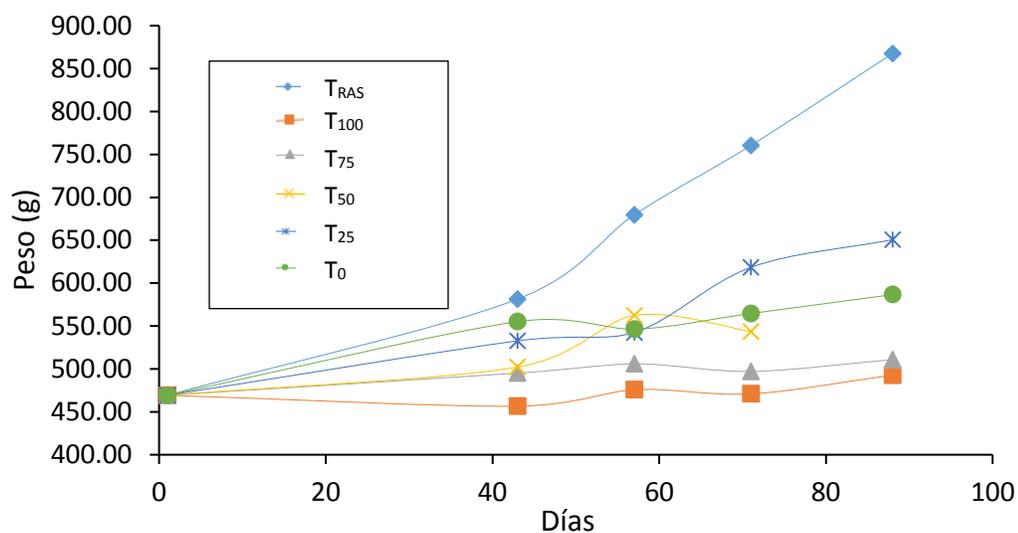


Figura 15. Peso (g) promedio registrado a lo largo del cultivo de totoaba.

Tabla 7. Valores promedio y desviación estándar de peso inicial (Pi), peso final (Pf), biomasa inicial (Bi), biomasa final (Bf), supervivencia, factor de conversión alimenticia (FCA) y tasa de crecimiento específica (TCE) de la totoaba cultivada durante 89 días en RAS y con diferentes concentraciones de biofloculados.

	T_{RAS}	T₁₀₀	T₇₅	T₅₀	T₂₅	T₀
Pi (g)	469.33±66.31	469.33±66.31	469.33±66.31	469.33±66.31	469.33±66.31	469.33±66.31
Pf (g)	867.58±96.91 ^a	492.70±54.84 ^c	510.75±131.2 ^{bc}	ND	650.67±44.63 ^b	586.58±85.43 ^b
Bi (kg/m³)	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75
Bf (kg/m³)	6.94±0.43	3.62±0.56	1.87±1.84	0	2.60±0.29	4.69±0.29
Índice de condición	1.49±0.11	1.33±0.15	1.46±0.36	-	1.33±0.12	1.34±0.13
Supervivencia (%)	100	92*	33**	-	50	100
FCA	1.2 ^a	12.1 ^c	2.2 ^b		2.1 ^b	3.2 ^b
TCE	0.60±0.06 ^a	0.04±0.02 ^c	0.06±0.21 ^{bc}	0.0	0.32±0.22 ^b	0.21±0.06 ^b

ND, No hay dato; mortalidad del 100%

* Un pez saltó del tanque

** Dos peces saltaron del tanque

3.6. Hematocrito

No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de hematocritos entre los diferentes tratamientos ($p > 0.05$). En el T₂₅ se presentó una mayor desviación estándar (Figura 16). Los valores de hematocrito tuvieron un promedio de $28.87 \pm 2.57\%$ en todos los tratamientos, con un mínimo y máximo de 24.6 y 35.0% para T_{RAS}; 24.1 y 33.2% para T₁₀₀; 27.0 y 29.8% para T₇₅; 25.0 y 33.5% para T₂₅; y 25.5 y 34.0% para T₀.

