

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO



PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA DE
VALPARAÍSO

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR Y GEOGRAFÍA

**Evaluación del rendimiento de *Abarenicola pusilla*
(Quatrefages, 1866) como remediador de carga orgánica
presente en el lodo de un sistema de recirculación para
acuicultura marina.**

Tesis para optar al Grado de Doctora en Acuicultura

Programa Cooperativo de Doctorado en Acuicultura
Universidad de Chile
Universidad Católica del Norte
P. Universidad Católica de Valparaíso

SILVIA GÓMEZ SUÁREZ

2018

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO



PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA DE
VALPARAÍSO

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR Y GEOGRAFÍA

**Evaluación del rendimiento de *Abarenicola pusilla*
(Quatrefages, 1866) como remediador de carga orgánica
presente en el lodo de un sistema de recirculación para
acuicultura marina.**

Tesis para optar al Grado de Doctora en Acuicultura

Programa Cooperativo de Doctorado en Acuicultura

Universidad de Chile

Universidad Católica del Norte

P. Universidad Católica de Valparaíso

SILVIA GÓMEZ SUÁREZ

Director de Tesis: Dr. Felipe Hurtado Ferreira

2018

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO



PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA DE
VALPARAÍSO

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR Y GEOGRAFÍA

Los miembros de esta Comisión informante de Tesis designada para revisar la tesis Doctoral de SILVIA GÓMEZ SUÁREZ, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctora en Acuicultura.

Director de Tesis:

Dr. Carlos Felipe Hurtado Ferreira

Comisión Informante:

Dr. Jurij Wacyk González

Dra. Gabriele Rodrigues de Lara

Dr. Nelson Díaz Pérez

Dr. Germán Merino Araneda

Evaluadora externa:

Mg. Chita Guisado Aránguiz

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO



PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA DE
VALPARAÍSO

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR Y GEOGRAFÍA

DECLARACIÓN DE LA AUTORA

Se permiten citas breves sin permiso especial de la Institución o autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. En cualquier otra circunstancia, se deberá solicitar permiso de la Institución o el autor.

SILVIA GÓMEZ SUÁREZ

ÍNDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN	i
DECLARACIÓN DE LA AUTORA	ii
ÍNDICE DE CONTENIDOS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ABREVIATURAS	xi
AGRADECIMIENTOS	xiii
DEDICATORIA	xv
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xvii
INTRODUCCIÓN	1
Sistemas de recirculación para acuicultura	1
Generación de desechos en sistemas de recirculación para acuicultura	3
<i>Productos inorgánicos disueltos</i>	4
<i>Sólidos orgánicos</i>	6
Caracterización del lodo acuícola	8
Efectos ambientales de la descarga de lodo acuícola	9
Normativa de descarga y tratamiento de lodo acuícola	10

<i>Clarificación/espesamiento del lodo</i>	12
<i>Estabilización del lodo</i>	13
<i>Transporte y disposición del lodo</i>	13
Métodos alternativos para tratamiento y reutilización de lodo acuícola	13
<i>Fertilizante para aplicación en suelos</i>	14
<i>Digestión anaerobia</i>	15
<i>Desafíos específicos en el tratamiento de lodo acuícola marino</i>	15
Bioremediación de componentes orgánicos presentes en lodo acuícola marino	16
<i>Familia Arenicolidae como remediadora orgánica</i>	18
Planteamiento del problema	24
HIPÓTESIS	25
OBJETIVOS	25
<i>Objetivo general</i>	25
<i>Objetivos específicos</i>	25
MATERIALES Y MÉTODOS	26
Lodo acuícola	27
<i>Extracción</i>	27
<i>Caracterización</i>	27
<i>Abarenicola pusilla</i>	28
<i>Recepción y aclimatación</i>	28

<i>Determinación peso seco</i>	28
<i>Crecimiento</i>	29
<i>Tasas de crecimiento</i>	29
<i>Relación producción - biomasa</i>	30
<i>Supervivencia</i>	30
Sustrato	30
Agua superficial	31
<i>Extracción, filtración y desinfección</i>	31
<i>Concentración de componentes nitrogenados inorgánicos</i>	31
<i>Parámetros fisicoquímicos de calidad de agua</i>	32
Diseño y funcionamiento de los sistemas de remediación orgánica	33
<i>Sistema de remediación I</i>	34
<i>Sistema de remediación II</i>	35
<i>Diseño</i>	36
<i>Dimensionamiento filtros biológicos</i>	37
<i>Determinación del tamaño mínimo muestral</i>	38
Análisis de remoción y asimilación de componentes orgánicos por <i>A. pusilla</i>	39
<i>Materia orgánica total</i>	39

<i>Nitrógeno total, carbono total y perfil isotópico</i>	40
<i>Contenido de proteínas y ácidos grasos</i>	41
Análisis estadísticos	42
RESULTADOS	43
<i>Objetivo Específico N° 1: Estimar la tasa de remoción de componentes orgánicos contenidos en el lodo procedente de un sistema de recirculación marino por A. pusilla con diferentes porcentajes de introducción de carga orgánica.</i>	43
Análisis del lodo acuícola	43
Análisis de la remoción y asimilación de componentes orgánicos	44
<i>Materia orgánica total</i>	44
Crecimiento y supervivencia de <i>A. pusilla</i>	45
Parámetros de calidad de agua	46
<i>Concentración y tasa de excreción de nitrógeno amoniacal total</i>	47
<i>Objetivo Específico N° 2: Determinar el rendimiento de remoción y asimilación de componentes orgánicos presentes en lodo acuícola por A. pusilla con diferentes rangos de generación de este compuesto y a diferentes densidades de organismos.</i>	50
Análisis del lodo acuícola	50
Análisis de la remoción y asimilación de componentes orgánicos	51
<i>Materia orgánica total</i>	51
<i>Contenido en nitrógeno y carbono total</i>	55

<i>Contenido en ácidos grasos y proteínas</i>	55
<i>Isótopos estables</i>	56
Crecimiento y supervivencia de <i>A. pusilla</i>	57
Parámetros de calidad de agua	57
Flujo de biomasa y nutrientes	58
DISCUSIÓN	60
Remoción y asimilación de componentes orgánicos	60
<i>Materia orgánica total</i>	60
<i>Contenido en nitrógeno total, carbono total y perfil isotópico</i>	64
<i>Contenido en proteínas</i>	65
<i>Contenido en ácidos grasos</i>	67
Crecimiento de <i>A. pusilla</i>	69
Concentración de nitrógeno amoniacal total en el agua superficial	71
Implementación de sistemas de remediación con <i>A. pusilla</i> asociados a cultivos en SRA	72
Proyecciones	74
CONCLUSIONES	75
BIBLIOGRAFÍA	76
ANEXOS	94

Anexo 1. Dimensionamiento sistemas de biofiltración del sistema de remediación II.	94
Anexo 2. Determinación número mínimo de poliquetos a implementar en el sistema de remediación II.	96
Anexo 3. Perfiles isotópicos utilizados para análisis de asimilación orgánica en los ensayos realizados en el sistema de remediación II.	97
Anexo 4. Distribución de los tamaños de partícula presentes en el lodo acuícola.	98
Anexo 5. Concentración de nitrito, nitrato y saturación de oxígeno en el agua superficial de las unidades en el sistema de remediación I.	99
Anexo 6. Parámetros de crecimiento y supervivencia de <i>A. pusilla</i> en los ensayos realizados en el sistema de remediación II.	101
Anexo 7. Concentración de componentes nitrogenados y otros parámetros fisicoquímicos analizados en el agua superficial de las unidades experimentales del sistema de remediación II.	102

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Poliquetos utilizados como remediadores de carga orgánica en el cultivo de especies marinas comerciales en sistemas de acuicultura en recirculación.	17
Tabla 2. Diseño de los experimentos realizados en el sistema de remediación II.	36
Tabla 3. Caracterización del lodo acuícola utilizado en los experimentos realizados en el sistema I.	43
Tabla 4. Parámetros de crecimiento y supervivencia de <i>A. pusilla</i> .	46
Tabla 5. Parámetros de calidad de agua en las unidades experimentales del sistema de remediación I.	47
Tabla 6. Caracterización del lodo acuícola utilizado en los experimentos realizados en el sistema II.	50
Tabla 7. Tasa de remoción de materia orgánica total por <i>A. pusilla</i> en los ensayos realizados en el sistema II.	54
Tabla 8. Contenido en proteína y ácidos grasos del lodo acuícola y <i>A. pusilla</i>	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Métodos utilizados en el tratamiento de lodo acuícola generado en sistemas de acuicultura en recirculación.	11
Figura 2. Análisis realizados a los distintos componentes que conforman las unidades de remediación con <i>A. pusilla</i> .	26
Figura 3. Diseño de los ensayos realizados en los sistemas de remediación con <i>A. pusilla</i> .	33
Figura 4. Diseño sistema de remediación II.	37
Figura 5. Remoción de materia orgánica total expresada en porcentaje en los ensayos realizados en el sistema de remediación I.	45
Figura 6. Incremento diario en la concentración de nitrógeno amoniacal total (mg/l) en las unidades con <i>A. pusilla</i> y unidades control en el sistema de remediación I.	48
Figura 7. Tasa de excreción de nitrógeno amoniacal total por <i>A. pusilla</i> en el sistema de remediación I.	48
Figura 8. Remoción de materia orgánica total alcanzada en el ensayo con distintos aportes de lodo en el sistema de remediación II.	51
Figura 9. Porcentaje de materia orgánica total presente en el sustrato de las unidades del sistema II (Ensayo 1, 45 días).	52
Figura 10. Remoción de materia orgánica total alcanzada en el ensayo con distintas densidades de organismos en el sistema de remediación II.	53
Figura 11. Porcentaje de materia orgánica total presente en el sustrato de las unidades del sistema II (Ensayo 2, 45 días).	53
Figura 12. Perfil isotópico ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$) obtenido en los ensayos realizados en el sistema de remediación II.	56
Figura 13. Flujo de nutrientes y biomasa en prototipo de bioremediación	59

ABREVIATURAS

SRA: sistemas de recirculación para acuicultura
MOP: materia orgánica particulada
MOD: materia orgánica disuelta
SST: sólidos suspendidos totales
N: nitrógeno
P: fósforo
kg: kilogramo
CO₂: dióxido de carbono
NID: nitrógeno inorgánico disuelto
PO₄⁻³: ortofosfato
NH₃: amoníaco
mg/l: miligramos por litro
NO₂⁻: nitrito
NO₃⁻: nitrato
C: carbono
μm: micrómetro
P_{TSS}: generación de sólidos suspendidos totales
η: eficiencia de remoción de sólidos
g: gramo
H₂S: sulfuro de hidrógeno
RAMA: reglamento ambiental para la acuicultura
CH₄: metano
C/N: relación carbono-nitrógeno
°C: grados centígrados o grados Celsius
MOT: materia orgánica total
mm: milímetro
NAT: nitrógeno amoniacal total
O₂: oxígeno

TAC: tasa absoluta de crecimiento
SGR: tasa específica de crecimiento
P/B: relación producción – biomasa
log: logaritmo
g/l: gramos por litro
m²: metro cuadrado
ml: mililitro
cm: centímetro
cm²: centímetro cuadrado
cm³: centímetro cúbico
l/h: litros por hora
m²/m³: metro cuadrado por metro cúbico
CO: carbono orgánico
 $\delta^{13}\text{C}$: delta carbono 13
 $\delta^{15}\text{N}$: delta nitrógeno 15
SD: desviación estándar
kg/m³: kilogramo por metro cúbico
 μg : microgramo
org/m²: organismos por metro cuadrado
ppm: partes por millón

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a Gabriel Yany y Dante Queirolo por la ayuda que me brindaron en los inicios de esta etapa.

Quiero dar un agradecimiento especial a Jaime Orellana por darme esta oportunidad, por la independencia que me dio para desarrollar una idea propia, abrirme las puertas de su laboratorio y por la confianza que depositó en mí desde que nos conocimos.

También a Felipe Hurtado por esa confianza que siempre ha demostrado tener en mí y que fue muy importante en momentos difíciles de este proceso. Por acompañarme hasta el final de este camino y por demostrarnos que es posible ser jefe y a la vez, compañero.

Agradezco enormemente a la Comisión por sus aportes durante todo este tiempo y por su ayuda para desarrollar esta investigación. Asimismo, al Programa de Doctorado en Acuicultura, en especial a la PUCV por la concesión de la beca que me ha permitido terminar este proceso.

A todo el personal de la Escuela de Ciencias del Mar, que hacen cada día un hogar de su lugar de trabajo. También a los profesores que me han ayudado desinteresadamente en el desarrollo de esta Tesis y su defensa, en especial a Eduardo Quiroga, José Gallardo y Cristian Canales.

A Alice Turner y Guillermo Valenzuela, sin su trabajo no habría podido llegar hasta aquí. Por recibirme en su laboratorio y en su preciosa casa patagónica. Gracias por desprender ese amor por la ciencia.

A mi familia. Gracias por el apoyo incondicional, por entender lo que significa hacer un doctorado tan lejos de casa. Gracias también por compartir los momentos importantes en la distancia. En especial, a mamá y Nusko. Por vosotras soy quien soy. Gracias por vuestro ejemplo. Este trabajo es vuestro.

A mis amigos de siempre, los de la vida. En especial a Bel, Luci, Manolo, Susi, Ange, Flu y Olalla, que he sentido muy cerca durante esta etapa. Vuestra amistad es muy importante para mí. Gracias por todo lo vivido y por hacerme sentir que no hay distancia. Sois los otros hermanos que tengo en mi vida.

A mis compañeros de Vigo, en especial Marti, Iriña y Sabela, mis Lopezmoranas. Gracias por el tiempo compartido. Sois una familia para mí.

A la gente del IGaFA, especialmente Santi, Cris, Pedro, Javier, Andrés, Adri y Silvia. Gracias por la amistad, por esta pasión que compartimos y por dejarme ver que nunca es tarde para hacer lo que sientes. Gracias también por enseñarme a amar esa pequeña isla que ahora es nuestro otro hogar.

A Nikos Papandroulakis, Stelios Stefanakis y Nikos Mitrizakis por permitirme aprender en su laboratorio, por su alegría, compañerismo y buena energía. Al resto de compañeros del HCMR, por transmitirme su pasión por el trabajo que realizan, por recibirme con los brazos abiertos y por enseñarme a vivir su bonito país.

A mis cretenses. Nacho, Fer, Vero, Giulia, Fátima, Vince, Natia, Alex, Artemis, María y Panos. Gracias a todos por enseñarme que la amistad no entiende de fronteras, nacionalidades o idiomas. Os llevo en el corazón.

A las kuklas, Paula y Ruth. Sois lo mejor que tengo. Gracias por estar en mi vida.

A Roberto, porque sin tu apoyo no habría llegado hasta aquí. También a tu familia, que la he sentido como propia. Gracias por tu cariño y amistad sincera, por darme la fuerza cuando la había perdido y por ser mi compañero en este camino.

A Coni y Juan Pablo. Sois parte de la familia que, sin esperarlo, me he encontrado a miles de kilómetros de casa. Gracias por el tiempo compartido, por enseñarme tanto y por vuestra increíble amistad. Después de conoceros, ya nunca más podré tener “el todo”.

A mis otras emigrantes, Yule, Jime y Anita, por la amistad y el cariño que me habéis dado todo este tiempo. Por compartir juntas este sentimiento que implica estar lejos de casa. Gracias por existir y habernos cruzado en este camino. Sois ya para siempre parte de mí.

A las chicas de la ECM, Andrea, Andreíta, Nazareth. También a los que ya no están pero siguen estando. Ale, Clemens, Andy. Gracias por vuestra amistad.

A mis compañeros de doctorado. Ramón, Marcelo, René, Héctor, Hernán. Gracias por el camino recorrido, las noches enteras de trabajo, de fiesta, de mantel verde, de pollo a la parrilla y junto al fuego. Gracias por enseñarme que la amistad puede surgir entre personalidades tan diferentes.

A Danilo, Jorge, Sandra y Sebastián. Me habéis enseñado a vivir Valparaíso.

A mi hermana, mi alma complementaria. O meu fogar.

RESUMEN

La generación de lodo acuícola, principal producto residual del cultivo en sistemas de recirculación para acuicultura (SRA), es uno de los mayores desafíos asociados a estos sistemas desde el punto de vista ambiental y logístico. Los métodos de tratamiento más utilizados se centran en reducir el volumen y carga orgánica del lodo para su disposición final en vertederos autorizados, lo que representa una posibilidad finita y ambientalmente poco eficaz. Se ha propuesto su uso como fertilizante en suelos y su degradación en procesos de digestión anaerobia. Sin embargo, estas opciones no son viables, o lo suficientemente eficientes, para aplicarlas como tratamiento de lodo acuícola de origen marino. Es por ello que la remediación con macroinvertebrados se ha propuesto como solución a este desafío, siendo los poliquetos de la familia *Arenicolidae* uno de los grupos candidatos para su implementación como remediadores en efluentes de SRA marinos.

En este estudio, se evaluó el rendimiento de remoción de lodo acuícola del poliqueto *Abarenicola pusilla* (Quatrefages, 1866), que en estudios preliminares había mostrado su capacidad de crecer en presencia de este compuesto pero se desconocía su potencial como especie remediadora. La mayor tasa de remoción de componentes orgánicos fue alcanzada por *A. pusilla* en un sistema de remediación con recirculación de agua y equipos de filtración biológica al implementar la mayor densidad de individuos (200 organismos/m²). La tasa máxima de remoción de MOT fue de 35,77 g/m² día (se redujo el 85,37% del total implementado en 45 días). La remoción de N y C total fue de 33,63 mg/día y 236,78 mg/día, respectivamente. La asimilación de componentes orgánicos fue corroborada por la obtención de incrementos significativos en la concentración de ácidos grasos, carbono total y carbono orgánico en la biomasa de los organismos al final de las experiencias (0,65%, 24,75% y 24,68% en 45 días de ensayos, respectivamente). La mayor tasa específica de crecimiento alcanzada por *A. pusilla* fue del 3,06% al día (un incremento de 8,48 g/m² día), lográndose supervivencias del 91,67% de los organismos. Los resultados obtenidos en este estudio constituyen un avance para las tecnologías de acuicultura marina en tierra, contribuyendo a su desarrollo sustentable.

ABSTRACT

Aquaculture sludge, main residual product from recirculating aquaculture systems (RAS), is one of the biggest challenges associated with these systems from the environmental and logistic point of view. Currently, most widely treatment methods focus on reducing its volume and organic load for its final disposal in authorized landfills, which represents a limited and environmentally inefficient possibility. Alternatives such as its use as fertilizer in soils or its degradation in anaerobic digestion processes have been proposed. However, these options are not viable, or efficient enough, to be applied in marine aquaculture sludge treatment. That is why remediation with macroinvertebrates has been proposed as a solution to this challenge. Family *Arenicolidae* (*Polychaeta*) has been considered as candidate for its implementation as bioremediator in marine RAS effluents.

In this study, the organic removal performance of the polychaete *Abarenicola pusilla* (Quatrefages, 1866) was evaluated. This species showed its growth capacity in presence of aquaculture sludge in preliminary investigations. However, its potential as organic bioremediator was still unknown. The maximum removal rate of organic compounds by *A. pusilla* was achieved in a remediation system with water recirculation and biological filters at highest densities of individuals (200 organisms / m²). This meant a MOT removal rate of 35.77 g / m² day (85.37% of MOT contained in the aquaculture sludge in 45 days). The removal rate of total N and C was 33.63 mg / day and 236.78 mg / day, respectively. Likewise, assimilation of organic compounds was corroborated by obtaining significant increase in fatty acids, total carbon and organic carbon in the biomass of the organisms at the end of the experiments (0.65%, 24.75% and 24.68 % in 45 days of trials, respectively). The highest specific growth rate achieved by *A. pusilla* was 3.06% per day (an increase of 8.48 g / m² per day) and survivals of 91.67% were achieved at the end of the experiments. The results obtained in this study constitute an advance for marine aquaculture technologies on land, contributing to its sustainable development.

INTRODUCCIÓN

Sistemas de recirculación para acuicultura

La producción global de acuicultura ha experimentado un crecimiento medio anual del 8% desde 1980, convirtiéndose en la industria alimentaria con mayor desarrollo en las últimas décadas (White *et al.*, 2017). La introducción en la industria de los sistemas de recirculación para acuicultura (SRA) surgió como alternativa a las tecnologías tradicionales de producción, para dar respuesta al incremento global en la demanda de productos acuícolas y a las nuevas regulaciones ambientales que han sido formuladas en los últimos años (Guerdat *et al.*, 2013; Yogeve *et al.*, 2017).

Los SRA se han definido como *sistemas acuáticos en tierra donde el agua es parcialmente recirculada después de un tratamiento mecánico y biológico, en un intento de reducir el consumo de agua y energía y la liberación de nutrientes al medio ambiente* (Zhang *et al.*, 2011). Estos sistemas de alta tecnología están, por tanto, basados en la reutilización y tratamiento de agua lo que permite el cultivo de organismos acuáticos en tierra con un porcentaje de recambio de agua menor al 1% al día (Bischoff, 2007; Orellana *et al.*, 2014; Waller *et al.*, 2015; Gunning *et al.*, 2016). En el cultivo en SRA es posible el mantenimiento de las condiciones adecuadas de cultivo para cada especie, permitiendo incrementar las tasas de crecimiento y por lo tanto reducir el tiempo para completar un ciclo productivo y además facilitando el cultivo de especies fuera de su rango biológico de distribución (Martins *et al.*, 2010; Orellana *et al.*, 2014). Estos beneficios han impulsado fuertemente la implementación de estos sistemas para diversificar e intensificar la industria acuícola y su sostenibilidad (Badiola *et al.*, 2012).

Las especies cultivadas en SRA a nivel mundial son tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), halibut del Atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*), rodaballo (*Scophthalmus maximus*), barramundi (*Lates calcarifer*), lenguado (*Solea solea*), lubina (*Dicentrarchus labrax*) y dorada (*Sparus aurata*). Mientras que otras especies han adquirido gran relevancia en zonas geográficas específicas, como por ejemplo la anguila (*Anguilla anguilla*) y salmón del Atlántico (*Salmo salar*) en

Europa, y el pez gato (*Ictalurus punctatus*) en Estados Unidos (del Campo *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2010; Dalsgaard *et al.*, 2013). Además, los SRA son ampliamente utilizados para fases de cultivo larvario por su bioseguridad y control de patógenos, lo que se evidencia a través de mejores índices de supervivencia y crecimiento en los organismos cultivados en comparación a las tecnologías de flujo abierto (Gutiérrez-Wing & Malone, 2006; del Campo *et al.*, 2010; Dalsgaard *et al.*, 2013).

Actualmente, la intensificación de la producción de los sistemas de acuicultura emplazados en tierra está orientada a lograr que la totalidad del volumen de cultivo se administre en SRA, como ya ocurre con la industria de cultivo de *Salmo salar* en las islas Feroe (Badiola *et al.*, 2012). En Chile, los sistemas de recirculación han tomado relevancia desde comienzos del año 2000, y actualmente siendo responsables de más del 50% de la producción de *smolt* de salmón del Atlántico (del Campo *et al.*, 2010). En respuesta a la necesidad de diversificación del sector y una mejor distribución geográfica en Chile, se ha desarrollado también el cultivo de otras especies marinas a escala industrial, como es el caso de *Seriola lalandi* en la región de Atacama (Orellana *et al.*, 2014).

Aunque los SRA se han definido como una alternativa para la intensificación y diversificación acuícola y sus efectos ambientales son menores, su producción en términos globales es todavía mucho menor a la alcanzada por los sistemas convencionales. La lenta adopción de los SRA se debe en parte a las altas inversiones iniciales requeridas para su implementación (Martins *et al.*, 2010). Además, su optimización energética es todavía un desafío pendiente. El consumo de energía necesaria para la circulación y tratamiento de agua es entre 1,4 y 1,8 veces mayor que en sistemas de flujo abierto (Martins *et al.*, 2010). Otras investigaciones sitúan esta diferencia de consumo entre el 24 y el 40%, lo que desincentiva su crecimiento (Mongirdas *et al.*, 2017). Merino *et al.*, (2017) describen una reducción de hasta el 50% del requerimiento de energía en el cultivo de abalón en el norte de Chile dependiendo de la localización geográfica del sistema productivo respecto del suministro de agua natural.

El desarrollo del ciclo completo de cultivo para una especie hidrobiológica en SRA requiere investigación para definir las adecuadas condiciones ambientales y los procesos requeridos para su adecuada operación y su factibilidad de viabilidad tecnológica. Aunque hoy en día existe un gran número de estudios que muestran experiencias exitosas en el cultivo de distintas especies en SRA, logrando el crecimiento hasta su talla comercial, es necesario continuar investigando la compatibilidad de otras muchas especies dulceacuícolas y marinas de las que todavía no se ha completado el ciclo de cultivo en estos sistemas (Dalsgaard *et al.*, 2013).

El potencial de los SRA para cultivo de peces no se encuentra totalmente desarrollado, en parte debido a retos que frenan su sostenibilidad. Uno de los principales desafíos actuales a los que se enfrentan los SRA es la reducción, disposición y reutilización de los desechos generados durante el ciclo de cultivo, y que son eliminados de estos sistemas en forma de efluentes (Martins *et al.*, 2010; van Rijn, 2013).

Generación de desechos en sistemas de recirculación para acuicultura

Los desechos procedentes de sistemas productivos acuícolas son aquellos generados durante el proceso de cultivo y que son posteriormente eliminados del sistema (Cripps & Bergheim, 2000). En el cultivo de peces en SRA estos desechos son resultado del proceso de alimentación que resultan en la excreción metabólica de los organismos, los que corresponden principalmente a materia orgánica particulada (MOP), materia orgánica disuelta (MOD), sólidos suspendidos totales (SST) y metabolitos disueltos (Piedrahita, 2003).

Los metabolitos disueltos están conformados mayoritariamente por compuestos orgánicos e inorgánicos de nitrógeno (N) y fósforo (P) (Verdegem, 2013). El N proviene del catabolismo de las proteínas contenidas en el alimento, cuyo porcentaje fluctúa entre el 30 y el 60% (Mongirdas *et al.*, 2017). En cambio, la inclusión de componentes de fósforo no es tan significativa, alcanzando entre el 1,1 y 1,2% en alimento de salmónidos. Sin embargo, la dificultad de asimilación de sus principales componentes hace que esté presente como producto mayoritario en los desechos de SRA (Bureau & Hua, 2010;

Mongirdas *et al.*, 2017). La asimilación por parte de los organismos con respecto al contenido total ingerido oscila entre el 20 - 50% para nitrógeno (N) y entre el 15 - 65% para fósforo (P). Las fracciones de excreción se sitúan entre el 32 – 64% (N) y el 0 – 38% (P), mientras que las pérdidas fecales están entre el 9 – 32% (N) y el 33- 63% (P) (Schneider *et al.*, 2005; Bischoff, 2007). Por tanto, su contenido en el alimento sumado a la eficiencia de asimilación por parte de los organismos tiene como consecuencia la generación de efluentes con importantes concentraciones de estos compuestos.

La producción mundial de acuicultura liberó a las masas de agua en el año 2008 un total de 1,7 y 0,46 millones de toneladas de N y P, respectivamente (Verdegem, 2013). Las descargas se sitúan en torno a 65 y 12 kilogramos (kg) de N y P por tonelada de producción (Herath & Satoh, 2015). Este tipo de descargas también pueden contener otros componentes como patógenos, hormonas o antibióticos, que pueden generar alteraciones en el comportamiento de organismos acuáticos y riesgos para la salud humana (Jegatheesan *et al.*, 2011; Gunning *et al.*, 2016; McCallum *et al.*, 2017). Asimismo, la incorporación cada vez mayor de ingredientes de origen terrestre en el alimento acuícola puede inducir modificaciones en las redes tróficas acuáticas (Woodcock *et al.*, 2018).

Productos inorgánicos disueltos

Los metabolitos inorgánicos generados en cultivos de peces en SRA se componen principalmente de nitrógeno y fósforo disueltos (productos finales del catabolismo proteico) y dióxido de carbono (CO₂) liberado en la respiración (Martins *et al.*, 2010).

