

Evaluación de dos medios bacterianos aceleradores del proceso de nitrificación en filtros biológicos de cultivos marinos

Marc Puigcerver
Lluís Tort

Universitat Autònoma de Barcelona. Unitat de Fisiologia Animal. Facultat de Ciències
08193 Bellaterra (Barcelona), Spain

Manuscrito recibido en mayo de 1996

Resumen

Se evalúan dos medios bacterianos aceleradores del proceso de nitrificación en un sistema de circulación de agua cerrado. Como sustrato de crecimiento de las bacterias se estableció una carga de arena viva sobre filtros semihúmedos y como productores de amonio 17 doradas (*Sparus aurata*) por tanque de cultivo de 400 L. Los parámetros físico-químicos fueron analizados y registrados del mismo modo para cada uno de los grupos. Los medios bacterianos evaluados fueron Alken Clear Flo 1200 y Biozyme. El tiempo para completar la oxidación del amonio no se redujo en ninguno de los dos tratamientos, pero disminuyó el tiempo para completar la oxidación de los nitritos en Biozyme y aumentó en Alken Clear Flo. La media de concentración basal más baja de amonio y nitrito se obtiene en el tanque tratado con Biozyme seguido del tratado con Alken Clear Flo y el tanque control.

Palabras clave: acuicultura, filtro biológico, componentes catabólicos, bacterias heterotrofas, *Nitrobacter*, *Nitrosomonas*, bacterias primarias.

Abstract. *Evaluation of two commercial nitrification accelerators in seawater biological filters*

Commercial bacterial formulations were added to new seawater tanks with individual recirculating systems, and their ability to accelerate the establishment of nitrification was compared with an untreated control. Crushed shells were used as filter media in biological trickle filters and 17 mediterranean seabreams (*Sparus aurata*) were introduced in the 400 L tanks as ammonia producers. Physico-chemical parameters were monitored and recorded with the same procedure for each of the experimental groups. The time for effective ammonia oxidation was not reduced in any of both treatments, but time of nitrite reduction diminished for Biozyme and increased in Alken Clear Flo. Baseline values for ammonia and nitrite through the experiment were lower for Biozyme, followed by Alken Clear Flo 1200 and control tank.

Key words: aquaculture, biological trickle filter, catabolic components, fungi, heterotrophic microbes, nitrobacter, nitrosomonas, primary bacteria.

Introducción

Aunque en la actualidad numerosas empresas de acuicultura tienen beneficios con la producción de peces en sistemas de recirculación de agua, muchos acuicultores ven un riesgo incontrolado en los sistemas de cultivo cerrado (Reitman, 1989). En este sentido, Miller & Libey (1984) comentaron que a pesar de que los especialistas llevan veinte años construyendo sistemas de recirculación, el éxito de éstos ha sido escaso. Uno de los mayores problemas de estos sistemas es el filtro biológico, el elemento más complejo y menos conocido de los circuitos cerrados. Mientras no exista un mayor conocimiento sobre la dinámica de los filtros biológicos, éstos serán ineficientemente utilizados en los sistemas de recirculación y la acuicultura en sistemas cerrados se mantendrá como una opción insegura (Kim *et al.*, 1987). No obstante, la utilización de filtros biológicos se encuentra actualmente ampliamente difundida, y en condiciones de mala calidad de los recursos hídricos es una opción comercial a considerar (Stellmacher, 1981).

Tradicionalmente, los filtros biológicos se basan en el crecimiento de poblaciones de bacterias nitrificantes quimiolitotróficas para oxidar el amonio a nitratos en un doble proceso secuencial conocido como *nitrificación* (Wheaton, 1977; Spotte, 1979). El amonio ($\text{NH}_4\text{-N}$) es el principal producto de excreción tóxico para los propios peces. El amonio y su forma oxidada, los nitritos, son factores limitantes en los cultivos marinos en circuitos cerrados y deben ser retirados para mantener el medio en buenas condiciones. Las bacterias nitrificantes se encuentran suspendidas en el agua y sobre las superficies de los sistemas de cultivo marinos, y en especial en la carga de los filtros biológicos (Wickins, 1983), especialmente apropiada para el desarrollo microbiano. El primer grupo de bacterias (*Nitrosomonas sp.*) convierte el amonio en nitrito y el segundo (*Nitrobacter sp.*) convierte el nitrito en nitrato, que se acumula en el cultivo (Kawai *et al.*, 1964; Coll, 1991).