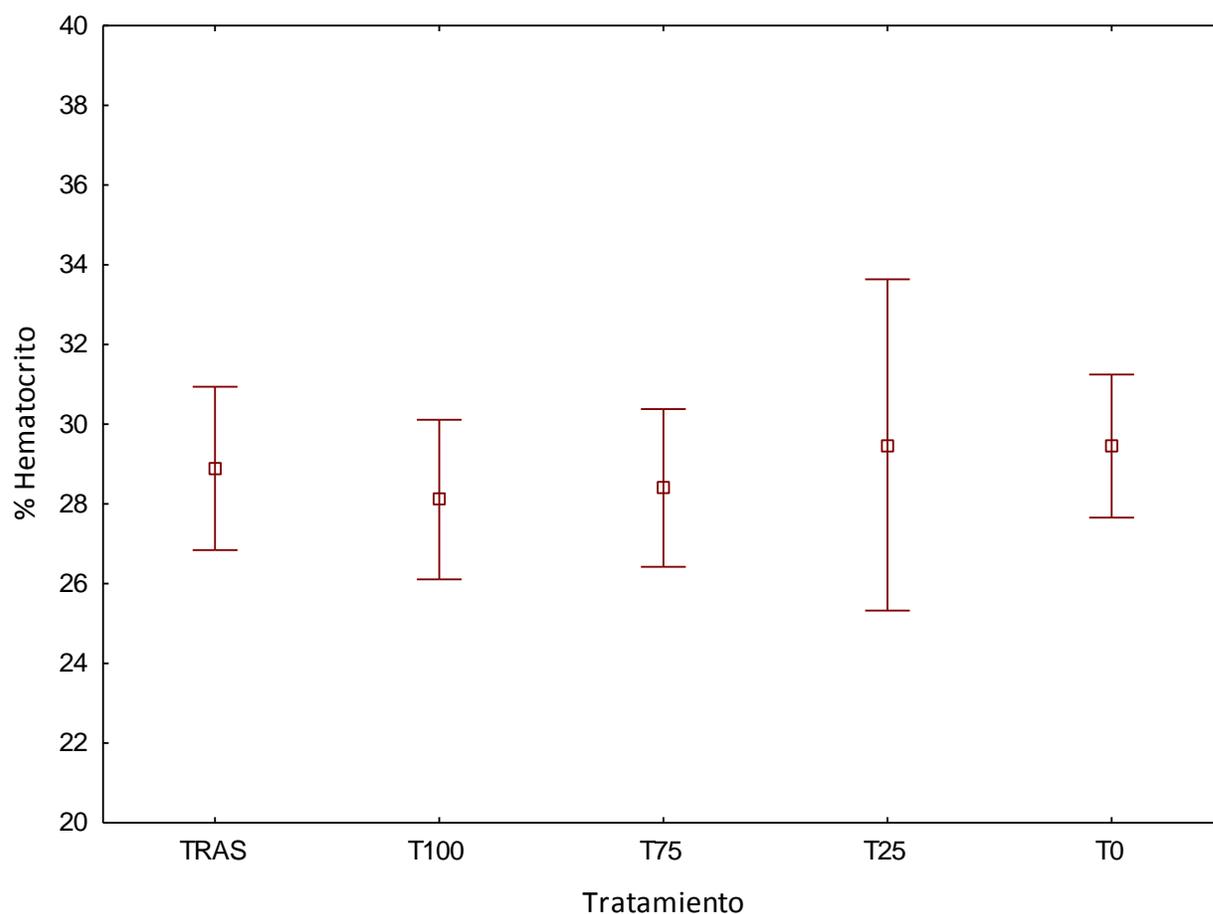


Figura 16. Porcentaje de hematocrito registrado en el último día de cultivo de totoaba. Media \pm desviación estándar.

Capítulo 4. Discusión

Las prácticas de la acuicultura, en forma particular el cultivo de camarones, han ocasionado daños al ambiente, por lo que en la década de los 70s se planteó el uso del sistema “biofloc” (BFT término en inglés) como una de las alternativas para mitigar estos efectos y además optimizar la producción (Avnimelech, 2009). La tecnología de biofloc ofrece varios beneficios como la disminución del uso de agua así como la mejora de la calidad del agua, debido a la incorporación del nitrógeno como proteína en los flóculos bacterianos (Avnimelech, 2009; Crab et al., 2012).

Un requisito indispensable para el éxito en el uso del biofloc es la aireación profusa, por una parte para mantener en suspensión la materia orgánica que se encuentra en el medio de cultivo, y por la otra para propiciar un porcentaje de saturación de oxígeno adecuado para los organismos cultivados. En los trabajos realizados con BFT, es común encontrar que hay concentraciones de oxígeno menores que el valor de saturación, debido en parte a la alta demanda metabólica de los microorganismos que se desarrollan en estos sistemas. En los tratamientos con biofloc donde se realizó el cultivo de totoaba, como era de esperar, se observó que la concentración de oxígeno fue menor (4.84 a 5.04 mg/L) comparada con el T_{RAS} (5.45 mg/L). Esta misma tendencia se observó en el trabajo de Emerenciano *et al.* (2012) quienes observaron que los valores de oxígeno disuelto fueron más bajos en los tratamientos con BFT ($5.9 \pm 1.0 \text{ mg L}^{-1}$), que en un sistema RAS ($7.1 \pm 0.9 \text{ mg L}^{-1}$).

En cuanto al pH en los tratamientos con biofloc, también se observó que el valor de este parámetro fue menor con valores entre 7.68 a 7.78, mientras que en el sistema de recirculación el pH fue de 7.97. Emerenciano *et al.* (2012) observaron que el valor de pH fue menor en los tratamientos con BFT (6.5), que en un sistema RAS (8.3). Esta disminución en el valor de pH en los sistemas con BFT se debe probablemente a las altas tasas de respiración por la gran cantidad de microorganismos presente en estos sistemas, que propician el incremento en la concentración de dióxido de carbono.

Los sistemas con BFT donde se realizó el cultivo de totoaba tuvieron un menor recambio de agua, comparado con los T_{RAS} , debido al retrolavado de los filtros, que sumado a la evaporación, propició el aumento de la salinidad durante el experimento, lo que también concuerda con lo reportado por Emerenciano *et al.* (2012), quien de la misma manera repuso el agua por pérdida por la remoción de lodo y por evaporación.

En relación con la alcalinidad, se encontraron diferencias entre los tratamientos T_{RAS} y BFT, lo cual se explica según Ebeling *et al.* (2006), a que el consumo de alcalinidad por las bacterias autótrofas (nitrificantes) es mayor (7.05 g Alk/g N) comparado con las bacterias heterótrofas (3.57 g Alk/g N), razón por la cual en el T_{RAS} la alcalinidad fue menor (107.21 ppm $CaCO_3$). Sin embargo, durante el cultivo, en todos los tratamientos la concentración de la alcalinidad no fue menor a 100 ppm $CaCO_3$, es posible que el recambio diario de agua ($\approx 10\%$) fuera suficiente para mantener la concentración de carbonatos, considerando que la alcalinidad del medio marino es de 110 a 125 ppm de $CaCO_3$.

La temperatura promedio de los tratamientos se mantuvo entre los 23.85 y 25.74 °C. Talamás (2001) menciona que la temperatura óptima de cultivo de totoaba es de 24 °C, lo cual se mantuvo dentro de lo recomendado para el cultivo de juveniles de totoaba.

La tecnología de biofloc ofrece varios beneficios como la disminución del uso de agua así como la mejora de la calidad del agua, debido a la incorporación del nitrógeno amoniacal en las proteínas bacterianas, este proceso se traduce en el crecimiento bacteriano, lo que lleva a la formación de los flóculos (Crab *et al.*, 2012). La eliminación de los desechos nitrogenados en este tipo de sistema de cultivo ha sido demostrada en varios estudios (Avnimelech, 1999; Browdy *et al.*, 2012). En la presente investigación, el análisis de la dinámica de la concentración del nitrógeno amoniacal total en los tanques de cultivo con biofloc se dividió en dos etapas, para poderlo comparar con la capacidad del sistema RAS de reducir la concentración de NAT. La maduración del biofiltro del T_{RAS} fue de aproximadamente siete semanas, tiempo que tardó en que en el sistema el NAT se mantuviera en concentraciones menores a 1 mg/L. Avnimelech (2015), menciona que el desarrollo de la actividad nitrificante es un proceso que toma varias semanas, en este lapso, las bacterias quimioautótrofas se adhieren al sustrato utilizado en el biofiltro, que en forma común consiste de partículas de polietileno o de arena de sílice. Timmons *et al.* (2002), mencionan que la concentración máxima de amoníaco en un cultivo sucede aproximadamente al día 14, posteriormente disminuye y se da la concentración máxima de los nitritos una vez pasado los 28 días y después se da la acumulación de nitratos. Es importante considerar el papel que tiene la temperatura en la concentración y actividad de las bacterias nitrificantes en el biofiltro, debido a que en temperaturas de 28-29°C alcanzan su máxima capacidad (Fernández-Polanco, 1994). Si bien, el promedio de la temperatura en este trabajo fue de $\approx 24.6^\circ C$, se alcanzaron temperaturas mínimas de 20.1°C, debido a que parte del estudio se llevó a cabo en la temporada de invierno, lo cual pudo incrementar el periodo de maduración del biofiltro. En el sistema con biofloculados las concentraciones de NAT se mantuvieron bajas (0 a 0.90 mg/L) durante el cultivo de totoaba, a excepción de T_0 a finales del cultivo. Avnimelech (2015), menciona que la reducción del nitrógeno por parte de las bacterias heterótrofas es relativamente rápido, para lo cual realizó una

demostración añadiendo azúcar como fuente de carbono (C:N de 20:1) en un tanque que contenía una concentración de 7 mg/l de NAT, después de aproximadamente 3 horas la concentración se redujo a 1 mg/L de NAT.