El fósforo disuelto es excretado principalmente en forma de ortofosfato (PO₄⁻³) procedente del metabolismo renal (Bureau & Hua, 2010), mientras que la mayor parte del nitrógeno inorgánico disuelto (NID) es excretado al agua de cultivo a través de las branquias. La proporción de nitrógeno liberada con respecto al total contenido en el alimento varía en función de la especie, tamaño de los organismos, densidad de cultivo, tipo de alimento y tasa de alimentación (Bischoff, 2007; Merino *et al.*, 2007a; Nerici *et al.*, 2012; Herath & Satoh, 2015). En cultivos de salmón del Atlántico (*Salmo salar*), el 45% del nitrógeno total del alimento se libera como NID (Wang *et al.*, 2012). Mientras

que en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) es el 63% (á Norði *et al.*, 2011), el 61% en dorada (*Sparus aurata*) (Lupatsch & Kissil, 1998) y el 60% en el cultivo de *Seriola lalandi* (Fernandes & Tanner, 2008).

El principal compuesto excretado por los peces es el amoníaco (NH_3), que representa aproximadamente el 60 – 90% de metabolitos nitrogenados totales (Mongirdas *et al.*, 2017). La eliminación del NH_3 es un factor clave en el tratamiento de agua de los SRA debido a la toxicidad que provoca en los organismos, debiendo mantenerse a concentraciones menores de 0,025 mg/l en el agua de cultivo (Crab *et al.*, 2007; Ebeling & Timmons, 2012). La implementación de filtros biológicos en SRA es necesaria para inducir su transformación a componentes nitrogenados con menor nivel de toxicidad. En estos biofiltros, la actividad metabólica bacteriana de los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* en condiciones aerobias induce un proceso denominado nitrificación, donde el NH_3 es oxidado a nitrito (NO_2^-) y este es oxidado finalmente a nitrato (NO_3^-), compuesto que se acumula en el agua del SRA (Martins *et al.*, 2010; Vilbergsson *et al.*, 2016).

Los metabolitos disueltos generados durante el proceso de cultivo pueden ser liberados a las masas de agua con el porcentaje de agua de recambio diario existente en los SRA. Con su descarga, inducen procesos de eutrofización en las aguas receptoras (Bureau & Hua, 2010). Este fenómeno, que provoca el aumento de la productividad primaria, es uno de los principales problemas ambientales que afecta a cuerpos de agua superficiales. La eutrofización conduce asimismo a disminuciones en la concentración de oxígeno y cambios ecológicos en las comunidades pelágicas y bentónicas existentes (Herath & Satoh, 2015; Johansen *et al.*, 2018; McIver *et al.*, 2018).

Sin embargo, en contraste con los sistemas productivos acuícolas a flujo abierto o en balsas-jaulas que poseen interacción directa con el ambiente acuático, en cultivos en SRA este porcentaje de agua de recambio puede ser tratado antes de su liberación al ambiente (Gunning *et al.*, 2016). Algunas de las técnicas más desarrolladas para reducir la concentración de estos productos inorgánicos disueltos en el efluente de los SRA son la implementación de reactores de desnitrificación para la eliminación de NO_3^- (Martins

et al., 2010) y la integración con cultivos multitróficos, que permite la reutilización tanto del NID como del PO_4^{-3} , absorbidos principalmente por organismos vegetales (Waller *et al.*, 2015; Cubillo *et al.*, 2016). La eliminación del dióxido de carbono del agua de cultivo se consigue en SRA por intercambio gaseoso, generalmente con la implementación de tecnologías de desorción de gases, denominados técnicamente como desgasificadores (Ebeling & Timmons, 2012).

Sólidos orgánicos

La materia orgánica particulada (MOP) es la principal forma de desecho generado en cultivos acuícolas en SRA (Chen *et al.*, 1997). Este término engloba los sólidos que son liberados al agua producto del alimento no ingerido, no digerido o no absorbido por los organismos (Bureau & Hua, 2010; Cubillo *et al.*, 2016). Estos, denominados también biosólidos, incluyen heces, alimento no consumido, mucus y flóculos que se desprenden del filtro biológico (Merino *et al.*, 2007b; Timmons & Ebeling, 2007). También puede haber una pequeña proporción de material endógeno procedente de los organismos de cultivo, como microorganismos intestinales y sus productos o enzimas digestivas (Bureau & Hua, 2010). Están conformados principalmente por compuestos orgánicos de carbono (C), nitrógeno (N) y fósforo (P) que están presentes en la dieta, tales como proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas, minerales o pigmentos (Herath & Satoh, 2015).

La materia orgánica particulada se clasifica según su tamaño en sólidos sedimentables, suspendidos y disueltos; diferenciándose estos últimos por su capacidad de atravesar o no un filtro de 1,2 micras (μm) (Merino *et al.*, 2007b; Ebeling & Timmons, 2012). La comparación entre sistemas basada en el rango de tamaños de partículas generadas es difícil ya que su distribución varía según el diseño del mismo, la especie cultivada o el tipo de alimento utilizado (Merino *et al.*, 2007b). Brinker *et al.*, (2005) determinaron que el porcentaje de partículas menores a $100\mu\text{m}$ se encuentra entre el 23 y el 39% del total. Mongirdas *et al.*, (2017) determinó que el 67% se encuentran en el rango entre 1,5 y $30\mu\text{m}$. Por otra parte, en un cultivo en SRA de *Dicentrarchus labrax* donde los organismos permanecieron durante 488 días alcanzando un peso

promedio de 2 kg, los tamaños de partículas mayoritarios se situaron entre 200 y 1600 μm , adquiriendo mayor relevancia el material de tamaño más grande a medida que avanzaba el cultivo (Orellana, 2006).

La tasa de generación de sólidos (P_{TSS}) en SRA puede llegar a representar el 52% con respecto al alimento total aportado al sistema (Mongirdas *et al.*, 2017). Este parámetro varía según la composición del alimento, el tamaño y tipo de especie cultivada y también de factores de manejo como la tasa de alimentación y la densidad de cultivo (Cripps & Bergheim, 2000; Couturier *et al.*, 2009; del Campo *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2013).

La presencia de MOP en el agua de cultivo de SRA tiene un impacto negativo en la calidad del agua y puede afectar a la salud y crecimiento de los organismos (Pedersen *et al.*, 2017). Por tanto, la rápida y efectiva eliminación de los sólidos generados es el proceso más crítico asociado al mantenimiento de estos sistemas (van Rijn, 2013). Por un lado, provoca una disminución en la eficiencia del proceso de nitrificación, ya que constituye un sustrato para el crecimiento de microorganismos heterótrofos que pueden desplazar a las bacterias nitrificantes en el biofiltro (Summerfelt & Penne, 2005). Su existencia provoca un aumento en el consumo de oxígeno disuelto y la generación de NH_3 por degradación bacteriana. Asimismo, pueden generar daños en las unidades de tratamiento de agua del sistema o provocar daño físico o fisiológico a los organismos de cultivo (Orellana, 2006; Schumann *et al.*, 2017).

Los límites de concentración seguros para partículas sólidas en SRA se encuentran entre 5 y 25 mg/l (Schumann *et al.*, 2017). Las principales tecnologías aplicadas para su eliminación están basadas en procesos gravitacionales y de filtración mecánica que provocan una separación sólido-líquido, siendo los sedimentadores radiales y filtros rotatorios (o filtros de tambor) los equipos más utilizados para este procedimiento (Yamamoto, 2017). Su eficiencia de remoción se sitúa entre el 50 y el 91% de los SST existentes en el agua del sistema dependiendo del tamaño de malla utilizado, que generalmente oscila entre 40 y 90 μm (Andrei *et al.*, 2016). La acción de los sedimentadores radiales y los filtros rotatorios es normalmente combinada con sistemas

de fraccionamiento de espuma (*skimmers*) y tratamientos con ozono para mejorar la eliminación de sólidos suspendidos de menor tamaño (Martins *et al.*, 2010; Gunning *et al.*, 2016).

Una vez la materia orgánica particulada (MOP) es extraída del agua del sistema, su acumulación genera un compuesto denominado lodo acuícola. Este se convierte en el principal producto residual de los sistemas productivos.

Caracterización del lodo acuícola

El lodo procedente de cultivos en SRA se caracteriza por un menor volumen que el generado en sistemas acuícolas tradicionales, pero cuenta con hasta cien veces mayor concentración de sólidos orgánicos y nutrientes (Zhang *et al.*, 2013; Mongirdas *et al.*, 2017). Este lodo posee un porcentaje de agua entre el 92 y el 97% (Rafiee & Saad, 2005; Mirzoyan *et al.*, 2010; Madariaga & Marín, 2017) pudiendo llegar incluso al 99% (Sharrer *et al.*, 2009; Hepp, 2012; Aruety *et al.*, 2016).

La tasa de producción de lodo en un SRA es dependiente de la concentración de SST existente en el agua y se define como:

$$P_{\text{lodo}} = P_{\text{TSS}} * \eta$$

Donde P_{TSS} es la generación de SST y η es la eficiencia de remoción de sólidos en el sistema. Esta se encuentra normalmente entre el 85 y el 95%, siendo función principalmente del diseño y funcionamiento del mismo (del Campo *et al.*, 2010).

Actualmente, un SRA con un diseño y manejo eficientes produce entre el 11 y el 40% de lodo respecto del total de alimento suministrado a los organismos (Luo *et al.*, 2015). Concretamente, en el cultivo de peces carnívoros en SRA son generados 250 g de lodo por kg de alimento incorporado al sistema (Murray *et al.*, 2014). Respecto a la biomasa producida, se generan 375 kg de residuos sólidos orgánicos secos por tonelada de producción final (Tal *et al.*, 2009). El creciente desarrollo del cultivo en SRA ha hecho incrementar significativamente la producción de lodo de acuicultura a nivel

mundial. En Chile, la producción de salmón en estos sistemas originó en el año 2010 alrededor de 2.000 toneladas de lodo, proyectándose que en 2015 esta cantidad se acercaría a las 3.000 toneladas (del Campo *et al.*, 2010).

El lodo es normalmente extraído de los sedimentadores radiales y del retrolavado automático de los equipos de filtración mecánica y es almacenado en diferentes instalaciones. La capacidad de acumulación de este compuesto en las instalaciones acuícolas es limitada, por lo que debe ser retirado periódicamente (Hepp, 2012; Edwards, 2015). Al efectuar su descarga al ambiente se inducen una serie de efectos ambientales que modifican el balance de los ecosistemas acuáticos.

Efectos ambientales de la descarga de lodo acuícola

La emisión intermitente de efluentes orgánicos al ambiente acuático procedente de cultivos en SRA se ha convertido en uno de los principales problemas asociados a esta tecnología. Las descargas de lodo de acuicultura provocan en los cuerpos de agua un fenómeno denominado enriquecimiento orgánico, que induce cambios ecológicos y deterioro de la calidad del agua (Gunning *et al.*, 2016; Akizuki & Toda, 2018).

El aumento en la concentración de componentes orgánicos y su posterior degradación en el ambiente acuático conducen a una reducción significativa en los niveles de oxígeno disuelto (Bureau & Hua, 2010; Srithongouthai & Tada, 2017). Causa asimismo cambios en las comunidades biológicas existentes, con alteraciones en las cadenas tróficas y la biodiversidad de los ecosistemas (Nimptsch *et al.*, 2015; Woodcock *et al.*, 2018). Puede afectar también a los sistemas bentónicos, provocando aumentos en la concentración de sulfuro de hidrógeno (H₂S) o amoníaco (NH₃) por acción microbiana (Srithongouthai & Tada, 2017).

La magnitud de los efectos ambientales provocados por la evacuación de lodo desde los sistemas productivos está en función del volumen, características y duración de la descarga de lodo, y también de las características fisicoquímicas, limnológicas y oceanográficas del ecosistema de destino y su capacidad asimilativa (Srithongouthai &

Tada, 2017; Woodcock *et al.*, 2017). Además de enriquecimiento orgánico, la descarga directa de lodo a las fuentes hídricas puede inducir estratificación y turbidez, disminuyendo la actividad fotosintética y afectando a la dispersión de nutrientes y oxígeno a las capas más profundas de la columna de agua (Bureau & Hua, 2010).

Como consecuencia de sus implicaciones ambientales, los límites de descarga de lodo acuícola al ambiente están regidos por disposiciones legales, definidas según los estándares de calidad que marca la legislación de cada país y según el tipo de cuerpo de agua a donde es liberado (Bjornsdottir *et al.*, 2016).

Normativa de descarga y tratamiento de lodo acuícola

La mayor independencia de los SRA con respecto al ambiente acuático permite el control del lodo anterior a su liberación a las masas de agua (Martins *et al.*, 2010; Mongirdas *et al.*, 2017). Sin embargo, algunos estudios han reportado que en países como China o Chile, grandes productores de acuicultura, las restricciones legales en cuanto a descargas procedentes de sistemas acuícolas en recirculación son a veces insuficientes y se ven poco reflejadas en la ley, por lo que pueden acabar convirtiéndose en focos de contaminación en el ambiente acuático (Nimptsch *et al.*, 2015; Xu & You, 2016). En Chile, las condiciones generales de normativa sanitaria para actividades acuícolas (exigencias en el manejo, generación de residuos, uso de fármacos o desinfección de efluentes) son regidas por el artículo n° 23 del Decreto Supremo n° 319/2001. El Decreto Supremo 90 del Ministerio de Medio Ambiente es la norma que regula los límites de descarga de distintos componentes procedentes de actividades industriales; y el artículo n° 8 del Reglamento Ambiental para la Acuicultura (RAMA), en conformidad a este último, determina de modo específico las descargas máximas permitidas para instalaciones acuícolas en tierra.

Actualmente, la industria acuícola mundial ha tenido que integrar el tratamiento de los sólidos generados como parte de sus operaciones. Esto es debido a la formulación de regulaciones ambientales cada vez más estrictas en cuanto a las descargas de materia orgánica (Mirzoyan *et al.*, 2008). En cultivos acuícolas intensivos, donde normalmente

se exceden los límites de liberación de lodo al ambiente acuático, deben realizarse distintos tratamientos para cumplir con la normativa vigente. Los principales métodos que se aplican (Figura 1) se basan en disminuir el volumen y la concentración de compuestos orgánicos del lodo generado (Cripps & Bergheim, 2000; van Rijn, 2013) y requieren de instalaciones de almacenamiento, métodos de transporte y lugares específicos para su disposición final (Martins *et al.*, 2010).

La eficiencia de los tratamientos de lodo acuícola se ha convertido en un desafío clave para la sostenibilidad de la industria. Las características de estos procedimientos están regidas en Chile por el artículo n° 4 del RAMA, Decreto Supremo n° 320/2001. El acuerdo n° 23/2013, denominado *Reglamento para el manejo de lodos generados en sistemas de tratamiento de efluentes de pisciculturas*, modifica algunos artículos de la anterior ley y es más específico en cuanto al manejo de lodo de SRA.

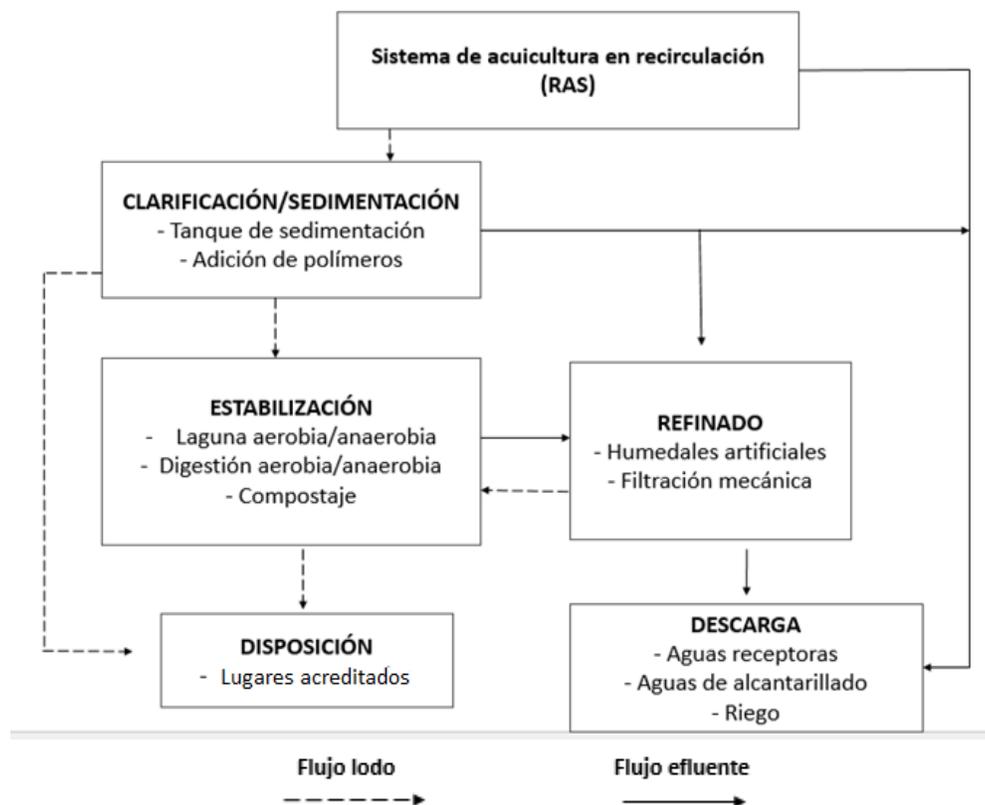


Figura 1: Métodos utilizados en el tratamiento de lodo acuícola generado en SRA. (Adaptado de del Campo *et al.*, 2010).

Clarificación/espesamiento del lodo

El primer procedimiento que se realiza en el tratamiento de lodo acuícola es la aplicación de tecnologías de espesamiento o clarificación para reducir su porcentaje en agua, lo que ayuda además a mitigar los costos de manipulación asociados a las tarifas de almacenamiento, transporte y eliminación (Yamamoto, 2017).

Por su simplicidad operacional, los estanques de sedimentación son la tecnología más utilizada para provocar la decantación de partículas sólidas y la deshidratación del lodo (van Rijn, 2013; Yamamoto, 2017). La ley marca los requerimientos en cuanto al tiempo de retención del compuesto y la superficie mínima obligatoria para la implementación de estos estanques. En España y Australia, deben poseer una superficie igual o mayor al 10 y 30% del total de la instalación de acuicultura, respectivamente (BOE-A-1974-204; Palmer, 2010). En Chile, el acuerdo n° 23/2013 del RAMA determina la obligatoriedad de que estas áreas de almacenamiento de lodos posean autorización sanitaria y estén diseñadas de forma que se impida la infiltración de líquidos hacia aguas subterráneas o superficiales. Además, está estipulado un tiempo de retención mínimo de 25 días. Esto puede provocar procesos de lixiviación de sólidos suspendidos disminuyendo la efectividad del proceso (Sharrer *et al.*, 2009).

Otros métodos de espesamiento consisten en la aplicación de lechos de arena, filtros de correa inclinada, filtros biológicos de membrana o bolsas geotextiles (Palacios & Timmons, 2001; Ebeling *et al.*, 2006; Sharrer *et al.*, 2007). Las técnicas de espesamiento pueden combinarse con la adición de polímeros que actúan como floculantes, haciendo más eficiente la sedimentación de partículas (van Rijn, 2013). El uso de bolsas geotextiles para drenaje es un procedimiento muy utilizado, que permite obtener hasta un 22 % de materia seca en 7 a 10 días cuando se combina con la adición de un polímero de coagulación (Sharrer *et al.*, 2009).

Estabilización del lodo

Posterior al espesamiento, debe realizarse la digestión o estabilización del lodo. Este proceso reduce la concentración de materia orgánica por transformación biológica (González-Hermoso *et al.*, 2016). Lagunas y digestores, que pueden ser aerobios o anaerobios, son las técnicas más utilizadas en este proceso (del Campo *et al.*, 2010). En Chile, la ley determina que debe alcanzarse en ellos una reducción de al menos el 38% de su contenido en sólidos volátiles.

En la regulación de algunos países, se contempla también la aplicación de tratamientos terciarios para la eliminación de compuestos tóxicos, materia en suspensión residual o microorganismos (Mateo-Sagasta *et al.*, 2015).

Transporte y disposición del lodo

Una vez el lodo ha sido estabilizado, su transporte debe ser realizado por empresas autorizadas y en vehículos completamente estancos para evitar derrames o emanación de olores. En relación con la disposición final de este compuesto, la ley da prioridad a su aplicación como fertilizante en suelos. Si no es posible, debe ser llevado a instalaciones acreditadas por las autoridades sanitarias y ambientales. En Chile, se ha reportado la falta de disponibilidad de vertederos especializados que cuenten con las condiciones para recibir este tipo de material (Hepp, 2012).

Métodos alternativos para el tratamiento y reutilización de lodo acuícola

La búsqueda de métodos que consigan reducir la cantidad de lodo acuícola generado y la posibilidad de ofrecerle usos alternativos se ha convertido en una prioridad a nivel mundial. Es uno de los grandes desafíos pendientes para conseguir una intensificación acuícola sustentable y debe promoverse como una opción ambiental y económicamente viable (Martins *et al.*, 2010; van Rijn, 2013; Krishnani *et al.*, 2018). Actualmente, en contraposición a las técnicas de tratamiento descritas, se ha impulsado una nueva teoría ambiental donde la valorización de los residuos siempre será prioritaria

a su eliminación. Esto quiere decir que, ante la opción de su disposición en vertederos, se evalúe previamente la factibilidad de su reducción o reciclaje (Ley de residuos *n°10/1998*).

Debido a sus altas concentraciones de componentes orgánicos e inorgánicos, este compuesto puede ser utilizado en diferentes procesos obteniendo además productos adicionales (Bjornsdottir *et al.*, 2016; Gunning *et al.*, 2016). Sin embargo, los principales métodos alternativos que son utilizados actualmente presentan desafíos y limitaciones importantes para su implementación, en particular en el tratamiento de lodo procedente de cultivo de especies marinas.

Fertilizante para aplicación en suelos

Para dar una alternativa al lodo acuícola procedente de cultivos en SRA, una de las técnicas más utilizadas a nivel mundial es su tratamiento para generación de fertilizantes y su posterior aplicación en suelos (del Campo *et al.*, 2010; Aubin *et al.*, 2017). Esto provee al suelo receptor de un suplemento de nutrientes, principalmente compuestos de N y P, que mejoran el crecimiento de organismos vegetales (Mora-Ravelo *et al.*, 2017). Para esto debe realizarse previamente su deshidratación parcial y una neutralización del pH, ya que el lodo bruto no es apto para su aplicación directa en el terreno. Además, deben realizarse análisis de contenido en metales pesados y antibióticos para su efectiva aplicación final (Bondarczuk *et al.*, 2016).

En Chile, su uso se encuentra restringido a los denominados suelos degradados (con pH ácido, erosionados y sin cobertura vegetal) y sus rangos de aplicación están determinados por la capacidad de carga del suelo específico donde se disponen (Decreto Supremo 04/2009). Experiencias realizadas en la Patagonia chilena determinaron aplicaciones de lodo acuícola entre 25 y 150 toneladas por hectárea en suelos degradados (Celis & Sandoval, 2010). Sin embargo, Chile no cuenta con regulaciones específicas que rijan el manejo y la aplicación de lodos acuícolas como fertilizante, por lo que su disposición final en lugares autorizados es todavía la única alternativa posible (Madariaga & Marín, 2017).

Digestión anaerobia

Otro proceso que consigue estabilizar y reducir la cantidad de lodo generado en SRA es su aplicación en procesos de digestión anaerobia, reacción que genera metano (CH₄) como principal producto final. Este biogás puede ser utilizado posteriormente como forma de energía para disminuir los costos de mantenimiento de estos sistemas (del Campo *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2013).

La degradación anaerobia de materia orgánica por acción bacteriana es un procedimiento utilizado a gran escala para el tratamiento de residuos orgánicos procedentes de la agricultura y procesos industriales. Sin embargo, existen factores que inhiben la metanogénesis en la digestión de lodo acuícola. Uno de ellos es la acumulación de NH₃ procedente del catabolismo proteico del alimento de acuicultura, que resulta tóxico para las bacterias metanogénicas (Zhang *et al.*, 2013). Por otra parte, el tiempo de retención del lodo en el digester debe ser menor a 10 días para inhibir la competencia bacteriana y aumentar el rendimiento del proceso, y la digestión efectiva de lodos acuícolas necesita tiempos de retención de 10 a 28 días (Suhr *et al.*, 2015).

Desafíos específicos en el tratamiento de lodo acuícola marino

La principal barrera para el desarrollo comercial generalizado de SRA para especies marinas es el costo de eliminación de los desechos sólidos generados y su baja eficiencia energética (Quinn *et al.*, 2016). El tratamiento y reutilización del lodo procedente de cultivos marinos posee más limitaciones en comparación al producido en sistemas dulceacuícolas (van Rijn, 2013).

Por un lado, su empleo como fertilizante tiene un alto riesgo de salinización de suelos y aguas adyacentes, haciendo que esta sea una técnica utilizada principalmente con lodo de cultivos dulceacuícolas (Mirzoyan *et al.*, 2008; Quinn *et al.*, 2016; Yogev *et al.*, 2017). En cuanto a su aplicación en digestores anaerobios, la salinidad del lodo afecta a los procesos bioquímicos de las bacterias metanogénicas,

convirtiéndose en la causa principal de su menor producción de metano (Zhang *et al.*, 2013). Por otra parte, la relación carbono-nitrógeno (C/N) del lodo salino es normalmente inferior a la adecuada para el proceso de metanogénesis, situada este entre 21 y 32 (van Rijn, 2013; Luo *et al.*, 2015). Actualmente se están realizando experiencias con bacterias halotolerantes para mejorar los rendimientos de este proceso (Quinn *et al.*, 2016).

Bioremediación de componentes orgánicos presentes en lodo acuícola marino

Para un tratamiento eficaz del lodo generado en SRA de especies marinas, una técnica fuertemente desarrollada en los últimos años es la introducción de especies extractivas en los efluentes de estos sistemas. Esto permite aumentar la sustentabilidad ambiental de los SRA al eliminar el lodo generado y ofrecer la posibilidad de reutilización de los nutrientes contenidos en este compuesto, realizándose una integración con cultivos multitróficos (Barrington *et al.*, 2009; Marques *et al.*, 2017). Debido a su capacidad de asimilar desechos orgánicos particulados procedentes de cultivos acuícolas intensivos, los principales candidatos para su implementación como bioremediadores orgánicos en efluentes de SRA marinos son los pertenecientes a los grupos *Holothuroidea* y *Polychaeta* (Brown *et al.*, 2011; Robinson *et al.*, 2015).

La clase *Polychaeta* (Grube, 1850) es un grupo complejo de organismos que abarca aproximadamente 14.000 especies diferentes agrupadas en 80 familias. Comprenden la mayor parte de la diversidad del filo *Annelida* y se encuentran en casi todos los hábitats acuáticos mostrando gran diversidad morfológica y fisiológica (Coutinho *et al.*, 2017). Son el grupo taxonómico dominante en ecosistemas marinos y estuarinos, particularmente en fondos arenosos y fangosos, siendo componentes funcionales ecológicamente significativos de estos ecosistemas (García-Alonso *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2016). En la Tabla 1 se muestran diferentes estudios que evaluaron la implementación de estos organismos como remediadores de carga orgánica procedente de cultivos marinos en SRA. Dos de las familias de poliquetos más utilizadas

con este fin son *Nereididae* y *Arenicolidae*, que han demostrado resultados significativos de remoción de componentes orgánicos presentes en lodo acuícola. También son capaces de asimilar proteínas y ácidos grasos poliinsaturados contenidos en el alimento de acuicultura, lo que permite el reciclaje de estos compuestos (Bradshaw *et al.*, 1990; Olive *et al.*, 2006; Bischoff *et al.*, 2009; Brown *et al.*, 2011).

Tabla 1: Poliquetos utilizados como remediadores de carga orgánica en el cultivo de especies marinas comerciales en SRA.