Existen cinco fases diferenciadas en la vida de un filtro biológico: ausencia de nitrificación (alta concentración de amonio), activación (alta concentración de nitritos), madurez, senilidad e inactivación. La fase de madurez es la ideal para la buena marcha del sistema. Un filtro biológico se considerará maduro cuando las poblaciones microbianas oxiden rápidamente todos los aportes de amonio a nitratos, sin apenas aparición de los nitritos intermedios (Wortman & Wheaton, 1991).

El sistema tradicional para acelerar la madurez de un nuevo filtro consiste en mezclar la carga de éste, con elementos de filtración de un sistema similar en el que ya estén las colonias bacterianas establecidas (Carmignani & Bennett, 1977; Bower & Turner, 1981; Miller & Libey, 1984). De todos modos, este sistema puede no ser adecuado en ocasiones, al poder transferir agentes patógenos u otros organismos indeseables. Ante esta posibilidad es prudente el uso de microorganismos específicos, crecidos en medios de cultivo externos, para acelerar la madurez de un filtro biológico.

En este artículo se describe la efectividad de dos fórmulas bacterianas comerciales que aumentan la velocidad de establecimiento de la capacidad oxidativa máxima de amonio y nitritos de las diferentes poblaciones bacterianas de los sistemas cerrados de cultivos marinos.

Material y métodos

El experimento se llevó a cabo en tres tanques cilíndrico-cónicos de fibra de vidrio de 400 L de capacidad. La temperatura ambiental media era de $17.9 \pm 1.7^\circ\text{C}$. Cada tanque contenía un filtro biológico semihúmedo con aproximadamente 6250 cm^3 de arena viva comercial. El flujo (600 l/h) de agua fue constante e igual para cada uno de los tanques durante todo el experimento. Se escogió la arena viva por su fácil disponibilidad así como por su capacidad tamponadora. Para minimizar contaminaciones preexperimentales, todo el material utilizado fue previamente esterilizado.

Los productos evaluados fueron un medio bacteriano líquido, Alken Clear Flo 1200 (Aquaculture Supply, Geneva), y un medio bacteriano liofilizado, Biozyme (Aquarium Products, Maryland). Los dos productos contienen bacterias heterótrofas: *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. stutzeri*, *P. fluorescens*, *Escherichia hermannii*, que se encargan de reducir el exceso de materia orgánica. Además, Alken Clear Flo contiene *Nitrosomonas sp.* y *Nitrobacter sp.* que reducen los compuestos nitrogenados tóxicos en nitratos. Biozyme se compone de bacterias primarias, hongos y enzimas catabólicos, sin presencia de *Nitrosomonas sp.* ni *Nitrobacter sp.* (Aquarium Products, 1996). Los medios fueron introducidos al inicio del experimento y posteriormente una vez por semana en cada tanque, siguiendo las instrucciones de uso del fabricante (1 ppm de Alken Clear Flo 1200 y 1/38 cápsula/litro de Biozyme). El tercer tanque fue utilizado como control.

Inmediatamente después de la introducción de los respectivos productos se introdujeron 17 doradas (*Sparus aurata*) con un peso medio de $260 \pm 40 \text{ g}$ en cada uno de los tanques. Los peces fueron alimentados *ad libitum* (media de 1,21% del peso total diario) al menos una vez al día con un pienso comercial de la casa Gallina Blanca Purina (DLEX 4). Se tomaron muestras de agua antes de la adición de los aceleradores y después de su introducción al menos tres veces por semana. Se analizaron 10 ml de agua por tanque y día para el cálculo de amonio total ($\text{NH}_4\text{-N}$) mediante la reacción de Berthelot y los nitritos ($\text{NO}_2\text{-N}$) según la reacción de Griess y las muestras resultantes leídas en un espectrofotómetro Kontron Uvikon 810. El filtro se consideró maduro tras la aparición del pico de concentración de nitrógeno y su establecimiento alrededor de $0.1 \text{ mg NH}_4\text{-N/l}$ y $0.05 \text{ mg NO}_2\text{-N/l}$. Todas las muestras fueron analizadas inmediatamente después de su recogida.