En el cultivo de totoaba con el RAS, después de la semana siete, se mantuvieron las concentraciones de NAT por debajo de 1 mg/L, al igual que en los tratamientos con floculados que tenían flujo (filtración mecánica). Sin embargo, el T₀ (sin flujo y sin filtración mecánica) tenía concentraciones > 1 mg/L de NAT. En este último tratamiento se encontraron flóculos más densos, posiblemente porque estos flóculos no estaban sometidos a la erosión ocasionada por el filtro mecánico. De Schryver *et al.* (2008), mencionan que las bacterias forman flóculos como una estrategia para propiciar una mayor absorción de nutrientes, ya que al crear una estructura interna altamente porosa, aumentan su permeabilidad, para permitir que el flujo de agua, nutrientes y gases pase a través de los poros, ya que el agua tiende a seguir el camino de menor resistencia. De lo contrario, como sucedió en este tratamiento (T₀), Liu y Tay (2002) mencionan que un flóculo más compacto y denso estaría inversamente relacionado con la difusividad de una sustancia, lo cual disminuye la absorción del nitrógeno por parte de los flóculos. Esta característica del flóculo, en el tratamiento T₀, puede ser discutida desde varios puntos de vista: el primero, como lo mencionan De Schryver *et al.* (2008), depende de la unión de las bacterias en flóculos, ya que su congregación es promovida por el estrés que provoca la depredación, ya que al congregarse son menos susceptibles al pastoreo. En el T₀ se observó la mayor biodiversidad de microorganismos (copépodos, nematodos, protozoarios, entre otros) por lo que el grado de compactación de los flóculos pudo ser una respuesta a la presencia de estos depredadores de bacterias. Liu y Tay (2002) mencionan que la fuerza de corte (shear force, en inglés) del agua, ocasionada por el movimiento de las burbujas en la columna de agua emitidas por las piedras difusoras, puede influenciar en las características de los floculados, es decir, una fuerza de corte alta formara gránulos aeróbicos lisos y densos. Si bien, todos los tratamientos del cultivo totoaba, estuvieron expuestos a la misma fuerza de corte ocasionada por la aireación, estos flóculos densos y lisos solo se presentaron en el T₀ debido a que no fueron erosionados por el filtro mecánico.

El exceso de sólidos suspendidos totales (SST) en un cultivo ocasiona impactos negativos en la calidad del agua, debido a la producción extrema de biomasa bacteriana producida por las bacterias heterótrofas, en comparación con las bacterias autótrofas (Ebeling *et al.*, 2006). En el presente trabajo los SST aumentaron gradualmente tanto en el tratamiento en RAS como en los BFT, en el primero como resultado de la proliferación continua de microalgas, mientras que en el BFT fue el resultado de la concentración de flóculos no filtrables, que se originaron por el crecimiento bacteriano, gracias a la disponibilidad de nutrientes producidos por los desechos de los peces (nitrógeno amoniacal) y del carbono resultante de la

adición continua de azúcar. La máxima concentración de SST fue de 5.36 g/L^{-1} al final del experimento y no es diferente del T_{RAS} . De manera general, los SST suelen ser diferentes del sistema BFT con respecto a RAS. Abduljabbar *et al.* (2015), realizaron un estudio con Tilapia, en el cual observaron diferencias en las concentraciones de SST en BFT comparado con el control (RAS), en el cual la diferencia se puede deber en parte a la producción bacteriana del sistema biofloc y al recambio de agua que se realizó en el tratamiento control ($\approx 20\%$). Las concentraciones de SST que estos autores obtuvieron fueron de 0.33 ± 0.01^a y $0.35 \pm 0.007^b \text{ m/L}^{-1}$, para el cultivo de tilapia en RAS y BFT, respectivamente. De manera similar, Xue Du *et al.* (2018), quienes realizaron un cultivo con carpas, también observaron diferencias en las concentraciones de SST entre un sistema BFT y un control, en el cual no agregaron un sustrato de carbono. En la presente investigación se registraron concentraciones extremas de SST (concentración máxima de 5.36 g/L^{-1}) debido en parte a que la totoaba no consumía directamente los flóculos, además de que el filtro mecánico utilizado en este trabajo no cumplió con su función de retirar los flóculos del sistema. Por el contrario, el filtro erosionaba los flóculos y estos regresaban al tanque de cultivo incrementando la concentración de sólidos y reduciendo significativamente la transparencia. Los SST se mantuvieron muy por encima de los valores recomendados por Hargreaves (2013), quien menciona que concentraciones de 200 a 500 mg/L son suficientes para un buen funcionamiento del sistema, sin tener gran demanda bacteriana de oxígeno en el tanque. El control de SST en los tanques es de gran importancia, debido a que está estrechamente relacionado con el control de oxígeno disuelto y los desechos nitrogenados (Abduljabbar *et al.*, 2015). Avnimelech (2012), recomienda concentraciones entre 200 y 400 mg/L^{-1} para el cultivo de tilapia. Sin embargo Poli *et al.* (2015), mencionan que no existen registradas concentraciones óptimas para el crecimiento en peces, lo cual resulta evidente si se considera la diversidad de especies, hábitats y hábitos de los peces.

Las diferentes características que tomaron los flóculos en los tratamientos dependieron de interacciones físicas, químicas y biológicas (Lara *et al.*, 2017). En este trabajo con totoaba, los factores que más influyeron en el caso de los tratamientos con filtración fueron los físicos, debido a la fricción ocasionada por el filtro; y en el tratamiento sin filtración, la turbulencia o fuerza de corte (shearing force), ocasionada por la aireación tuvo una mayor influencia. Estas alteraciones en los flóculos influyeron en la lectura de la medida volumétrica del biofloc. En T_0 se observaron flóculos más grandes y densos (gránulos) y por ende con una tasa de sedimentación mayor, esta característica de los flóculos se asoció con la falta de interacción de los flóculos con el filtro mecánico. Posteriormente, en T_{25} , se observó que los flóculos eran muy esponjosos y ocupaban la totalidad de volumen en el cono Imhoff, sin embargo, se registró materia sedimentada, la cual presentaba características similares a los gránulos observados en T_0 . Esto puede ser

una consecuencia de la tasa de filtración, que no era suficiente para que los flóculos se filtraran en su totalidad y se formaran con estas características, registrando un promedio de 3.64 ml L^{-1} del volumen del cono Imhoff. En T_{50} , posiblemente la tasa de circulación era lo suficientemente alta para evitar que los flóculos formaran gránulos, sin embargo se observaron flóculos muy esponjosos, con un volumen promedio de 375 ml L^{-1} . Mientras que en los tratamientos con biofloculados con flujo alto (T_{100} y T_{75}) y el T_{RAS} , no se observaron sólidos sedimentables. Es probable que, en T_{100} y T_{75} , esta ausencia aparente se debiera al efecto erosivo del filtro mecánico sobre los flóculos, mientras que T_{RAS} las microalgas de tamaño muy pequeño se mantuvieron en suspensión durante el periodo de lectura de los conos Imhoff.