Poliqueto	Especie de cultivo	Referencia
<i>Nereis (Hediste) diversicolor</i> (Müller, 1776)	<i>Solea senegalensis</i>	Marques <i>et al.</i> , 2017
	<i>Huso huso</i>	Pajand <i>et al.</i> , 2017
	<i>Salmo salar</i>	Seekamp, 2017
	<i>Sparus aurata</i>	Martínez-García <i>et al.</i> , 2015
	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Callier <i>et al.</i> , 2014
	<i>Sparus aurata</i>	Bischoff <i>et al.</i> , 2009
	<i>Anguilla</i> sp.	García-Alonso <i>et al.</i> , 2008
<i>Perinereis aibuhitensis</i> (Grube, 1878)	<i>S. aurata</i> y <i>D. labrax</i>	Bischoff, 2007
	<i>Ruditapes decussatus</i>	Batista <i>et al.</i> , 2003
<i>Perinereis nuntia</i> (Lamarck, 1818)	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Fang <i>et al.</i> , 2016
	<i>Paralichthys</i> sp.	Yang <i>et al.</i> , 2015
<i>Perinereis helleri</i> (Grube, 1878)	<i>Penaeus monodon</i>	Palmer, 2010
	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Honda & Kikuchi, 2002
<i>Perinereis helleri</i> (Grube, 1878)	<i>P. monodon</i>	Palmer <i>et al.</i> , 2018
	<i>P. monodon</i>	Palmer, 2010

Poliqueto	Especie de cultivo	Referencia
<i>Nereis (Alitta) virens</i> (Sars, 1835)	<i>H. hippoglossus</i> <i>D. labrax</i> <i>Crassostrea virginica</i>	Brown <i>et al.</i> , 2011 Suckow <i>et al.</i> , 2010 Tenore <i>et al.</i> , 1974
<i>Capitella</i> sp (Blainville, 1828)	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Callier <i>et al.</i> , 2014
<i>Sabella spallanzanii</i> (Gmelin, 1791)	<i>Palaemon</i> sp ND <i>S. aurata</i> y <i>D. labrax</i>	Granada <i>et al.</i> , 2016 Cavallo <i>et al.</i> , 2007 Giangrande <i>et al.</i> , 2005
<i>Branchiomma luctuosum</i> (Grube, 1870)	ND	Cavallo <i>et al.</i> , 2007
<i>Arenicola loveni loveni</i> (Kinberg, 1866)	<i>Haliotis midae</i>	Yearsley <i>et al.</i> , 2011
<i>Arenicola marina</i> (Linnaeus, 1758)	<i>S. maximus</i> y <i>S. senegalensis</i> <i>Salmo salar</i>	Guerrero & Cremades, 2012 Lamprianidou, 2015

ND: No determinada

Familia Arenicolidae como remediadora orgánica

La Familia *Arenicolidae* (Johnston, 1835) está conformada por cerca de 30 especies distintas. Está compuesta por cuatro géneros: *Arenicolides* (Mesnil, 1898), *Branchiomaldane* (Langerhans, 1881), *Arenicola* (Lamarck, 1801) y *Abarenicola* (Wells, 1959), siendo los dos últimos los más numerosos y ampliamente reconocidos (Darbyshire, 2017).

Están presentes en sedimentos costeros de todo el mundo y pueden dominar la abundancia de la macrofauna de fondos arenosos y fangosos en zonas intermareales y submareales someras. Su presencia en estos ambientes se debe a su adaptación a fluctuaciones de temperatura, salinidad, oxígeno y tiempos de exposición a la desecación (Alyakrinskaya, 2003; Moreno *et al.*, 2007; García-Alonso *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2016).

En Chile, solamente se ha registrado la presencia del género *Abarenicola*, que se encuentra representado por cuatro especies: *Abarenicola pusilla* (Quatrefages, 1866) en latitudes entre 29 y 41°S, *Abarenicola affinis chiliensis* (Wells, 1963) (42°S), *Abarenicola assimilis assimilis* (Ehlers, 1897) y *Abarenicola assimilis brevior* (Well, 1963) (53-55°S), siendo la primera de ellas la única presente en ambientes con temperaturas mayores a 10°C (Rozbaczylo *et al.*, 2006; Moreno *et al.*, 2007).

Los organismos pertenecientes a la Familia *Arenicolidae* viven en las capas subsuperficiales del sedimento, en galerías semipermanentes con forma de *J* o *U* y que recubren de mucus para su estabilización y mantenimiento (Crane & Merz, 2012; Görlitz, 2012). Han sido reconocidos como ingenieros ecosistémicos de fondos marinos, concepto que se utiliza para describir organismos que alteran su ambiente directa o indirectamente resultado de su comportamiento alimenticio y su actividad metabólica (Fadhullah & Syakir, 2016). La bioturbación (o reelaboración de sedimentos) es el término que engloba las modificaciones producidas por estas especies como consecuencia de su modo de alimentación, actividades de mantenimiento de la galería, defecación en la superficie del sedimento y excavación en el sustrato. Estos procesos tienen una importante función ecológica, afectando a las características biogeoquímicas de los sedimentos marinos y a las comunidades bentónicas existentes en ellos (Fadhullah & Syakir, 2016; Crane & Merz, 2017; Koo & Seo, 2017). La tasa de bioturbación es función de la especie, su tamaño y densidad, y también de parámetros ambientales como la disponibilidad de alimento o la temperatura (Wethey *et al.*, 2008; Koo & Seo, 2017).

Los movimientos peristálticos de los segmentos de su cuerpo producidos por la acción de su musculatura provocan un fenómeno denominado bioirrigación. Este consiste en el bombeo activo de agua que transporta oxígeno, partículas orgánicas y sustancias disueltas entre el interior de la galería y la capa superficial del sedimento (Riisgard & Banta, 1998; Görlitz, 2012). Este proceso juega un papel fundamental en la oxigenación de las capas más profundas del sustrato acelerando la degradación biológica y remineralización de la materia orgánica por parte de microorganismos aerobios y favoreciendo el proceso de nitrificación (Hylleberg, 1975; Riisgard & Banta, 1998; Görlitz, 2012; Ito *et al.*, 2016). Asimismo, afecta a los flujos de nutrientes en la interfaz agua–sustrato promoviendo la eliminación de metabolitos hacia la superficie (Bergström *et al.*, 2017). Para *Arenicola marina*, el proceso de bombeo significa el paso de aproximadamente 1 litro de agua al día entre la columna de agua y el interior de la galería donde se encuentra (Wethey *et al.*, 2008).

Los poliquetos son bioindicadores de contaminación en ambientes marinos. Están presentes en fondos cerca de instalaciones acuícolas que liberan sus efluentes al medio acuático, caracterizados por condiciones de enriquecimiento orgánico y bajas concentraciones de oxígeno (Kinoshita *et al.*, 2008; Fadhullah & Syakir, 2016). Incluso pueden sobrevivir en ausencia total de oxígeno durante varios días (Oglesby, 1973). De los organismos pertenecientes al género *Abarenicola*, la especie *Abarenicola affinis chiliensis* presenta abundancias mayores al 95% en comparación con la macrofauna total existente en ambientes de este tipo, sometidos a hipoxia (0,75 mg/l de oxígeno disuelto) y con proporciones mayores al 20% de materia orgánica total (MOT) en el sedimento (Moreno *et al.*, 2007).

La supervivencia de la Familia *Arenicolidae* en estos ambientes está favorecida por las adaptaciones fisiológicas que poseen. Por un lado, la presencia de múltiples ramificaciones branquiales en la pared del cuerpo hace altamente eficiente su proceso de respiración (Crane & Merz, 2012). Por otra parte, poseen hemoglobina extracelular disuelta en sangre como principal pigmento respiratorio, y esta tiene una elevada afinidad por el oxígeno permitiendo su fijación y transporte aún en

condiciones de hipoxia (Wells, 1966; Moreno *et al.*, 2007; Hiebert, 2014). Además, pueden incrementar la concentración de esta proteína en sangre en respuesta a deficiencias de oxígeno en el ambiente (Alyakrinskaya, 2003). Para ejemplificar este fenómeno, la saturación media (porcentaje de sitios activos ocupados por oxígeno) de la hemoglobina de *Arenicolidae* ocurre a una presión parcial de oxígeno de 2 mm, mientras que la de los humanos ocurre a 27 mm (Wells, 1966). Este pigmento respiratorio tiene asimismo una función protectora, ya que ayuda en la regulación del pH interno de estos organismos, mantiene la homeostasis y presión osmótica del cuerpo y acelera la oxidación de sulfuro de hidrógeno (H₂S), compuesto tóxico generado por actividad microbiana en condiciones de bajo oxígeno (Alyakrinskaya, 2003; Chabasse *et al.*, 2006). Sin embargo, aunque pueden sobrevivir gracias a estas adaptaciones, muestran una disminución de su actividad metabólica en ambientes de hipoxia que puede producir cese de la alimentación, movimientos retardados e incluso inmovilidad total en los organismos (Wells, 1966; Alyakrinskaya, 2003).

Las especies de la Familia *Arenicolidae* son consumidoras de materia orgánica muerta (principalmente en forma de detritos) además de microalgas, bacterias, micro y meiofauna (Hylleberg, 1975; Riisgard & Banta, 1998; Alyakrinskaya, 2003; Olive *et al.*, 2009). Los representantes del género *Abarenicola* se alimentan mayoritariamente de detritos orgánicos que extraen del sustrato y agua intersticial, y que son posteriormente defecados en la superficie del sedimento. Sin embargo, *Abarenicola pacifica* puede adoptar diferentes formas de alimentación (depósito, suspensión o absorción de materia orgánica disuelta) dependiendo de la disponibilidad de alimento en el sustrato (Hiebert, 2014). El proceso de alimentación ocurre a través de una prolongación del aparato bucal denominada probóscide, estructura musculosa evaginable que posee glándulas de mucus (o papilas bucales) a las que adhieren las partículas orgánicas que posteriormente son llevadas a la cavidad bucal (Hiebert, 2014). El aparato digestivo se completa con la existencia de un esófago, estómago, intestino y ano. Tras la ingestión, depositan sus montículos fecales en la superficie del sedimento (Görlitz, 2012). Los productos metabólicos

nitrogenados generados como resultado del metabolismo (principalmente en forma de amoníaco) son liberados al exterior por orificios presentes en algunos segmentos del cuerpo, denominados nefridioporos (Wells, 1966; Hiebert, 2014). Estos organismos sintetizan y almacenan ácidos grasos y glucógeno (Alyakrinskaya, 2003; Olive *et al.*, 2009).

El tipo y forma de alimentación que presentan sumado a su capacidad de sobrevivir en condiciones de enriquecimiento orgánico convierten a las especies de la familia *Arenicolidae* en candidatas ideales para su implementación como bioremediadores orgánicos del lodo procedente de sistemas de producción acuícola, particularmente para cultivos intensivos en SRA dado que sus efluentes están constituidos por lodo con menor volumen y más concentración (Zhang *et al.*, 2013; Mongirdas *et al.*, 2017). El desarrollo de un componente bioremediador en base a *Arenicolidae* requiere de investigación aplicada debido a que el desarrollo de prototipos estará en función de la compatibilidad en los requerimientos ambientales y nutricionales del organismo con el lodo generado por el sistema de producción acuícola (Bischoff, 2007).

La Familia *Arenicolidae* es uno de los grupos de poliquetos que han demostrado su capacidad de reducción de MOP procedente de efluentes acuícolas en ensayos de laboratorio y sistemas multitróficos integrados (Dubois *et al.*, 2007; Barrington *et al.*, 2009; Yearsley *et al.*, 2011; Guerrero & Cremades, 2012; Lamprianidou, 2015). Además, el reciclaje de lodo puede producir compuestos para su inclusión en alimento acuícola. Los poliquetos marinos pueden ser un ingrediente importante en el alimento para algunas especies de acuicultura, debido a que poseen ácidos grasos que consiguen mejorar su valor nutricional (Wouters *et al.*, 2002; Meunpol *et al.*, 2005; Bischoff *et al.*, 2009).

Estudios preliminares sugieren que *Abarenicola pusilla* (Quatrefages, 1866) podría ser utilizada como especie bioremediadora, considerando que se ha observado crecimiento al ser cultivados con lodo procedente de SRA marinos (Valenzuela-Olea,

com.pers.). Sin embargo, se requieren estudios que permitan fortalecer la factibilidad biológica a través de la determinación de su eficiencia de remoción y asimilación de lodo acuícola, a fin de evaluar su factibilidad tecnológica como un proceso unitario biológico de remoción de sólidos suspendidos totales generados en sistemas de producción acuícola en recirculación. Por otro lado, existe la posibilidad de obtención de organismos de *A. pusilla* procedentes de cultivo, lo que permite utilizar individuos de una misma edad y tamaño. Esto implica mayor igualdad en las réplicas experimentales y mejor capacidad de comparación entre los resultados obtenidos (Görlitz, 2012). Asimismo, esto hace que no sea necesario la obtención de los organismos a través de muestreos biológicos en el medio natural, mejorando la sustentabilidad ambiental y factibilidad del estudio.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los sistemas de recirculación para acuicultura (SRA) mantienen una parcial independencia con el medio acuático, ya que su tecnología, basada en el tratamiento y reutilización del agua de cultivo genera externalidades que se liberan al medio ambiente. Entre ellas está el lodo, cuya gestión constituye en la actualidad un importante desafío ambiental y logístico. El lodo se origina en el proceso de alimentación y metabolismo de los organismos cultivados y está constituido principalmente por compuestos orgánicos. La liberación de lodo acuícola al medio acuático provoca alteraciones en las condiciones fisicoquímicas del agua y en las comunidades biológicas existentes. Por ello, en la legislación orientada a la protección del medio ambiente se definen límites máximos de descarga másica permitidos según las características del lodo y del cuerpo de agua receptor. Cuando estos límites son excedidos, lo que ocurre generalmente en sistemas acuícolas intensivos, deben realizarse una serie de tratamientos para remoción de carga orgánica que permita cumplir la normativa. Posteriormente, debe realizarse una gestión de los sólidos para su adecuado manejo durante la disposición final del lodo en vertederos autorizados.

El tratamiento efectivo del lodo es una de las barreras críticas para el desarrollo sustentable de los SRA, lo que hace que la búsqueda de alternativas para reducir y tratar este compuesto sea actualmente una de las grandes prioridades a nivel mundial asociadas a su crecimiento. La salinidad del lodo producido en cultivo de especies marinas limita su uso como fertilizante en suelos y presenta menor rendimiento en procesos de digestión anaerobia, principales técnicas alternativas propuestas para su tratamiento. Esto ha hecho que la remediación con macroinvertebrados se haya formulado como una solución a este desafío. Poliquetos de la Familia *Arenicolidae* son considerados importantes candidatos para su implementación como organismos extractivos en efluentes de SRA marinos. Se ha observado que la especie *Abarenicola pusilla* puede crecer y alimentarse al ser expuesta a lodo acuícola, y tal observación permite suponer un potencial para desarrollar un proceso unitario biológico en base a este poliqueto como bioremediador orgánico.

HIPÓTESIS

El poliqueto *Abarenicola pusilla* reduce significativamente la concentración de materia orgánica y nutrientes presentes en el lodo generado en un sistema de recirculación para acuicultura marina.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el potencial de remoción de componentes orgánicos presentes en el lodo de un sistema de recirculación para acuicultura marina utilizando el poliqueto *Abarenicola pusilla*.

Objetivos Específicos

1. Estimar la tasa de remoción de componentes orgánicos contenidos en el lodo procedente de un SRA marino por *Abarenicola pusilla* con diferentes porcentajes de introducción de carga orgánica.
2. Determinar el rendimiento de remoción y asimilación de componentes orgánicos presentes en lodo acuícola por *Abarenicola pusilla* en un SRA a nivel experimental con diferentes rangos de generación de este compuesto y a diferentes densidades de organismos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Con el fin de evaluar el potencial de *A. pusilla* como remediador orgánico, se realizaron una serie de ensayos donde los organismos fueron implementados en diferentes unidades experimentales. Todas contaban con una capa de sustrato y una de agua superficial que recubría dicho sedimento, donde se procedió asimismo a la incorporación del lodo acuícola. Sus características y los análisis realizados en cada uno de estos componentes durante los ensayos se muestran en la Figura 2.

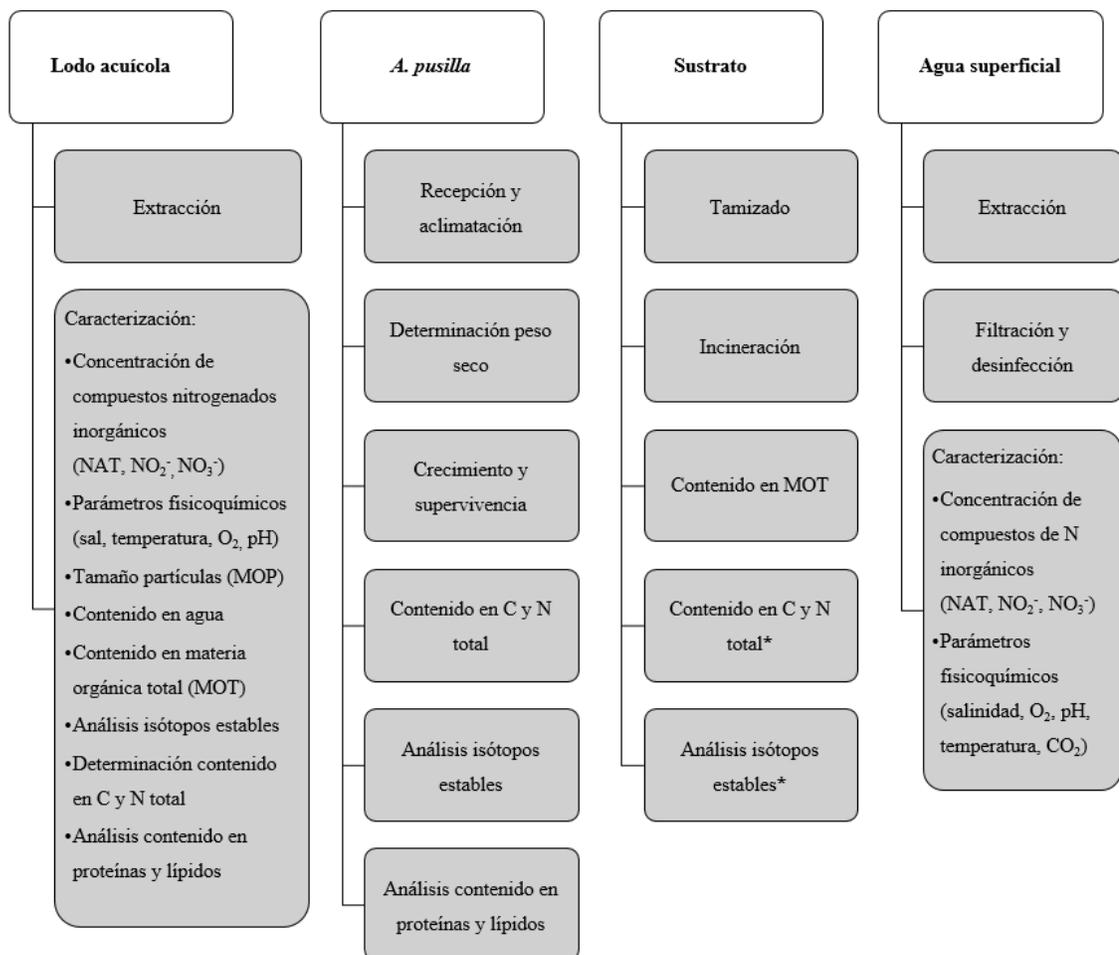


Figura 2: Análisis realizados a los distintos componentes que conforman las unidades de remediación con *A. pusilla*. Los procedimientos señalados con (*) se llevaron a cabo solamente al final de las experiencias.

1. Lodo acuícola

1.1. Extracción

El lodo utilizado en los diferentes ensayos de remediación fue obtenido del cultivo en SRA de la especie marina *Seriola lalandi* (Valenciennes, 1833). El lodo fue recolectado del retrolavado automático de un filtro de tambor radial con pantalla giratoria (60 μm , HEX F1-1, Alemania) al que se acopló un tanque de sedimentación cilíndrico con fondo troncocónico de 220 litros (Tal *et al.*, 2009).

El lodo fue extraído del fondo del tanque de sedimentación para ser utilizado en los ensayos en un tiempo máximo de 24 - 48 horas después de su remoción desde el sistema acuícola, para intentar reducir cualquier tipo de degradación por acción microbiológica (Mongirdas *et al.*, 2017).

1.2. Caracterización

La concentración de componentes nitrogenados inorgánicos del lodo fue determinada con un espectrofotómetro (Hach DR-3900). El nitrógeno amoniacal total (NAT) fue determinado con el método Nessler (Hach 8038), el nitrito (NO_2^-) con el método de diazotización (Hach 8507) y el nitrato (NO_3^-) con el método de reducción de cadmio (Hach 8192). Anterior a estos análisis, el lodo fue filtrado (0,2 μm) para disminuir el error asociado que puede implicar en las mediciones la presencia de sólidos en suspensión, microorganismos y partículas coloidales (Khan *et al.*, 2005; Perera *et al.*, 2007; Aruety *et al.*, 2016; Mayhead *et al.*, 2018). Parámetros fisicoquímicos como temperatura, concentración de oxígeno disuelto y pH fueron medidos con una sonda portátil multiparámetro (Hach HQ40D) y la determinación de salinidad se realizó utilizando un refractómetro (RHS-10ATC).

La distribución de tamaños de las partículas se determinó haciendo pasar el lodo a través de una torre de tamices (80 – 5000 μm). El contenido en agua se calculó como la diferencia de peso entre el lodo fresco y seco. Para ello, las muestras recogidas se

deshidrataron en un horno mufla a $60 \pm 5^\circ\text{C}$ realizando mediciones cada 24 horas hasta alcanzar peso constante, para evitar la volatilización de compuestos lipídicos y la eliminación del agua de absorción, que incluye la fracción de agua ligada a las proteínas (Winberg & Duncan, 1971; Green & Boyd, 1995; Bischoff, 2007; Yearsley *et al.*, 2009; MacDonald *et al.*, 2013; Fang *et al.*, 2016). El contenido en materia orgánica total (MOT) fue determinado como porcentaje de pérdida de biomasa por incineración de la muestra en un horno mufla a 550°C durante 24 horas (Mason *et al.*, 1983; APHA, 1998; Bischoff, 2007; Palmer, 2010). La caracterización de la concentración de componentes orgánicos se muestra en el apartado 6.

2. *Abarenicola pusilla*

2.1. Recepción y aclimatación

Los individuos de la especie *Abarenicola pusilla* fueron transportados vivos en un sustrato vegetal húmedo a $17 - 18^\circ\text{C}$ desde el Laboratorio de Ciencias Marinas y Limnológicas de la Universidad Austral de Chile, localizado en Valdivia hasta el Laboratorio Experimental de Acuicultura (LEDA) de la PUCV (Valparaíso) por vía terrestre. A su llegada, se procedió a su purga o desarenado con el fin de eliminar posible contenido estomacal. Para ello, se mantuvieron durante 3-4 horas en un sistema con agua de mar filtrada que contaba con flujo abierto y en ausencia de sedimento (Palmer, 2010). A continuación, se establecieron en un sustrato inerte (Caval cód. 133631) sin adición de lodo durante 48 horas para su aclimatación (Weston *et al.*, 2000; Nelson *et al.*, 2012).

2.2. Determinación peso seco

El peso de los organismos fue determinado con una balanza de precisión (Jadever SNUG II-300). La determinación del peso húmedo se realizó eliminando el exceso de agua de los organismos con un material absorbente, proceso que debe ser rápido para evitar el colapso de las branquias fuera del agua o sedimento, factor clave para su supervivencia. El peso seco se determinó tras deshidratación en un horno mufla ($60 \pm 5^\circ\text{C}$ hasta alcanzar peso constante) para evitar la volatilización de compuestos lipídicos y la

eliminación del agua de absorción, que incluye la fracción de agua ligada a las proteínas (Edmondson, 1971; Lovegrove, 1971; Paterson, 1982; Mason *et al.*, 1983; Bischoff, 2007). El contenido en agua fue obtenido como porcentaje según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ agua} = \{(\text{Peso húmedo} - \text{Peso de muestra deshidratada}) \times 100\} / \text{Peso húmedo}$$

Ecuación 1

2.3. Crecimiento

2.3.1. Tasas de crecimiento

El porcentaje de crecimiento diario de los organismos fue calculado en base a su peso seco utilizando la tasa específica de crecimiento (μ) según la siguiente fórmula (Jørgensen *et al.*, 1993):

$$\mu = 100 * \{\ln (W_t) - \ln (W_0) / t\} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

μ = Tasa específica de crecimiento (días⁻¹)

W_0 = peso seco promedio anterior al experimento (g)

W_t = peso seco promedio al término del experimento (g)

t = tiempo en días

Asimismo, se calculó la tasa absoluta de crecimiento (TAC) relacionando posteriormente el incremento de biomasa de los organismos con el tiempo de implementación en las unidades experimentales y con la superficie de las mismas (Hopkins, 1992):

$$TAC = (W_t - W_0) / t \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde:

W_0 = peso seco promedio anterior al experimento (g)

W_t = peso seco promedio al término del experimento (g)

t = tiempo en días

2.3.2. Relación producción - biomasa

Un buen indicador de la producción de biomasa en especies de macrobentos marinos es la relación producción – biomasa (P/B), que fue también determinada como índice de crecimiento según la siguiente fórmula (Tumbiolo & Downing, 1994):

$$\text{Log } P = 0,24 + 0,96 * \text{log } (B) - 0,21 * \text{log } (M_{\text{máx}}) + 0,03 * T_s - 0,16 * \text{log } (D+1)$$

Ecuación 4

Donde:

P = Producción de biomasa de poliquetos (g/m² año)

B = Densidad de poliquetos implementada al inicio de las experiencias (g/m²)

M_{máx} = Peso seco de los individuos alcanzado al final de las experiencias (mg)

T_s = Temperatura del agua (°C)

D = Profundidad de la columna de agua (m)

2.4. Supervivencia

La supervivencia de *A. pusilla* fue monitoreada como un indicador del correcto funcionamiento de los sistemas de remediación y para analizar posibles diferencias entre las series bajo distintas condiciones experimentales. La mortalidad de *Abarenicola pusilla* fue registrada diariamente, recolectando los organismos muertos de la superficie del sedimento en las unidades experimentales. La supervivencia fue calculada según la proporción de individuos que viven al final de cada experiencia, en relación con el número total de ellos que fueron implementados al comienzo, expresándose en porcentaje (Pechenik & Cerulli, 1991; Bischoff, 2007).

3. Sustrato

El sedimento funcionó como hábitat para los organismos. Se utilizó sustrato comercial (Caval cód. 133631), el cual fue sometido previamente a incineración (550 ± 50 °C durante 24 horas) para eliminar posible contenido en materia orgánica (APHA, 1998; Bischoff, 2007; Palmer, 2010). Se realizó asimismo un tamizado anterior a su

implementación a los sistemas para conseguir una granulometría entre 0,063 y 0,5 mm, ya que en este rango se obtienen mayores tasas de supervivencia y de actividad metabólica para especies del género *Abarenicola*, como son *A. pacifica* y *A. claparedi vagabunda* (Crane & Merz, 2012).

La introducción del lodo a las unidades se realizó una vez incorporado el sustrato. Dicha introducción no se realizó como una capa expuesta en la parte superior de este, sino que se ubicó en las capas subsuperficiales, agregando posteriormente una capa adicional de sedimento inerte para evitar la lixiviación de sus componentes (Olive *et al.*, 2006).

4. Agua superficial

Las unidades de remediación contaron permanentemente con una capa de agua superficial, ya que en estas condiciones los organismos presentan mayores índices de actividad y alimentación (Görlitz, 2012).

4.1. Extracción, filtración y desinfección

El agua fue extraída de forma directa del mar gracias a un sistema de bombeo (Vogt AM-751), filtrada previamente para reducir la cantidad de sólidos suspendidos mediante el uso de filtros de arena (Jacuzzi TP-30) y de cartucho (Vigaflow 20, 5 y 1 μ m) y tratada con sistema ultravioleta (Red Base 40w UV-C T5) (Olive *et al.*, 2006; Merino *et al.*, 2007b).

