

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria
Ingeniería Agronómica



Proyecto Especial de Graduación
**Uso de microorganismos de montaña en un sistema biofloc para tilapia
gris (*Oreochromis niloticus*)**

Estudiantes

Matheo Javier Álava Bravo

Sebastián Dávalos Suazo

Asesores

Patricio E. Paz, Ph.D.

Carolina Avellaneda, Ph.D.

Honduras, agosto 2021

Autoridades

TANYA MÜLLER GARCÍA

Rectora

ANA M. MAIER ACOSTA

Vicepresidenta y Decana Académica

CELIA ODILA TREJO RAMOS

Directora Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria

HUGO ZAVALA MEMBREÑO

Secretario General

Contenido

Índice de Cuadros.....	4
Índice de Figuras	5
Resumen	6
Abstract.....	7
Introducción.....	8
Metodología.....	12
Ubicación y Duración del Experimento.....	12
Microorganismos de Montaña.....	12
Identificación y Conteo de Bacterias en Microorganismos de Montaña.....	16
Sistema Biofloc.....	18
Materiales para Medición de Parámetros de Agua	21
Diseño y Análisis Experimental	21
Resultados y Discusión.....	22
Aislamiento e Identificación de Bacterias en Laboratorio	22
Resultados Parámetros de Calidad de Agua	25
Amonio.....	25
Resultados Parámetros de Calidad de Agua	28
Resultados en Producción de Tilapia Gris.....	30
Conclusiones	33
Recomendaciones.....	34
Referencias.....	35

Índice de Cuadros

Cuadro 1 Variación en los niveles de amonio ionizado en tanques de tilapia gris (<i>Oreochromis niloticus</i>) en el primer recambio de agua realizado al sexto día	27
Cuadro 2 Niveles de nitrógeno amoniacal ionizado en tanques de tilapia gris (<i>Oreochromis niloticus</i>) en 28 días de toma de muestra evaluando el comportamiento de microorganismos de montaña en comparación a probióticos comerciales.	28
Cuadro 3 Medición de parámetros de calidad del agua en tanques de tilapia gris (<i>Oreochromis niloticus</i>) tratados bajo un sistema biofloc	29
Cuadro 4 Supervivencia de tilapia gris (<i>Oreochromis niloticus</i>) bajo el sistema de biofloc con la evaluación de microorganismos de montaña.....	31
Cuadro 5 Comparación de los niveles de biomasa e índice de conversión de conversión alimenticia en los diferentes tratamientos evaluados en 28 días de experimento	31

Índice de Figuras

Figura 1 Pesado de muestras de suelo sacado del monte Uyuca	13
Figura 2 Conversión en MMO de fase solida a fase liquida.	13
Figura 3 Resultados de solución bajo condiciones anaerobias.....	14
Figura 4 Implementación de muestra de microorganismos de montaña a la solución liquida.....	14
Figura 5 Sellado hermético para iniciar proceso de fermentación láctica y reproducción de levaduras	15
Figura 6 Resultados de la solución liquida después de reposo anaerobio	15
Figura 7 Instalación de sistema de aireación.....	18
Figura 8 Flóculos formados en los tanques.....	20
Figura 9 Aislamiento de bacterias encontradas en una muestra de suelo recolectada en el monte Uyuca a 1900 msnm.....	22
Figura 10 Recolección de muestras de bacterias formadas en medios de cultivo con agar nutritivo.	23
Figura 11 Bacterias asiladas en medio agar nutritivo pasadas por pruebas con tinción gram identificadas en un microscopio a 100x.	23
Figura 12 Resultados prueba electroforesis para la identificación de <i>Pseudomonas flourescence</i> en medio PSDF	25
Figura 13 Comportamiento de los niveles de amonio ionizado en tanques de tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>) utilizando probióticos comerciales y microorganismos de montaña en comparación al control.	26

Resumen

La producción de tilapia es una de las ramas de la acuicultura que más se ha popularizado a través de los años, con un crecimiento anual del 7%. Para esta investigación se implementó un sistema biofloc, que consiste en el crecimiento y reproducción de bacterias heterotróficas nitrificantes que crean flóculos que disminuyen los niveles de nitrógeno amoniacal ionizado y aportan como fuente de proteína para las tilapias. En el siguiente estudio se usó el probiótico Terminate, utilizado para el control de amonio en producciones intensivas de camarón. Adicionalmente, se usaron microorganismos de montaña recolectados en el monte Uyuca y procesados en el laboratorio de fitopatología para la identificación de bacterias benéficas en la muestra, y reproducidas en tanques de plástico con la adición de melaza y agua; al mismo tiempo, se mantuvo un control en donde no se aplicó ningún microorganismo externo al agua para simular una producción acuícola convencional. Al final del experimento se encontraron diferencias significativas en los niveles de nitrógeno amoniacal ionizado (NH_4^+) en los tres tratamientos experimentales, siendo la incorporación de los microorganismos de montaña el método más efectivo para la reducción de niveles de NH_4^+ ; además, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos aplicados, en los niveles de nitrato (NO_3) teniendo una mayor concentración de este compuesto los tanques experimentales utilizando probióticos comerciales. Los demás parámetros de calidad de agua medidos (temperatura, pH, y oxígeno disuelto) se mantuvieron en rangos óptimos para el crecimiento de microorganismos en el agua y de los peces.

Palabras clave: Flóculos, microorganismos de montaña, nitrificación, probióticos, sistema Biofloc

Abstract

Tilapia production is one of the branches of aquaculture that has become more popular over the years, with an annual growth rate of 7%. For this research, a biofloc system was implemented, which consists of the growth and reproduction of nitrifying heterotrophic bacteria that create floccules that reduce ammonia nitrogen by nitrification processes and provide a source of protein for the tilapia. In the following study, the probiotic Terminate was used for the control of ammonium in intensive shrimp production, and mountain microorganisms collected from the Uyuca mountain and analyzed in the phytopathology laboratory were also implemented for the identification of beneficial bacteria in the sample, and reproduced in plastic tanks with the addition of molasses and water; at the same time a control was maintained where no external microorganisms were applied to the water to simulate a conventional aquaculture production. At the end of the experiment, significant differences were found in the levels of ionized ammonia nitrogen (NH_4^+) in the three experimental treatments, being the mountain microorganisms the most effective method for the reduction of NH_4^+ levels; in addition, significant differences were found among the applied treatments in the levels of nitrate (NO_3), with a higher concentration of this compound in the experimental tanks using commercial probiotics. The other water quality parameters measured (temperature, pH, and dissolved oxygen) were maintained in optimal ranges for the growth of microorganisms in the water and fish.

Keywords: Biofloc system, flocs, mountain microorganisms, nitrification, probiotics.

Introducción

La demanda global de alimento ha logrado que haya un incremento exponencial en la sobreproducción agrícola y en el malgasto de recursos naturales. En los últimos 30 años el consumo mundial de pescado se ha duplicado (Emerenciano et al. 2017), este es un ejemplo de cómo el mercado ha crecido estas últimas décadas; causando una explotación mundial de pesca que tiene como efecto la desaparición de especies marítimas (Ahmad et al. 2017). Sin embargo, en los últimos años se ha activado un sector de producción que ha ayudado a disminuir la sobre pesca y el aprovechamiento ilegal de recursos marítimos de los océanos; este método de producción es la acuicultura. La acuicultura en tierra es básicamente el uso de estructuras con agua que cumplen con las condiciones fisicoquímicas del animal y alimentar, ya sea peces o camarón, con balanceado a base de granos y con microorganismos como zooplancton, fitoplancton, protozoarios u otros, con el fin de poder producir alimento con una alta demanda en el mercado (Crab et al. 2012).