La alta turbiedad es una característica de un sistema con biofloc, la transparencia (8.81 a 13.47 cm) registrada en este trabajo, fue inferior a la reportada por Khanjani *et al.* (2017) y Espírito Santo *et al.* (2017), las cuales fueron de $\approx 15 \text{ cm}$ y 16 cm , respectivamente. Esto se pudo deber a la cantidad de SST que se manejaron en el sistema, con 200 mg L^{-1} , en ambos trabajos.

La turbidez en el agua pudo afectar la visión de la totoaba y su capacidad para capturar el alimento suministrado durante el cultivo. La baja tasa de consumo de alimento en los tratamientos con biofloc tuvo una repercusión en el crecimiento y en el índice hepatosomático (IH). Los peces almacenan glucógeno o lípidos como fuente de energía en el hígado, la cual después de un tiempo prolongado de ayuno o inanición, utilizan como fuente de energía, lo cual puede producir un agotamiento del contenido de reservas en este órgano (Enes, 2008). Los estudios de cultivo de peces con biofloc se han hecho con especies de hábitos omnívoros, que aprovechan los flóculos como alimento directamente, por esta razón, las medidas del IH en los trabajos realizados por Ekasari *et al.* (2013), Ekasari *et al.* (2016) y Bakhshi *et al.* (2018), en Tilapia, Bagre y Carpa, respectivamente, no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos con biofloculados y el control (sin biofloc). En el presente estudio, se observó un efecto en el IH entre T_{RAS} y los tratamientos con biofloc, con un mayor valor del índice en las totoabas del T_{RAS} (0.83) con respecto a las cultivadas en biofloc (0.65). La diferencia entre los tamaños del hígado mostrados en la figura 13 es muy evidente, sin embargo, esta gran diferencia no se ve reflejada en el IH debido a que en la fórmula para obtener el IH se toma en cuenta el peso de los organismos, y en el caso de los peces que se encontraban en los tratamientos con biofloc, el peso era menor (493.55 g, en T_{100}) comparado con el de las totoabas cultivadas en el T_{RAS} (867.58 g).

El efecto de los sólidos suspendidos totales (SST) sobre los peces se ve reflejado en sus branquias. Este órgano se encuentra expuesto directamente al medio de cultivo y su constitución histológica los hace muy susceptibles a diferentes agentes estresores, ya sean químicos (pesticidas, metales pesados; Ruiz-Picos y

López-López, 2012) o mecánicos (sólidos suspendidos; Au *et al.*, 2004). Azim y Little (2008) observaron que en un cultivo de tilapia con biofloc con concentraciones mayores a 500 mg L⁻¹ de SST, las branquias presentaban engrosamiento en los extremos distales de algunos filamentos, con telangiectasias en las lamelas; al igual que en el presente trabajo, donde las totoabas cultivadas en todos los tratamientos presentaron estas alteraciones en sus branquias. Au *et al.* (2004), describieron que cuando el mero (*Epinephelus coioides*) se expone a concentraciones >50 mg L⁻¹ se produce un agrandamiento de los vasos sanguíneos en las lamelas branquiales. En totoaba, se observó un proceso similar, en el que las células pilares se rompieron, aumentando el espacio vascular, que provocó telangiectasia. También se demostró que cuando el mero se exponía a concentraciones >200 mg L⁻¹ de SST existía desprendimiento del epitelio branquial y que con concentraciones >2000 mg L⁻¹ de SST, las células de cloruro, las cuales se encuentran en la región basal de las lamelas, se incrementaron en número (Au *et al.*, 2004). En este trabajo con totoaba las concentraciones de SST superaban los 2000 mg L⁻¹ y se observaron alteraciones del epitelio (Figura 14B) y de las células de cloruro. Bash *et al.* (2001) hicieron una recopilación de la información publicada sobre el efecto de los SST en branquias de salmónidos y observaron la concentración letal media (LC50) a concentraciones >3000 mg L⁻¹. Estos autores mencionan que como resultado de la continua irritación de las branquias, ocasionada por los SST, los peces producen mucus para proteger la superficie branquial, situación que también se observó en las totoabas cuando se realizaban las biometrías quincenalmente.

Con base en el índice de alteraciones propuesto por Poleksic y Mitrovic-Tutundzic (2011) se observó que la mayoría de los cambios branquiales encontrados en el cultivo de totoaba se encuentran en la primera y segunda etapa de su clasificación (Tabla 2). Los autores indican que las alteraciones en estas etapas involucran un daño menor en los tejidos branquiales, de manera que con una mejoría en las condiciones ambientales, se puede regenerar la estructura y función normal de las branquias. Santos *et al.* (2014) utilizaron los cambios histológicos de branquias de dos especies de peces dulceacuícolas como indicadores de la calidad de agua en un lago de Brasil. Estos autores observaron que las alteraciones en las branquias, causadas por contaminantes xenobióticos no específicos presentes en el lago, se encontraban en la primera y segunda etapa de la clasificación de Poleksic y Mitrovic-Tutundzic (2011). Los autores también concluyeron que dependiendo de la intensidad, estas lesiones pueden ser reversibles cuando cesa la presencia del xenobiótico.