4.2. Concentración de componentes nitrogenados inorgánicos

Al igual que para la caracterización del lodo acuícola, la concentración de componentes nitrogenados inorgánicos del agua en los sistemas de remediación fue determinada con un espectrofotómetro (Hach DR-3900). El nitrógeno amoniacal total (NAT) fue determinado con el método Nessler (Hach 8038). La concentración de NAT debe ser mantenida en valores menores a 8 mg/l, ya que se ha reportado que aumentos de esta concentración producen toxicidad e incluso muerte en otras especies de poliquetos en sistemas experimentales con temperatura promedio de $19,9 \pm 0,5$, pH de $7,97 \pm 0,24$ y

salinidad de $26,3 \pm 1,4$ (Bischoff, 2007; Seekamp, 2017). Las diferencias diarias en la concentración de estos componentes se analizaron como la tasa de excreción diaria por los organismos, medidas en mg/l día. El nitrito (NO_2^-) fue analizado con el método de diazotización (Hach 8507) y el nitrato (NO_3^-) con el método de reducción de cadmio (Hach 8192).

4.3. *Parámetros fisicoquímicos de calidad de agua*

Los parámetros fisicoquímicos en el agua superficial de las unidades fueron monitoreados diariamente para determinar la capacidad de *A. pusilla* de sobrevivir y crecer en las condiciones experimentales propuestas. Adicionalmente, fue posible estimar la variabilidad en la concentración de estos componentes bajo las distintas condiciones experimentales.

La concentración de oxígeno disuelto, temperatura y pH del agua superficial fueron medidos diariamente con una sonda portátil multiparámetro (Hach HQ40D). La temperatura fue mantenida entre 17 y 20 °C (Retraubun *et al.*, 1996; Olive *et al.*, 2006; Moreno *et al.*, 2007) a través del sistema de climatización de la sala de bioensayos. El pH debe ser mantenido entre 7,5 y 7,9 (Toulmond, 1975; Alyakrinskaya, 2003). No fue necesario ajuste de pH en estas experiencias, ya que los valores se encontraron dentro de ese rango. Todas las unidades experimentales fueron equipadas con un suplemento de aire a través de un difusor (Sunsun HT – 500) (Bischoff, 2007). Esto permitió una saturación de oxígeno en el agua cercana al 100%, con el fin de evitar la presencia de condiciones de bajo oxígeno en el sustrato donde estaban implementados los organismos, lo que podría inducir a menores índices de alimentación y tasa metabólica (Alyakrinskaya, 2003).

La salinidad fue registrada diariamente utilizando un refractómetro (RHS-10ATC) y mantenida respectivamente a 36 y 30 g/l, dependiendo de las experiencias realizadas (Alyakrinskaya, 2003; Moreno *et al.*, 2007; Hiebert, 2014; Valenzuela-Olea, *com. pers.*). En caso de incrementos de salinidad fuera de este rango por fenómenos de evaporación, se *procedió* a la adición de agua destilada para el mantenimiento de esta

condición. La concentración de dióxido de carbono (CO₂) disuelto en el agua fue determinada con un analizador (OxyGuard G03C2).

5. Diseño y funcionamiento de los sistemas de remediación orgánica con *A. pusilla*

Con el fin de evaluar el potencial de remoción de compuestos orgánicos contenidos en lodo acuícola de un SRA marino por *Abarenicola pusilla*, se diseñaron e implementaron dos sistemas de remediación para la incorporación de estos organismos. El objetivo de las experiencias realizadas en el sistema I fue determinar en primera instancia la compatibilidad de esta especie con los componentes orgánicos del lodo utilizado, evaluando su tasa de remoción y asimilación según distintas concentraciones de lodo añadido. En los ensayos realizados en el sistema II se determinó el rendimiento de remoción de lodo por *A. pusilla* según el rango de generación de este compuesto en un SRA marino a nivel experimental. Las condiciones generales de estos ensayos se muestran en la Figura 3.

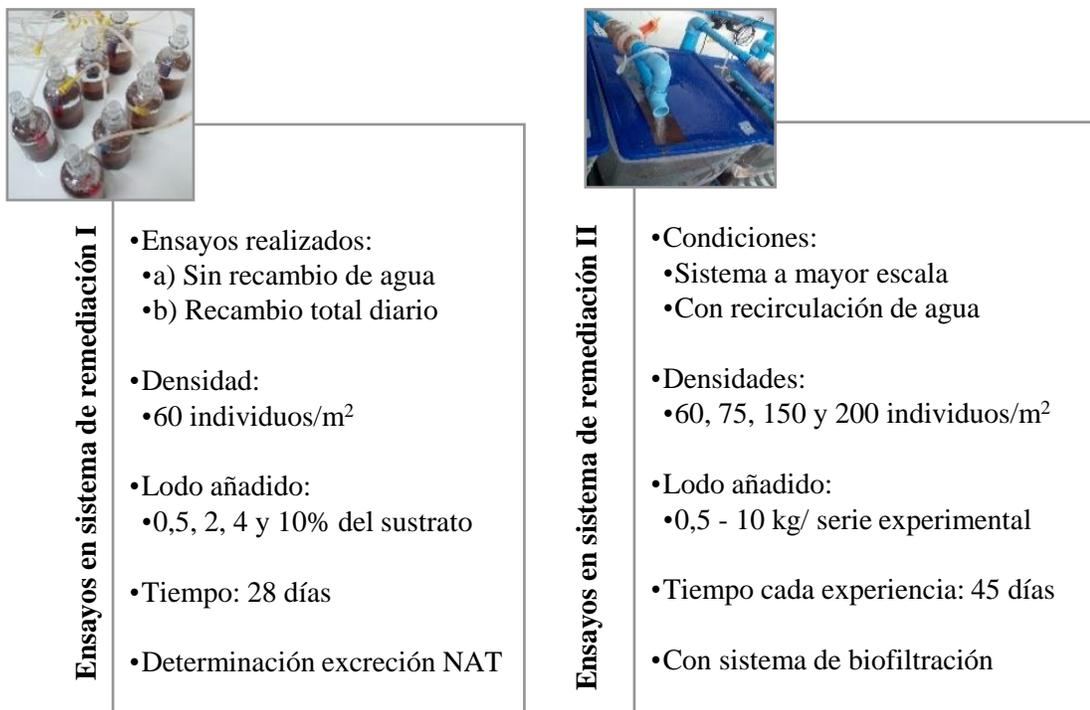


Figura 3: Diseño de los ensayos realizados en los sistemas de remediación con *A. pusilla*.

5.1. Sistema de remediación I

Los ensayos realizados en este sistema tuvieron como objetivo determinar la compatibilidad de *A. pusilla* con el lodo, estimando la tasa de remoción de MOT y su crecimiento y supervivencia. Por otro lado, se determinó la tasa de excreción de NAT por los organismos ya que es uno de los factores más importantes causantes de mortalidad en poliquetos en ensayos de laboratorio (Bischoff, 2007; Seekamp, 2017). Además, la obtención de este resultado permitió realizar el dimensionamiento de los biofiltros a implementar en el sistema II. El lodo utilizado para los ensayos en este sistema fue obtenido del cultivo en SRA de la especie marina *Seriola lalandi* (Valenciennes, 1833) operando con 310 organismos con un peso promedio (\pm SD) de $456,2 \pm 54,3$ g y una densidad de cultivo de $30,1 \text{ kg/m}^3$. La dieta utilizada declara un contenido de 45% de proteína bruta, 20% de materia grasa, 9% de ceniza y 1,4% de fósforo (NOVA ME 300, calibre 6,4 mm). Los peces fueron alimentados al 1,5% de la biomasa (Orellana *et al.*, 2014).

Este sistema I contaba con 16 unidades experimentales independientes ordenadas en 4 series, de 500 ml cada una. En ellas se implementó una capa de sustrato de 5 cm de espesor ($130,41 \pm 0,25$ g) y se añadieron diferentes porcentajes de lodo acuícola en cada serie (0,5%, 2%, 4% y 10%) en comparación con el contenido total de sustrato inerte introducido (Batista *et al.*, 2003; Olive *et al.*, 2006). En comparación con la biomasa de organismos, la adición fue en cada serie de $1,56 \pm 0,19$; $5,73 \pm 0,55$; $11,20 \pm 0,81$ y $25,98 \pm 3,69$ g lodo/ g poliqueto, respectivamente. Todas las unidades experimentales fueron equipadas con un suplemento de aire a través de un difusor (Sunsun HT – 500).

En cada serie experimental (de tres réplicas) se implementó un control, que consistió en una unidad sin poliquetos (Bischoff, 2007; Berntsen, 2018). Los individuos fueron implementados a una densidad de 60 organismos/m² ($81,52 \pm 20,14 \text{ g/m}^2$), considerada la densidad límite soportada por *A. pusilla* en ensayos en laboratorio (Valenzuela-Olea, *com. pers.*). Se realizaron distintos tipos de ensayos en este sistema en términos de recambio de agua. En el primero de ellos se mantuvieron las unidades sin

flujo ni recambio de agua. Sin embargo, debido a las mortalidades obtenidas, en las siguientes experiencias se realizó el recambio del 100% del agua cada 24 horas, procedimiento que se realizó posteriormente a las mediciones de calidad de agua en el sistema.

5.2. Sistema de remediación II

En este sistema II fue incorporado un sistema de recirculación de agua y equipos de filtración biológica. Los ensayos para la estimación del rendimiento de remoción orgánica de *A. pusilla* en el sistema II fueron llevados a cabo usando lodo acuícola procedente de un SRA con *Seriola lalandi* con un peso promedio (\pm SD) de $3000,2 \pm 110,4$ g ($n = 29$) y una densidad de cultivo de $10,85$ kg/m³. La dieta utilizada declara un contenido de 45% de proteína bruta, 20% de materia grasa, 9% de ceniza y 1,4% de fósforo (NOVA ME 2000, calibre 12 mm). Los peces fueron alimentados al 0,5% de la biomasa (Orellana, *com. pers.*). La tasa de generación de lodo del SRA pudo determinarse anterior a los ensayos calculando la cantidad de lodo húmedo producido diariamente por kg de alimento entregado a los organismos ($n = 5$), debido a su acumulación en el tanque de sedimentación utilizado para su extracción.

Se llevaron a cabo dos tipos de experimentos. Uno con la adición de diferentes concentraciones de lodo en cada serie, relacionando este aporte con la tasa de generación diaria de lodo en el SRA con *Seriola lalandi* ($125,03 \pm 0,06$ hasta $2503,62 \pm 2,73$ g por unidad experimental) a una densidad de 60 individuos/m². El otro incorporando a cada serie la cantidad de lodo máxima generada al día ($2503,62 \pm 2,73$ g por unidad) e implementando diferentes densidades de individuos (60, 75, 150 y 200 individuos/m²). La asimilación de componentes orgánicos del lodo fue determinada para los organismos implementados a mayor densidad en el ensayo, en comparación con su contenido al inicio de las experiencias. El detalle del diseño se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2: Diseño de los experimentos realizados en el sistema de remediación II. El peso se expresa como peso húmedo (g).

Experimento 1				
Lodo (g/unidad exp.)	125,03 ± 0,06	500,69 ± 0,67	1000,79 ± 0,51	2503,62 ± 2,73
Lodo (g lodo/g poliqueto)	16,80 ± 1,36	64,10 ± 9,52	116,13 ± 5,10	261,38 ± 46,91
Densidad (org/m ²)	60	60	60	60
(g poliqueto/m ²)	112,1 ± 8,64	118,8 ± 16,37	129,45 ± 5,66	147,00 ± 27,69
Experimento 2				
Lodo (g/unidad exp.)	2503,62 ± 2,73	2503,62 ± 2,73	2503,62 ± 2,73	2503,62 ± 2,73
Lodo (g lodo/g poliqueto)	325,01 ± 57,84	264,84 ± 33,14	121,01 ± 13,69	95,33 ± 5,47
Densidad (org/m ²)	60	75	150	200
(g poliqueto/m ²)	117,9 ± 19,7	143,35 ± 18,34	312,90 ± 33,25	404,97 ± 22,89

5.2.1. Diseño

El sistema II contó con 16 unidades experimentales conformadas de material plástico con un volumen útil de 33,6 litros y una superficie de 1344 cm². En el fondo de cada una se incorporó una capa de grava de 5 cm de espesor y se dispuso un tubo de drenaje subsuperficial horizontal de 40 cm de largo, con perforaciones cada 5 cm para asegurar el paso del agua hacia la salida (Honda & Kikuchi, 2002; Palmer, 2010). Sobre la grava, se incorporó una capa de arena fina de 10 cm de espesor (2502,40 ± 2,45 g por unidad) donde se implementaron los organismos. Para evitar la mezcla entre sustratos se incorporó una fibra textil entre ambas capas. La capa de agua superficial contaba con 10 cm de columna. Todas las unidades experimentales fueron equipadas con un suplemento de aire a través de un difusor (Sunsun HT – 500). El detalle del diseño de las unidades se muestra en la Figura 4A.

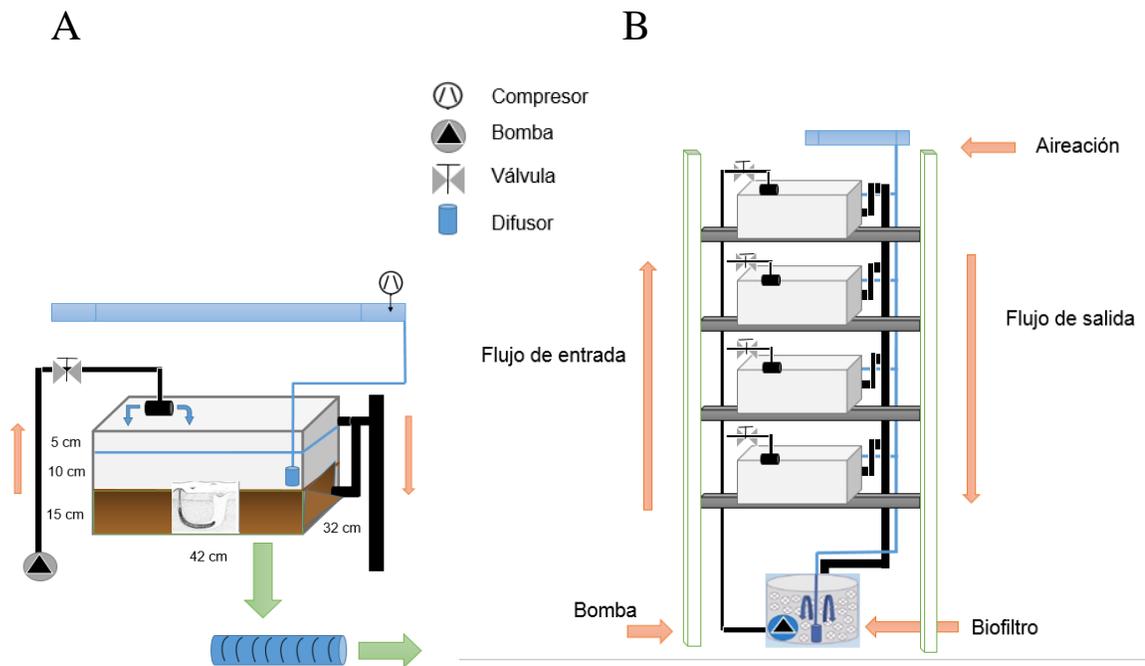


Figura 4: Diseño sistema de remediación II. A) Detalle de las unidades de filtración. Las flechas naranjas indican la dirección del flujo de agua. Las flechas verdes muestran el funcionamiento del sistema de drenaje de agua. B) Diseño de una serie completa de unidades experimentales.

Las unidades de filtración fueron implementadas en series de cuatro formando así una serie independiente con respecto a las demás (Figura 4B). En cada serie, tres unidades correspondían a réplicas experimentales con poliquetos y se implementó una unidad control por cada serie o condición experimental (Bischoff, 2007; Berntsen, 2018). El agua fue recirculada con una bomba sumergible (Grech CHJ - 6000) con un caudal de 54 l/h, para permitir el recambio total de agua en las unidades cada hora (Bischoff, 2007). Cada serie dispone de un biofiltro independiente, dimensionado según la tasa de excreción máxima de NAT alcanzada en el sistema de remediación I.

5.2.2. Dimensionamiento filtros biológicos

La introducción de filtros biológicos en el sistema de remediación II tiene que ver con la necesidad de mantener la concentración de NAT a niveles inferiores a 8 mg/l en el agua, para evitar mortalidad de los organismos debido a su toxicidad (Bischoff, 2007). Se

implementaron biofiltros aerobios tipo *reactor de biofilm en lecho móvil*, que contaban con la aplicación de un compresor de aire para facilitar la oxigenación y el proceso de nitrificación microbiano (Ebeling & Timmons, 2012). En ellos se introdujeron portadores de biofilm de polipropileno con un área específica de 800 m²/m³ para el anclaje de las bacterias nitrificantes (Drennan *et al.*, 2006; Rusten *et al.*, 2006). Estos permanecen en suspensión a medida que el agua fluye a través del biofiltro, que se airea activamente.

El volumen necesario que debían poseer los filtros biológicos fue calculado utilizando el incremento máximo diario en la concentración de NAT obtenido en el sistema I (Drennan *et al.*, 2006). Los cálculos se muestran en el Anexo 1. Una vez determinado dicho volumen, se aplicó un factor de seguridad de un 25% para definir el volumen de operación del reactor del biofiltro. Esto con el fin, por un lado, de favorecer el movimiento tanto del agua como de los biomedios o sustrato en su interior. Por otra parte, para evitar posibles pérdidas en los sistemas por rebalse debido al movimiento activo y turbulencia del agua (Ebeling & Timmons, 2012).

5.2.3. Determinación del tamaño mínimo muestral

Para asegurar el fundamento estadístico de los ensayos realizados, se determinó el número mínimo necesario de poliquetos a implementar en el sistema II. El cálculo fue realizado para poder evaluar con base estadística si las diferencias en la remoción de MOT obtenidas por *A. pusilla* en los ensayos eran o no significativas. El análisis se realizó según la siguiente fórmula (Fernández, 1996):

$$n = \{2 * (Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 * S^2\} / d^2 \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde:

n = Número de poliquetos necesario en los ensayos

Z_α = Valor Z correspondiente al riesgo estadístico deseado

Z_β = Valor Z correspondiente al poder estadístico deseado

S² = Varianza de la variable cuantitativa que tiene el grupo de referencia

d = Valor mínimo de la diferencia que se desea detectar

Los resultados se muestran en el Anexo 2. Se asumió un riesgo estadístico de 0,05 y un poder estadístico del 90% para conferir solidez a los cálculos realizados y poder detectar diferencias en los promedios de remoción de MOT obtenidos (Fernández, 1996). El dato utilizado para la varianza del grupo de referencia (S^2) fue el obtenido para cada serie experimental en los ensayos del sistema de remediación I, ya que anteriormente no existían datos de este tipo en la literatura. La variable cuantitativa utilizada fue el porcentaje de remoción de MOT para cada condición experimental.

6. Análisis de remoción y asimilación de componentes orgánicos por *A. pusilla*

La única fuente de alimento suministrada a *A. pusilla* durante los ensayos consistió en el lodo acuícola generado en el SRA marino, cuya adición se realizó al inicio de cada experimento. El contenido de componentes orgánicos en el lodo fue analizado al inicio y durante las experiencias para determinar la capacidad de remoción y asimilación de estos componentes en los sistemas de remediación.

6.1. Materia orgánica total

El contenido en MOT presente en el sedimento de las unidades experimentales fue usado como indicador del consumo de los componentes orgánicos del lodo por *A. pusilla* (Bischoff, 2007). Para analizar el contenido de MOT en el sustrato, se tomaron muestras de la totalidad de la capa de sedimento con la introducción de cilindros plásticos verticales (sistema 1 = 98,12 cm³; sistema 2 = 196,25 cm³). El procedimiento implicó la toma de tres muestras aleatorias de cada unidad control (cada una formada por tres submuestras). Asimismo, se tomaron tres submuestras en cada unidad experimental, que conformaron en conjunto una muestra para cada unidad (Bischoff, 2007; Palmer, 2010).

El sedimento extraído fue deshidratado (60°C hasta peso constante) e incinerado (24 horas a 550°C). La diferencia en peso existente entre las muestras secas e incineradas indica el contenido en MOT del sustrato (Bischoff, 2007; Palmer, 2010). Los resultados fueron calculados como porcentaje de MOT removida respecto al total implementado y

como g de MOT removidos por m² y día. Se procedió de la misma forma para el análisis de MOT contenida en el lodo acuícola.

6.2. Nitrógeno total, Carbono total y perfil isotópico

El contenido en nitrógeno total (N), carbono total (C) y el perfil de isótopos estables fueron determinados usando un espectrómetro de masas de relación isotópica (IRMS, Thermo Delta Advantage) acoplado a un analizador elemental (Flash EA2000) (Silva *et al.*, 2011). La concentración de N y C total fue analizada en el lodo acuícola, en la biomasa de los organismos y en el sedimento con el fin de evaluar variaciones en su contenido tras los ensayos y determinar la efectiva remoción y asimilación de estos compuestos en los sistemas de remediación (Palmer, 2010; Baharudin, 2014).

Los perfiles de isótopos estables fueron analizados para $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$, dos de los isótopos más comúnmente utilizados en estudios en ambientes acuáticos. Su análisis es una de las herramientas más adecuadas como indicador del flujo y transferencia de materia orgánica a través de las redes tróficas (Bianchi & Canuel, 2011; Andrade *et al.*, 2016), siendo utilizados también en ensayos de remediación orgánica con poliquetos para determinar la remoción y asimilación de estos componentes (Callier *et al.*, 2014). El análisis de asimilación de carbono orgánico (CO) por isótopos se realizó adaptando el modelo de Bianchi (2007) según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ CO asimilado} = \{(\bar{\delta}^{13}\text{C } A. \textit{pusilla} - \bar{\delta}^{13}\text{C estándar}) / (\bar{\delta}^{13}\text{C inicial} - \bar{\delta}^{13}\text{C estándar})\} * 100$$

Ecuación 6

Donde:

$\bar{\delta}^{13}\text{C } A. \textit{pusilla}$: Composición isotópica de los organismos al final de las experiencias

$\bar{\delta}^{13}\text{C inicial}$: Composición isotópica de los organismos al inicio de las experiencias

$\bar{\delta}^{13}\text{C estándar}$: Composición isotópica de otras especies del género *Abarenicola* en ambientes marinos (LeDuc *et al.*, 2006).

Para este análisis, se tomó como composición isotópica extrema (*end-member*) el perfil de un sedimento con condiciones de enriquecimiento orgánico bajo instalaciones acuícolas en el mar (Jackson & Dasgupta, 2008; Quiroga, *com.pers.*) y se utilizaron perfiles de isótopos de otras especies de poliquetos en ambientes marinos (LeDuc *et al.*, 2006; Mayr *et al.*, 2011; Andrade *et al.*, 2016; Zapata-Hernández *et al.*, 2016). Los datos de perfiles utilizados se detallan en el Anexo 3.

6.3. Determinación del contenido de proteínas y ácidos grasos

Se determinó la concentración de proteínas y ácidos grasos en el lodo acuícola y en la biomasa de *A. pusilla* anterior y posteriormente a los ensayos. El contenido de ácidos grasos fue determinado como extracto etéreo por extracción con solvente orgánico en un equipo *Soxhlet* (AOAC 963.15) (Vergara *et al.*, 1999). Este análisis es utilizado como indicador de procedencia de la dieta de los organismos en ecosistemas marinos. Asimismo, se ha utilizado en ensayos de remediación con poliquetos alimentados con lodo acuícola para determinar así su capacidad de asimilación por los organismos (Bischoff *et al.*, 2009).

La concentración de proteínas fue analizada según el método de determinación microquímica de nitrógeno o método Kjeldahl (AOAC 960.52). El análisis de proteínas fue realizado para comprobar la asimilación de estos componentes contenidos en el lodo por *A. pusilla*. Estudios con otras especies de poliquetos pertenecientes a la familia *Arenicolidae* muestran que estos organismos pueden asimilar las proteínas contenidas en la dieta que consumen o el sustrato donde habitan (Hylleberg, 1975; Honda & Kikuchi, 2002; Alyakrinskaya, 2003; Coutinho *et al.*, 2017).

7. Análisis estadísticos

Se utilizó el software SPSS v.19 para la realización de los análisis estadísticos. La normalidad y homogeneidad de los datos obtenidos fueron comprobadas mediante la prueba de Shapiro-Wilk. La significancia estadística en cuanto a la remoción y asimilación de N y C, cambios en el perfil isotópico y contenido en proteínas y ácidos grasos de los organismos fue determinada mediante prueba T de Student ($p < 0,05$). La significancia estadística en cuanto a remoción de MOT, supervivencia, tasas de crecimiento y tasa de excreción de NAT fue determinada por análisis ANOVA de una vía. Las diferencias significativas fueron analizadas utilizando el test de Tukey a nivel de significancia $p < 0,05$.

RESULTADOS

Objetivo Específico N° 1. Estimar la tasa de remoción de componentes orgánicos contenidos en el lodo procedente de un SRA marino por *A. pusilla* con diferentes porcentajes de introducción de carga orgánica.

Análisis del lodo acuícola

Los ensayos para la estimación de remoción orgánica en el sistema I fueron llevados a cabo usando lodo acuícola procedente de un SRA con *Seriola lalandi*. Los resultados del análisis de lodo se muestran en la Tabla 3. La distribución de tamaños de partícula mayoritarios se concentró principalmente entre 400 – 600 μm , representando estos el 46% del total (Anexo 4A).

Tabla 3. Caracterización del lodo acuícola utilizado en los experimentos realizados en el sistema I. (Media \pm SD, n = 5).

pH	7,28 \pm 0,01
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	21,8 \pm 0,10
O ₂ (% saturación)	69,85 \pm 1,44
O ₂ (mg/l)	4,93 \pm 0,10
Nitrógeno amoniacal total (NAT) (mg/l)	1,95 \pm 0,13
Nitrito (NO ₂ ⁻ - N) (mg/l)	0,48 \pm 0,02
Nitrato (NO ₃ ⁻ - N) (mg/l)	12,00 \pm 0,22
Salinidad (g/l)	35,00 \pm 0,50
Contenido en agua (%)	89,91 \pm 0,11
Contenido en MOT (%)	84,30 \pm 0,06
N total (%)	2,11 \pm 0,001
C total (%)	17,25 \pm 0,01
Relación C/N	8,17

Análisis de la remoción y asimilación de componentes orgánicos por *A. pusilla*

Materia orgánica total

La remoción de MOT por *A. pusilla* en los 28 días que duró el experimento fue estimada a todas las concentraciones de lodo acuícola añadido. Los resultados se muestran en la Figura 5. No se logró remoción de materia orgánica al implementar en el sustrato la cantidad máxima de lodo acuícola, correspondiente al 10% con respecto al total de sustrato inerte incluido en las unidades experimentales.

En las unidades que contaban con 2% de aporte de lodo se removió el $29,34 \pm 3,67\%$ de la MOT inicial implementada en 28 días. La máxima tasa de remoción alcanzada resultó ser de $0,37 \pm 0,033$ g de MOT por día. No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de remoción de MOT entre las unidades con 0,5, 2 y 4% de lodo añadido. Todas las series experimentales muestran diferencias significativas de remoción respecto a sus correspondientes controles.

En las unidades control, a excepción del que contaba con 0,5% de lodo, se produjo un aumento del contenido en MOT. En las unidades con 10% de lodo, este fenómeno ocurrió después de 48 – 72 horas de haberse iniciado las experiencias.