Uno de los temas principales de la acuicultura es su efecto sobre el agua usada para la producción. ¿Qué se hace cuando las propiedades químicas del agua en nuestra producción ya no son óptimas? Normalmente en los grandes criaderos de peces, el agua utilizada en la producción es descargada a los cuerpos de agua más cercanos, ya sean ríos u océanos, con el potencial de provocar una contaminación considerable (Chaverra Garcés 2017). Sin embargo, estudios acerca del uso de microorganismos que benefician a la calidad y vida del agua han logrado sacar adelante al sector productivo acuícola, ya que, han permitido reducir la necesidad de recambios de agua y recirculación de agua en los tanques/piscinas utilizadas. Dentro de estas técnicas de conservación de agua se encuentra el sistema de biofloc, el cual es la crianza de diferentes microorganismos como: algas, bacterias heterótrofas nitrificantes, hongos, y diferentes tipos de virus que pegándose gracias a fuerzas de atracción fisicoquímicas crean flóculos que con la ayuda de aireadores de suspensión, estos se van a poder hallar en la superficie de los tanques (Del Monroy-Dosta et al. 2013).

Los microorganismos floculados o bioflocs ayudan brindando macro y micronutrientes que ayudan al desarrollo de los peces o crustáceos y también ayudan principalmente a disminuir los niveles de nitrógeno amoniacal ionizado en el agua gracias a la presencia de bacterias nitrificantes que desionizan el compuesto químico (Rajkumar et al. 2016). Los principales microorganismos dentro del sistema de biofloc son bacterias heterótrofas nitrificantes; en otras palabras, microorganismos que necesitan ser alimentados con fuentes de carbohidratos como lo son: harina de coco, salvado de trigo, melaza y otros (Khanjani 2020b)

El factor que más dificulta el crecimiento de microorganismos benéficos para la acuicultura es la suspensión en la que deben estar, ya que, si no se encuentran en las superficies de los tanques, se puede provocar un efecto negativo en la calidad de agua, ya que, no serán aprovechados por los organismos en producción y pueden contaminar el agua (Hernández Mancipe et al. 2019). Otro punto negativo del cultivo de flóculos es que las bacterias nitrificantes que se usan de manera comercial no son halladas con facilidad en la naturaleza, más bien, su crecimiento se hace en medios de cultivos controlados dentro de laboratorios; es por esto, que normalmente el biofloc comercial no es accesible para todos los productores por su precio, el cual puede ser considerablemente alto.

La alta descarga de materia orgánica, compuestos nitrogenados, metabolitos tóxicos y bioquímicos es lo que más perjudica la calidad fisicoquímica del agua de los ríos y océanos que sufren de estos desechos (Emerenciano et al. 2017). Una de las principales propiedades químicas que afectan a la salud y calidad del agua son los niveles de amoniaco y amonio ionizado que existen en los tanques y piscinas acuícolas. Según Tidwell (2012), el amonio ionizado NH_4^+ es el resultado del desglose de la proteína que se da en el proceso metabólico del pez o crustáceo; en otras palabras, las excretas de los organismos liberan NH_3 , que es altamente toxico para los seres vivos, y una vez en contacto con el agua se convierte en lo que conocemos como nitrógeno amoniacal ionizado. Aproximadamente el 87% del nitrógeno consumido en la proteína del alimento es devuelto al agua por difusión pasiva en las agallas de los peces (Khanjani 2020a).

Los niveles de nitrógeno amoniacal son reducidos mediante la adición de microorganismos que oxiden compuestos nitrogenados para generar energía. Según Bioacuafloc (2018), con la expulsión de amoníaco por las branquias, este se transforma en nitrógeno amoniacal ionizado; más aún, cuando los niveles de pH en el medio son inferiores a 8. Mas adelante, existen grupos de bacterias nitrificantes del género *Nitrosomonas* spp. que oxidan el amonio ionizado (NH_4^+) y lo convierten a nitritos (NO_2); más adelante los nitritos son oxidados y convertidos en nitratos (NO_3) por grupos de bacterias del género *Nitrobacter* spp. por último, el nitrato pasa por un proceso de desnitrificación en el cual se resulta en nitrógeno gaseoso por la ausencia de oxígeno (Pérez Muñoz 2021).

Lo que se busca en este sistema de producción es la eliminación de amonio y nitrito ya que estos son peligrosos para animales acuáticos en niveles por encima de 1.1 y 4.1 ppm o mg/L durante largos periodos de tiempo pudiendo alcanzar un 50% de mortalidad, como puede ocurrir en la tilapia del Nilo (Ingle de la Mora et al. 2003). La importancia de los sistemas biofloc es en la reducción de los impactos ambientales negativos que son producidos por las descargas de agua que provienen de la acuicultura tradicional a diferencia de este sistema que puede reducir el recambio de agua y reusar los nutrientes que este sistema nos provee por la asociación de actividades microbianas aerobias con la alta cantidad de materia orgánica presente en el estanque, alcanzando un balance del carbono y del nitrógeno logrando sacar un exceso de estos compuestos del agua en forma de biomasa bacteriana. Gracias a esto se producen bajos niveles de nitrógeno en el agua y así lograr mantener estables los parámetros fisicoquímicos del agua.

Según investigaciones, se dice también que se utilizan microorganismos de montaña para el tratamiento de aguas residuales, estos microorganismos de montaña tienen un rol benéfico en los procesos biológicos del suelo y de los agroecosistemas; también se ha observado que se encuentran alrededor de 80 especies de microorganismos de unos 10 géneros diferentes pertenecientes a cuatro grupos: bacterias fotosintéticas, actinomicetos, bacterias productoras de ácido láctico y levaduras (Rodríguez y Tafur 2014). Sin embargo, estos microorganismos de montaña se extraen de un medio

natural, donde no se ha desarrollado actividad antropogénica. En este ecosistema se descompone la materia orgánica que más adelante se transforma en los nutrientes necesarios para el desarrollo de su flora reiniciando el ciclo (Díaz Burgos y Collantes Chules 2019).

El objetivo de este estudio fue comparar los niveles de nitrógeno amoniacal ionizado en tanques de tilapia gris empleando microorganismos de montaña y probióticos comerciales bajo un sistema biofloc. Seguido de esto, se midieron los niveles de: pH, temperatura, oxígeno disuelto, y nitratos en el agua con el fin de obtener conocimiento sobre los efectos que pueden causar el sistema implementado hacia estos parámetros. Por último, se midió el crecimiento y rendimiento productivo de la tilapia gris bajo este sistema tomando en cuenta su comportamiento y reacción ante los tratamientos implantados.

Metodología

Ubicación y Duración del Experimento

El proyecto se realizó en la unidad de acuacultura “Daniel E. Meyer” de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano dentro de un invernadero que está entre las piscinas circulares y los estanques de producción. La temperatura promedio en la zona donde está ubicada la unidad es de 26 °C y la temperatura promedio dentro del invernadero oscila entre 25-35 °C. La altura promedio en la zona es de 800 msnm.

Microorganismos de Montaña

La recolección de los microorganismos de montaña fue hecha en el monte Uyuca en la parte más alta de la montaña. Esto, ya que, estos microorganismos benéficos únicamente se pueden encontrar en bosques que no hayan sido intervenidos con agroquímicos tanto en el suelo como en la vegetación en un tiempo mínimo de tres años (de Los Angeles 2012). Esta parte alta del monte Uyuca es caracterizada por ser un bosque que no ha sido tratado por el hombre en más de 25 años por lo que se determinó que ahí se encontraría en abundancia microorganismos benéficos en el suelo.

Se recolectaron muestras de suelo de 4.54 kg a diferentes alturas empezando por los 1900 msnm, la profundidad de la muestra de suelo se hizo de aproximadamente a 5 cm quitando las hojas de la primera capa del suelo (Bustamante 2014). Se tomó una muestra de suelo cada 100 metros; por ende, se tomaron un total de 10 muestras siendo la última a los 2009 msnm. El muestreo se hizo en las zonas más húmedas de las zona donde haya estancamiento de agua, y preferiblemente cerca de raíces de árboles y plantas, debido a que mientras más cerca se toma la muestra de la vegetación, más probabilidad hay de encontrar microorganismos benéficos que ayudan en el proceso de la nitrificación y desnitrificación (Montaño Arias y Sánchez-Yañez 2014).