Los SST en la columna de agua también afectó el crecimiento de la totoaba. Utne-Palm (2002) menciona que las partículas suspendidas entre el predador y la presa dispersan la luz e interfieren con la detección de la misma, lo cual explica que la ingesta de alimento haya sido menor en los tratamientos con biofloc. También, el estrés generado por las concentraciones elevadas de SST puede reducir la capacidad de los

peces para realizar funciones básicas, como alimentarse, intercambiar gases y resistir enfermedades, lo que puede afectar el crecimiento (Redding *et al.*, 1987). En el cultivo de totoaba, el crecimiento fue mayor en T_{RAS} comparado con los sistemas BFT. El peso promedio final de las totoabas cultivadas en T_{RAS} fue de 867.58 ± 96.91 g, mientras que en los sistemas con biofloc, por ejemplo en T_{100} , el peso promedio final fue de 492.70 ± 54.84 g. En contraste, Azim y Little (2008) y Najdegerami *et al.* (2016) reportan que los peces cultivados en biofloc tuvieron un mayor crecimiento. Es posible que debido a que los organismos cultivados, tilapia y carpa respectivamente, aprovechan el biofloc incluyéndolo como parte de su dieta, tuvieron una aportación de proteína bacteriana y probióticos que propiciaron a una mayor digestibilidad y asimilación de nutrientes del alimento consumido. Zhang *et al.* (2018), realizaron un estudio con carpa (*Carassius gibelio*) a diferentes concentraciones de SST (0, 300, 600, 800 y 1000 mg L⁻¹), y observaron que el cultivo en biofloc beneficia a este pez, debido a la incorporación de la proteína bacteriana, lo que se tradujo en un mayor crecimiento conforme la concentración de SST se incrementó, hasta alcanzar su mayor crecimiento en concentraciones de 800 mg L⁻¹, sin embargo, la TCE disminuyó en los peces expuestos a concentraciones de SST mayores de 1,000 mg L⁻¹. Los autores atribuyeron esta disminución en la TCE al estrés que el biofloc podría estar causando a los peces, debido a que las branquias fueron parcialmente obstruidas con los sólidos suspendidos.

El factor de condición (FC) de las totoabas no indicó diferencias entre los tratamientos, por lo que se podría concluir que las totoabas se muestran sanas en T_{RAS} y en los Tratamientos con biofloc. Sin embargo, si se consideran las características del hígado y la observación de las totoabas de los tratamientos con biofloculados, que mostraban una reducción de la musculatura, se puede concluir que los resultados de este factor podría llevar a una conclusión errónea. Chaverra *et al.* (2017) realizó un estudio con cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) en biofloc, en el cual calculó un factor de condición de ≈ 5 . Estos autores comparan el valor reportado por Brú-Cordero *et al.* (2017) para la misma especie, quien obtuvo un factor de condición de ≈ 2 , ambos autores concluyeron que los peces tenían buen estado físico. Chaverra *et al.* (2017) explica que esta diferencia en el factor de condición se debe a la diferencia del peso de los peces. Este último autor trabajó con organismos de 70 g, mientras que Brú-Cordero *et al.*, (2017) lo hicieron con organismos de 200 g. En el cultivo de totoaba en T_{RAS} , el peso final de los organismos alcanzó un promedio de 867.58 ± 96.91 g y una longitud de 38.8 ± 1.59 cm, mientras que en T_{100} los organismos tuvieron un peso promedio final de 492.70 ± 54.84 g y una longitud de 33.4 ± 1.75 cm, así, la diferencia de pesos y tallas entre T_{RAS} y los tratamientos con biofloc, pudo haber sido influido en los valores del FC enmascarando la diferencia en estado de salud observado en el hígado y las branquias.

En la evaluación del estado de salud de los peces también se utilizan los parámetros sanguíneos. Estos parámetros son relativamente fáciles de analizar y requieren de un nivel de intervención moderado, que permite que los peces se recuperen del estrés que la extracción de la sangre les produce. El hematocrito es un indicador útil para evaluar el estado de salud de los peces (Kim *et al.*, 2018), aunque varía de acuerdo a la especie, ya que está relacionado con el hábitat y con el metabolismo (Bastardo y Barberán, 2004). En el presente trabajo, el hematocrito de totoaba no fue afectado por los diferentes tratamientos y tuvo un intervalo de 28.11 a 29.48%. Resultados similares fueron obtenidos por Azim y Little (2008) en tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) cultivada con biofloc y en un sistema de recirculación como control. Los autores observaron que no había diferencias significativas y el valor promedio del hematocrito fue 27%. En el lenguado (*Paralichthys olivaceus*) cultivado en ambos sistemas (RAS y BFT) también se evaluó el hematocrito ($\approx 42\%$) y tampoco se encontraron diferencias entre tratamientos (Kim *et al.*, 2018). Sin embargo, en el presente estudio, al comparar los organismos cultivados con BFT, se observó un daño importante en las branquias y un cambio en las características del hígado en comparación con las características normales de los peces cultivados en un RAS, por lo que no se puede asumir que el estado de salud de las totoabas era bueno. Es posible que el hematocrito no sea un buen indicador del estado de salud cuando se estudian los efectos del biofloc en el desempeño de esta especie, ya que al no encontrar diferencias entre los tratamientos posiblemente este parámetro refleje una respuesta compensatoria por parte de los peces; esta conclusión podría aplicarse a las otras especies estudiadas. Es posible que otros parámetros de la sangre, como la concentración de aspartato y alanina aminotransferasas o el análisis diferencial de leucocitos, entre otros, aporten un diagnóstico más adecuado del estado de salud de los peces en este tipo de estudios.

Capítulo 5. Conclusiones

- El biofloc mejora la calidad de agua al mantener un mejor y más rápido control de los desechos nitrogenados, en comparación con el RAS, donde el biofiltro maduró hasta la semana 7 de cultivo.
- El peso de las totoabas en los sistemas con biofloc fue menor, en parte debido al bajo consumo de alimento ocasionado por la poca visibilidad en el tanque y también por el estrés ocasionado por las altas concentraciones de sólidos suspendidos.
- El índice hepatosomático de las totoabas cultivadas en los tratamientos con biofloc fue menor, causado por la baja tasa de consumo de alimento, lo que propició el uso de sus reservas energéticas.
- De acuerdo con el índice de daño branquial (Poleksic y Mitrovic-Tutundzic, 1994) en las totoabas cultivadas, las alteraciones en el tejido branquial se pueden revertir si las condiciones de cultivo se mejoran.
- La BFT podría ser una tecnología viable para el cultivo de esta especie, sin embargo se debe seguir investigando con un enfoque en el control de la concentración de SST para disminuir la turbidez. De la misma manera, una vez controlado esta variable, se podrían realizar estudios que comprueben si las ventajas que otorgan los biofloculados se reflejan en el desempeño de la totoaba, como aumento de la asimilación de nutrientes y la estimulación del sistema inmunológico.