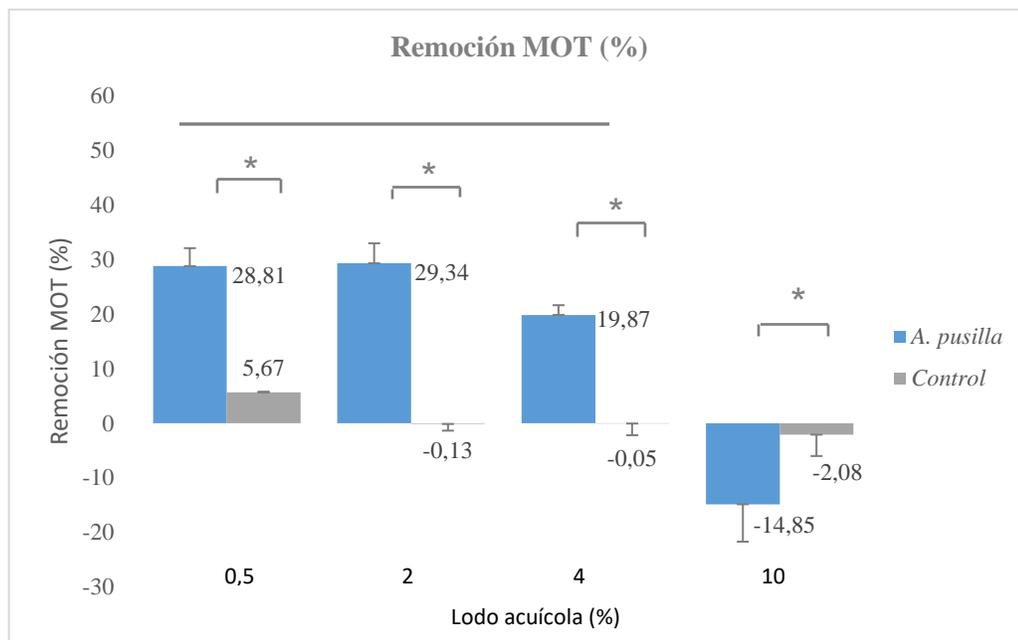


Figura 5: Remoción de materia orgánica total expresada en porcentaje en los ensayos realizados en el sistema de remediación I (28 días). El rendimiento de remoción de *A. pusilla* se muestra en las columnas azules. Las columnas grises representan las unidades control. Las diferencias significativas ($p < 0.05$) se expresan con (*). La línea sobre las barras indica los grupos que no son significativamente diferentes.

Crecimiento y supervivencia de *A. pusilla*

Los organismos utilizados en los ensayos de remediación en el sistema I contaron con un peso húmedo inicial de $1,35 \pm 0,33$ g ($n = 46$), presentando un contenido de agua en su biomasa del $88,58 \pm 3,14\%$ ($n = 15$). Los resultados de crecimiento y supervivencia de los organismos se muestran en la Tabla 4.

No se encontraron diferencias significativas en los índices de crecimiento obtenidos en las series con 0,5, 2 y 4% de lodo añadido, donde el máximo incremento de biomasa obtenido fue de $123,56 \pm 20,12$ g/m² día. El porcentaje de crecimiento diario fue del $8,90 \pm 1,54$ % y la relación P/B de $47,86 \pm 11,86$ año⁻¹, obteniéndose un factor de conversión de 1,58 g MOT/g poliqueto. Sí existen diferencias en crecimiento entre los organismos implementados en la serie con 0,5% respecto a la de 10% de lodo.

Las mayores supervivencias fueron alcanzadas por los organismos implementados en las unidades con 0,5 y 2% de lodo (que significó el $83,33 \pm 28,87\%$ de los individuos vivos al final de las experiencias). Estas resultaron significativamente diferentes a la obtenida en la serie con 10% de lodo ($35,56 \pm 3,85\%$).

Tabla 4. Parámetros de crecimiento y supervivencia de *A. pusilla* en el sistema de remediación I. (Media \pm SD, n = 46, 28 días de experiencia).

	0.5% lodo	2% lodo	4% lodo	10% lodo
Tasa absoluta de crecimiento ($\text{g/m}^2 \text{ día}$)	$123,56 \pm 20,12^a$	$96,07 \pm 46,53$	$86,17 \pm 30,34$	$53,26 \pm 34,73^b$
SGR (μ) (día^{-1})	$8,90 \pm 1,54^a$	$6,76 \pm 2,63$	$6,24 \pm 2,00$	$3,94 \pm 2,44^b$
Supervivencia (%)	$83,33 \pm 28,87^a$	$83,33 \pm 28,87^a$	$55,56 \pm 9,62$	$35,56 \pm 3,85^b$
Relación P/B (año^{-1})	$47,86 \pm 11,86^a$	$33,89 \pm 17,01$	$30,18 \pm 12,61$	$17,65 \pm 11,66^b$

^a Diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a unidades con 10% de lodo.

^b Diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a unidades con 0,5% de lodo.

Parámetros de calidad de agua

Los parámetros fisicoquímicos analizados en el agua superficial del sistema I se muestran en la Tabla 5. La salinidad se mantuvo en $36,08 \pm 0,72 \text{ g/l}$. El pH osciló entre 6,04 y 8,18, obteniéndose los valores más elevados en las unidades experimentales con mayor concentración de lodo acuícola. El porcentaje mínimo de saturación de oxígeno medido en el agua fue del 48%, obtenido en las unidades con 10% de lodo. La disminución en la concentración de oxígeno disuelto fue mayor según el porcentaje de lodo incorporado, disminuyendo $1,62 \pm 0,95 \text{ mg/l}$ ($23,21 \pm 10,55\%$ de saturación) al día en las unidades con aporte del 10% de lodo acuícola. Esto sumado a la degradación de las condiciones de calidad del sedimento (color negruzco en la superficie e interior del sustrato) sugirió que en los siguientes ensayos debía de implementarse otra forma de aporte de oxígeno, que asegurara el mantenimiento de esta condición.

El máximo incremento diario en la concentración de $\text{NO}_2^- - \text{N}$ fue de 0,85 mg/l en las unidades con 4% de lodo (concentración máxima alcanzada = 2,23 mg/l). En el caso del $\text{NO}_3^- - \text{N}$, el mayor incremento fue de 2,33 mg/l en las unidades con 10% de lodo (concentración máxima alcanzada = 9,60 mg/l). Los datos correspondientes a las diferencias diarias en la concentración de ambos componentes y en los niveles de saturación de oxígeno en el agua superficial de las series experimentales se muestran en el Anexo 5.

Tabla 5. Parámetros de calidad de agua en las unidades experimentales del sistema de remediación I. (Media \pm SD, 28 días de experiencia). Parámetros del agua inicial utilizada en los ensayos: $\text{NO}_2^- - \text{N}$ = 0,02 \pm 0,01 mg/l; $\text{NO}_3^- - \text{N}$ = 0,54 \pm 0,16 mg/l; pH= 7,64 \pm 0,17; O_2 = 99,41 \pm 3,66 % saturación; temperatura = 18 \pm 1,13°C.

	0,5% lodo	2% lodo	4% lodo	10% lodo
pH	7,64 \pm 0,23	7,73 \pm 0,21	7,70 \pm 0,24	7,71 \pm 0,26
O_2 (% saturación)	93,88 \pm 4,10	93,71 \pm 2,37	92,44 \pm 3,84	80,72 \pm 8,84
Temperatura (°C)	19,11 \pm 0,56	19,14 \pm 0,55	19,16 \pm 0,50	19,16 \pm 0,49
$\text{NO}_2^- - \text{N}$ (mg/l)	1,19 \pm 1,13	0,97 \pm 0,59	2,65 \pm 1,71	2,23 \pm 1,71
$\text{NO}_3^- - \text{N}$ (mg/l)	2,52 \pm 3,21	2,68 \pm 2,96	3,25 \pm 3,13	4,84 \pm 4,75

Concentración y tasa de excreción de NAT

Los resultados del incremento diario de NAT en el agua de las unidades experimentales se muestran en la Figura 6. Las series con 4 y 10% de lodo presentaron incrementos de NAT significativamente mayores. El incremento máximo diario promedio fue de 18,54 \pm 4,56 mg/l de NAT en las unidades con 10% de lodo acuícola, llegando a una concentración máxima de 28,25 mg/l en el agua superficial. No se encontraron diferencias entre las series con 0,5 y 2% de lodo. Todas las series experimentales muestran diferencias significativas con sus respectivos controles.

La tasa de excreción de NAT por *A. pusilla* se muestra en la Figura 7. Las unidades con 10% de lodo muestran diferencias significativas en comparación con las

demás, alcanzando una tasa de excreción de $0,139 \pm 0,04$ mg de NAT por gramo de poliqueto y día. Este resultado fue utilizado para el dimensionamiento de los filtros biológicos del sistema de remediación II.

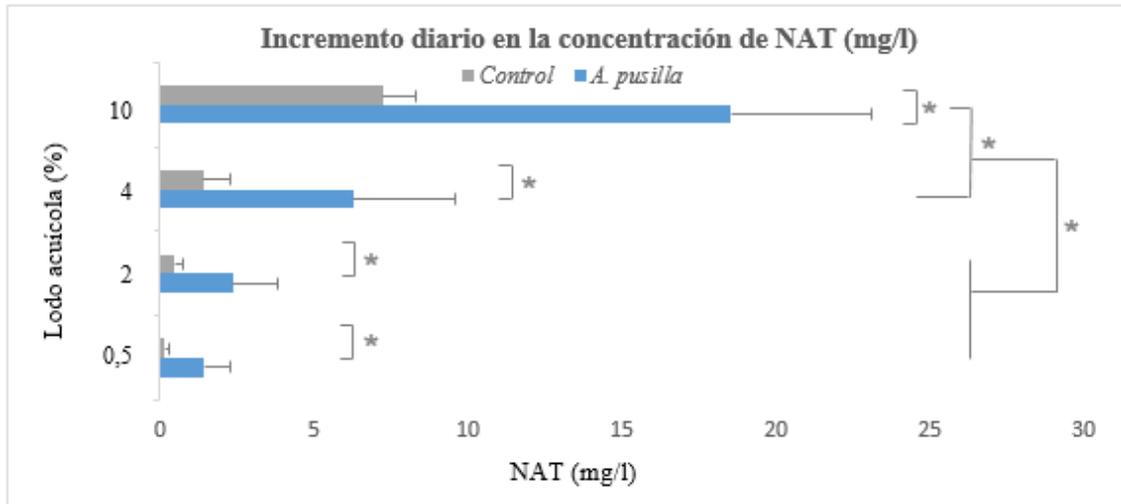


Figura 6: Incremento diario en concentración de NAT (mg/l) en las unidades con *A. pusilla* y unidades control en el sistema de remediación I (Media \pm SD, 28 días). La existencia de diferencias significativas entre las series ($p < 0,05$) se expresa con (*).

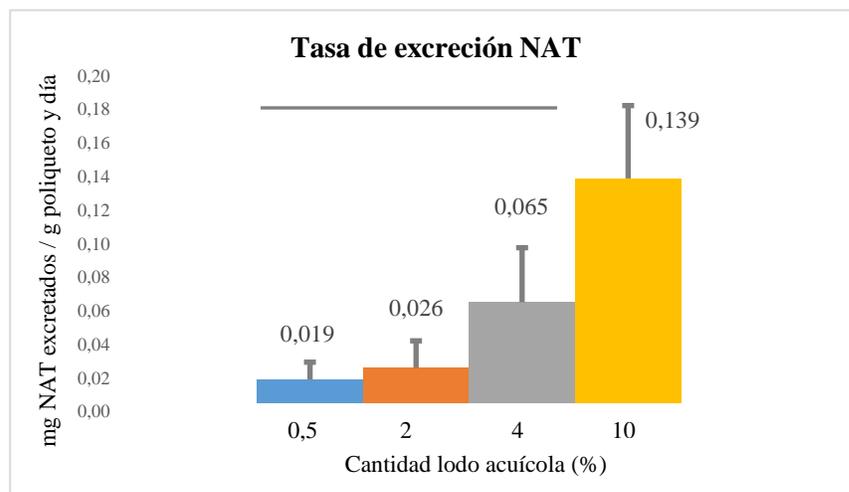


Figura 7: Tasa de excreción de NAT por *A. pusilla* en el sistema de remediación I. Los valores se muestran como mg de NAT excretados por gramo de organismo y día (Media \pm SD, 28 días). La línea sobre las barras indica los grupos que no son significativamente diferentes.

Los resultados obtenidos en este primer objetivo específico sugirieron que la especie *A. pusilla* es una candidata potencial para remediación de componentes orgánicos contenidos en el lodo acuícola de un SRA marino. Se comprobó que existía compatibilidad nutricional entre este poliqueto con la materia orgánica existente en el lodo y se obtuvieron además índices de crecimiento y supervivencia que demostraron la factibilidad de su implementación como bioremediador.

En ensayos de este tipo, se recomienda la adición de lodo al 2% en las unidades experimentales. Esto es debido a la mayor supervivencia obtenida y a la tasa de remoción de MOT alcanzada por los organismos. No se muestran los resultados obtenidos en los ensayos realizados sin recambio de agua en las unidades experimentales, ya que la mortalidad fue del 100% de los organismos en 24 – 72 horas. Por otro lado, en los ensayos realizados con recambio total del agua diariamente, no se consiguió obtener remoción de MOT en las unidades con mayor incorporación de lodo acuícola (10%). Además, en ellas se obtuvieron índices de supervivencia de los organismos significativamente menores en comparación a las que poseían 0,5, 2 y 4% de lodo.

Esto sugirió la implementación de un sistema de remediación a mayor escala que contara con sistema de recirculación de agua y biofiltración, ya podría permitir, además de mejorar la calidad y oxigenación del sedimento y reducir la concentración de NAT en el agua superficial, la determinación de la tasa de remoción orgánica de este poliqueto al ofrecerle condiciones experimentales más adecuadas. Se pretendía así, además, aumentar la concentración de lodo añadida a las unidades experimentales con el fin de evaluar el rendimiento real de *A. pusilla* como remediador orgánico.

Objetivo Específico N° 2. Determinar el rendimiento de remoción y asimilación de componentes orgánicos presentes en lodo acuícola por *A. pusilla* en un SRA a nivel experimental con diferentes rangos de generación de este compuesto y a diferentes densidades de organismos.

Análisis del lodo acuícola

Los resultados del análisis de lodo se muestran en la Tabla 6. La cantidad de lodo acuícola generada en el SRA de *S. lalandi* fue de $10,12 \pm 0,19$ kg de lodo producido por cada kg de alimento suministrado diariamente a los organismos de cultivo (media \pm SD, n = 5). El lodo contó con un porcentaje de humedad del 96,18%, lo que significó la generación de aproximadamente 400 g de lodo seco por kg de alimento suministrado. El contenido de MOT presente en el lodo significó el $82,17 \pm 0,12\%$. Los tamaños de partícula mayoritarios (49%) se encontraron entre 1000 y 3000 μm (Anexo 4B).

Tabla 6. Caracterización del lodo acuícola utilizado en los experimentos realizados en el sistema II. (Media \pm SD, n = 5).

pH	$6,65 \pm 0,03$
Temperatura (°C)	$19,7 \pm 0,14$
O ₂ (% saturación)	$14,60 \pm 0,42$
O ₂ (mg/l)	$1,09 \pm 0,18$
Nitrógeno amoniacal total (NAT) (mg/l)	$10,70 \pm 0,08$
Nitrito (NO ₂ ⁻ - N) (mg/l)	$0,27 \pm 0,02$
Nitrato (NO ₃ ⁻ - N) (mg/l)	$0,7 \pm 0,12$
Salinidad (g/l)	$36,00 \pm 0,50$
Contenido en agua (%)	$96,18 \pm 0,23$
Contenido en MOT (%)	$82,17 \pm 0,12$
N total (%)	$4,1 \pm 0,05$
C total (%)	$29,4 \pm 0,32$
Relación C/N	7,16

Análisis de la remoción y asimilación de componentes orgánicos por *A. pusilla*

Materia orgánica total

La remoción de MOT alcanzada tras 45 días en el ensayo con adición de distintas cantidades de lodo se muestra en la Figura 8. El mayor porcentaje de remoción de MOT se obtuvo en la serie con 2.002,76 g de lodo (C2), que fue de $48,46 \pm 3,23$ % de la MOT removida en 45 días. La tasa máxima de remoción fue de $12,35 \pm 0,09$ g de MOT removidos diariamente por m^2 en la serie con aporte de 10% de lodo, mostrando diferencias significativas con C1 y C2. Todas las series muestran diferencias con sus respectivos controles. En la figura 9 se muestra el porcentaje de MOT presente en el sustrato de las unidades durante la experiencia, considerando el 100% inicial como el aporte de lodo realizado anterior a los ensayos.

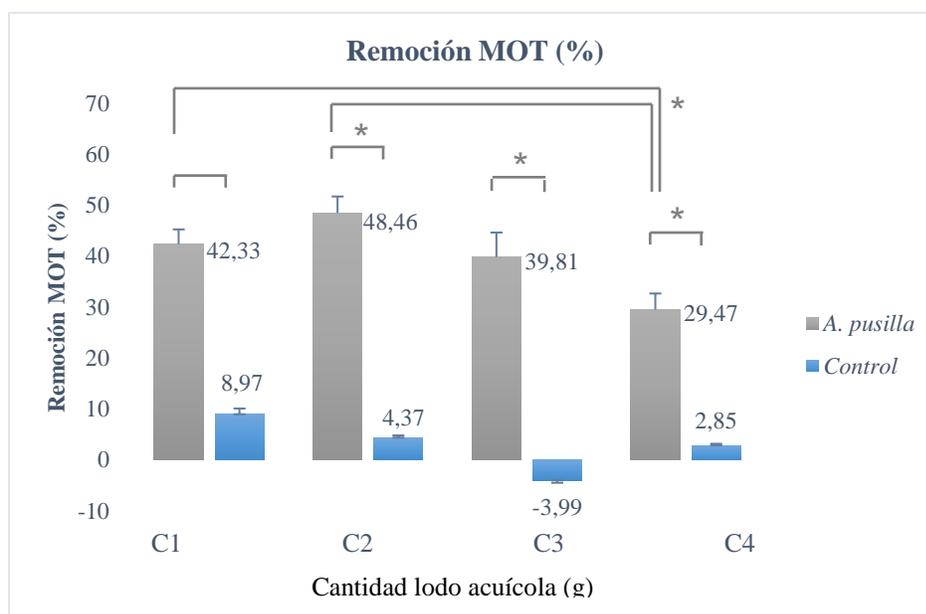


Figura 8: Remoción de MOT (Ensayo 1, sistema II). Cantidad de lodo aportada: C1 = 500,11 g; C2 = 2.002,76 g; C3 = 4.003,16 g; C4 = 10.014,50 g. Se expresa como porcentaje de remoción a los 45 días. Las diferencias significativas ($p < 0,05$) se indican con (*).

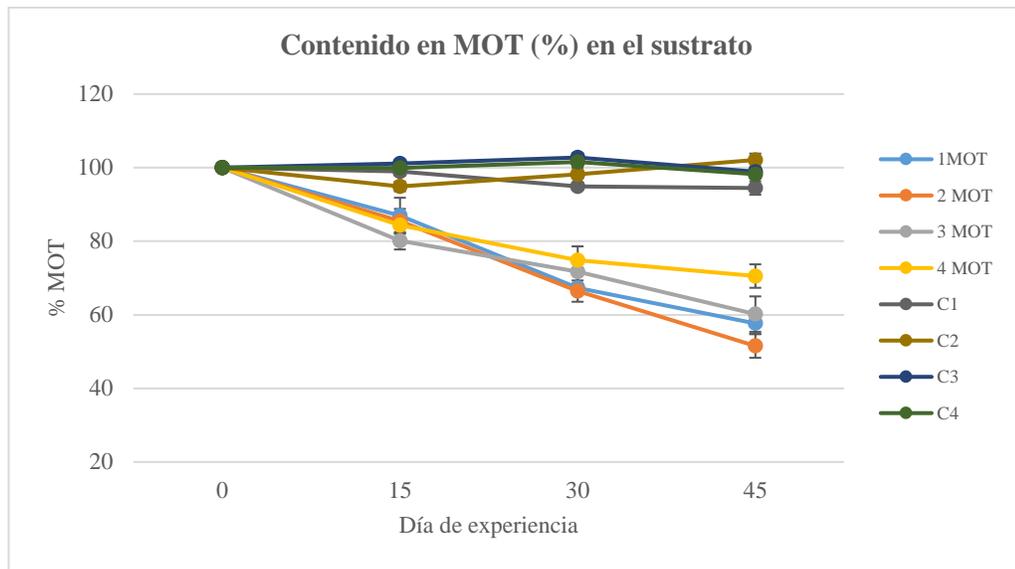


Figura 9: Porcentaje de MOT presente en el sustrato de las unidades del sistema II (Ensayo 1, 45 días). Las series se corresponden con: 1MOT = adición de 500,11 g; 2 MOT = 2.002,76 g; 3 MOT = 4.003,16 g; 4 MOT = 10.014,50 g. Los controles se denominan como C1, C2, C3 y C4 para cada serie experimental, respectivamente.

Los resultados obtenidos en el experimento 2, donde se implementaron diferentes densidades de organismos, se muestran en las Figuras 10 y 11. El mayor porcentaje de remoción de MOT en este ensayo se obtuvo en las unidades que poseían la mayor densidad de individuos ($200 \text{ organismos/m}^2$). Esto supuso la eliminación del $85,37 \pm 7,65$ % de la MOT en 45 días (y una tasa de remoción de $35,77 \pm 0,05 \text{ g /m}^2 \text{ día}$). Se encontraron diferencias significativas entre las series con 60 y 75 organismos/ m^2 en comparación a las de 150 y 200 org/ m^2 . Todas las series muestran diferencias con sus respectivos controles.

En la Tabla 7 se muestra la tasa de remoción obtenida por unidad de superficie y periodo de tiempo ($\text{g MOT removidos / m}^2 \text{ y día}$) para ambos experimentos.

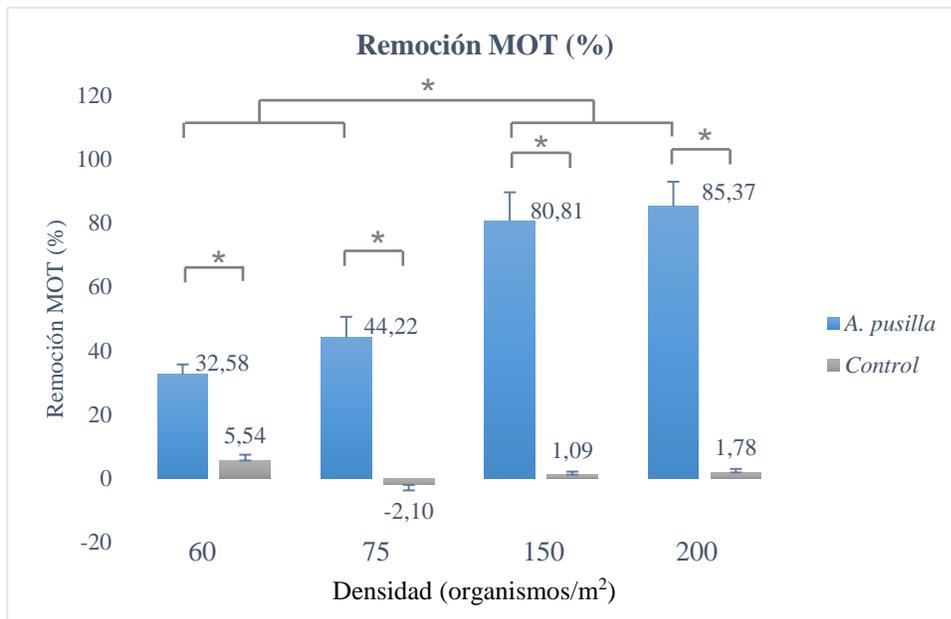


Figura 10: Remoción de MOT alcanzada en el ensayo realizado con distintas densidades de organismos en el sistema de remediación II. Se expresa como porcentaje de remoción a los 45 días. La cantidad aportada de lodo acuícola en cada serie fue de 10.014,50 g. Las diferencias significativas ($p < 0.05$) se indican con (*).

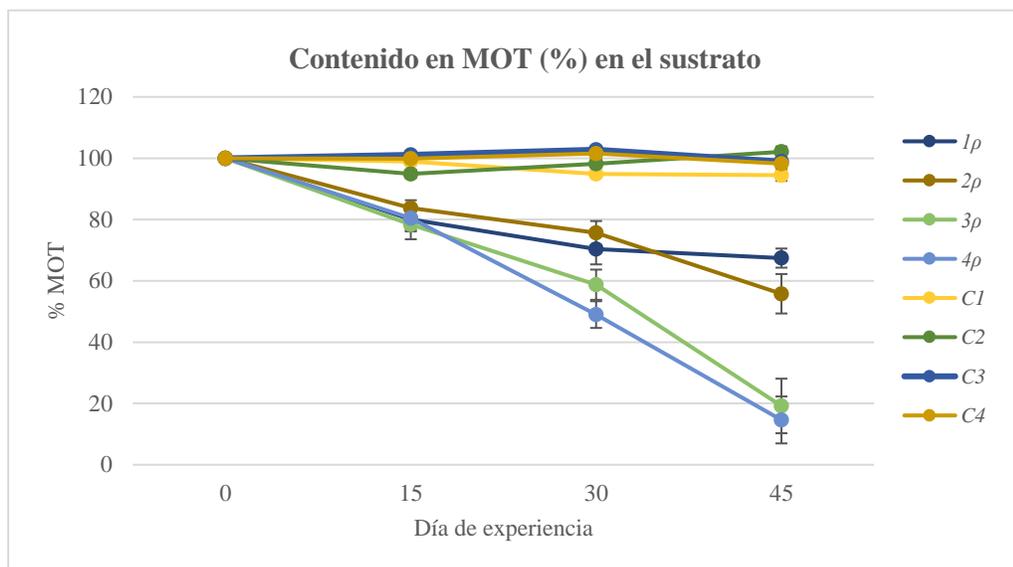


Figura 11: Porcentaje de MOT presente en el sustrato de las unidades del sistema II (Ensayo 2, 45 días). Las series se corresponden con: 1ρ = 60 org/m²; 2ρ = 75 org/m²; 3ρ = 150 org/m²; 4ρ = 200 org/m². Los controles son C1, C2, C3 y C4 para cada serie, respectivamente.

Tabla 7. Tasa de remoción de MOT por *A. pusilla* en los ensayos realizados en el sistema II. Se expresa en g de MOT removidos / m² y día. Las concentraciones de lodo añadido se corresponden con: C1 = 500,11 g; C2 = 2.002,76 g; C3 = 4.003,16 g; C4 = 10.014,50 g implementados a cada serie de unidades con *A. pusilla*.

Experimento 1				
Lodo añadido	C1	C2	C3	C4
Densidad (org/m ²)	60	60	60	60
Biomasa (g/m ²)	55,61 ± 4,29	58,93 ± 8,12	64,21 ± 2,81	72,92 ± 13,74
Tasa remoción (g/m ² día)	0,89 ± 0,06 ^a	3,80 ± 0,12 ^a	6,67 ± 0,10	12,35 ± 0,09
Experimento 2				
Lodo añadido	C4	C4	C4	C4
Densidad (org/m ²)	60	75	150	200
Biomasa (g/m ²)	58,48 ± 9,77	71,11 ± 9,10	155,21 ± 16,49	195,86 ± 11,07
Tasa remoción (g/m ² día)	13,65 ± 0,04 ^b	18,53 ± 0,05 ^b	33,86 ± 0,05 [†]	35,77 ± 0,05 [†]

^a Diferencias significativas (p<0,05) con respecto a C4.

^b Diferencias significativas (p<0,05) con respecto a unidades con 150 y 200 organismos/m².

[†] Diferencias significativas (p<0,05) con respecto a unidades con 60 y 75 organismos/m².

Contenido en N y C total

La concentración de estos compuestos en el lodo acuícola fue inicialmente de $4,1 \pm 0,05$ % (N total) y $29,4 \pm 0,32$ % (C total). Se obtuvieron tasas de remoción estadísticamente significativas para ambos componentes. Se alcanzó una reducción de 33,63 mg/día (N) y 236,78 mg/día (C) en 45 días de experiencias, obtenidas en las unidades con mayor densidad de individuos en el experimento 2. El contenido en N y C total en la biomasa de *A. pusilla* tras las experiencias fue respectivamente de $9,31 \pm 1,58$ % y $34,06 \pm 5,74$ %. Esto supuso un aumento del 6,92% y 24,75% respecto al contenido inicial anterior a los ensayos, siendo solamente la asimilación de C total por los organismos estadísticamente significativa.