Una vez recolectados los microorganismos de montaña, se procedió a pasar las muestras a fase líquida para la utilización inmediata o aplicación del mismo producto una vez terminado el

proceso de reproducción, a diferencia del medio sólido que es la fase la cual conserva estos microorganismos (Campo Martinez et al. 2014).

Figura 1

Pesado de muestras de suelo sacado del monte Uyuca.



En este paso se pesaron 5.44 kg de microorganismos de montaña (sólidos) con el objetivo de tener una buena relación de estos microorganismos y melaza disuelta en el tanque, posteriormente se colocó en un saco de manta o plástico para la implementación al medio líquido (Molina et al. n.d.).

Figura 2

Conversión en MMO de fase solida a fase liquida.



Con ayuda de un barril de 200 L, se suministraron 150 L de agua sin cloro, esto se hace simplemente dejando el agua en reposo por cierto periodo de tiempo que puede ir desde uno a tres días. Una vez hecho este proceso se suministra un galón de melaza para obtener una mayor sobrevivencia y reproducción de los microorganismos presentes de la muestra (Khanjani 2020a).

Figura 3

Resultados de solución bajo condiciones anaerobias.



En la Figura 3 se muestra el resultado después del proceso de mezclado. Es importante que la solución quede mezclada de manera homogénea para así asegurar que existan carbohidratos en todo el medio líquido y no existan partes donde no haya presencia de melaza.

Figura 4

Implementación de muestra de microorganismos de montaña a la solución líquida.



Se procedió a sumergir en un saco la muestra de suelo pesado previamente dentro del barril para un mayor aprovechamiento del medio líquido, de modo que los microorganismos aprovecharan la fuente de carbono suministrada para su reproducción. Posteriormente a los 150 L de agua que había en el barril se le agregaron 30 L adicionales hasta completar 180 L (Molina et al. [sin fecha]).

Figura 5

Sellado hermético para iniciar proceso de fermentación láctica y reproducción de levaduras.



El barril fue sellado con una tapa hermética, dejándolo en reposo alrededor de 30 días protegido de factores ambientales como el sol y la lluvia para que se llevara a cabo una fermentación anaeróbica para degradar la glucosa, extrayendo energía mediante glucólisis (Corrales et al. 2015).

Figura 6

Resultados de la solución líquida después de reposo anaerobio.



La Figura 6 muestra los resultados de la reproducción de microorganismos de montaña en medio líquido un mes después de haber pasado todos los procesos fermentativos y reproductivos. Se encontró una capa de diferentes hongos en la parte de arriba de la solución; sin embargo, para este estudio no se investigó los efectos de estos, por ende, se procedió a remover de la solución.

Identificación y Conteo de Bacterias en Microorganismos de Montaña

El análisis de los microorganismos se llevó a cabo en el laboratorio de fitopatología de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, luego se sembraron las diferentes muestras en medios de cultivo para poder identificar los diferentes tipos de bacterias presentes en la muestra. Los pasos fueron:

- Se pesaron 5 g de suelo seco, aforando en 50 mL de agua destilada estéril en un tubo cónico.
- Se colocó la muestra en una mesa orbital por 5 min/300 rpm esto con el fin de tener una mezcla homogénea entre el suelo y agua.
- Se aclimataron tres platos Petri por muestra en la cámara de flujo laminar, rotulando estos platos con nombre, fecha y dilución de la muestra.
- Empleando una pipeta estéril se transfirió 1 mL de la mezcla de suelo con el agua destilada estéril a un tubo que contenía 9 mL de agua destilada estéril con dilución 10^{-1} .
- Se realizaron diluciones seriadas de 1:10, es decir, colocando 1 mL de agua destilada estéril y añadiendo 9 mL del tubo anterior hasta la dilución 10^{-4} para una mejor identificación.
- Se agitó la muestra y se tomaron 100 μ L que se colocaron en el centro del medio de cultivo, con la ayuda de un asa de Digrafsky estéril, esparciendo la muestra en el medio de cultivo.
- Se sellaron los medios con Parafilm y fueron incubados a 28 °C.
- Se observaron los platos Petri 24 y 48 horas después y se finalizó con el conteo de los hongos y bacterias.

Para la resiembra de bacterias se siguieron los siguientes pasos:

- Se preparó la cámara de flujo laminar, limpiándola y desinfectándola con alcohol al 70%
- Se preparó un medio de cultivo agar nutritivo para la reproducción de bacterias, y un medio de cultivo "PSDF" para la identificación de *Pseudomonas* spp.
- Se aclimató la cámara de flujo laminar entre 10-15 min antes de la resiembra y después se removió cualquier agua condensada en los platos.

- Se prepararon los materiales: asa delgada y fina con su incinerador bacteriológico, parafina y contenedor con alcohol al 95%.
- Se realizó la siembra con el método de Frobisher, el que consiste en una secuencia de estriados con el asa en el medio con el objetivo de diluir la muestra para obtener las unidades formadoras de colonias. El asa fue esterilizada antes de cada estriado.
- Se sellaron los platos con parafina, se rotularon y fueron colocados en contenedores de crecimiento a temperatura ambiente o en la incubadora a 37 °C.

En el protocolo para la tinción de Gram se realizaron los siguientes pasos:

- Preparación del frotis: Se limpió el portaobjetos con alcohol al 70%
- Se colocó una gota de agua destilada sobre el portaobjetos y con el asa esterilizada se tomó una pequeña muestra de la bacteria fresca.
- Se mezcló y se esparció la muestra con el agua destilada para tener una mezcla homogénea en el frotis.
- Se pasó el frotis sobre el mechero para que se seque la muestra.
- Se preparó un control para comparar el resultado.
- Tinción con cristal violeta: Se aplicaron de 1-2 gotas de cristal violeta esparciéndolo con un palillo con el fin de que cubra todo el frotis. Se incubó por un minuto y se lavó con agua destilada.
- Aplicación de lugol: Se aplicó de 1-2 gotas de Lugol y más adelante se esparció con un palillo con el fin de cubrir todo el frotis. Se incubó por un minuto y después se lavó con agua destilada.
- Aplicación de alcohol acetona: Durante cuatro segundos se aplicó alcohol acetona en el frotis con e inmediatamente se lo lavo con agua destilada.

- Contra tinción con safranina: Se aplicaron de 1-2 gotas de safranina y se esparció con un palillo de manera que cubra todo el frotis. Luego se incubó por un minuto y se lavó con agua destilada.
- Observación con el microscopio: Se secó suavemente el frotis con papel toalla; más adelante, se puso un cubreobjetos en el frotis y se aplicó aceite de inmersión para la observación al microscopio con el lente 100x.

Sistema Biofloc

Para el sistema de biofloc se implementó un sistema de aireación diferente a los sistemas experimentales comúnmente usados en la unidad en donde se utilizan piedras difusoras. Esto debido a que se necesitaba un método de aireación más intenso por la alta demanda de oxígeno de las bacterias en el sistema (Tidwell 2012). Se implementó también un sistema en donde las partículas en el agua puedan permanecer suspendidas, ya que, para que ocurra el proceso fisicoquímico de la floculación, las bacterias tienen que permanecer constantemente flotando en la superficie del agua en el tanque (Khanjani 2020a).

Figura 7

Instalación de sistema de aireación.



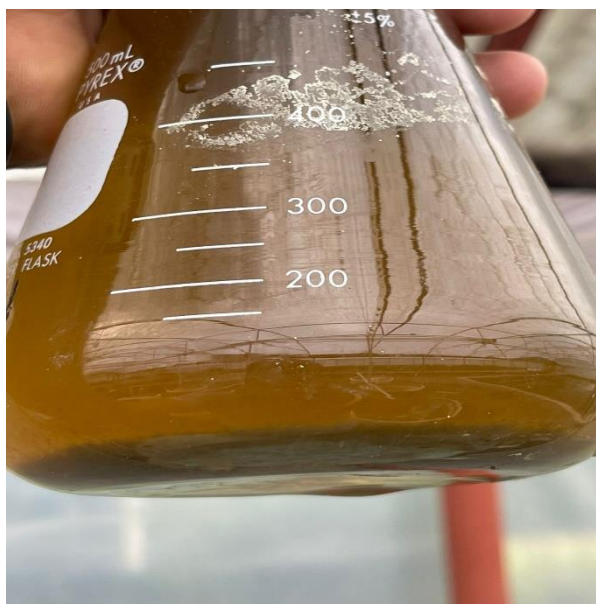
El sistema consistió en un marco hecho con tubería PVC de 1" de 48 x 58 cm, en el cual mediante el uso de conectores y cinta teflón se le unen 4 mangueras difusoras verticalmente. Una vez terminados los marcos, se construyó el sistema siendo potenciado por un aireador regenerativo de 1.5 Hp.