Durante el período experimental, la salinidad se mantuvo sobre el 40% sustituyendo el agua evaporada por agua desionizada. El pH fue analizado regularmente pero no se corrigió en ningún momento. La excreción de dióxido de carbono produce la acidificación del agua (Lin & Randall, 1989). A pesar de compensar esta acidificación con arena viva como substrato filtrante, el pH medio se mantuvo siempre a niveles inferiores a la saturación de carbonato cálcico. El pH inicial fue de 8.38 y los valores finales oscilaban entre 7.43 y 7.55. La concentración de oxígeno en agua fue en todo momento superior a 6 mg/l.

Resultados

Progresivamente, y debido a la excreción nitrogenada de las doradas, la concentración de amonio aumentó en el sistema hasta alcanzar un nivel máximo. De acuerdo con lo esperado, a partir de este pico la concentración de amonio fue disminuyendo progresivamente, aumentando simultáneamente la concentración de nitritos. Tras alcanzar el nivel máximo de concentración de nitritos se fue observando un aumento en la concentración de nitratos simultáneamente a una progresiva reducción de los nitritos.

El tiempo para completar la oxidación de amonio (4 días), no se redujo en ninguno de los dos tratamientos respecto del tanque control (figura 1). Por el contrario, el tiempo para completar la oxidación de los nitritos, disminuyó en 15 días (60%) con Biozyme y aumentó en 5 días (20%) con Alken Clear Flo (figura 2) respecto a las tres semanas para el establecimiento del tanque control. El pico de concentración de nitritos se produjo aproximadamente un 45% antes en los tanques tratados que en el tanque control, pero el nivel basal de nitritos se retrasó también en el caso de Alken Clear Flo.

El primer pico de concentración máxima de amonio y nitritos para cada uno de los tratamientos fue, respectivamente: Alken Clear Flo (2.265 y 0.747 ppm),

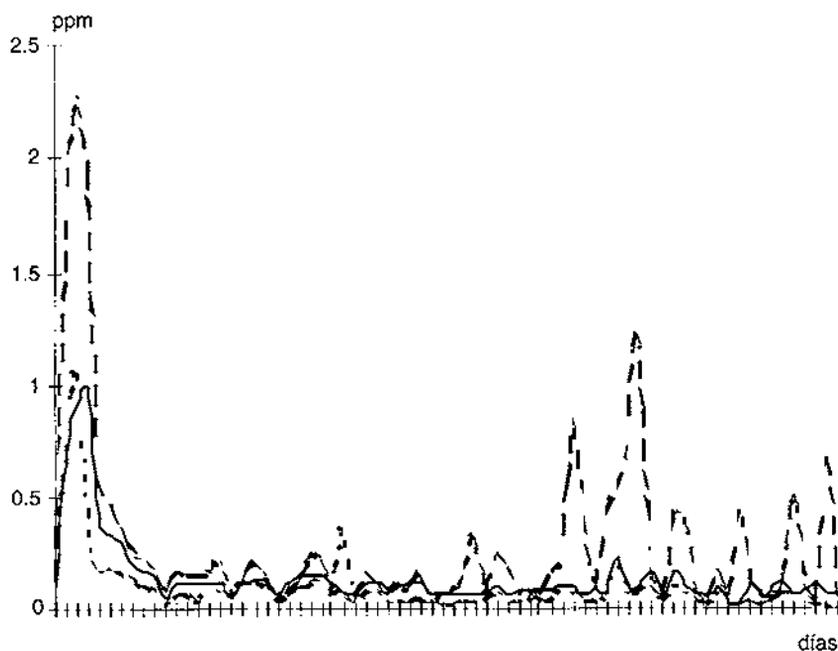


Figura 1. Evolución de la concentración de amonio total respecto al tiempo para cada uno de los tanques. Tanque control, línea continua; Alken Clear Flo 1200, línea discontinua, y Biozyme, línea punteada.