Contenido en ácidos grasos y proteínas

El análisis de estos componentes para el lodo acuícola y la biomasa de *A. pusilla* se muestran en la Tabla 8. Los organismos incrementaron en un 0,65% el porcentaje de ácidos grasos contenidos en su biomasa durante los 45 días de realización de los ensayos. El porcentaje de proteínas disminuyó el 2,98% al final de las experiencias. Los cambios en la concentración de ambos compuestos en la biomasa de los organismos antes y después de los ensayos realizados resultaron ser estadísticamente significativos.

Tabla 8. Contenido en proteína y ácidos grasos. Analizados para el lodo acuícola y *A. pusilla* al inicio y al final de las experiencias realizadas en el sistema de remediación II. Los datos se expresan como % en base seca.

	Ácidos grasos (%)	Proteína (%)
Lodo <i>S. lalandi</i>	$14,43 \pm 1,18$	$17,70 \pm 0,15$
<i>A. pusilla</i> inicial	$2,50 \pm 0,16$	$9,50 \pm 0,06$
<i>A. pusilla</i> final	$3,15 \pm 0,23$	$6,52 \pm 0,06$

Isótopos estables

Se analizó el perfil isotópico ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$) del lodo acuícola utilizado en los ensayos y de la biomasa de *A. pusilla* anterior y posterior a los mismos. Los resultados se muestran en la Figura 12. El desplazamiento en el perfil del isótopo $\delta^{13}\text{C}$ para *A. pusilla* en los 45 días que duraron los ensayos resultó ser de 1,17 ppm, que resultó en una asimilación estadísticamente significativa de este compuesto por parte de los organismos. No se encontraron diferencias en el perfil del isótopo $\delta^{15}\text{N}$. El análisis del perfil isotópico aplicando la adaptación del modelo de Bianchi (2007) determinó que el porcentaje de carbono orgánico (CO) asimilado por *A. pusilla* al final de las experiencias fue del 24,68% con respecto al contenido inicial en su biomasa.

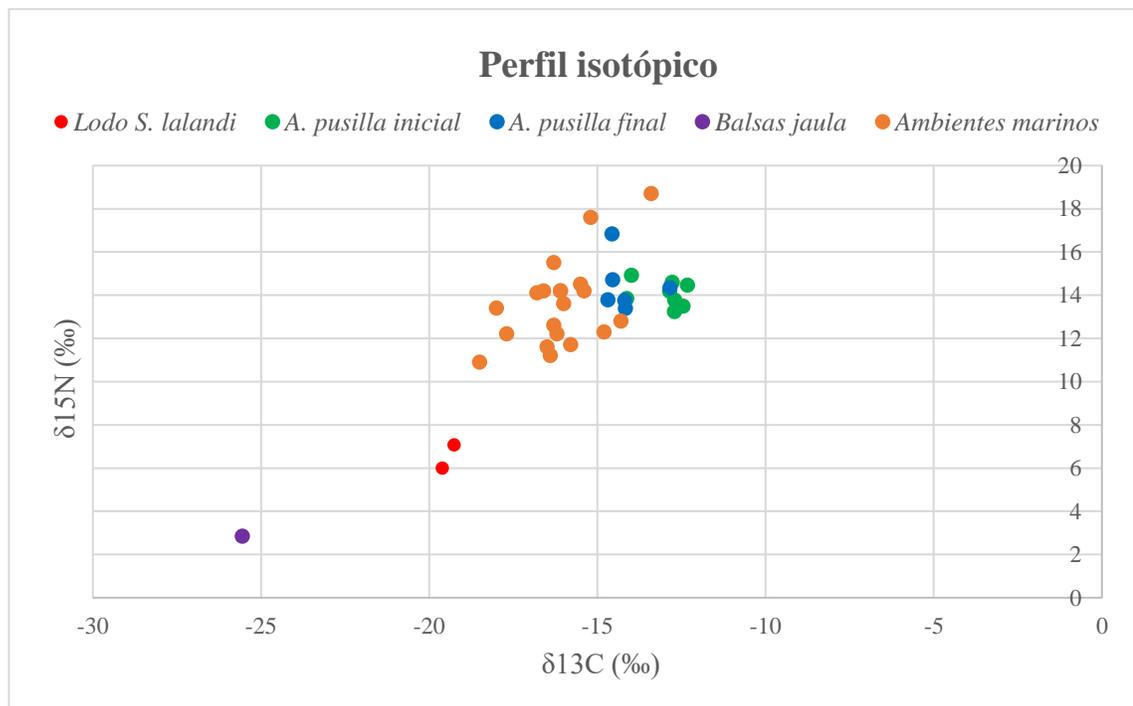


Figura 12: Perfil isotópico ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$) obtenido en los ensayos realizados en el sistema de remediación II. Los datos se corresponden con el perfil del lodo acuícola (puntos rojos) y de la biomasa de *A. pusilla* anterior y posterior a las experiencias (puntos verdes y azules, respectivamente). Se incluye también el dato utilizado como *end-member* (punto violeta) y perfiles isotópicos de otras especies de poliquetos en ambientes marinos (puntos naranjas).

Crecimiento y supervivencia de *A. pusilla*

Los organismos utilizados en los ensayos de remediación en el sistema II contaron con un peso húmedo inicial de $2,11 \pm 0,25$ g (ensayo 1, n = 48) y $2,00 \pm 0,07$ g (ensayo 2, n = 96). El porcentaje de agua en su biomasa resultó ser de $86,93 \pm 3,97\%$ (n = 15). Los resultados de crecimiento y supervivencia se muestran con detalle en el Anexo 6. Aunque no se encontraron diferencias significativas entre las series experimentales, la mayor tasa de crecimiento en el ensayo 1 fue alcanzada por los organismos implementados en la serie de unidades con 4.003,16 g de lodo añadido (C3), que experimentaron un porcentaje de crecimiento diario del $3,06 \pm 0,22 \%$ (un crecimiento absoluto de $8,48 \pm 0,74$ g/m² día y una relación P/B de $72,60 \pm 9,39$ año⁻¹). Según la remoción obtenida, esto se traduce en un factor de conversión de 4,22 g MOT/g de poliqueto. En el ensayo 2, el crecimiento máximo diario fue alcanzado por los organismos implementados a 60 y 75 individuos/m² ($2,57 \pm 0,05 \%$ y $2,58 \pm 0,20 \%$ de incremento de biomasa al día, respectivamente). Se encontraron diferencias en las tasas de crecimiento para estas condiciones en comparación a las restantes (150 y 200 organismos/m²).

La supervivencia de *A. pusilla* supuso un incremento en comparación con las obtenidas en los ensayos del sistema I. La máxima alcanzada fue de $91,67 \pm 14,43 \%$. La más baja coincidió con los organismos implementados a la mayor densidad (200 organismos/m²) siendo del $76,92 \pm 7,69 \%$ de los individuos vivos tras 45 días de experiencias. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la supervivencia entre distintas condiciones experimentales en ambos ensayos.

Parámetros de calidad de agua

Los resultados obtenidos de pH, temperatura y concentración de compuestos nitrogenados se muestran en el Anexo 7. El pH se mantuvo entre 7,53 y 7,89 ($7,77 \pm 0,05$ en promedio). La temperatura del agua osciló entre 17,4 y 18,8 °C (con un promedio de $17,96 \pm 0,24$ °C). La concentración de NO₃⁻ - N se mantuvo en un rango entre 0,40 y 1,50 mg/l (promedio de $0,76 \pm 0,21$ mg/l). Por otro lado, la concentración

de $\text{NO}_2^- - \text{N}$ experimentó valores más altos al inicio de los ensayos, llegando a un máximo de 0,42 mg/l en la serie de unidades con un aporte de lodo de 2.002,76 g. Posterior a este incremento, la concentración promedio se mantuvo en $0,04 \pm 0,07$ mg/l.

El promedio en la concentración de NAT en las distintas series que conformaban el sistema II fue de $0,44 \pm 0,24$ mg/l. Durante los primeros días de los ensayos, se alcanzó un nivel máximo de 1,55 mg/l en las que presentaban mayor adición de lodo acuícola. Sin embargo, esta concentración disminuyó a medida que avanzaban los experimentos, manteniéndose posteriormente siempre en valores menores a 1 mg/l. La salinidad se mantuvo a $30,19 \pm 0,41$ g/l. El contenido en oxígeno disuelto fue mantenido a niveles mayores al 100% de saturación, con un promedio de $107,59 \pm 2,67$ % a lo largo de las experiencias ($8,39 \pm 0,24$ mg/l). La concentración de CO_2 en el agua fue de 1 mg/l hasta el final de los ensayos.

Flujo de biomasa y nutrientes en el sistema de remediación con *A. pusilla*

Los resultados obtenidos en este segundo objetivo específico permitieron determinar el rendimiento de remoción y la asimilación de los compuestos orgánicos del lodo de un SRA marino en un sistema de remediación con *A. pusilla*. Los resultados obtenidos en el primer objetivo, además de la compatibilidad de la especie y de una estimación de su tasa de remoción de lodo, ayudaron a establecer las condiciones experimentales adecuadas para su supervivencia en ensayos de este tipo y el diseño de un sistema prototipo de remediación para la adecuada implementación de los organismos.

La Figura 13 es una representación esquemática del flujo de nutrientes y biomasa obtenidos durante el desarrollo de los ensayos en el sistema de remediación II. En él, se detallan los cambios producidos en los niveles de oxígeno y NAT en el agua, el crecimiento obtenido por *A. pusilla* y la remoción de los componentes orgánicos contenidos en el lodo que fueron estudiados en este trabajo. Al incorporar 1 kg de lodo húmedo (con un contenido en N y C total de 4,1% y 29,4%, respectivamente) se obtuvieron $38,16 \text{ g/m}^2$ de biomasa de *A. pusilla* tras 45 días de ensayos. Esto significa un factor de conversión de 4,22 g MOT necesarios para

obtener 1 g de biomasa del poliqueto. El promedio de la concentración de oxígeno no presentó diferencias en contraposición a lo observado en el sistema de remediación I (donde la disminución promedio diaria fue del 23,2% de saturación y 1,62 mg/l en las unidades con 10% de adición de lodo).

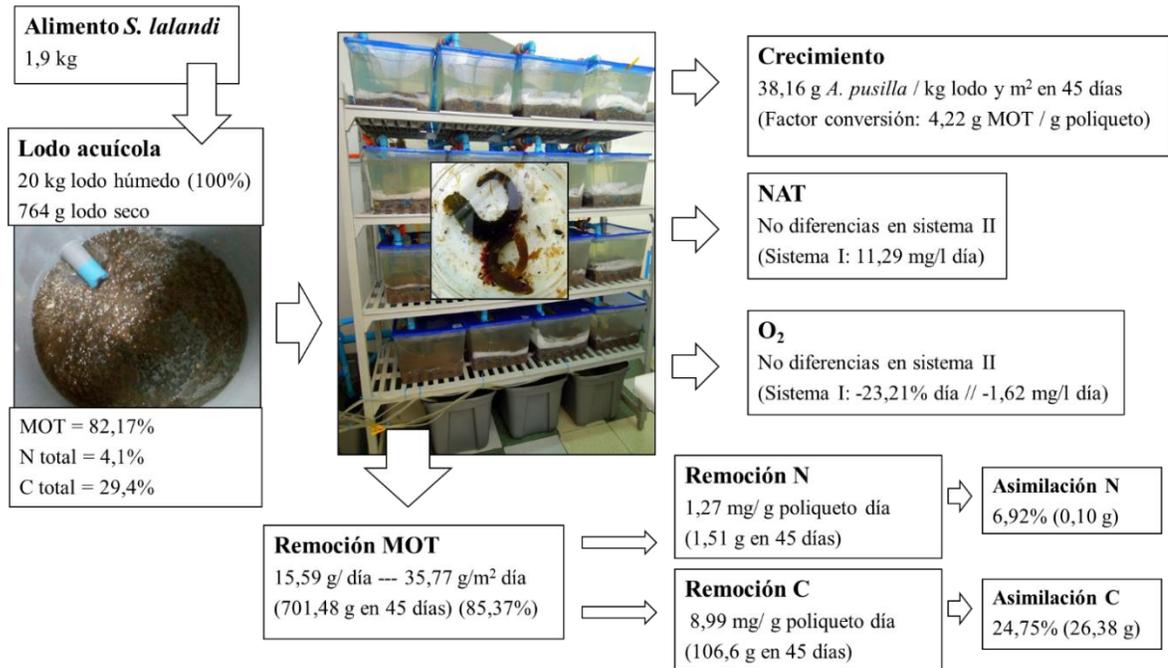


Figura 13: Representación del flujo de nutrientes y biomasa obtenido al implementar lodo acuícola de cultivo de *S. lalandi* en SRA en un prototipo de remediación con *A. pusilla*. Los datos utilizados corresponden al ensayo realizado con 200 organismos/m² en el sistema de remediación II.

Por cada kg de lodo húmedo añadido al sistema, se removieron 1,51 g de N y 106,6 g de C total en 45 días de ensayo. El aumento experimentado por *A. pusilla* con respecto al contenido inicial en su biomasa fue del 6,92% (0,1g) de N total y 24,75% (26,38 g) de C total, siendo la asimilación de C estadísticamente significativa. La remoción de MOT significó 15,59 g removidos por día de ensayo (701,5 g en 45 días de ensayos, correspondiente al 85,37% del total implementado al inicio de la experiencia). La concentración de NAT en el sistema II presentó un incremento máximo de 1,1 mg/l al cuarto día de ensayo. Tras este aumento inicial, las variaciones en la concentración promedio no presentaron variaciones importantes (Anexo 7).

DISCUSIÓN

Remoción y asimilación de componentes orgánicos contenidos en el lodo

Materia orgánica total

La generación de lodo en el SRA utilizado en este estudio concuerda con lo reportado por Luo *et al.*, (2015), donde se indica que el rango de generación de lodo se sitúa entre el 11 y el 40% del total de alimento suministrado a los organismos. Por lo tanto, el SRA utilizado en esta investigación se encuentra en el límite superior del rango dado por este estudio.

Considerando una instalación acuícola con SRA para cultivo de especies marinas que produzca un lodo de características similares a las de este estudio y asumiendo que genera la misma cantidad (10 kg de lodo húmedo por kg de alimento suministrado a los organismos), serían necesarios 279 m² para la implementación de un sistema de remediación con *A. pusilla* para remover la totalidad del lodo producido por kg de alimento suministrado al SRA en un día. La superficie requerida permite ya proponer posibles prototipos para implementar una operación unitaria biológica de bioremediación de lodo en un sistema de producción acuícola emplazado en tierra, por ejemplo un prototipo vertical con el fin de optimizar el área. Hay reportes que señalan que es posible la implementación de una capa de sustrato de 20 cm de profundidad en unidades con otras especies de poliquetos en ensayos de remediación (Palmer, 2010; Fang *et al.*, 2016). Considerando este supuesto de profundidad del sustrato, otra versión de prototipo para *A. pusilla* podría reducir a la mitad (139 m²) la superficie requerida para el sistema de remediación. Un sistema que considere la operación unitaria biológica con disposición vertical y con un sustrato de 20 cm de profundidad podría construirse con un total 5 unidades y una superficie proyectada para el sistema de remediación de 28 m²/kg de alimento entregado al SRA, lo cual permite proyectar alternativas para su implementación en un sistema de producción acuícola.

Otro punto a considerar es que en este trabajo la máxima tasa de remoción de lodo ($35,77 \text{ g/m}^2 \text{ día}$) se obtuvo con la mayor densidad de organismos en el sistema, los que presentaron una tasa de crecimiento de $8,48 \text{ g/m}^2 \text{ día}$ (factor de conversión de $4,2 \text{ kg MOT/kg}$ poliqueto). Es posible que al aumentar la densidad de organismos se obtengan mejores rendimientos de remoción (Palmer, 2010) lo que permitiría aumentar la eficiencia del prototipo de bioremediación. Por otra parte, la tasa de generación de lodo en un SRA difiere entre $0,11$ a $0,4 \text{ kg/kg}$ alimento según sea su diseño y operación del sistema productivo (del Campo *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2015). En consecuencia, el acoplamiento de un prototipo de bioremediación a un SRA con otras características puede requerir menor superficie para la implementación de un sistema de remediación con este poliqueto.

La adición del lodo en este estudio se realizó siempre anterior al inicio de los ensayos de remediación, como sistema estático donde se analizó el contenido en materia orgánica presente en el lodo al inicio y periódicamente durante los experimentos. Podrían esperarse mayores resultados de remoción de MOT si *A. pusilla* fuera implementada en un sistema dinámico donde el lodo fuese añadido de forma periódica. Esto es debido a las mayores tasas de remoción obtenidas en las semanas iniciales en los ensayos en el sistema II en comparación a las tasas obtenidas hacia el final de las experiencias. Este hecho coincide con lo reportado por Honda & Kikuchi (2002) y Brown *et al.*, (2011), que indican mayores tasas de ingestión por los poliquetos cuando el lodo presenta mayor cantidad de componentes orgánicos. Otro análisis que confirma esta hipótesis es que las tasas de remoción de MOT obtenidas en este trabajo tras 45 días de ensayos fueron mayores al implementar mayor contenido de componentes orgánicos en el sistema II. También podría esperarse un aumento en la remoción de MOT al implementar densidades de organismos mayores a las utilizadas en este estudio, siempre que no se observen fenómenos de competencia por territorio (Koo & Seo, 2017).

La remoción de MOT obtenida en las unidades control pudo ser debida a la remineralización de componentes orgánicos por actividad bacteriana,

específicamente microorganismos heterótrofos consumidores de materia orgánica que normalmente se encuentran asociados al lodo de acuicultura y que pueden proliferar en los sistemas de remediación (Batista *et al.*, 2003; Olive *et al.*, 2009; Palmer, 2010; Palmer, 2018). Los aumentos de MOT obtenidos en las unidades control, así como en las unidades con mayor implementación de lodo en el sistema I pudieron ser debidas a la degradación de los componentes orgánicos en el sedimento de las mismas (Nimptsch *et al.*, 2015; Srithongouthai & Tada, 2017). Esto tuvo como consecuencia una disminución significativa en los niveles de oxígeno disuelto e incrementos en la concentración de NAT en el agua superficial de las unidades. Ambos fenómenos pueden reducir la tasa de remoción de MOT por *A. pusilla* y la remineralización por microorganismos aerobios (Wells, 1966; Alyakrinskaya, 2003; Marín, 2003; Bischoff, 2007; Seekamp, 2017).

No se analizó específicamente el porcentaje de remoción de MOT que se debió a fenómenos de remineralización, tomando el sistema de remediación como un conjunto donde la remoción total es resultado tanto de la actividad metabólica de *A. pusilla* como de los posibles microorganismos existentes en el sistema. Se asumió así que la diferencia en las tasas de remoción de MOT con las unidades control es lo correspondiente a la remoción biológica por los poliquetos. Por otra parte, es difícil determinar el porcentaje de remoción de componentes asociado a este fenómeno en las unidades con organismos. Es posible que en ellas se produzca mayor remineralización, ya que este proceso se ve favorecido por las actividades de bioturbación de los poliquetos (Hylleberg, 1975; Riisgard & Banta, 1998; Görlitz, 2012; Ito *et al.*, 2016).

No se analizó la posible lixiviación de componentes orgánicos del lodo desde el sustrato al agua superficial de los sistemas de remediación. Sin embargo, el método de introducción del lodo en las capas subsuperficiales del sustrato, la ausencia de turbulencia en el agua (que puede generarse debido al movimiento de organismos acuáticos), el diseño de las unidades experimentales que provocaba la obligatoriedad del paso del agua a través del sustrato y la incorporación de la fibra textil que

separaba las capas de sedimento reducen esta posibilidad (Olive *et al.*, 2006; Stewart *et al.*, 2006; Garrabrants *et al.*, 2010). Además, la adición del lodo solamente al principio de las experiencias reduce los procesos de lixiviación, ya que este fenómeno es significativamente mayor en las primeras 24 horas. Tras 2 – 7 días desde la implementación del lodo, la precipitación química y/o la ingestión de materia orgánica por microorganismos aerobios reducen la concentración de material orgánico lixiviado en el agua superficial de las unidades experimentales (Stewart *et al.*, 2006).

La comparación entre investigaciones en cuanto a eficiencia de remoción de MOT es difícil, ya que está determinada por factores que son determinantes en los resultados como son las características del lodo acuícola utilizado y el diseño del sistema de remediación donde se implementan los organismos (Bischoff, 2007; Nelson *et al.*, 2012; Seekamp, 2017). Sin embargo, se observa que otros organismos utilizados para remediación de lodo acuícola presentan rendimientos de remoción de MOT similares e incluso menores a las obtenidas en este estudio. Fang *et al.*, (2016) reporta remoción de hasta el 50% de la MOT contenida en el lodo de *Paralichthys olivaceus* alcanzada en 35 días de ensayos por *Perinereis aibuhitensis*. Esto significó una tasa de remoción de 13,43 mg de MOT por gramo de poliqueto al día, menor a la obtenida en este estudio (27,39 mg MOT/ g poliqueto día). Por otra parte, los resultados de Marques *et al.*, (2017) reportaron una remoción del 70% de la MOT contenida en lodo de *Solea senegalensis* en cultivo intensivo en SRA por *Nereis diversicolor* en 150 días de experiencias. Otros estudios indican que *Perinereis nuntia* y *Perinereis helleri* removieron, en 16 semanas de ensayo, en torno al 50% de la MOT contenida en lodo acuícola procedente del cultivo de *Penaeus monodon* (Palmer, 2010). Por otro lado, ensayos con *Cucumaria frondosa* presentan remociones en torno al 80% al ser alimentados con lodo de cultivo de *Salmo salar* (Nelson *et al.*, 2012).

Debe tenerse en cuenta que, en la investigación de Fang *et al.*, (2016), el lodo utilizado para los ensayos fue obtenido del fondo marino procedente de un cultivo

acuícola en jaulas en mar abierto. Esto podría tener relación con la menor eficiencia de remoción por parte de los poliquetos debido a procesos de degradación del lodo anterior a su implementación en los ensayos de laboratorio (Mongirdas *et al.*, 2017). Asimismo, en el trabajo de Palmer (2010), los sistemas de remediación con *P. nuntia* y *P. helleri* estaban implementados en el exterior, provocando diferencias importantes en los parámetros fisicoquímicos del agua superficial y del sedimento a lo largo del tiempo que duraron los ensayos, lo que pudo influir en la eficiencia de remoción por los poliquetos.

Nitrógeno total, carbono total y perfil isotópico

En este estudio, el prototipo de bioremediación con *A. pusilla* fue capaz de remover significativamente el N y C total presente en el lodo añadido a las unidades experimentales. La remoción de N total obtenida ($1,27 \pm 0,01$ mg N/ g poliqueto día) resultó mayor que en otros estudios, donde por ejemplo *P. aibuhitensis* logró la remoción de $0,33 \pm 0,05$ mg N / g día (Fang *et al.*, 2016) y *P. nuntia vallata* fue capaz de eliminar $0,65 \pm 1,17$ mg N / g día con respecto al total contenido en el lodo acuícola (Honda & Kikuchi, 2002).

Se han reportado menores tasas de remoción de nitrógeno total por parte de otros grupos de organismos. Es el caso de *Holothuria forskali*, que eliminó 0,184 mg N / g organismo y día del total contenido en el lodo procedente de un cultivo con *D. labrax* (MacDonald *et al.*, 2013). Asimismo, otros estudios de remediación no reportan resultados significativos en cuanto a la remoción de N total por otras especies de poliquetos (Palmer, 2010).

La remoción del C total contenido en el lodo acuícola para *A. pusilla* ($8,99 \pm 0,03$ mg C/ g poliqueto y día) resultó también mayor que en otros estudios de remediación con poliquetos, como es el caso de *P. aibuhitensis* en ensayos con la adición de lodo de un cultivo con *P. olivaceus* ($2,99 \pm 0,47$ mg C/ g día) (Fang *et al.*, 2016). Al comparar los datos como porcentaje de remoción, el obtenido diariamente por *A. pusilla* (2,01%) también resultó mayor que para *H. forskali*, que removió el

0,5% del C total diario contenido en el lodo de un cultivo de *D. labrax* (MacDonald *et al.*, 2013). Estas diferencias podrían ser debidas al menor contenido de N y C total del lodo acuícola utilizado en los ensayos mencionados con respecto al que se usó en este trabajo. Otros factores que pueden influir en la remoción de estos componentes orgánicos son el diseño del sistema de remediación, las condiciones experimentales ofrecidas a los organismos o la eficiencia de la especie remediadora utilizada (Bischoff, 2007).

La asimilación de C total por *A. pusilla* (24,75% en 45 días) resultó similar a la alcanzada por *P. aibuhitensis*, que asimiló en 35 días casi el 20,5% del C contenido en el lodo acuícola suministrado (Fang *et al.*, 2016). Asimismo, la asimilación de carbono orgánico (CO) por *A. pusilla* comprobada por los cambios significativos obtenidos en el perfil del isótopo $\delta^{13}\text{C}$, se asimila a la alcanzada por la especie *Nereis diversicolor* al ser alimentada con lodo procedente de un cultivo de *D. labrax*, donde se alcanzó una variación de aproximadamente 1 ppm en 30 días (Callier *et al.*, 2014). Por otro lado, en ensayos con *Apostichopus japonicus* en el medio acuático se obtuvo una variación en este componente de 1,6 ppm en 238 días (Yokoyama, 2013). En este caso, la menor asimilación de componentes de C podría deberse a la ingestión de otros componentes orgánicos que no se correspondan con el lodo acuícola procedente de las jaulas de cultivo.

Contenido en proteínas

La reducción significativa en la concentración de proteínas presente en la biomasa de *A. pusilla* tras los ensayos realizados se ha observado también en otros estudios, donde la cantidad de N total y proteínas presente en otras especies de poliquetos disminuye tras su implementación en sistemas de remediación de lodo acuícola (Suckow *et al.*, 2010; Seekamp, 2017).

Algunos estudios asocian este fenómeno a elevados niveles de NAT en el agua superficial de los sistemas donde se implementan los organismos remediadores (Palmer, 2010). Sin embargo, en este trabajo la concentración promedio de este

compuesto resultó menor que la indicada como tóxica en ensayos con poliquetos (Bischoff, 2007). Aun así, no puede descartarse que disminuyendo la concentración de NAT puedan alcanzarse asimilaciones significativas de N total y proteínas por *A. pusilla*.

La disminución del porcentaje de proteínas en la biomasa de *A. pusilla* en este estudio pudo ser debido asimismo a una reducción en su concentración de hemoglobina en sangre durante las experiencias, resultado de la elevada saturación de oxígeno en el agua superficial del sistema de remediación (Wells, 1966; Alyakrinskaya, 2003). La concentración de proteínas presente en *Arenicola marina* en el ambiente acuático (17,4% con respecto a la biomasa total de los organismos) es mayor a la presentada por *A. pusilla* en este estudio (Alyakrinskaya, 2003). Este fenómeno podría parecer contradictorio, asumiendo que en el medio acuático existe menor disponibilidad de alimento. Sin embargo, el hecho de que el hábitat natural de esta familia de poliquetos sean fondos caracterizados por condiciones de enriquecimiento orgánico donde necesitan aumentar su concentración de hemoglobina para un transporte de oxígeno eficiente podría avalar la hipótesis planteada. Se necesitarían más estudios para comprobar si, realizando cambios en la concentración de oxígeno del agua superficial del sistema de remediación, se consigue obtener mayor contenido de proteínas en la biomasa de *A. pusilla* al final de las experiencias. Por otro lado, existen investigaciones que concluyen que la disminución en la concentración de proteínas durante ensayos de este tipo puede deberse a la mayor disponibilidad de nutrientes ofrecida a los organismos, que trae como consecuencia una menor inversión de energía para la búsqueda de alimento. Esto se traduce en una menor formación de músculo, componente que posee alto porcentaje de proteínas (Seekamp, 2017).