Una vez instalado el sistema de aireación se inició el proceso de floculación de las bacterias nitrificantes dentro de los tanques. Para esto se usó un probiótico liofilizado con el nombre comercial Terminate, usado comúnmente en la producción comercial de camarón. Se limpiaron los tanques con agua y detergente para no contar con residuos de partículas que pudiesen afectar negativamente la reproducción de bacterias.

Se aplicaron 5 g de cal en dosificación única para asegurar que el pH se mantuviese en el rango de 6-9 (Hernández Mancipe et al. 2019). El probiótico comercial fue administrado cada dos días en dosis de 1.5 g durante dos semanas, conteniendo cepas de bacterias nitrificantes como: *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus*, y *Bacillus licheniformis*. Adicionalmente, se añadieron 100 g de melaza junto al probiótico, ya que, las bacterias presentes en la solución son heterotróficas y necesitan una fuente de carbono para su mantenimiento y reproducción (Kubitza 2011). Una vez activadas las bacterias y aplicadas en los tanques, se siguió aplicando 100 g de melaza cada dos días para la reproducción de estas y para acelerar la formación de flóculos dentro de los tanques.

Figura 8

Flóculos formados en los tanques.



Los primeros flóculos se pudieron observar a partir del cuarto día de aplicación de bacterias y melaza, y mientras más melaza se suministraba al medio, mayores cantidades de flocs se encontraban en la superficie. Esto debido a que la formación de flocs dependen de la cantidad de carbono que se encuentran en el medio, ya que, al haber mayor reproducción de bacterias en la solución se logran más uniones de estas por exopolisacáridos encontrados en la membrana celular de la célula bacteriana, que generan pegajosidad (Bioacuafloq 2018).

Se sembró tilapia gris (*Oreochromis niloticus*) en etapa de pre-cria, con una población inicial de 30 peces por tanque con un peso promedio por tanque de 21.40 g. Se utilizó alimento comercial "Alcon" proporcionado por la unidad. En explotaciones comerciales, la alimentación de tilapias en el estado productivo de pre-cria se realiza con 40-45% de proteína cruda para un desarrollo y crecimiento óptimo en el animal (La Acuicultura 2017). Sin embargo, se alimentó con balanceado de 38% de PC, ya que, al reducir los niveles de proteína en el alimento se obtiene un mejor manejo de la relación C:N que ayuda a una mejor asimilación de nutrientes en el agua (Zapata Lovera et al. 2017).

En otras palabras, al reducir los niveles de proteína en el alimento, se redujo los niveles de nitrógeno en el agua manteniendo siempre arriba los niveles de carbono con la aplicación de melaza.

Materiales para Medición de Parámetros de Agua

Se utilizó el kit “API Reef Master Test Kit” que incluye siete botellas de solución de prueba, dos tarjetas de color y cuatro tubos de prueba de vidrio. Este equipo permitió medir los niveles de amonio (mg/L), y nitrato (mg/L). Se utilizó un oxímetro “YSI Pro 20A” que proporcionó datos de oxígeno disuelto en el agua medido en mg/L, y la temperatura del agua en °C. Mas adelante, se usó el medidor de pH “HANNA HI98127”.

Diseño y Análisis Experimental

Se realizó un diseño completamente al azar (DCA) en donde el análisis de resultados se obtuvo mediante un análisis de varianza (ANDEVA) con tres tratamientos y tres repeticiones teniendo un total de nueve unidades experimentales; además se hicieron medidas repetidas en el tiempo para separar las medias utilizando LSMEANS. Para el análisis se utilizó el paquete estadístico Statistical Analysis System (SAS® versión 9.4), con un nivel de significancia de $P \leq 0.05$. Las variables de biomasa, índice de conversión alimenticia y sobrevivencia fueron comparadas por medio de la prueba Duncan por medio del programa InfoStat, con un nivel de significancia de $P \leq 0.05$.

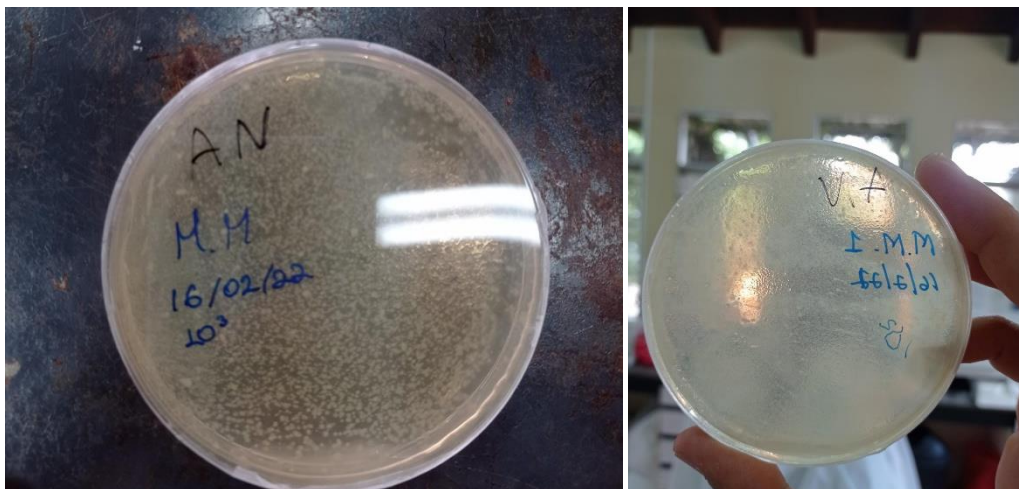
Resultados y Discusión

Aislamiento e Identificación de Bacterias en Laboratorio

La muestra de suelo diluida en diferentes concentraciones, a 10^{-2} y a 10^{-3} con la finalidad de lograr un crecimiento de colonias separadas, pero a la vez voluminosas. Posteriormente las muestras diluidas fueron sembradas en medios de cultivo de agar nutritivo para el crecimiento de bacterias. Se dejaron las muestras veinticuatro horas en la incubadora a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ para garantizar un ambiente controlado y así evitar el crecimiento de microorganismos no deseados. Los resultados del aislamiento se pueden apreciar en la Figura 9.

Figura 9

Aislamiento de bacterias encontradas en una muestra de suelo recolectada en el monte Uyuca a 1900 msnm.



Una vez escogida la muestra, se analizó la morfología colonial de cada una de las colonias para obtener una idea general de que bacterias se encontraron en la muestra.

Figura 10

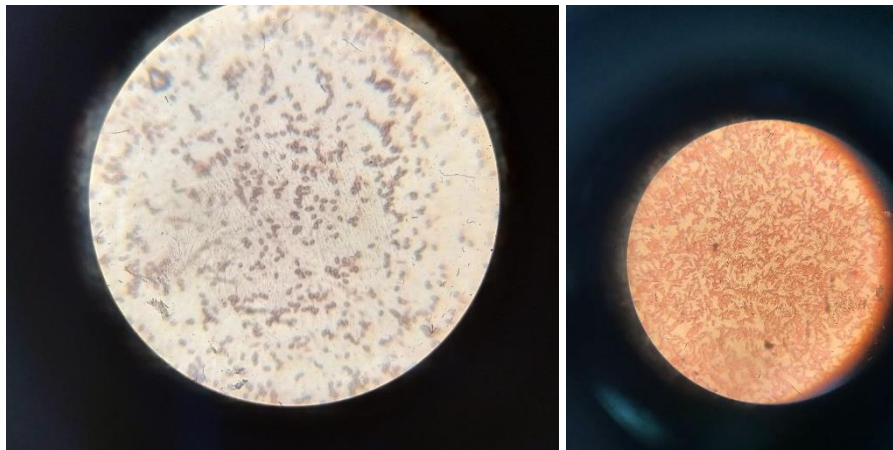
Recolección de muestras de bacterias formadas en medios de cultivo con agar nutritivo.