Byozyme (1.04 y 0.109 ppm) y el tanque control (0.996 y 0.2505 ppm). Tras el establecimiento de la capacidad oxidativa máxima de amonio, se van observando pequeños picos de concentración total de éste en el tanque tratado con Alken Clear Flo, mientras que en los otros dos estos picos no aparecen. Estos picos secundarios se dan los días 49 (0.841 mg/l), 55 (1.235 mg/l), 58 (0.41 mg/l), 64 (0.438 mg/l), 69 (0.493 mg/l) y 72 (0.668 mg/l). Los picos pueden deberse a una prematura senilidad del filtro producida por el colapso del sustrato filtrante y posterior recuperación (Kim *et al.*, 1987). La concentración media de amonio \pm varianza del tanque tratado con Biozyme (0.09 ± 0.02 ppm) es la más baja, y significativamente diferente de la obtenida en el tanque tratado con Alken Clear Flo (0.14 ± 0.03 ppm; T-Student: $P \leq 3,48 \cdot 10^{-6}$, $n = 72$) y de la obtenida del tanque control (0.28 ± 0.17 ppm; T-Student: $P \leq 1,23 \cdot 10^{-6}$, $n = 72$). También aparecen diferencias significativas entre la concentración media del tanque tratado con Alken Clear Flo y el tanque control (T-Student: $P \leq 7,09 \cdot 10^{-5}$, $n = 72$). En cuanto al nivel de nitritos, no se observan picos de concentración en los tanques tratados, mientras que en el tanque control los días 44 y 45 se detecta un pico secundario de concentración mayor que el primario: 0.897 versus 0.319 mg/l (figura 2). Se observan diferencias significativas en la concentración media \pm varianza de nitritos en el tanque tratado con Biozyme ($0.05 \pm 4 \cdot 10^{-4}$ ppm) respecto al tanque con-

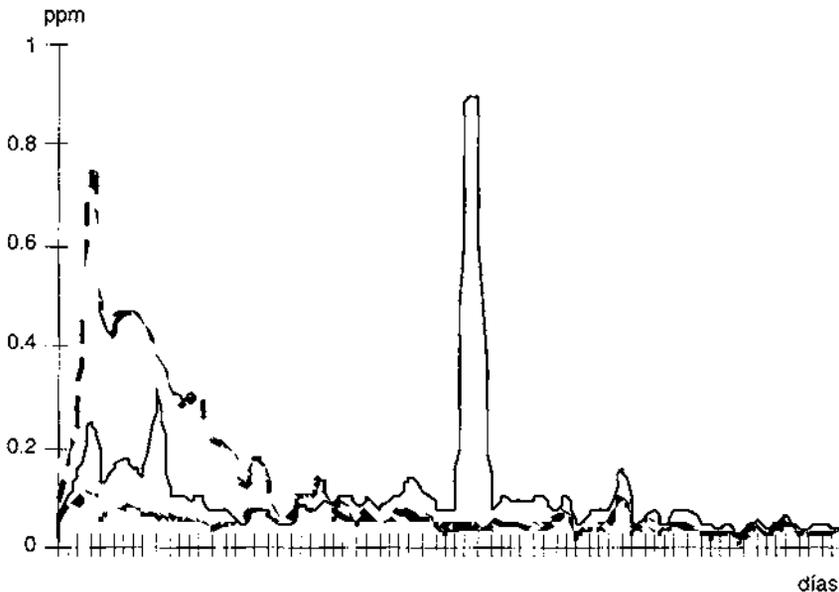


Figura 2. Evolución de la concentración de nitritos respecto al tiempo para cada uno de los tanques. Tanque control, línea continua; Alken Clear Flo 1200, línea discontinua, y Biozyme, línea punteada.

trol (0.11 ± 0.02 ppm; T-Student: $P \leq 0.0002$, $n = 72$) y el tratado con Alken Clear Flo (0.11 ± 0.02 ppm; T-Student: $P \leq 4,34.10^{-5}$, $n = 72$). Sin embargo, no hay diferencia significativa en la concentración media de amonio entre el tanque control y el tanque tratado con Alken Clear Flo (T-Student: $P \leq 0,39$, $n = 72$).

Discusión

La sucesión de las diferentes fases del proceso de nitrificación ha seguido un desarrollo normal en los tres tanques experimentales: al pico de amonio le sucede el pico de nitritos, los cuales dan lugar a la acumulación de nitratos (Azpiroz-Lasarte *et al.*, 1995).