Otros estudios de remediación con poliquetos de la familia *Nereididae* sí muestran asimilación de componentes orgánicos de N como son las proteínas (Honda & Kikuchi, 2002; Fang *et al.*, 2016). En estas investigaciones, la remoción de estos compuestos contenidos en el lodo resultó ser menor que en el presente trabajo y, sin

embargo, las tasas de asimilación por los organismos fueron mayores a las alcanzadas por *A. pusilla*. No puede descartarse que la familia *Arenicolidae* posea una menor eficiencia a la hora de asimilar proteínas presentes en lodo acuícola o que estas especies presenten una mayor tasa de excreción de componentes nitrogenados, haciendo menos eficiente el proceso de asimilación. Deberían realizarse nuevos análisis para confirmar este fenómeno. Asimismo, en cuanto al contenido total de proteínas en la biomasa de los organismos, estudios con poliquetos de la familia *Nereididae* muestran concentraciones en torno al 50% de proteínas (Brown *et al.*, 2011; Pajand *et al.*, 2017), significativamente mayores a las presentadas por *A. pusilla*. Es por ello que algunas especies de esta familia, como *Nereis virens* y *Nereis diversicolor* han sido calificadas como buena fuente de proteínas para su reintroducción en alimento para acuicultura (Pajand *et al.*, 2017).

También debe tenerse en cuenta que las características del lodo acuícola utilizado puede influir en la tasa de asimilación de proteínas por los poliquetos. Las tasas de asimilación obtenidas por *N. virens* fueron conseguidas al ser alimentado con lodo que presentaba un 50% de proteínas, mayor al del lodo utilizado en este estudio (Brown *et al.*, 2011). Sin embargo, al suministrar alimento de acuicultura con un 9% de proteínas a la especie *N. diversicolor*, esta consiguió una concentración total de proteínas en su biomasa del 8,87%, más similar a la que se obtuvo con *A. pusilla* (Santos *et al.*, 2016).

Contenido en ácidos grasos

Se ha demostrado que poliquetos pertenecientes a las familias *Nereididae* y *Arenicolidae* asimilan ácidos grasos al ser utilizados en ensayos de laboratorio como remediadores orgánicos (Olive *et al.*, 2009; Brown *et al.*, 2011, Seekamp, 2017; Marques *et al.*, 2018). En este estudio, la concentración de ácidos grasos en la biomasa de *A. pusilla* experimentó asimismo un incremento significativo durante los ensayos en el sistema II, lo que podría ofrecer una posibilidad a la biomasa producida como fuente de nutrientes esenciales (Bischoff *et al.*, 2009). Sin embargo, se necesitarían

nuevos análisis de perfiles de ácidos grasos para comprobar la presencia de componentes importantes para su uso en la industria acuícola.

La asimilación de ácidos grasos por los poliquetos difiere según la concentración presente de estos componentes en el lodo acuícola (Seekamp, 2017). El contenido de ácidos grasos en la biomasa de *N. virens* resultó de casi un 20% al ser alimentado con lodo acuícola con un 22% de ácidos grasos, mayor al del lodo utilizado en este estudio (Brown *et al.*, 2011). Sin embargo, otros estudios de remediación indican concentraciones más similares a las de este estudio con *A. pusilla* en cuanto al contenido de ácidos grasos (Bischoff *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2016; Seekamp, 2017).

La obtención de los organismos de *A. pusilla* procedentes de cultivo podría tener relación con el aumento obtenido en la concentración de ácidos grasos, que aun resultando significativo fue menor en comparación al reportado en otras investigaciones. Los poliquetos almacenan ácidos grasos al aumentar la disponibilidad y calidad del alimento en el sustrato donde se encuentran (García-Alonso *et al.*, 2008; Seekamp, 2017) determinándose que organismos obtenidos del medio acuático presentan menores concentraciones de estos componentes en comparación a organismos de cultivo (Bischoff *et al.*, 2009; Brown *et al.*, 2011). Individuos de la especie *Arenicola marina* obtenidos del medio natural y más tarde implementados en un sistema de cultivo presentaron un contenido de ácidos grasos de 7,19% al final de las experiencias (Olive *et al.*, 2006). Asimismo, individuos de la especie *Nereis diversicolor* obtenidos del medio acuático presentaron un aumento de 1,55% en su contenido de ácidos grasos en 30 días al ser alimentados con lodo de un cultivo de *Salmo salar* en ensayos de laboratorio (Seekamp, 2017). En ambos casos se obtuvieron incrementos de ácidos grasos mayores a los obtenidos por *A. pusilla*. Por tanto, la procedencia de los organismos utilizados en este estudio podría explicar el menor incremento obtenido en la concentración de ácidos grasos al final de las experiencias.

Por otro lado, la estabilidad en las condiciones experimentales del sistema de remediación con *A. pusilla* puede haber influenciado en que la asimilación de ácidos grasos no haya sido mayor. La asimilación de estos componentes ocurre cuando existe variabilidad en las condiciones ambientales, ya sea disponibilidad y calidad de alimento, presencia o ausencia de luz o cambios en la temperatura del agua (Olive *et al.*, 2009; Brown *et al.*, 2011, Seekamp, 2017). Sería interesante estudiar los posibles cambios en asimilación de ácidos grasos por *A. pusilla* al realizar modificaciones en las condiciones ambientales del sistema de remediación.

Crecimiento de *A. pusilla*

Las tasas de crecimiento obtenidas por *A. pusilla* en estos ensayos sugieren que, además de existir compatibilidad con los componentes orgánicos del lodo acuícola, las condiciones experimentales ofrecidas a los organismos fueron adecuadas para su implementación en sistemas de este tipo. No hay datos publicados hasta el momento acerca de las tasas de crecimiento que experimenta *A. pusilla* en medio acuático. Para realizar una comparación de este parámetro, las especies *N. virens* y *N. diversicolor* presentan una SGR de 0,0062% y 0,005% en el medio acuático, significativamente menores a la obtenida en este estudio (Kristensen, 1984). El crecimiento de *A. pusilla* en los ensayos parece estar relacionado con la densidad de implementación de individuos. Se obtuvieron índices de crecimiento significativamente menores en las series experimentales con mayores densidades de organismos, coincidiendo con lo reportado por Palmer, 2010.

La tasa de crecimiento alcanzada por *A. pusilla* en los ensayos realizados (3,06% al día) se asimila a otros estudios de remediación de lodo acuícola con invertebrados. Brown *et al.*, (2011) indica que *Nereis virens* experimentó un crecimiento del 2,1% diario al ser implementado durante 71 días en un sistema alimentado con lodo procedente del cultivo de *Hippoglossus hippoglossus*. Honda & Kikuchi (2002) obtuvieron una tasa específica de crecimiento para *Perinereis nuntia vallata* del 1,66% al alimentarse de lodo acuícola de *Paralichthys olivaceus* en un ensayo de 15 días de duración. En un estudio

donde se implementó *Apostichopus japonicus* bajo jaulas de cultivo de *Pagrus major* en el medio acuático, estos alcanzaron un crecimiento de 1,3% diario en 545 días de experiencias (Yokoyama, 2013). Por otro lado, *Nereis diversicolor* experimentó un crecimiento del 3,4% durante un ensayo de 8 semanas al ser implementado en un sistema con adición de lodo procedente del cultivo de *Huso huso* (Pajand *et al.*, 2017).

Menores índices de crecimiento fueron reportados por Suckow *et al.*, (2010) para *Nereis virens* en el efluente de un SRA con *D. labrax*, donde los organismos experimentaron un crecimiento diario del 0,9% en un ensayo de 6 semanas de duración. Asimismo, *Perinereis aibuhitensis* obtuvo un crecimiento máximo del 0,64% en 35 días al ser alimentado con lodo de *Paralichthys olivaceus* (Fang *et al.*, 2016). En otro estudio con *Arenicola loveni loveni*, el crecimiento también fue menor, resultando del 0,39% al día al ser implementado en el efluente de un cultivo de *Haliotis midae* (Yearsley *et al.*, 2011).

En cuanto a la comparación del crecimiento de *A. pusilla* entre las series experimentales de este estudio, en el sistema I fueron los organismos implementados a menores concentraciones de lodo (0,5, 2 y 4%) los que alcanzaron mayores tasas de crecimiento. Esto coincide con otros estudios que determinan que no siempre existe correlación entre la tasa de ingestión o remoción de lodo por los organismos y el crecimiento que experimentan (Bischoff *et al.*, 2009; Seekamp, 2017). En este caso, esto pudo ser debido a la inexistencia de recirculación de agua y biofiltración, que provocó aumentos muy significativos en la concentración de NAT y degradación de la calidad del sedimento en las series con mayor concentración de lodo, provocando en ellas la obtención de menores tasas de crecimiento y remoción de MOT (Bischoff, 2007; Seekamp, 2017). En el sistema II, los mayores índices de crecimiento fueron obtenidos al implementar menores densidades de organismos (60 y 75 organismos/m²), resultado que concuerda con lo encontrado en otros estudios de remediación con poliquetos (Palmer, 2010).

El crecimiento alcanzado por *A. pusilla* fue mayor en los ensayos llevados a cabo en el sistema de remediación I en comparación a los realizados en el sistema II. Debido a que las condiciones experimentales fueron mejoradas en este último, este hecho podría deberse a la calidad del lodo suministrado a los organismos. El lodo utilizado para los ensayos en el sistema II fue retirado 48 horas después de su eliminación del SRA. El lodo utilizado en el sistema I fue retirado a las 24 horas. La remineralización y lixiviación de sus componentes orgánicos se refleja en sus resultados de caracterización fisicoquímica con menores concentraciones de oxígeno disuelto, un pH más ácido y mayores niveles de NAT, pudiendo esto haber influenciado en la calidad del mismo (Stewart, 2005; Stewart *et al.*, 2006; Mongirdas *et al.*, 2017).

Concentración de NAT en el agua superficial

La concentración de este compuesto fue analizada por la toxicidad que provoca en otros grupos de poliquetos utilizados en ensayos de remediación. La máxima tasa de excreción de NAT alcanzada por *A. pusilla* resultó similar a la obtenida por *P. nuntia vallata* en ensayos de este tipo (0,17 mg NAT/ g poliqueto y día) (Honda & Kikuchi, 2002). La mortalidad de *A. pusilla* resultó mayor en las unidades experimentales del sistema I que presentaron las concentraciones de NAT más elevadas. Esto concuerda con otros estudios, sugiriendo que para esta especie la concentración de este compuesto es también un factor clave para su supervivencia (Bischoff, 2007; Seekamp, 2017).

En las unidades control del sistema I (a excepción de la que contaba con menor concentración de lodo) se produjo un aumento del contenido en NAT en el agua superficial, lo que pudo ser debido a fenómenos de remineralización por actividad bacteriana (Batista *et al.*, 2003; Olive *et al.*, 2009; Palmer, 2010; Palmer, 2018). Este aumento fue mayor según aumentaba la cantidad de lodo acuícola añadido, lo que ha sido reportado asimismo por otros estudios (Bischoff, 2007). Esto sugiere que la inexistencia de recirculación de agua y biofiltración para reducir la concentración de

NAT en un sistema experimental de este tipo no permite implementación de lodo a concentraciones mayores al 2% en comparación con el total de sustrato inerte implementado. El aumento de la concentración de NAT en el agua superficial y de MOT en el sustrato en estos ensayos pudo ser debido a la degradación de la calidad del sedimento. Este presentó una capa de color negrozco en el interior y la superficie del mismo, condiciones similares a las de enriquecimiento orgánico en ambientes acuáticos con influencia de actividades acuícolas intensivas (Nimptsch *et al.*, 2015; Srithongouthai & Tada, 2017).

Debido a la implementación de los sistemas de biofiltración, la concentración de NAT en los ensayos realizados en el sistema II fue significativamente menor a la obtenida en el sistema I. Este compuesto presentó un incremento inicial significativo para después mantenerse siempre a niveles menores a 1 mg/l. Lo mismo ocurrió con la concentración de $\text{NO}_2^- - \text{N}$. Condiciones similares han sido descritas en otros estudios de remediación (Bischoff, 2007; Yang *et al.*, 2015).

Implementación de sistemas de remediación con *A. pusilla* asociados a cultivos en SRA

La búsqueda de alternativas para reducir y tratar el lodo generado en los sistemas de producción acuícola de especies marinas es actualmente una prioridad a nivel mundial asociada a la expansión y desarrollo sustentable de la acuicultura (Martins *et al.*, 2010; van Rijn, 2013; Krishnani *et al.*, 2018). El objetivo de este estudio era evaluar la factibilidad biológica de *A. pusilla* como organismo remediador de los componentes orgánicos presentes en el lodo removido de un SRA de *Seriola lalandi*, ya que existían antecedentes de que este poliqueto era capaz de vivir y crecer en lodo acuícola, sin embargo se desconocía su potencial como bioremediador.

Los resultados demuestran que el contenido orgánico del lodo presenta compatibilidad nutricional con *A. pusilla* al obtenerse tasas de remoción positivas en los diferentes tipos de ensayos realizados, alcanzando además asimilación de distintos tipos de nutrientes, como carbono orgánico y ácidos grasos presentes en el mismo. La remoción

y asimilación de estos componentes obtenida por *A. pusilla* en estas experiencias indica que este poliqueto puede ingerir lodo acuícola como única fuente de alimento. De los datos obtenidos, se concluye también que existen diferencias en la eficiencia de remoción por *A. pusilla* según las distintas condiciones experimentales.

La implementación de *A. pusilla* como bioremediadora en efluentes de acuicultura puede aumentar la sustentabilidad ambiental de los cultivos marinos en SRA. Por un lado, permitiría reducir las descargas de lodo al ambiente eliminando o disminuyendo así los riesgos ambientales que esto conlleva (Nimptsch *et al.*, 2015; Srithongouthai & Tada, 2017; Woodcock *et al.*, 2018) y, por otro lado, podría ofrecer la posibilidad de reutilización de nutrientes orgánicos contenidos en él (Bradshaw *et al.*, 1990; Olive *et al.*, 2006; Bischoff *et al.*, 2009; Brown *et al.*, 2011). Es por ello que la implementación de poliquetos como remediadores de efluentes de acuicultura podría incluirse dentro del concepto de *Economía azul*, que implica una administración más sostenible del cultivo de recursos acuáticos (Ababouch & Fipi, 2015).

La implementación de un sistema de remediación con este poliqueto implicaría un gasto económico asociado al SRA. Sin embargo, esto dependerá del diseño del mismo. La aplicación de sistemas de bombeo para conseguir la recirculación del agua en un sistema con unidades en vertical conllevaría un mayor costo energético para su funcionamiento, sin embargo aseguraría poder contar con menor disponibilidad de espacio. Asimismo, la implementación de los sistemas de biofiltración implica contar con mayores niveles de saturación de oxígeno en el agua para un buen rendimiento de las bacterias nitrificantes. Esto incluye la necesidad de contar con algún mecanismo de inyección de aire en el agua del sistema. Sin embargo, dependiendo de la concentración de NAT en el agua de las unidades, estos podrían no ser necesarios. Por otra parte, la posibilidad de utilizar la biomasa de *A. pusilla* como fuente de alimento para otras especies acuícolas gracias a la reutilización de los ácidos grasos contenidos en el lodo podría conferir un valor añadido a este producto (Bischoff *et al.*, 2009; Brown *et al.*, 2011).

PROYECCIONES

1. *A. pusilla* puede ser una buena candidata para su implementación en sistemas de remediación asociados a instalaciones acuícolas a pequeña escala, debido a la reducción obtenida de componentes orgánicos presentes en el lodo de un SRA marino. Considerando la tasa de generación de lodo y la reducción máxima de MOT alcanzada en este estudio, sería necesaria una superficie de 28 m² para la implementación de un sistema de remediación con *A. pusilla* que contara con cinco unidades implementadas en vertical para la remoción total en un día del lodo generado por kg de alimento suministrado a los organismos de cultivo.
2. En este estudio se determinaron los parámetros básicos esenciales para la implementación de *A. pusilla* en sistemas de remediación. Asimismo, se determinó la remoción de lodo generado en un SRA a nivel experimental bajo diferentes condiciones. En un futuro sería interesante comprobar e intentar incrementar su rendimiento de remoción en un sistema acuícola de mayor producción.
3. Sería interesante evaluar la capacidad de *A. pusilla* para asimilar ácidos grasos contenidos en el lodo, determinando también la existencia de posibles cambios en su perfil de ácidos grasos. Esto puede ser atractivo desde el punto de vista de su reintroducción como ingrediente en alimentos acuícolas, mejorando su calidad.
4. Finalmente también sería interesante evaluar el acoplamiento de este sistema a otros modelos utilizados en SRA, como cultivos en acuaponía.

CONCLUSIONES

1. Las mayores tasas de remoción de componentes orgánicos por *A. pusilla* se alcanzaron en un sistema de remediación con recirculación de agua y equipos de filtración biológica al introducir la mayor densidad de individuos (200 organismos/m²). La tasa máxima de remoción de MOT fue de 35,77 g/m² día (el 85,37% del total implementado en 45 días). La remoción de N total alcanzada durante los ensayos fue de 33,63 mg/día (1,27 mg N/g poliqueto día), mientras que la remoción de C total obtenida fue de 236,78 mg/día (8,99 mg C/g poliqueto día).
2. La asimilación de componentes orgánicos fue corroborada por la obtención de incrementos significativos en la concentración de ácidos grasos, carbono total y carbono orgánico en la biomasa de los organismos al final de las experiencias. Estos resultaron ser del 0,65%, 24,75% y 24,68% en 45 días de ensayos, respectivamente.
3. La mayor tasa específica de crecimiento alcanzada por *A. pusilla* fue obtenida en un sistema de remediación con recirculación de agua y biofiltración, siendo del 3,06% al día durante 45 días de ensayos (un incremento de 8,48 g/m² día). Se lograron supervivencias del 91,67% de los organismos al final de las experiencias.

REFERENCIAS

á Norði, G., R. N. Glud, E. Gaard & K. Simonsen. 2011. Environmental impacts of coastal fish farming: carbon and nitrogen budgets for trout farming in Kaldbaksfjørður (Faroe Islands). *Marine Ecol. Progr. Ser.* 431: 223-241.

Ababouch, L. & F. Fipi. 2015. Fisheries and aquaculture in the context of blue economy. Background Paper. Economic Commission for Africa. Abdou Diouf International Conference Center, Dakar, Senegal. 13 pp.

Akizuki, S. & T. Toda. 2018. An anaerobic-aerobic sequential batch process with simultaneous methanogenesis and short-cut denitrification for the treatment of marine biofouling. *Waste Manag.* <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.12.013>.

Alyakrinskaya, I. O. 2003. Some ecological features of the lugworm *Arenicola marina* L. (*Annelida, Polychaeta*) and its morphological and biochemical adaptations to burrowing. *Biology Bulletin of the Russian Academy of Sciences.* 30(4): 411-418.

Andrade, C., C. Ríos, D. Gerdes & T. Brey. 2016. Trophic structure of shallow-water benthic communities in the sub-Antarctic Strait of Magellan. *Polar Biology.* 39(12): 2281-2297.

Andrei, S., A. Pop, I. Gageanu, E. Laza, D. Cujbescu, I. Voicea & V. Vladut. 2016. Aspects on mechanical filtering in aquaculture systems. *Annals of the University of Craiova-Agriculture, Montanology, Cadastre Series.* 46(2): 296-305.

APHA. 1998. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (20th ed.). APHA: Washington DC.

Aruety, T., T. Brunner, Z. Ronen, A. Gross, K. Sowers & D. Zilberg. 2016. Decreasing levels of the fish pathogen *Streptococcus iniae* following inoculation into the sludge digester of a zero-discharge recirculating aquaculture system (RAS). *Aquaculture.* 450: 335-341.

Aubin, J., M. Callier, H. Rey-Valette, S. Mathé, A. Wilfart, M. Legendre, J. Slembrouck, D. Caruso, E. Chia, G. Masson, J. P. Blancheton, Ediwarman, J. Haryadi, T. H. Prihadi, J. M. Casaca, S. T. J. Tamassia, A. Tocqueville & P. Fontaine. 2017. Implementing

ecological intensification in fish farming: definition and principles from contrasting experiences. *Reviews in Aquaculture*. <https://10.1111/raq.12231>.

Badiola, M., D. Mendiola, & J. Bostock. 2012. Recirculating Aquaculture Systems (RAS) analysis: Main issues on management and future challenges. *Aquacult. Eng.* 51: 26-35.

Baharudin, N. S. 2014. Polychaete Assisted Sand Filter in Treating Synthetic Wastewater (Doctoral dissertation, Universiti Sains Malaysia, pp. 142).

Barrington, K., T. Chopin & S. Robinson. 2009. Integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) in marine temperate waters. In: D. Soto (ed.). *Integrated mariculture: a global review*. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper. No. 529. Rome, FAO, pp. 7–46.

Batista, F. M., P. Fidalgo e Costa, D. Matias, S. Joaquim, C. Massapina, A. M. Passos, P. P. Ferreira & L. C. da Fonseca. 2003. Preliminary results on the growth and survival of the polychaete *Nereis diversicolor* (OF Muller, 1776), when fed with faeces from the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* (L., 1758). *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 19(1-4): 443.

Bergström, P., M. S. Carlsson, M. Lindegarth, J. K. Petersen, S. Lindegarth & M. Holmer. 2017. Testing the potential for improving quality of sediments impacted by mussel farms using bioturbating polychaete worms. *Aquacult. Res.* 48(1): 161-176.

Berntsen, F. H. 2018. Growth of the polychaete *Hediste diversicolor* (OF Müller, 1776) fed on smolt sludge and biogas residues: Evaluation of RNA/DNA Ratio as growth indicator. (Master's thesis, Norwegian University of Science and Technology, NTNU, Trondheim, Norway, 55 pp).

Bianchi, T. S. 2007. *Biogeochemistry of estuaries*. Oxford University Press, New York, 687 pp.

Bianchi, T. S., & E. A. Canuel. 2011. *Chemical biomarkers in aquatic ecosystems*. Princeton University Press, New Jersey, 395 pp.

Bischoff, A. A. 2007. Solid waste reduction of closed recirculated aquaculture systems by secondary culture of detritivorous organisms (Doctoral Thesis, Christian-Albrechts-Universität, Kiel, Germany, 179 pp).

Bischoff, A. A., P. Fink & U. Waller. 2009. The fatty acid composition of *Nereis diversicolor* cultured in an integrated recirculated system: Possible implications for aquaculture. *Aquaculture*. 296(3-4): 271-276.

Bjornsdottir, R., G. V. Oddsson, R. I. Thorarinsdottir & R. Unnthorsson. 2016. Taxonomy of means and ends in aquaculture production—Part 1: The functions. *Water*. 8(8): 319.

BOE-A-1974-204. Orden por la que se dictan normas sobre ordenación zootécnico-sanitaria de centros de piscicultura instalados en aguas continentales. *Boletín Oficial del Estado*, Gobierno de España, pp. 1830-1831.

Bondarczuk, K., A. Markowicz & Z. Piotrowska-Seget. 2016. The urgent need for risk assessment on the antibiotic resistance spread via sewage sludge land application. *Environ. Int.* 87: 49-55.

Bradshaw, S. A., S. C. O'Hara, E. D. Corner & G. Eglinton. 1990. Dietary lipid changes during herbivory and coprophagy by the marine invertebrate *Nereis diversicolor*. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 70(4): 771-787.

Brinker, A., W. Koppe & R. Rösch. 2005. Optimised effluent treatment by stabilised trout faeces. *Aquaculture*. 249(1-4): 125-144.

Brown, N., S. Eddy & S. Plaud. 2011. Utilization of waste from a marine recirculating fish culture system as a feed source for the polychaete worm, *Nereis virens*. *Aquaculture*. 322: 177-183.

Bureau, D. P. & K. Hua. 2010. Towards effective nutritional management of waste outputs in aquaculture, with particular reference to salmonid aquaculture operations. *Aquacult. Res.* 41(5): 777-792.

Callier, M. D., F. Rossi, T. Geoffroy, S. Hutting, V. Van Bruggen & J. P. Blancheton. 2014. Bioremediation of fish farm waste by deposit-feeding polychaetes *Capitella sp.* and *Hediste diversicolor*. In: *Aquaculture Europe 2014, Meeting of the European Aquaculture Society (EAS): Adding value*, 14-17 October 2014, Donostia-San Sebastián, Spain.

Cavallo, D., A. Pusceddu, R. Danovaro & A. Giangrande. 2007. Particulate organic matter uptake rates of two benthic filter-feeders (*Sabella spallanzanii* and *Branchiomma luctuosum*) candidates for the clarification of aquaculture wastewaters. *Marine Poll. Bull.* 54(5): 622-625.

- Celis A. J. & B. M. Sandoval. 2010. Agricultural potential of salmon wastes used as organic fertilizer on two Chilean degraded soils. *Ratio*. 100(9.3): 13-4.
- Chabasse, C., X. Bailly, M. Rousselot & F. Zal. 2006. The multigenic family of the extracellular hemoglobin from the annelid polychaete *Arenicola marina*. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol Biol*. 144(3): 319-325.
- Chen, S., D. E. Coffin & R. F. Malone. 1997. Sludge production and management for recirculating aquacultural systems. *J. World Aquacult. Soc.* 28(4): 303-315.
- Coutinho, M. C. L., V. L. Teixeira & C. S. G. Santos. 2017. A Review of *Polychaeta* Chemicals and their Possible Ecological Role. *Journal of Chemical Ecology*. 1-23. <https://doi.org/10.1007/s10886-017-0915-z>.
- Couturier, M., T. Trofimencoff, J. U. Buil & J. Conroy. 2009. Solids removal at a recirculating salmon-smolt farm. *Aquacult. Eng.* 41(2): 71-77.
- Crab, R., Y. Avnimelech, T. Defoirdt, P. Bossier & W. Verstraete. 2007. Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture*. 270(1-4): 1-14.
- Crane, R. L. & R. A. Merz. 2012. Sediment properties and burrowing of *Abarenicola pacifica* and *A. claparedi vagabunda* in False Bay. In: *Blinks / BEACON / NSF Research Experience for Undergraduates 2012*, 21 pp.
- Crane, R. L. & R. A. Merz, R. A. 2017. Mechanical properties of sediment determine burrowing success and influence distribution of two lugworm species. *J. Exp. Biol.* 220(18): 3248-3259.
- Cripps, S. J. & A. Bergheim. 2000. Solids management and removal for intensive land-based aquaculture production systems. *Aquacult. Eng.* 22(1-2): 33-56.
- Cubillo, A. M., J. G. Ferreira, S. M. Robinson, C. M. Pearce, R. A. Corner & J. Johansen. 2016. Role of deposit feeders in integrated multi-trophic aquaculture—a model analysis. *Aquaculture*. 453: 54-66.
- Dalsgaard, J., I. Lund, R. Thorarinsdottir, A. Drengstig, K. Arvonen & P. B. Pedersen. 2013. Farming different species in RAS in Nordic countries: Current status and future perspectives. *Aquacult. Eng.* 53: 2-13.

Darbyshire, T. 2017. A re-evaluation of the *Abarenicola assimilis* group with a new species from the Falkland Islands and key to species. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 97(5): 897-910.

del Campo, L. M., P. Ibarra, X. Gutiérrez & H. Takle. 2010. Utilization of sludge from recirculation aquaculture systems. Nofima Marin AS report, Innovation Norway. Report 9/2010.

Dornhoffer, T. M., G. G. Waldbusser & C. Meile. 2015. Modeling lugworm irrigation behavior effects on sediment nitrogen cycling. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 534.

Drennan II, D. G., K. C. Hosler, M. Francis, D. Weaver, E. Aneshansley, G. Beckman, C. H. Johnson & C. M. Cristina. 2006. Standardized evaluation and rating of biofilters II. Manufacturer's and user's perspective. *Aquacult. Eng.* 34(3): 403-416.

Dubois, S., J. C. Marin-Léal, M. Ropert & S. Lefebvre. 2007. Effects of oyster farming on macrofaunal assemblages associated with *Lanice conchilega* tubeworm populations: A trophic analysis using natural stable isotopes. *Aquaculture*. 271(1-4): 336-349.

Ebeling, J. M., C. F. Welsh & K. L. Rishel. 2006. Performance evaluation of an inclined belt filter using coagulation/flocculation aids for the removal of suspended solids and phosphorus from microscreen backwash effluent. *Aquacult. Eng.* 35(1): 61-77.

Ebeling, J. M., & M. B. Timmons. 2012. Recirculating aquaculture systems. In: Tidwell J. (ed.). *Aquaculture production systems*. Wiley-Blackwell, Hoboken, pp. 245-277.