Una vez obtenidas las muestras del medio de cultivo, se realizaron las pruebas de tinción de Gram para lograr diferenciar a las bacterias que se encontraron en el medio. Mas adelante, se observaron las formas de las bacterias presentes en un microscopio para lograr identificar los géneros de bacterias previamente aisladas. Los resultados obtenidos se pueden observar en la Figura 10.

Figura 11

Bacterias aisladas en medio agar nutritivo pasadas por pruebas con tinción Gram identificadas en un microscopio a 100x.

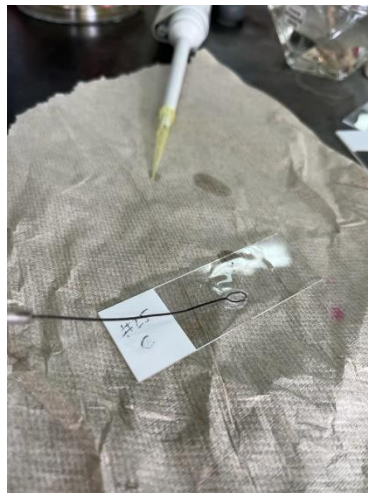


Los resultados en la tinción Gram dio como conclusión que las bacterias presentes en el medio son bacilos Gram-positivos y bacilos Gram-negativos. Esto debido a la alta concentración de peptidoglucanos presentes en la pared celular de la bacterias que permitió la entrada de la safranina a la célula de las mismas (Mora 2012). Mas adelante, basándose en la morfología de las bacterias observadas, se llegó a la conclusión de que en la muestra de suelo extraída del monte Uyuca hubo la presencia de bacterias del género *Bacillus* spp. (De Castro 2001).

Mas adelante se hicieron pruebas de Catalasa para determinar si las bacterias presentes en la muestra son aerobias o anaerobias. Para esta prueba se utilizó peróxido de hidrógeno para determinar si las bacterias contaban con la enzima catalasa para descomponer el peróxido de hidrogeno aplicado. El resultado salió negativo al final de prueba, ya que, no se mostró reacción por parte de las bacterias hacia el peróxido de hidrogeno. Por ende, se concluyó que las bacterias presentes en la muestra fueron anaerobias.

Figura 12

Resultados prueba catalasa en bacterias aisladas.



Los bacilos Gram-negativos se pusieron a crecer en medio específico para la identificación de presencia de bacterias del género *Pseudomonas*, estas se pusieron en medio PSDF *Pseudomonas* F Agar y luego de su crecimiento se observó bajo luz ultravioleta en el transiluminador en donde se

examina la presencia del pigmento fluorescente pioverdina encontrado comúnmente en *Pseudomonas flourescens* (Shaad 2001). La muestra fue sembrada en una base de agar para pseudomonas (PSDF), ya que, el medio cuenta con ceftriaxona y nalidixato de sodio que promueve el crecimiento de pseudomonas. los resultados de las pruebas de ultravioleta se pueden observar en la Figura 13.

Figura 13

Resultados en el transiluminador para la identificación de Pseudomonas flourescens en medio PSDF.



Resultados Parámetros de Calidad de Agua

Durante el experimento se midieron parámetros de calidad de agua con el fin de determinar si los microorganismos de montaña lograban hacer el mismo efecto que los probióticos comerciales en reducir los niveles de nitrógeno amoniacal ionizado (NH_4^+). Los parámetros medidos durante el experimento fueron: amonio, pH, temperatura, oxígeno disuelto, y nitrato.

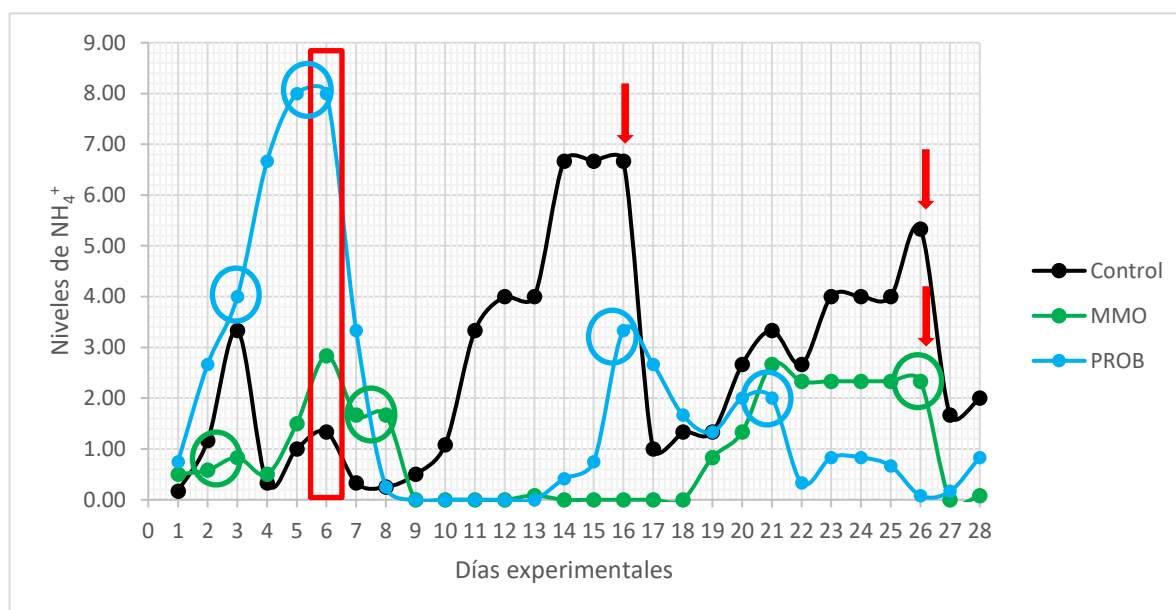
Amonio

Los resultados de amonio fueron los más importantes para la investigación, ya que, en base a eso se pudo interpretar la eficiencia de los tratamientos que fueron experimentados en la

investigación. Los resultados salieron favorables para el tratamiento con microorganismos de montaña, ya que, estos tanques mantuvieron los niveles más bajos de amonio en el agua.

Figura 14

*Comportamiento de los niveles de amonio ionizado en tanques de tilapia (*Oreochromis niloticus*) utilizando probióticos comerciales y microorganismos de montaña en comparación al control.*



Nota. Círculos representan aplicación de tratamientos. Figuras en rojo representan recambios de agua

MMO: Microorganismos de Montaña

PROB: Probióticos Comerciales

La Figura 9 muestra la fluctuación del amonio en el transcurso del experimento. Los recambios de agua se hicieron en base al nivel de amonio que presentaba el agua en los tanques experimentales. Según Flores (2002), los rangos de tolerancia de amonio ionizado en el agua para tilapia oscilan entre 2.0-6.0 mg/L; por ende, los recambios de agua se hicieron en base a los análisis de agua. La inoculación tanto de los probióticos comerciales como de los microorganismos de montaña se hizo en base a los niveles de amonio presentes en el agua.

Del día 1 al día 6 se aplicó por separado la melaza y las bacterias nitrificantes liofilizadas a los tanques experimentales; sin embargo, a partir del día 7 se empezó a activar a las bacterias colocándolas en un balde con la melaza por 48 horas y de ahí aplicar a los tanques. Este método de

activación permitió que los microorganismos crecieran a mayores concentraciones y así lograr una mayor presencia de colonias de bacterias nitrificantes en el agua (Agüero Murillo 2009). El primer recambio de agua en todos los tratamientos se realizó a los seis días, con un reemplazo de 60 litros de agua en cada tanque, representando un 20% del agua total de cada tratamiento. En los siguientes tres recambios de agua se recambió hasta un 50% del tanque, surgiendo en un recambio de 150 litros de agua por tanque. La variación en los niveles de amonio después los recambios de agua son demostrados en el Cuadro 1.