Literatura citada

- Abduljabbar, Nour, A., Srour, M., Fayed, W. y Mansour, A. 2015. Intensive Nile Tilapia (*Oreochromis Niloticus*) Production Under Biofloc Technology Systems. *Global Journal of Fisheries and Aquaculture Researches*. 2, 64-80.
- Ahmad, I., Babitha Rani, A. M., Verma, A. K., Maqsood, M. 2017. Biofloc technology: an emerging avenue in aquatic animal healthcare and nutrition. *Aquaculture International*, 25(3), 1215–1226. <https://doi.org/10.1007/s10499-016-0108-8>
- APHA, AWWA y WEF. 1995. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. P. Amer. & H. Assoc., Eds. (10th ed.). Washington D.C.
- Arvizu, J., Chávez, H. 1972. Sinopsis sobre la biología de la totoaba, (*Cynoscion macdonaldi*) Gilbert, 1890. *FAO Fisheries Synopsis*, 108.(I).
- Au, D. W. T., Pollino, C. A., Wu, R. S. S., Shin, P. K. S., Lau, S. T. F., Tang, J. Y. M. 2004. Chronic effects of suspended solids on gill structure, osmoregulation, growth, and triiodothyronine in juvenile green grouper *Epinephelus coioides*. *Marine Ecology Progress Series*, 266(7), 255–264. <https://doi.org/10.3354/meps266255>
- Avnimelech, Y. 1999. Carbon:nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture*, 176(2), 227–235. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00085-X](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00085-X)
- Avnimelech, Y. 2006. Bio-filters: The need for an new comprehensive approach. *Aquacultural Engineering*, 34(3), 172–178. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2005.04.001>
- Avnimelech, Y. 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. *Aquaculture*, 17(2), 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.11.025>
- Avnimelech, Y. 2009. Biofloc Technology – A Practical Guide Book. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United States.
- Avnimelech, Y. 2012. Biofloc Technology – A Practical Guide Book. 2nd Edition. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United States.
- Avnimelech, Y. 2015. Biofloc Technology – A Practical Guide Book. 3rd Edition. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United States.
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J., Gray, J., Meyer-Reil, L., Thingstad, F. 1983. The Ecological Role of Water-Column Microbes in the Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 10(1), 257–263. <https://doi.org/10.3354/meps010257>

- 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.06.036>
- Bakhshi, F., Najdegerami, E.H., Manaffar, R., Tokmechi, A., Farah K.R. y Jalali A.S. 2018 Growth performance, haematology, antioxidant status, immune response and histology of common carp (*Cyprinus carpio* L.) fed biofloc grown on different carbon sources. *Aquac Res.* 49, 393-403. <https://doi.org/10.1111/are.13469>
- Bash, J., Berman, C. H., y Bolton, S. 2001. Effects of turbidity and suspended solids on salmonids. University of Washington Water Center.
- Bastardo, A. y Díaz. R. 2004. Parámetros hematológicos de la paragua, *Chaetodipterus faber* (Broussonet) (Pices: Ehippidae), en condiciones de cultivo. *Zootecnia Trop.* 22 (4): 361-370.
- Bilotta, G. S., Brazier, R. E. 2008. Understanding the influence of suspended solids on water quality and aquatic biota. *Water Research*, 42(12), 2849-2861. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.03.018>
- Bregnballe, J. 2015. A Guide to Recirculation Aquaculture: An Introduction to the New Environmentally Friendly and Highly Productive Closed Fish Farming Systems. FAO. 45-71
- Browdy, C. L., Ray, A. J., Leffler, J. W., y Avnimelech, Y. 2012. Biofloc-based Aquaculture Systems. *Aquaculture Production Systems*, 278-307.
- Brú-Cordero, S. B., Pertúz-Buevas, V., Ayazo-Genes, J., Atencio-García, V. J., Pardo-Carrasco, S. 2017. Bicultivo de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) y tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) en biofloc alimentadas con dietas de origen vegetal. *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria Y de Zootecnia*, 64(1), 44-60. <https://doi.org/10.15446/rfmvz.v64n1.65824>
- Brú-Cordero, S. B. 2016. Cultivo en suspensión activa (Bioflocs): una alternativa para la piscicultura urbana, 79. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/54396/>
- Cannon, R. 1966. The Sea of Cortez. Lane Magazine and Book Company. Menlo Park, California, 68-69.
- Chaverra, S., García, J., Pardo, S. 2017. Efectos del biofloc sobre los parámetros de crecimiento de juveniles de cachama blanca *Piaractus brachypomus*. CES Medicina Veterinaria y Zootecnia, Norteamérica.
- Cienfuegos, K., Monroy, M., Del Carmen, M., Mejía, J., Becerril, D., Cienfuegos, M., Monroy, K., Dosta, M. y Partida, A. 2017. Probiotics used in Biofloc system for fish and crustacean culture: A review. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*. 5.
- Collazos-Lasso, L. F., Arias-Castellanos, J. A. 2015. Fundamentos de la tecnología biofloc (BFT). Una alternativa para la piscicultura en Colombia. Una revisión. *Orinoquia*, 19(1), 77-86.

- Crab, R., Avnimelech, Y., Defoirdt, T., Bossier, P., Verstraete, W. 2007. Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture*, 270(1–4), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.05.006>
- Crab, R., Chielens, B., Wille, M., Bossier, P., Verstraete, W. 2010. The effect of different carbon sources on the nutritional value of bioflocs, a feed for *Macrobrachium rosenbergii* postlarvae. *Aquaculture Research*, 41(4), 559–567. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02353.x>
- Crab, R., Defoirdt, T., Bossier, P., Verstraete, W. 2012. Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges. *Aquaculture*, 356–357, 351–356. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.04.046>
- De Anda-Montañez, J. A., García de León, F. J., Zenteno-Savín, T. Balart-Paez, E., Méndez-Rodríguez, L. C., Bocanegra-Castillo, N. Martínez-Aguilar, S., Campos-Dávila, L., Román Rodríguez, M. J., Valenzuela-Quiñonez, F., Rodríguez-Jaramillo, M. E., Meza, C. 2013. Estado de salud y estatus de conservación de la(s) población(es) de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) en el Golfo de California: una especie en peligro de extinción. Centro. Informe Final, SNIB-CONABIO. Proyecto No. HK050, México, D.F.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.02.019>
- De Souza, D. M., Suita, S. M., Leite, F. P. L., Romano, L. A., Wasielesky, W., Ballester, E. L. C. 2012. The use of probiotics during the nursery rearing of the pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) in a zero exchange system. *Aquaculture Research*, 43(12), 1828–1837. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02992.x>
- Diario Oficial de la Federación. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Recuperado de <http://www.dof.gob.mx/normasOficiales/4254/semarnat/semarnat.htm>
- Dibello, J. C., Doassans, C. A. 2013. Crecimiento y sobrevivencia de carpa común (*cyprinus carpio*) y carassius (*carassius auratus*) (osteichthys, cyprinidae) en un sistema super intensivo con aplicación de biofloc, comparando con sistema de filtro biológico y sistema tradicional con aireación. Tesis de Doctorado. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.
- Ebeling, J.M., Timmons, M.B. y Bisogni, J.J. 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia–nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*. 257, 346-358. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.03.019>.
- Ekasari, J. , Zairin, M. , Putri, D. U., Sari, N. P., Surawidjaja, E. H. y Bossier, P. 2015. Biofloc-based reproductive performance of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* L. broodstock. *Aquac Res.* 46: 509-512. doi:10.1111/are.12185