Comparar directamente los resultados obtenidos en el presente trabajo con otros estudios sobre el establecimiento de filtros es difícil debido al gran número de variables implicadas (tipo de filtro biológico, substrato filtrante, volumen de filtración, temperatura, salinidad, especie y densidad de carga), tal como han demostrado Malone & Manthe (1985). Por lo que respecta a la velocidad de establecimiento del filtro bacteriano, los parámetros más influyentes son la temperatura (Vandenbyllaardt & Foster, 1992), la profundidad del substrato filtrante (Siddall, 1974; Miller & Libey, 1984) y posiblemente la salinidad (aunque sobre ésta no existe bibliografía), siempre que el oxígeno y el pH se mantengan por encima de los niveles críticos. La superficie total del material filtrante no tiene ningún efecto en el tiempo de acondicionamiento (Bower & Turner, 1981; Manthe & Malone, 1987): el establecimiento del filtro en este estado se encuentra limitado por la producción de bacterias nitrificantes y no por la superficie disponible. Una vez los filtros se encuentran establecidos, además de los parámetros citados, la superficie total de material influye sobre la cantidad de compuestos nitrogenados que pueden ser procesados y, en consecuencia, influye sobre la carga total teórica de los tanques en las condiciones dadas. Los resultados del tanque control en el presente estudio se asemejan a los obtenidos por Kim *et al.* (1987); Vandenbyllaardt & Foster (1992), y Azpiroz-Lasarte (1995). Éstos necesitaron de dos a tres semanas para establecer el filtro biológico, en cultivos de carpas, carpines, híbridos de tilapia, peces gato, carpas herbívoras y truchas arco-iris, especies de agua dulce mantenidas a una temperatura entre 7 y 28 °C y valores de oxígeno entre 2 y 5.7 mg/l. Manthe *et al.* (1984) y Malone & Manthe (1985) necesitaron entre 30 y 37 días para acondicionar los filtros de tanques en cultivos de cangrejo azul a temperaturas entre 12 y 23 °C y una salinidad del 4%. Hirayama (1974), Bower & Turner (1981) y Mcvel & Chamroux (1981) necesitaron entre 30 y 100 días para establecer diferentes modelos de filtros biológicos, alimentados directamente con sales amónicas. La velocidad de establecimiento de dichos filtros es más lenta a pesar de la teórica ventaja de carecer de metabolitos orgánicos. Estos metabolitos inhiben el crecimiento de las bacterias nitrificantes y favorecen el desarrollo de bacterias heterótrofas competidoras por el substrato (Kawai *et al.*, 1964), que representan, en condiciones de cultivo industrial, el 90% de la población bacteriana total. Serán necesarios estudios ulteriores que comparen el desarrollo bacteriano en condiciones de laboratorio respecto a las condiciones

de cultivo para entender completamente la gran variabilidad de resultados presentes en la bibliografía.

Las bacterias nitrificantes son difíciles de cultivar por su tendencia a formar agregados incorporados en conjuntos viscosos sobre superficies sólidas y por su lento crecimiento (Harremoes, 1982; Haug & McCarty, 1972); no forman endosporas y al género *Nitrobacter* no se le conocen estadios de resistencia (Buchanan & Gibbons, 1974). Manthe & Malone (1987) comprobaron que la adición de bacterias nitrificantes no presentaba un efecto significativo respecto al tiempo de acondicionamiento de los filtros biológicos, aduciendo posibles problemas de *shock* bacteriano inducido por la poca adecuación del cultivo bacteriano a un tipo de filtración específico. Ante estos inconvenientes, no parece extraño que de los medios evaluados, el más efectivo para reducir compuestos nitrogenados sea una preparación comercial sin *Nitrosomonas sp.* ni *Nitrobacter sp.* Por lo tanto, parece que la composición de Biozyme libre de *Nitrosomonas sp.* y *Nitrobacter sp.*, contiene un equilibrio entre cepas bacterianas, hongos y enzimas catabólicas, mucho más efectivo que la formulación de Alken Clear Flo. De todos modos, a pesar de lo novedoso del producto, la reducción de amonio a nitratos se produce secuencialmente a los tres y cuatro días respectivamente (figuras 1 y 2). El menor rendimiento de Alken Clear Flo puede ser debido a que la temperatura óptima de crecimiento se encuentre por encima de la media de las condiciones térmicas utilizadas en este estudio (18°C). Aunque el producto no ofrece indicaciones al respecto, según Knowles *et al.* (1965) la temperatura óptima de crecimiento de las bacterias nitrificantes se encuentra entre 25-30°C.

Podemos concluir, pues, que Biozyme ha demostrado ser el medio bacteriano más efectivo en nuestras condiciones, en cuanto a la disminución del tiempo de establecimiento, así como el mantenimiento de una concentración menor de compuestos nitrogenados respecto a los otros tanques. Alken Clear Flo 1200 no sirve para disminuir el tiempo de establecimiento del filtro bacteriano, pero una vez éste establecido, reduce la concentración de compuestos nitrogenados por debajo de la concentración control. Por eso su uso es aconsejable en caso de querer aumentar la capacidad oxidativa temporal del filtro.