Cuadro 1

Variación en los niveles de amonio ionizado en tanques de tilapia gris (Oreochromis niloticus) en el primer recambio de agua realizado al sexto día.

Día	Control	PROB	MMO
6	1.33 ± 0.58	8.00 ± 0.00	2.83 ± 4.48
7	0.33 ± 0.29	3.33 ± 1.15	1.76 ± 2.02
Probabilidad	0.2619	<.0001	0.1909

Nota. PROB: Probiótico. MMO: Microorganismos de montaña. Probabilidad ≤ 0.05 = Diferencia significativa

En el primer recambio de agua se puede notar una diferencia significativa en los niveles de amonio con el tratamiento de probióticos; esto debido a que al haber mayores niveles de amonio en el agua, va a existir una mayor disminución de nitrógeno a la hora de hacer recambios de agua (Boyd 2001). Sin embargo, se puede observar que en los otros dos tratamientos no hubo diferencia significativa en cambios de amonio después de hacer recambio de agua; por ende, al hacer recambios de agua no se disminuyeron los niveles de amonio de manera significativa.

Una vez realizados los recambios de agua se procedió a inocular el probiótico y la solución de microorganismos de montaña en las unidades experimentales. Se realizaron cinco aplicaciones de probiótico comercial y tres aplicaciones de la solución líquida con microorganismos de montaña. Los resultados en los niveles de nitrógeno amoniacal ionizado se reflejan en el Cuadro 2.

Cuadro 2

*Niveles de nitrógeno amoniacal ionizado en tanques de tilapia gris (*Oreochromis niloticus*) en 28 días de toma de muestra evaluando el comportamiento de microorganismos de montaña en comparación a probióticos comerciales.*

Tratamientos	Media y D.E.
Control	2.65 ± 2.21
PROB	1.84 ± 2.41
MMO	0.96 ± 1.47
Probabilidad	0.0034
C.V. (%)	59.92

Nota. PROB: Probiótico. MMO: Microorganismos de montaña. Probabilidad ≤ 0.05 = Diferencia significativa. C.V: Coeficiente de Variación

De los tres tratamientos aplicados, las unidades experimentales que mantuvieron los niveles de amonio más bajo fueron los tratados con microorganismos de montaña; esto es debido a la mayor variedad de organismos que se encuentran dentro de este sustrato. Según Rodríguez y Tafur (2014), existen aproximadamente 80 especies de microorganismos de montaña que están separados en cuatro grupos principales: bacterias fotosintéticas, actinomicetos, bacterias productoras de ácido láctico, y levaduras. Estas últimas pueden ser las causantes de que haya habido mayor actividad de bacterias nitrificantes dentro del medio, ya que, activan otros microorganismos alrededor de estas en estado de fermentación (Higa 2013).

Resultados Parámetros de Calidad de Agua

Todos los parámetros evaluados en el experimento tienen relación con el incremento o disminución en los niveles de nitrógeno amoniacal ionizado en el agua. Tanto el pH como la temperatura del agua se mantuvieron en rangos óptimos para el desarrollo; sin embargo, los parámetros de nitrato y oxígeno disuelto mostraron irregularidades en todos los tanques experimentales.

Cuadro 3

Medición de parámetros de calidad del agua en tanques de tilapia gris (Oreochromis niloticus) tratados bajo un sistema biofloc

Tratamientos	Nitrato (mg/L)	Temperatura (°C)	O.D. (mg/L)	pH
Control	83.75 ± 66.58	26.63 ± 0.85	5.66 ± 0.65	6.95 ± 0.54
PROB	102.5 ± 63.95	26.90 ± 0.83	5.69 ± 0.66	6.73 ± 0.69
MMO	91.25 ± 55.58	26.65 ± 0.84	5.77 ± 0.65	6.72 ± 0.70
Probabilidad	0.0130	0.1971	0.5810	0.2854
C.V.(%)	18.07	2.03	37.56	5.79

Nota. O. D= Oxígeno Disuelto. Probabilidad ≤ 0.05 = Diferencia significativa. C.V: Coeficiente de Variación

El Cuadro 3 demuestra que los niveles de nitrato permanecieron altos en el transcurso del ensayo. Se esperaba que a mayores niveles de amonio hubiese menores concentraciones de nitrato, por el proceso de nitrificación esperado dentro del agua; sin embargo, los niveles de NO₃ permanecieron arriba de 80 ppm desde el día 8 en todos los tratamientos y a partir de ahí solo subieron hasta llegar a 160 ppm. Según Hrubec et al. (1996), niveles de nitrato mayores a 200 ppm pueden causar daños hematológicos como incrementos de glóbulos rojos inmaduros que llegan a causar anemia, y además efectos inmunológicos, ya que, a altas concentraciones de nitrato hay una mayor producción de anticuerpos.

Las concentraciones más altas de nitrato no superaron las 160 ppm por lo que no se considera tóxico para las tilapias. Los niveles de nitrato mostraron diferencia significativa en los tratamientos medidos resultando en una mayor cantidad de nitratos en el tratamiento con probióticos comerciales. Esto puede explicarse por la falta de bacterias desnitrificadoras que convierten el NH₃ a nitrógeno gaseoso mediante procesos anaeróbicos (Iñón 2006).

La temperatura se mantuvo en el rango óptimo para un eficiente ritmo de crecimiento de tilapia que oscila entre 25 y 30 °C (Vásquez-Salazar et al. 2014). No existió diferencia significativa entre tratamientos, ya que, como el experimento fue realizado dentro de un invernadero, las condiciones ambientales fueron controladas.

El oxígeno disuelto tampoco mostró diferencia significativa debido al sistema de oxigenación que se mantuvo funcionando con regularidad durante todo el experimento. Los resultados fueron

óptimos en base a la demanda de oxígeno de los microorganismos suministrados en el agua. Según Tidwell (2012), en producciones intensivas con altas densidades de organismos existe mayor abundancia de: heces fecales, alimento no consumido, y otras fuentes de carbono orgánico que privan la dominancia de organismos fotoautótrofos en el medio; sin embargo, favorece al incremento de microorganismos heterótrofos que al igual que cualquier otro organismo, necesitan oxígeno para poder reproducirse. Es por esto, que en sistemas con altas producciones donde abundan principalmente bacterias aerobias obligadas como las bacterias nitrificantes, es necesario que los niveles de oxígeno disuelto sean mayores a 5 mg/L.

Los niveles de pH se mantuvieron en niveles óptimos para el desarrollo y crecimiento de la tilapia gris. El rango deseable para los peces fluctúa entre 6.5 a 8.5, ya que, al estar en estos valores, el pH del agua coincide con el de la sangre del animal. Los valores de pH en el estudio se mantuvieron estables sin mostrar diferencia significativa entre tratamientos, los tanques controles fueron los que se mantuvieron con los niveles de pH más altos durante el experimento. Esto permitió que existan mayores niveles de nitrógeno amoniacal ionizado que en los otros tratamientos, ya que, al haber un pH cercano a 7, va a predominar la forma amoniacal NH_4^+ (Kubitza 2017).

Resultados en Producción de Tilapia Gris

Se midieron tres diferentes factores para el análisis de la producción y desarrollo del ensayo. La sobrevivencia del pez que determina si las condiciones impuestas en el agua son óptimas para que el animal viva. La biomasa que determina el peso de producción que hay en una pesca, y por último el índice de conversión alimenticia que mide la eficiencia del pez en convertir el alimento suministrado en masa corporal (Hinostroza Canturin 2017). Los resultados se mostraron positivos obteniendo índices de sobrevivencia bastante altos en todos los tratamientos y un índice de conversión alimenticia apto para una producción comercial.

Cuadro 4

Sobrevivencia de tilapia gris (Oreochromis niloticus) bajo el sistema de biofloc con la evaluación de microorganismos de montaña.