- Ekasari, J., Angela, D., Waluyo, S. H., Bachtiar, T., Surawidjaja, E. H., Bossier, P., De Schryver, P. 2014. The size of biofloc determines the nutritional composition and the nitrogen recovery by aquaculture animals. *Aquaculture*, 426–427. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.01.023>
- Ekasari, J., Muhammad, A., Wiyoto, W., Ratih, F., Gilang S., Sulistiani, R., Muhammad A. y Muhammad Z. 2016. Biofloc technology application in African catfish fingerling production: The effects on the reproductive performance of broodstock and the quality of eggs and larvae. *Aquaculture*. 464, 349-356. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.07.013>.
- Emerenciano, M. , Ballester, E. L., Cavalli, R. O. y Wasielesky, W. 2012. Biofloc technology application as a food source in a limited water exchange nursery system for pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817). *Aquaculture Research*. 43: 447-457. doi:10.1111/j.1365-2109.2011.02848.x
- Emerenciano, M., Gaxiola, G., Cuzon, G. 2013. Biofloc Technology (BFT): A Review for Aquaculture Application and Animal Food Industry. *Intech*, (1), 301–328. <https://doi.org/10.5772/53902>
- Enes, P., Panserat, S., Kaushik, S., y Oliva-Teles, A. 2008. Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish. *Fish physiology and biochemistry*. 35. 519-39.
- Espírito Santo, C. M., Pinheiro, I. C., Jesus, G. F., Mouriño, J. L., Vieira, F. d. y Seiffert, W. Q. 2017. Soybean molasses as an organic carbon source in the farming of *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in a biofloc system. *Aquac Res*. 48: 1827-1835.
- FAO. 2013. National Aquaculture Sector Overview. Visión general del sector acuícola nacional - México. National Aquaculture Sector Overview Fact Sheets. Roma.
- FAO. 2016. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma. <https://doi.org/978-92-5-306675-9>
- Fernández-polanco, F., Villaverde, S., García-Encina, P. 1994. Temperature effect on nitrifying bacteria activity in biofilters: Activation and free ammonia inhibition. *Water Science and Technology*. 30, 121-130. DOI: 10.2166/wst.1994.0552.
- Fischer, W., F. Krupp, W. Schneider, C. Sommer, K.E. Carpenter y V.H. Niem. 1995. Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca en el Pacífico Centro-Oriental. Vols. I, II y III. Invertebrados y Vertebrados parte 1 y 2: 1-1813.
- FishBase. 2017. *Piaractus brachypomous*. Recuperado de <http://www.fishbase.org/summary/5808>
- Flanagan, C. A., Hendrickson, J. R. 1976. Observations on the commercial fishery and reproductive biology of the totoaba, *Cynoscion macdonaldi*, in the northern Gulf of California. *Fishery Bulletin*, 4(3), 531–544.
- Hargreaves, J. A. 2013. Biofloc production systems for aquaculture. *SRAC Publication*, 45(3), 1–12. Retrieved from <https://srac.tamu.edu/>

- Hari, B., Madhusoodana Kurup, B., Varghese, J. T., Schrama, J. W., Verdegem, M. C. J. 2004. Effects of carbohydrate addition on production in extensive shrimp culture systems. *Aquaculture*, 241(1–4), 179–194. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.07.002>
- Hernández-Ayón, J. M., Galindo-Bect, M. S., Flores-Báez, B. P., Alvarez-Borrego, S. 1993. Nutrient concentrations are high in the turbid waters of the Colorado River Delta. *Coastal and Shelf Science*, 37, 593–602.
- James, D. 2009. Aquaculture Production and Biodiversity Conservation. *BioScience*, 59(1), 27–38. <https://doi.org/10.1525/bio.2009.59.1.7>
- Jiménez-Ojeda, Y. K., Collazos-Lasso L. F., Arias-Castellanos J. A. 2018 Dynamics and use of nitrogen in Biofloc Technology - BFT. *AAFL Bioflux*. 11 (4): 1107-1129.
- Khanjani, M. H., Sajjadi, M. M., Alizadeh, M. y Sourinejad, I. 2017. Nursery performance of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) cultivated in a biofloc system: the effect of adding different carbon sources. *Aquac Res*. 48: 1491-1501.
- Khatoon, H., Banerjee, S., Guan Yuan, G. T., Haris, N., Ikhwanuddin, M., Ambak, M. A., Endut, A. 2016. Biofloc as a potential natural feed for shrimp postlarvae. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 113, 304–309. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.04.006>
- Kim, Jun-Hwan, Kim, J.K. y Kim, Jong-Hyun. 2018. Bio-floc technology application in flatfish *Paralichthys olivaceus* culture: Effects on water quality, growth, hematological parameters, and immune responses. *Aquaculture*. 495, 703-709. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.034>.
- Kubitza F. 2011. Sistema Com Bioflocos Sem Renovação De Água. *Panorama Da AQUICULTURA*, 21, 14–23.
- Lake, R. G., Hinch, S. G. 1999. Acute effects of suspended sediment angularity on juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 56, 862–867. <https://doi.org/10.1139/f99-024>
- Lara, G., Krummenauer, D., Abreu, P. C., Poersch, L. H. y Wasielesky, W. 2017. The use of different aerators on *Litopenaeus vannamei* biofloc culture system: effects on water quality, shrimp growth and biofloc composition. *Aquaculture International*. 25(1), 147--162.
- Liu, Y., y Tay, J. H. 2002. The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water research*. 36(7), 1653-1665.
- Lugert, V., Thaller, G., Tetens, J., Schulz, C., Krieter, J. 2016. A review on fish growth calculation: Multiple functions in fish production and their specific application. *Reviews in Aquaculture*, 8(1), 30–42. <https://doi.org/10.1111/raq.12071>
- Martinez-Porchas, M., y Martinez-Cordova, L. R. 2012. World aquaculture: environmental impacts and troubleshooting alternatives. *TheScientificWorldJournal*, 2012, 389623. DOI: 10.1100/2012/389623