Bibliografía

- Aquarium Products. 1996. «Biozyme». Freshwater and saltwater use. Aquarium Products Company Bulletin 1001: 2 p.
- Azpiroz-Lasarte, U.; Papandroulakis, N.; Divanach, P.; Kentouri, M. 1995. Comparison of the nitrification efficiency of three substrates with well water in flow-through conditions. Proceedings of the fifth national congress on aquaculture, p. 914-918.
- Bower, C.E.; Turner, D.T. 1981. Accelerate nitrification in new seawater culture systems: effectiveness of commercial additives and seed media from established systems. *Aquaculture* 24: 1-6.
- Buchanan, R.E.; Gibbons, N.E. (ed.). 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams and Wilkins Co. Baltimore, MD.
- Carmignani, G.M.; Bennett, J.P. 1977. Rapid start-up of a biological filter in a closed aquaculture system. *Aquaculture* 11: 85-88.

- Coll, J. 1991. *Aquicultura marina animal*. Mundi Prensa. Madrid.
- Harremoes, P. 1982. Criteria for nitrification in fixed film reactors. *Water Sci. Technol.* 14: 167-187.
- Haug, R.T.; McCarty, P.L. 1972. Nitrification with submerged filters. *J. Water Pollut. Control Fed.* 44: 2086-2102.
- Hirayama, K. 1974. Water control by filtration in closed systems. *Aquaculture* 4: 369-385.
- Kawai, A.; Yoshida, Y.; Kimata, M. 1964. Biochemical studies on the bacteria in aquarium with circulating system. I. Changes of the qualities of breeding water and bacterial population of the aquarium during fish cultivation. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 30: 55-62.
- Kim, I.-B.; Kim, P.-K.; Chee, Y.-O. 1987. The ammonia removal capacity of a few kinds of filter media in a water reuse aquaculture system. *Bull. Korean Fish. Soc.* 20(6): 561-568.
- Knowles, G.; Downing, A.L.; Barrett, M.J. 1965. Determination of kinetic constants for nitrifying bacteria in mixed culture, with the aid of an electronic computer. *J. Gen. Microbiol.* 38: 263-278.
- Lin, H.; Randall, D.J. 1990. The effect of varying water pH on the acidification of expired water in rainbow trout. *J. exp. Biol.* 149: 149-160.
- Malone, R.F.; Manthe, D.P. 1985. Chemical addition for accelerated nitrification of biological filters in closed blue crab shedding systems. *National Symposium on the Soft-shelled Blue Crab Fishery*, febrero, 12-13: 41-47.
- Manthe, D.P.; Malone, R.F. 1987. Chemical addition for accelerated biological filter acclimation in closed blue crab shedding systems. *Aquacultural Engineering* 6: 227-236.
- Manthe, D.P.; Malone, R.F.; Kumar, S. 1984. Limiting factors associated with nitrification in closed blue crab shedding systems. *Aquacultural Engineering* 3: 119-139.
- Mevel, G.; Chamroux, S. 1981. A study on nitrification in the presence of prawns (*Penaeus japonicus*) in marine closed systems. *Aquaculture* 23: 29-43.
- Miller, G.E. & Libey, G.S. 1984. Evaluation of a trickling biofilter in a recirculating aquaculture system containing channel catfish. *Aquacultural Engineering* 3: 39-57.
- Reitman, V. 1989. Angling for business from «pollution-free» fish farms. *The Washington Post*, 26 de noviembre, p.H2.
- Siddall, S.E. 1974. Studies of closed marine culture systems. *Prog. Fish-Culturist* 36(1): 8-15.
- Spotte, S. 1979. *Fish and invertebrate culture, water management in closed systems*. Wiley-Interscience. Nueva York.
- Stellmacher, M. 1981. *Aquaculture outlook and situation*, USDA Economics and Statistics Service, National Economics Division. Washington DC.
- Vandenbyllaardt, L.J.; Foster, M.J. 1992. Performance characteristics of four biological filters and the development of a filter sizing procedure. *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences* 1854: 21 p.
- Wheaton, F.W. 1977. *Aquaculture Engineering*. Wiley-Interscience. Nueva York.
- Wickins, J.F. 1983. Studies on marine biological filters. Model filters. *Water Res.* 17 (12): 1769-1780.
- Wortman, B.; Wheaton, F. 1991. Temperature effects on Biodrum nitrification. *Aquacultural Engineering* 10: 183-205.