Tratamientos	Media y D.E.
Control	0.92 ± 0.04
PROB	0.93 ± 0.09
MMO	0.95 ± 0.04
Probabilidad	0.8017
C.V. (%)	15.49

Nota. PROB: Probióticos. MMO: microorganismos de montaña. Probabilidad ≤ 0.05 = Diferencia significativa

Se obtuvo una tasa de sobrevivencia óptima en todos los tanques de los diferentes tratamientos. En las unidades experimentales tratadas con microorganismos de montaña fue en donde se encontraron mayores niveles de sobrevivencia; esto debido a que en estos tanques se encontraron menores niveles de nitrógeno amoniacal que produjo una reducción en los niveles de estrés en los peces ocasionando una menor tasa de mortalidad (Montaño Arias y Sánchez-Yañez 2014).

Cuadro 5

Comparación de los niveles de biomasa e índice de conversión de conversión alimenticia en los diferentes tratamientos evaluados en 28 días de experimento

Tratamientos	Biomasa	ICA
Control	1265.10 ^a ± 77.97	0.88 ^a ± 0.10
PROB	1216.65 ^{ab} ± 67.91	0.97 ^{ab} ± 0.12
MMO	1076.73 ^b ± 68.07	1.29 ^b ± 0.24
Probabilidad	0.0422	0.0508
C.V. (%)	6.03	15.91

Nota. PROB: Probióticos. MMO: microorganismos de montaña. ICA: Índice de conversión alimenticia. ^{abc}= Medias con letras diferentes en la columna indican diferencia entre tratamiento (P ≤ 0.05)

Los resultados muestran una mejor producción en cuanto a masa y mejor índice de conversión alimenticia en los controles. Sin embargo, cabe recalcar que los resultados obtenidos en los tratamientos con probióticos comerciales y microorganismos de montaña son muy prometedores en el ámbito comercial. Esto ya que los rangos óptimos para una producción factible de tilapia oscilan entre 1.2 a 1.5 kilogramos de alimento necesarios para convertir a 1 kg de carne (Pineda 2012). En los

tanques con probióticos comerciales, el índice de conversión alimenticia fue menor a lo que estipula Pineda en su investigación, lo que significa que los peces requirieron menos alimento suministrado para convertirlo en masa corporal. Esto se debe a que los flóculos formados en el sistema aprovechan la fuente de nitrógeno absorbida en el amonio presente sintetizándola para convertirse en fuente de proteína que puede ser aprovechada por los peces (Hernández Mancipe et al. 2019).

Conclusiones

La solución líquida de microorganismos de montaña logró mantener los niveles de nitrógeno amoniacal ionizado en óptimas condiciones para la producción de tilapia gris obteniendo mejores resultados que los probióticos comerciales.

Los tratamientos evaluados en el estudio no afectaron las propiedades fisicoquímicas del agua manteniendo todos los parámetros de calidad de agua en rangos ideales para la supervivencia y desarrollo de la tilapia gris.

El rendimiento en cuanto a biomasa y conversión alimenticia de la tilapia gris fue superior en las unidades experimentales sin tratamientos aplicados; sin embargo, todos los tratamientos mostraron un desarrollo óptimo de crecimiento y acrecentamiento en los animales estudiados.

Recomendaciones

Hacer más estudios sobre los organismos dentro de los microorganismos de montaña para identificar las bacterias benéficas presentes que actúan en la disminución de amonio ionizado en el agua.

Cuantificar el número de bacterias en la muestra para determinar el número de unidades formadoras de colonia dentro en los microorganismos de montaña.

Hacer estudios en base al aporte proteico por parte de los flóculos hacia la tilapia gris bajo un sistema biofloc.

Referencias

- Agüero Murillo AC. 2009. Producción de bacterias fijadoras de nitrógeno (*Azotobacter*, *Bacillus* y *Pseudomonas*); en Medio Líquido a base de Melaza, para su aplicación en el cultivo de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) [Tesis]. [sin lugar]: Instituto Tecnológico de Costa Rica. 67 p; [consultado el 21 de jun. de 2022]. <https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/553/TESIS.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Ahmad I, Babitha Rani AM, Verma AK, Maqsood M. 2017. Biofloc technology: an emerging avenue in aquatic animal healthcare and nutrition. *Aquacult Int.* 25(3):1215–1226. doi:10.1007/s10499-016-0108-8.
- Bioacuafloc. 2018. ¿Cómo acaba el Biofloc con el amonio, los nitritos y los nitratos del agua? Bioacuafloc; [consultado el 16 de jun. de 2022]. <https://www.bioacuafloc.com/biofloc/como-acaba-el-biofloc-con-el-amonio-los-nitritos-y-los-nitratos-del-agua/>.
- Bioacuafloc. 2018. ¿Qué es el BIOFLOC? Aquí explicamos en detalle de qué se trata esta tecnología. [sin lugar]: [sin editorial]; [actualizado el 16 de abr. de 2020; consultado el 14 de jun. de 2022]. <https://www.bioacuafloc.com/biofloc/que-es-biofloc/>.
- Boyde C. 2001. *Methods for improving shrimp farming in Central America*. Managua: Universidad Centroamericana, Centro Investigación de Ecosistemas Acuáticos. 292 p. ISBN: 999243614X.
- Bustamante M. 2014. Producción de Microorganismos de Montaña para el Desarrollo de una Agricultura Orgánica; [consultado el 8 de jun. de 2022]. https://estaticos.qdq.com/swdata/files/950/950904418/CIn_3256.pdf.
- Campo Martínez AdP, Acosta Sánchez RL, Morales Velasco S, Prado FA. 2014. Evaluación de microorganismos de montaña (mm) en la producción de acelga en la meseta de Popayán. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA.* 12(1):79–87. spa. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6117842>.
- Corrales LC, Antolinez Romero DM, Bohórquez Macías JA, Corredor Vargas AM. 2015. Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *nova*; [consultado el 19 de jun. de 2022]. 13(24):55. <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v13n24/v13n24a06.pdf>. doi:10.22490/24629448.1717.
- Crab R, Defoirdt T, Bossier P, Verstraete W. 2012. Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges. *Aquaculture.* 356-357:351–356. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.04.046.
- De Castro N. 2001. *Morfología y estructura de los microorganismos* [Catedra de Microbiología]. Venezuela: Universidad Central de Venezuela, Facultad de Farmacia. 34 p; [consultado el 4 de jul. de 2022]. http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/08_Tema_2_morfologia.pdf.
- de Los Angeles M. 2012. *Microorganismos Guía Técnica 4*; [consultado el 5 de jun. de 2022]. https://www.jica.go.jp/project/elsalvador/0603028/pdf/production/vegetable_04.pdf.
- Del Monroy-Dosta MC, Lara-Andrade R de, Castro-Mejía J, Castro-Mejía G, Coelho-Emerenciano MG. 2013. Composición y abundancia de comunidades microbianas asociadas al biofloc en un cultivo de tilapia. *Rev. biol. mar. oceanogr.* 48(3):511–520. doi:10.4067/S0718-19572013000300009.