- Minjarez-Osorio, C., González-Félix, M. L., Perez-Velazquez, M. 2012. Biological performance of *Totoaba macdonaldi* in response to dietary protein level. *Aquaculture*. 50–54. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.07.028>
- Najdegerami, E.H., Bakhshi, F. y Lakani, F. B. 2016. Effects of biofloc on growth performance, digestive enzyme activities and liver histology of common carp (*Cyprinus carpio L.*) fingerlings in zero-water exchange system. *Fish Physiology and Biochemistry*. 42(2), 457–465.
- OIE. 2012. Código Sanitario para los Animales Acuáticos: Aspectos relativos al bienestar en el aturdimiento y el sacrificio de peces de cultivo para consumo humano. Consultado el 10 de abril del 2018, de http://www.oie.int/index.php?id=171&L=2&htmfile=chapitre_welfare_stunning_killing.htm
- Ogello, E. O., Musa, S. M., Aura, C. M., Abwao, J. O., Munguti, J. M. 2014. An Appraisal of the Feasibility of Tilapia Production in Ponds Using Biofloc Technology: A review. *International Journal of Aquatic Science*, 5(1), 2008–8019.
- Orellana, J., Waller, U., y Wecker, B. 2014. Culture of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) in a marine recirculating aquaculture system (RAS) with artificial seawater. *Aquacultural engineering*. 58, 20-28.
- Pfeiffer, T. y Wills, P. 2011. Evaluation of three types of structured floating plastic media in moving bed biofilters for total ammonia nitrogen removal in a low salinity hatchery recirculating aquaculture system. *Aquacultural Engineering*. 45, 51-59. DOI: 10.1016/j.aquaeng.2011.06.003.
- Poleksić, V., y Mitrović-Tutundžić, V. 1994. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish. *Oxford: Fishing News Books*. 339-52.
- Poli, M. A., Schweitzer, R., Pires de Oliveira, A. 2015. The use of biofloc technology in a South American catfish (*Rhamdia quelen*) hatchery: Effect of suspended solids in the performance of larvae, *Aquacultural Engineering*. 66, 17-21.
- Rajkumar, M., Pandey, P.K., Aravind, R., Vennila, A., Bharti, V. y Purushothaman, C.S. 2015. Effect of different biofloc system on water quality, biofloc composition and growth performance in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquaculture Research*. 47(11): 3432–3444
- Redding, J.M., Schreck, C. B. y Everest, F. H. 1987. Physiological Effects on Coho Salmon and Steelhead of Exposure to Suspended Solids. *Transactions of the American Fisheries Society*. 116(5): 737-744
- Roa-lázaro, A., Espinosa-araujo, J., Prieto-guevara, M., Pertuz-buevas, V., Atencio-garcía, V. 2017. Levante de reproductores de bocachico *Prochilodus magdalenae* con tecnología biofloc, (Vcl). 202–205.
- Román Rodríguez, M. J., Hammann, M. G. 1997. Age and growth of totoaba, *Totoaba macdonaldi* (Sciaenidae), in the upper Gulf of California. *Fishery Bulletin*. 95(3): 620–628.
- Ruiz-Picos, R., y López-López, E. 2012. Gill and liver histopathology in *Goodea atripinnis* Jordan, related to oxidative stress in Yuriria lake, Mexico. *International Journal of Morphology*, 30(3), 1139-1149.

- Santos, D., Melo, M. R. S., Mendes, D. C. S., Rocha, I. K., Silva, J. P. L., Cantanhêde, S. M., y Meletti, P. C. 2014. Histological changes in gills of two fish species as indicators of water quality in Jansen Lagoon (São Luís, Maranhão State, Brazil). *International journal of environmental research and public health*. 11 (12): 12927-12937.
- Serra, F. P., Gaona, C. A. P., Furtado, P. S., Poersch, L. H., Wasielesky, W. 2015. Use of different carbon sources for the biofloc system adopted during the nursery and grow-out culture of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture International*, 23(6), 1325–1339. <https://doi.org/10.1007/s10499-015-9887-6>
- Solorzano, L. 1969. Determination of ammonia in natural seawater by the phenol-hypochlorite method. *Limnology and Oceanography*, 14(5), 799–801. <https://doi.org/10.4319/lo.1969.14.5.0799>
- Talamás Rohana, E. 2001. Efecto de la temperatura sobre la preferencia térmica y el metabolismo de juveniles de (*Totoaba macdonaldi*) (Gilbert,1890). Tesis de maestría en ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California .
- Tidwell, J. H. 2012. Aquaculture Production Systems. Recirculating Aquaculture Systems. John Wiley & Sons, Inc. 245-277.
- Timmons M.B., Ebeling J.M., Wheaton F.W., Summerfelt S.T. y Vinci B.J. 2002. Recirculating aquaculture systems. Northeastern Regional Aquaculture Center. E.U.A.
- Timmons, M.B., Ebeling, J.M. y Piedrahita, R.H. 2009. Acuicultura en sistemas de recirculación, LLC Edición. Ithaca, USA: Cayuga Aqua Ventures
- Timmons, M.B., Ebeling, J.M. 2010. Recirculating Aquaculture (2nd ed.), Cayuga Aqua Ventures, Ithaca, NY.
- Tacon, A. G. J., Cody, J. J., Conquest, L. D., Divakaran, S., Forster, I. P. y Decamp, O. E. 2002. Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. *Aquaculture Nutrition*. 8, 121–137.
- True, C. D. 2012. Desarrollo de la biotecnia de cultivo de *Totoaba macdonaldi*. Tesis de Doctorado. Universidad Autonoma de Baja California. Ensenada, Baja California.
- Utne-Palm. 2002. Visual feeding of fish in a turbid environment: Physical and behavioural aspects. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*. 35(1): 111-128. <https://doi.org/10.1080/10236240290025644>
- Valdez-Muñoz, C., Aragón-Noriega, E. A., Ortega-Rubio, A., Salinas-Zavala, C. A., Alfredo Arreola-Lizárraga, J., Hernández-Vázquez, S., Beltrán Morales, L. F. 2010. Distribución y abundancia de juveniles de totoaba , *totoaba macdonaldi*, y la salinidad del hábitat de crianza. *Interciencia*, 35(2), 136–139.

- Vinatea, L., Malpartida, J., Carbó, R., Andree, K. B., Gisbert, E., y Estevez, 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.
- Xu, W. J., Morris, T. C., Samocha, T. M. 2016. Effects of C/N ratio on biofloc development, water quality, and performance of *Litopenaeus vannamei* juveniles in a biofloc-based, high-density, zero-exchange, outdoor tank system. *Aquaculture*, 453, 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.11.021>
- Xue Du, Almeida, D., Song, D., Zhao, Z., Luo, L., Wang, C., Li, J., Wang, L., Ji, F., Xu, Q. 2018. Effects of organic carbon addition on water quality and phytoplankton assemblages in biofloc technology ponds *Aquaculture*. 497, 155-163.
- Zhang, M., Qiao G. y Xu D.H. 2018. Effect of different water biofloc contents on the growth and immune response of gibel carp cultured in zero water exchange and no feed addition system. *Aquac Res.* 49, 1647–1656. <https://doi.org/10.1111/are.1362>