- Díaz Burgos TC, Collantes Chules L. 2019. Determinación de la efectividad del uso de microorganismos de montaña para el tratamiento de las aguas residuales in vitro en el caserío de Chontamuyo. Tarapoto: Universidad Peruana Unión-filial Tarapoto. https://repositorio.upeu.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12840/1944/Tito_Tesis_Licenciatura_2019.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
- Emerenciano MGC, Martínez-Córdova LR, Martínez-Porchas M, Miranda-Baeza A. 2017. Biofloc Technology (BFT): A Tool for Water Quality Management in Aquaculture. [sin lugar]: [sin editorial]. <https://www.intechopen.com/chapters/53211>.
- F. Kubitzka. 2011. Cultivo de tilapias en sistemas con bioflocos. Panorama da Acuicultura; [consultado el 13 de jun. de 2022]. https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/acuicultura/publicaciones/_archivos/000000_Desarrollos%20Acu%C3%ADcolas/130808_Cultivo%20de%20tilapias%20en%20sistemas%20con%20bioflocos.pdf.
- Flores P. 2002. Manual de crianza tilapia. Argentina: Nicovita; [consultado el 20 de jun. de 2022]. 49 p. <http://www.industriaacuicola.com/biblioteca/Tilapia/Manual%20de%20crianza%20de%20tilapia.pdf>.
- Hernández Mancipe LE, Londoño Velez JI, Hernández García KA, Torres Hernández LC. 2019. Los sistemas biofloc: una estrategia eficiente en la producción acuícola. Ces. Med. Vet. Zootec. 14(1):70–99. doi:10.21615/cesmvz.14.1.6.
- Higa T. 2013. Reproducción de Microorganismos de Montaña. <http://ingenieroambiental.com/index.php?pagina=811>.
- Hinostroza Canturín MA. 2017. “Evaluación de dietas comerciales en el crecimiento, supervivencia, conversión alimentaria, índice corporal y resistencia al estrés para alevinos de Tilapia de Nilo (*Oreochromis niloticus*) en condiciones del laboratorio.”. [sin lugar]: Universidad Nacional del Callao, PE. spa. <http://repositorio.unac.edu.pe/handle/20.500.12952/2739>.
- Hrubec T, Smith S, Robertson J. 1996. Nitrate Toxicity: A Potential Problem of Recirculating Systems. [sin lugar]: Department of Biomedical Science and Pathobiology. https://www.researchgate.net/publication/267377185_Nitrate_Toxicity_A_Potential_Problem_of_Recirculating_Systems.
- Ingle de la Mora, Genoveva, Villareal-Delgado EL, Arredondo-Figueroa JL, Ponce-Palafox JT, Barriga-Sosa, Irene de los A. sep. 2003. Evaluación de algunos parámetros de calidad del agua en un sistema cerrado de recirculación para la acuicultura, sometido a diferentes cargas de biomasa de peces [Artículo]. Av. San Rafael Atlixco 186, Colonia Vicentina, Apartado Postal 55-535, Iztapalapa, 09340, México, D. F.: Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Instituto Nacional de la Pesca. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0188-88972003000400001&script=sci_arttext.
- Iñón N. 2006. Ciclo del nitrógeno: Fijación Biológica del Nitrógeno. [sin lugar]: [sin editorial]; [consultado el 21 de jun. de 2022]. 74 p. <http://www.iib.unsam.edu.ar/archivos/docencia/licenciatura/biotecnologia/2017/QuimicaBiol/1495120476.pdf>.
- Khanjani M.H. 2020a. Biofloc system applied to Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) farming using different carbon sources: Growth performance, carcass analysis, digestive and hepatic enzyme activity. Iran: Iranian Journal of Fisheries Sciences. <http://jifro.ir/article-1-4467-fa.pdf>.
- Khanjani M.H. 2020b. Biofloc system applied to Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) farming using different carbon sources: Growth performance, carcass analysis, digestive and hepatic enzyme activity. Iran: Iranian Journal of Fisheries Sciences. <http://jifro.ir/article-1-4467-fa.pdf>.

- Kubitza F. 2017. El parámetro de calidad del agua a menudo ignorado: pH. [sin lugar]: Global Seafood Alliance; [actualizado el 15 de ene. de 2018; consultado el 22 de jun. de 2022]. <https://www.globalseafood.org/advocate/el-parametro-de-calidad-del-agua-a-menudo-ignorado-ph/>.
- La Acuicultura CT de. 2017. Alimentación optimizada para tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) de senegal. [sin lugar]: [sin editorial]; [consultado el 15 de jun. de 2022]. 48 p. <https://www.ong-aida.org/wp-content/uploads/2017/06/Informe-Alimentaci%C3%B3n-Tilapia-v2.pdf>.
- Li H-B, Singh RK, Singh P, Song Q-Q, Xing Y-X, Yang L-T, Li Y-R. 2017. Genetic Diversity of Nitrogen-Fixing and Plant Growth Promoting *Pseudomonas* Species Isolated from Sugarcane Rhizosphere. *Front Microbiol.* 8:1268. eng. doi:10.3389/fmicb.2017.01268.
- Molina E, Alcantar JG, Ramos HN. n.d. Microorganismos: Guía Técnica 4. El Salvador: Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal; [consultado el 17 de jun. de 2022]. 4 p. https://www.jica.go.jp/project/elsalvador/0603028/pdf/production/vegetable_04.pdf.
- Montaño Arias NM, Sánchez-Yañez JM. 2014. Nitrification in tropical soils linked to microbial competition: a model based on Lotka-Volterra theory. *ECOS*; [consultado el 8 de jun. de 2022]. 23(3):98–104. <https://www.redalyc.org/pdf/540/54032954013.pdf>. doi:10.7818/ECOS.2014.23-3.13.
- Mora X. 2012. Diferenciando bacterias Gram+ y Gram-. [sin lugar]: Selecciones avícolas; [consultado el 4 de jul. de 2022]. 3 p. <https://seleccionesavicolas.com/pdf-files/2012/2/6536-diferenciando-bacterias-gran-y-gram.pdf>.
- Pérez Muñoz JA. 2021. Evaluación del proceso de nitrificación en un sistema de fangos activos mediante técnicas respirométricas y su relación con bioindicadores y variables de proceso [Tesis de master]. Departamento de Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente: Universitat Politècnica de València. 11 p; [consultado el 26 de jun. de 2022]. <https://cidta.usal.es/cursos/bioindicacion/bibliografia/u1d2.pdf>.
- Pineda M. 2012. FCA: Calcular alimento para tilapias... Sinaloa, Mexico: Piscicultura Global; [actualizado el 22 de jun. de 2022; consultado el 22 de jun. de 2022]. <https://www.pisciculturaglobal.com/serie-alimento-para-tilapias-calculando/>.
- Rajkumar M, Pandey PK, Aravind R, Vennila A, Bharti V, Purushothaman CS. 2016. Effect of different biofloc system on water quality, biofloc composition and growth performance in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquac Res.* 47(11):3432–3444. doi:10.1111/are.12792.
- Rodríguez N, Tafur Z. 2014. Producción de Microorganismos de Montaña para el Desarrollo de una Agricultura Orgánica. Urbanización Santa Lucia, Tarapoto, San Martín - Perú: Universidad Peruana Unión-filial Tarapoto, Centro de Investigación en Ingeniería Ambiental. 1 p; [consultado el 20 de jun. de 2022]. https://estaticos.qdq.com/swdata/files/950/950904418/CIn_3256.pdf.
- Sara Cristina Chaverra Garcés. 2017. Efectos del biofloc sobre los parámetros de crecimiento de juveniles de cachama blanca *Piaractus brachypomus*. Colombia: Universidad CES. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=CO2021A05979>.
- Shaad N.W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, Third Edition. N. W. Shaad, J. B. Jones and W. Chun (eds). 22 × 28 cm, 373 pp. St Paul, USA: American Phytopathological Society Press [<http://www.scisoc.org>], 2001. US\$55. ISBN 089054 263. *Plant Pathology.* 50(6):812–814. doi:10.1046/j.1365-3059.2001.00635.x.

- Tidwell JH. 2012. *Aquaculture Production Systems*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell. ISBN: 9781118250105.
- Vásquez-Salazar RD, Pupo-Urrutia AC, Jiménez-Aguas HJ. 2014. Sistema energéticamente eficiente y de bajo costo para controlar la temperatura y aumentar el oxígeno en estanques de cultivo de alevines de tilapia roja. *Fac. Ing*; [consultado el 21 de jun. de 2022]. 23(36):9. <http://www.scielo.org.co/pdf/rfing/v23n36/v23n36a02.pdf>. doi:10.19053/01211129.2708.
- Zapata Lovera KP, BRITO LO, LIMA PCM de, VINATEA Arana LA, GALVEZ AO, CÁRDENAS JMV. 2017. Cultivo de alevines de tilapia en sistema biofloc bajo diferentes relaciones carbono/nitrógeno. *Bol. Inst. Pesca*. 43(3):399–407. doi:10.20950/1678-2305.2017v43n3p399.