Edmondson, W. T. 1971. Methods for Processing Samples and Developing Data, in Edmondson W. T. & G. G. Winberg (eds.). *A Manual on Methods for the Assessment of Secondary Productivity in Fresh Waters*. International Biological Programme Handbook No. 17. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 358 pp.

Edwards, P. 2015. Aquaculture environment interactions: past, present and likely future trends. *Aquaculture*. 447: 2-14.

Fadhullah, W., & M. I. Syakir. 2016. Polychaetes as Ecosystem Engineers: Agents of Sustainable Technologies. In: *Renewable Energy and Sustainable Technologies for Building and Environmental Applications*, Springer, Cham, pp. 137-150.

- Fang, J., J. Zhang, Z. Jiang, M. Du, Y. Liu, Y. Mao, Y. Gao & J. Fang. 2016. Environmental remediation potential of *Perinereis aibuhitensis* (*Polychaeta*) based on the effects of temperature and feed types on its carbon and nitrogen budgets. *Mar. Biol. Res.* 12(6): 583-594.
- Fernandes, M. & J. Tanner. 2008. Modelling of nitrogen loads from the farming of yellowtail kingfish *Seriola lalandi* (Valenciennes, 1833). *Aquacult. Res.* 39(12): 1328-1338.
- Fernández, P. 1996. Determinación del tamaño muestral. *Cad. Aten. Primaria.* 3: 138-141.
- García-Alonso, J., C. T. Müller & J. D. Hardege. 2008. Influence of food regimes and seasonality on fatty acid composition in the ragworm. *Aquat. Biol.* 4(1): 7-13.
- Garrabrants, A. C., D. S. Kosson, H. A. van der Sloot, F. Sanchez & O. Hjelmar. 2010. Background information for the leaching environmental assessment framework (LEAF) test methods. United States Environmental Protection Agency (US EPA). 187 pp.
- Giangrande, A., A. Cavallo, M. Licciano, E. Mola, C. Pierri & L. Trianni. 2005. Utilization of the filter feeder polychaete *Sabella spallanzanii* (*Sabellidae*) as bioremediator in aquaculture. *Aquacult. Int.* 13(1-2): 129-136.
- González-Hermoso, J. P., E. Peña-Messina, A. Miranda-Baeza, L. R. Martínez-Córdoba, M. T. Gutiérrez-Wing & M. Segovia. 2016. Effect of four different pretreatments in nitrogen and phosphorus flow and mass balance in effluents of a recirculating aquaculture system. *CICIMAR Océánides* 31(2): 21-34.
- Görlitz, S. 2012. The lugworm *Abarenicola affinis* (*Arenicolidae*, *Polychaeta*) in tidal flats of Otago, southern New Zealand. (Doctoral dissertation, University of Otago, pp. 188).
- Granada, L., N. Sousa, S. Lopes & M. F. Lemos. 2016. Is integrated multitrophic aquaculture the solution to the sectors' major challenges?—a review. *Reviews in Aquaculture.* 8(3): 283-300.
- Green, B. W & C. E. Boyd. 1995. Chemical budgets for organically fertilized fish ponds in the dry tropics. *J World Aquac Soc.* 26(3): 284-296.

Guerdat, T. C., T. M. Losordo, D. P. DeLong & R. D. Jones. 2013. An evaluation of solid waste capture from recirculating aquaculture systems using a geotextile bag system with a flocculant-aid. *Aquacult. Eng.* 54: 1-8.

Guerrero, S. & J. Cremades. 2012. Integrated Multi-trophic Aquaculture (IMTA): A sustainable, pioneering alternative for marine cultures in Galicia. In: J. Reg. Government of Galicia (Spain), pp. 111, 2012.

Gunning, D., J. Maguire, & G. Burnell. 2016. The development of sustainable saltwater-based food production systems: a review of established and novel concepts. *Water.* 8(12): 598.

Gutierrez-Wing, M. T. & R. F. Malone. 2006. Biological filters in aquaculture: trends and research directions for freshwater and marine applications. *Aquacult. Eng.* 34(3): 163-171.

Hepp, C. 2012. Resultados preliminares sobre el uso de lodos de pisciculturas sobre suelos agropecuarios de origen volcánico de la Patagonia occidental (Aysén). Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro de Investigación INIA Tamel Aike, Coyhaique, Aysén-Patagonia, Chile. Boletín técnico n° 223, 82 pp.

Herath, S. S. & S. Satoh. 2015. Environmental impact of phosphorus and nitrogen from aquaculture. In: *Feed and Feeding Practices in Aquaculture*, 369-386.

Hiebert, T.C. 2014. *Abarenicola pacifica*. In: *Oregon Estuarine Invertebrates: Rudys' Illustrated Guide to Common Species*, 3rd ed. T.C. Hiebert, B.A. Butler and A.L. Shanks (eds.). University of Oregon Libraries and Oregon Institute of Marine Biology, Charleston, OR.

Honda, H. & K. Kikuchi. 2002. Nitrogen budget of polychaete *Perinereis nuntia vallata* fed on the feces of Japanese flounder. *Fisheries Science.* 68(6): 1304-1308.

Hopkins, K. D. 1992. Reporting fish growth: a review of the basics. *J. World Aquacult. Soc.* 23(3): 173-179.

Hylleberg, J. 1975. Selective feeding by *Abarenicola pacifica* with notes on *Abarenicola vagabunda* and a concept of gardening in lugworms. *Ophelia.* 14(1-2): 113-137.

Ito, M., K. Ito, K. Ohta, T. Hano, T. Onduka, K. Mochida & K. Fujii. 2016. Evaluation of bioremediation potential of three benthic annelids in organically polluted marine sediment. *Chemosphere*. 163: 392-399.

Jackson, M. G. & R. Dasgupta. 2008. Compositions of HIMU, EM1, and EM2 from global trends between radiogenic isotopes and major elements in ocean island basalts. *Earth Planet. Sci. Lett.* 276(1-2): 175-186.

Jegatheesan, V., L. Shu & C. Visvanathan. 2011. Aquaculture effluent: impacts and remedies for protecting the environment and human health. In: Nriagu J (ed.) *Encycl. Environ. Health*, 123-135.

Johansen, P. O., T. E. Isaksen, E. Bye-Ingebrigtsen, M. Haave, T. G. Dahlgren, S. E. Kvalø, M. Greenacre, D. Durand & H. T. Rapp. 2018. Temporal changes in benthic macrofauna on the west coast of Norway resulting from human activities. *Marine Poll. Bull.* 128: 483-495.

Jørgensen, E. H., J. S. Christiansen & M. Jobling. 1993. Effects of stocking density on food intake, growth performance and oxygen consumption in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Aquaculture*. 110(2): 191-204.

Khan, S., T. Wintgens, P. Sherman., J. Zaricky & A. Schäfer. 2005. A performance comparison of individual and combined treatment modules for water recycling. *Environ Prog.* 24(4): 383-391.

Kinoshita, K., S. Tamaki, M. Yoshioka, S. Srithonguthai, T. Kunihiro, D. Hama, K. Ohwada & H. Tsutsumi. 2008. Bioremediation of organically enriched sediment deposited below fish farms with artificially mass-cultured colonies of a deposit-feeding polychaete *Capitella sp. I*. *Fisheries science*. 74(1): 77-87.

Koo, B. J. & J. Seo. 2017. Sediment reworking by a polychaete, *Perinereis aibuhitensis*, in the intertidal sediments of the Gomso Bay, Korea. *Ocean Science Journal*. 52(4): 511-518.

Krishnani, K. K., N. Kumar, K. K. Meena & N. P. Singh. 2018. Bioremediation of perturbed waterbodies fed with wastewater for enhancing finfish and shellfish production. In: *Wastewater Management Through Aquaculture*, Springer, Singapore, pp. 185-206.

Kristensen, E. 1984. Life cycle, growth and production in estuarine populations of the polychaetes *Nereis virens* and *N. diversicolor*. *Ecography*. 7(3): 249-250.

Lamprianidou, F. 2015. Development of a model for evaluating and optimizing the performance of integrated multitrophic aquaculture (IMTA) systems. (Doctoral Thesis, University of Stirling, 226 pp).

LeDuc, D., P. K. Probert, R. D. Frew & C. L. Hurd. 2006. Macroinvertebrate diet in intertidal seagrass and sandflat communities: a study using C, N, and S stable isotopes. *New Zeal. J. Mar. Fresh. Res.* 40(4): 615-629.

Ley de residuos. Ley nº 10/1998. Boletín Oficial del Estado (nº 96). Jefatura del Estado, Gobierno de España, 22 abril 1998.

Lovegrove, T. 1971. The Effects of Various Factors on Dry Weight Values. *Rapp. Cons. Explor.* 153: 86-91.

Luo, G. Z., N. Ma, P. Li, H. X. Tan & W. Liu. 2015. Enhancement of anaerobic digestion to treat saline sludge from recirculating aquaculture systems. *Sci. World J.* 2015, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2015/479101>.

Lupatsch, I., & G. W. Kissil. 1998. Predicting aquaculture waste from gilthead seabream (*Sparus aurata*) culture using a nutritional approach. *Aquat. Living Resour.* 11(4): 265-268.

MacDonald, C. L., S. M. Stead & M. J. Slater. 2013. Consumption and remediation of European Seabass (*Dicentrarchus labrax*) waste by the sea cucumber *Holothuria forskali*. *Aquacult. Int.* 21(6): 1279-1290.

Madariaga, S. T. & S. L. Marín. 2017. Sanitary and environmental conditions of aquaculture sludge. *Aquacult. Res.* 48(4): 1744-1750.

Marín, R. M. 2003. Fisicoquímica y microbiología de los medios acuáticos: tratamiento y control de calidad de aguas. Ed. Díaz de Santos, Madrid, España (No. 628.161 MARf), 305 pp.

Marques, B., R. Calado & A. I. Lillebø. 2017. New species for the biomitigation of a super-intensive marine fish farm effluent: Combined use of polychaete-assisted sand filters and halophyte aquaponics. *Sci. Total Environ.* 599: 1922-1928.

- Marques, B., A. I. Lillebø, F. Ricardo, C. Nunes, M. A. Coimbra & R. Calado. 2018. Adding value to ragworms (*Hediste diversicolor*) through the bioremediation of a super-intensive marine fish farm. *Aquacult. Environ. Interact.* 10: 79-88.
- Martínez-García, E., M. S. Carlsson, P. Sánchez-Jerez, J. L. Sánchez-Lizaso, C. Sanz-Lazaro & M. Holmer. 2015. Effect of sediment grain size and bioturbation on decomposition of organic matter from aquaculture. *Biogeochemistry.* 125(1): 133-148.
- Martins, C. I. M., E. H. Eding, M. C. Verdegem, L. T. Heinsbroek, O. Schneider, J. P. Blancheton, E. Roque d'Orbcastel & J. A. J. Verreth. 2010. New developments in recirculating aquaculture systems in Europe: A perspective on environmental sustainability. *Aquacult. Eng.* 43(3): 83-93.
- Mason, W. T., P. A. Lewis & C. I. Weber. 1983. An evaluation of benthic macroinvertebrate biomass methodology. *Environ Monit Assess.* 3(1): 29-44.
- Mateo-Sagasta, J., L. Raschid-Sally & A. Thebo. 2015. Global wastewater and sludge production, treatment and use. In: *Wastewater*, Springer, Dordrecht, pp. 15-38.
- Mayhead, E., A. Silkina, C. A. Llewellyn & C. Fuentes-Grünwald. 2018. Comparing nutrient removal from membrane filtered and unfiltered domestic wastewater using *Chlorella vulgaris*. *Biology.* 7(1): 12.
- Mayr, C. C., G. Försterra, V. Häussermann, A. Wunderlich, J. Grau, M. Zieringer & A. V. Altenbach. 2011. Stable isotope variability in a Chilean fjord food web: implications for N-and C-cycles. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 428: 89-104.
- McCallum, E. S., E. Krutzemann, T. Brodin, J. Fick, A. Sundelin & S. Balshine. 2017. Exposure to wastewater effluent affects fish behaviour and tissue-specific uptake of pharmaceuticals. *Sci. Total Environ.* 605: 578-588.
- McIver, R., I. Milewski, R. Loucks & R. Smith. 2018. Estimating nitrogen loading and far-field dispersal potential from background sources and coastal finfish aquaculture: A simple framework and case study in Atlantic Canada. *Estuarine, Coastal and Shelf Science.* <https://10.1016/j.ecss.2018.01.005>.
- Merino, G., J. Barraza, J. Illanes, M. Morales, C. Basulto & G. Drago. 2017. Ingeniería aplicada al cultivo del abalón en estanques en el norte de Chile. *Salmon Expert.* N°56: 50-54.

- Merino, G., D. Conklin & R. Piedrahita. 2007a. Ammonia and urea excretion rates of California halibut (*Paralichthys californicus*) under farm-like conditions. *Aquaculture*. 271: 227-243.
- Merino, G. E., R. H. Piedrahita & D. E. Conklin. 2007b. Settling characteristics of solids settled in a recirculating system for California halibut (*Paralichthys californicus*) culture. *Aquacult. Eng.* 37(2): 79-88.
- Meunpol, O., P. Meejing & S. Piyatiratitivorakul. 2005. Maturation diet based on fatty acid content for male *Penaeus monodon* (Fabricius) broodstock. *Aquacult. Res.* 36(12): 1216-1225.
- Mirzoyan, N., S. Parnes, A. Singer, Y. Tal, K. Sowers & A. Gross. 2008. Quality of brackish aquaculture sludge and its suitability for anaerobic digestion and methane production in an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Aquaculture*. 279(1-4): 35-41.
- Mirzoyan, N., Y. Tal & A. Gross. 2010. Anaerobic digestion of sludge from intensive recirculating aquaculture systems. *Aquaculture*. 306(1-4): 1-6.
- Mongirdas, V., G. Žibienė & A. Žibas. 2017. Waste and its characterization in closed recirculating aquaculture systems: A review. *Journal of Water Security*, 3. <https://dx.doi.org/10.15544/jws.2017.002>.
- Mora-Ravelo, S. G., A. Alarcon, M. Rocandio-Rodriguez & V. Vanoye-Eligio. 2017. Bioremediation of wastewater for reutilization in agricultural systems: a review. *Appl. Ecol. Env. Res.* 15(1): 33-50.
- Moreno, R. A., N. Rozbaczylo, R. D. Sepulveda, M. I. Marinkovic, W. E. Arntz & S. Thatje. 2007. On some ecological aspects of the lugworm *Abarenicola affinis chiliensis* Wells, 1963 (*Polychaeta: Scolecida: Arenicolidae*) from shallow soft bottoms of northern Chile. *Helgol. Mar. Res.* 61(1): 1-7.
- Murray, F., J. Bostock & D. Fletcher. 2014. Review of recirculation aquaculture system technologies and their commercial application. *Aquaculture Research Reports, Highlands and Islands Enterprise*. University of Stirling, Scotland, pp. 75.

Nelson, E. J., B. A. MacDonald & S. M. C. Robinson. 2012. The absorption efficiency of the suspension-feeding sea cucumber, *Cucumaria frondosa*, and its potential as an extractive integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) species. *Aquaculture*. 370: 19-25.

Nerici, C., A. Silva & G. Merino. 2012. Effect of two temperatures on ammonia excretion rates of *Seriola lalandi* (Palm fish) juveniles under rearing conditions. *Aquacult. Eng.* 46: 47– 52.

Nimptsch, J., S. Woelfl, S. Osorio, J. Valenzuela, P. Ebersbach, W. von Tuempling, R. Palma, F. Encina, D. Figueroa, N. Kamjunke & D. Graeber. 2015. Tracing dissolved organic matter (DOM) from land-based aquaculture systems in North Patagonian streams. *Sci. Total Environ.* 537: 129-138.

Oglesby, L. C. 1973. Salt and water balance in lugworms (*Polychaeta: Arenicolidae*), with particular reference to *Abarenicola pacifica* in Coos Bay, Oregon. *Biological Bulletin*. 145(1): 180-199.

Olive, P. J. W., S. Craig & P. B. D. Cowin. 2006. U.S. Patent No. 7,004,109. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Olive, P. J., T. Duangchinda, E. Ashforth, S. Craig, A. C. Ward & S. J. Davies. 2009. Net gain of long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFA) in a lugworm *Arenicola marina* bioturbated mesocosm. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 387: 223-239.

Orellana, J. 2006. Identification and quantification of suspended solids and their effects in modern marine recirculation systems. (Doctoral Thesis, Christian-Albrechts-Universität, Kiel, Germany, 236 pp).

Orellana, J., U. Waller & B. Wecker. 2014. Culture of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) in a marine recirculating aquaculture system (RAS) with artificial seawater. *Aquacult. Eng.* 58: 20-28.

Pajand, Z. O., M. Soltani, M. Bahmani & A. Kamali. 2017. The role of polychaete *Nereis diversicolor* in bioremediation of wastewater and its growth performance and fatty acid composition in an integrated culture system with *Huso huso* (Linnaeus, 1758). *Aquacult. Res.* 48(10): 5271-5279.

Palacios, G. L. & M. B. Timmons. 2001. Determining design parameters for recovery of aquaculture wastewater using sand beds. *Aquacult. Eng.* 24(4): 289-299.

- Palmer, P. J. 2010. Polychaete-assisted sand filters. *Aquaculture*. 306 (1-4): 369-377.
- Palmer, P. J., S. Wang, D. Mann & W. J. Nash. 2018. Polybridge Season 3: Ecosystem effects of polychaete-assisted sand filters. National Landcare Programme Innovation Grant N° 041 – Legacy Project. Technical Report, pp. 44.
- Paterson, C. G. 1982. Energy Distribution in Biomass Estimates within a Freshwater Bivalve Community. *Can. J. Zool.* 60: 2753-2756.
- Pechenik, J. A., & T. R. Cerulli. 1991. Influence of delayed metamorphosis on survival, growth, and reproduction of the marine polychaete *Capitella sp. I*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 151(1): 17-27.
- Pedersen, P. B., M. von Ahnen, P. Fernandes, C. Naas, L. F. Pedersen & J. Dalsgaard. 2017. Particle surface area and bacterial activity in recirculating aquaculture systems. *Aquacult. Eng.* 78: 18-23.
- Perera, P., Z. Y. Han., Y. X. Chen & W. X. Wu. 2007. Recovery of nitrogen and phosphorous as struvite from swine waste biogas digester effluent. *Biomed Environ Sci.* 20(5): 343-350.
- Piedrahita, R. H. 2003. Reducing the potential environmental impact of tank aquaculture effluents through intensification and recirculation. *Aquaculture*. 226(1-4): 35-44.
- Quinn, B. M., E. A. Apolinario, A. Gross & K. R. Sowers. 2016. Characterization of a microbial consortium that converts mariculture fish waste to biomethane. *Aquaculture*. 453: 154-162.
- Rafiee, G. & C. R. Saad. 2005. Nutrient cycle and sludge production during different stages of red tilapia (*Oreochromis sp.*) growth in a recirculating aquaculture system. *Aquaculture*. 244(1-4): 109-118.
- Retraubun, A. S. W., M. Dawson & S. M. Evans. 1996. Spatial and temporal factors affecting sediment turnover by the lugworm *Arenicola marina* (L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 201(1-2): 23-35.
- Riisgard, H. U. & G. T. Banta. 1998. Irrigation and deposit feeding by the lugworm *Arenicola marina*, characteristics and secondary effects on the environment. A review of current knowledge. *Vie et milieu*. 48(4): 243-258.

Robinson, G., G. S. Caldwell, C. J. W. Jones, M. J. Slater & S. M. Stead. 2015. Redox stratification drives enhanced growth in a commercially important deposit-feeding invertebrate: implications for bioremediation and integrated aquaculture. *Aquacult. Environ. Interact.* 8: 1-13.

Rozbaczylo, N., R. A. Moreno & M. J. Montes. 2006. Poliquetos bentónicos submareales de fondos blandos desde el seno Reloncaví hasta boca del Guafo, Chile (*Annelida, Polychaeta*). *Cienc. Tecnol. Mar*, 29(2): 95-106.

Rusten, B., B. Eikebrokk, Y. Ulgenes & E. Lygren. 2006. Design and operations of the Kaldnes moving bed biofilm reactors. *Aquacult. Eng.* 34(3): 322-331.

Santos, A., L. Granada, T. Baptista, C. Anjos, T. Simões, C. Tecelão, P. Fidalgo e Costa, J. L. Costa & A. Pombo. 2016. Effect of three diets on the growth and fatty acid profile of the common ragworm *Hediste diversicolor* (OF Müller, 1776). *Aquaculture*. 465: 37-42.

Schneider, O., V. Sereti, E. H. Eding & J. A. J. Verreth. 2005. Analysis of nutrient flows in integrated intensive aquaculture systems. *Aquacult. Eng.* 32(3-4): 379-401.

Schumann, M., J. Unger & A. Brinker. 2017. Floating faeces: Effects on solid removal and particle size distribution in RAS. *Aquacult. Eng.* 78: 75-84.

Seekamp, I. 2017. Utilization of excess nutrients from land-based aquaculture facilities by *Hediste diversicolor* (OF Müller, 1776). Production of polychaete biomass and its potential use in fish feed (Master's thesis, Norwegian University of Science and Technology, pp. 96).

Sharrer, M. J., Y. Tal, D. Ferrier, J. A. Hankins & S. T. Summerfelt. 2007. Membrane biological reactor treatment of a saline backwash flow from a recirculating aquaculture system. *Aquacult. Eng.* 36(2): 159-176.

Sharrer, M. J., K. Rishel & S. Summerfelt. 2009. Evaluation of geotextile filtration applying coagulant and flocculant amendments for aquaculture biosolids dewatering and phosphorus removal. *Aquacult. Eng.* 40(1): 1-10.

Silva, N., C. A. Vargas & R. Prego. 2011. Land–ocean distribution of allochthonous organic matter in surface sediments of the Chiloé and Aysén interior seas (Chilean Northern Patagonia). *Cont. Shelf Res.* 31(3-4): 330-339.

Srithongouthai, S. & K. Tada. 2017. Impacts of organic waste from a yellowtail cage farm on surface sediment and bottom water in Shido Bay (the Seto Inland Sea, Japan). *Aquaculture*. 471: 140-145.

Stewart, N. T. 2005. Characterization of nutrient leaching rates from settled rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sludge. (Master's thesis, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, 65 pp).

Stewart, N. T., Boardman, G. D., & Helfrich, L. A. (2006). Characterization of nutrient leaching rates from settled rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sludge. *Aquacult. Eng.* 35(2): 191-198.

Suckow, B., A. Bischoff, B. H. Buck & M. Simon. 2010. Growth and biochemical composition of *Nereis virens* (Sars, 1835) applied as a bioconverter of solid waste from land-based fish culture. In: Abstracts of Aquaculture Europe 2010.

Suhr, K. I., C. O. Letelier-Gordo & I. Lund. 2015. Anaerobic digestion of solid waste in RAS: Effect of reactor type on the biochemical acidogenic potential (BAP) and assessment of the biochemical methane potential (BMP) by a batch assay. *Aquacult. Eng.* 65: 65-71.

Summerfelt, R. C. & C. R. Penne. 2005. Solids removal in a recirculating aquaculture system where the majority of flow bypasses the microscreen filter. *Aquacult. Eng.* 33(3): 214-224.

Tal, Y., H. J. Schreier, K. R. Sowers, J. D. Stubblefield, A. R. Place & Y. Zohar. 2009. Environmentally sustainable land-based marine aquaculture. *Aquacul.* 286(1-2): 28-35.

Tenore, K. R. & U. K. Gopalan. 1974. Feeding efficiencies of the polychaete *Nereis virens* cultured on hard-clam tissue and oyster detritus. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 31(10): 1675-1678.

Timmons, M. B. & J. M. Ebeling. 2007. Recirculating aquaculture. NRAC Publ No. 01 – 007. Cayuga Aqua Ventures. Ithaca, NY, Second Edition, 975 pp.

Toulmond, A. 1975. Blood oxygen transport and metabolism of the confined lugworm *Arenicola marina* (L.). *J. Exp. Biol.* 63(3): 647-660.

- Tumbiolo, M. L., & J. A. Downing. 1994. An empirical model for the prediction of secondary production in marine benthic invertebrate populations. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 114: 165-174.
- van Rijn, J. 2013. Waste treatment in recirculating aquaculture systems. *Aquacult. Eng.* 53: 49-56.
- Verdegem, M. C. 2013. Nutrient discharge from aquaculture operations in function of system design and production environment. *Reviews in Aquaculture.* 5(3): 158-171.
- Vergara, J. M., G. Lopez-Calero, L. Robaina, M. J. Caballero, D. Montero, M. S. Izquierdo & A. Aksnes. 1999. Growth, feed utilization and body lipid content of gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed increasing lipid levels and fish meals of different quality. *Aquaculture.* 179(1-4): 35-44.
- Vilbergsson, B., G. V. Oddsson & R. Unnthorsson. 2016. Taxonomy of means and ends in aquaculture production.—Part 3: The technical solutions of controlling N compounds, organic matter, P compounds, metals, temperature and preventing disease. *Water*, 8(11): 506.
- Waller, U., A. K. Buhmann, A. Ernst, V. Hanke, A. Kulakowski, B. Wecker, J. Orellana & J. Papenbrock. 2015. Integrated multi-trophic aquaculture in a zero-exchange recirculation aquaculture system for marine fish and hydroponic halophyte production. *Aquacult. Int.* 23(6): 1473-1489.
- Wang, X., L. M. Olsen, K. I. Reitan & Y. Olsen. 2012. Discharge of nutrient wastes from salmon farms: environmental effects, and potential for integrated multi-trophic aquaculture. *Aquac. Environ. Interact.* 2(3): 267-283.
- Wells, G. P. 1966. The lugworm (*Arenicola*)—a study in adaptation. *Neth. J. Sea Res.* 3(2): 294-313.
- Weston, D. P., D. L. Penry & L. K. Gulmann. 2000. The role of ingestion as a route of contaminant bioaccumulation in a deposit-feeding polychaete. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 38(4): 446-454.
- Wethey, D. S., S. A. Woodin, N. Volkenborn & K. Reise. 2008. Porewater advection by hydraulic activities of lugworms, *Arenicola marina*: a field, laboratory and modeling study. *J. Mar. Res.* 66(2): 255-273.

White, C. A., S. H. Woodcock, R. J. Bannister & P. D. Nichols. 2017. Terrestrial fatty acids as tracers of finfish aquaculture waste in the marine environment. *Reviews in Aquaculture*. <https://doi.org/10.1111/raq.12230>.

Winberg, G. G., & A. Duncan. 1971. *Methods for the estimation of production of aquatic animals*. Academy Press, London. No. 592 M67.

Woodcock, S. H., C. Troedsson, T. Strohmeier, P. Balseiro, K. S. Skaar & Ø. Strand. 2017. Combining biochemical methods to trace organic effluent from fish farms. *Aquacult. Environ. Interact.* 9: 429-443.

Woodcock, S. H., T. Strohmeier, Ø. Strand, S. A. Olsen & R. J. Bannister. 2018. Mobile epibenthic fauna consume organic waste from coastal fin-fish aquaculture. *Marine Environ. Research*. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.02.017>.

Wouters, R., B. Zambrano., M. Espin., J. Calderon., P. Lavens & P. Sorgeloos. 2002. Experimental broodstock diets as partial fresh food substitutes in white shrimp *Litopenaeus vannamei* B. *Aquac. Nutr.* 8(4): 249-256.

Xu, H. & S. You. 2016. A Review on Treatment of Aquaculture Wastes. 2nd International Conference on Education Technology, Management and Humanities Science (ETMHS 2016). Atlantic Press, pp. 748-751.

Yamamoto, Y. 2017. Characteristics of Closed Recirculating Systems. In: *Application of Recirculating Aquaculture Systems in Japan*. Springer, Tokyo, pp. 21-53.

Yang, D., C. Cao, G. Wang, Y. Zhou & Z. Xiu. 2015. The Growth Study of *Perinereis aibuhitensis* in Airlift Recirculating Aquaculture System. *The Open Biotechnology Journal*, 9(1): 143-149.

Yearsley, R. D., C. L. Jones & P. J. Britz. 2009. Effect of settled sludge on dissolved ammonia concentration in tanks used to grow abalone (*Haliotis midae* L.) fed a formulated diet. *Aquacult. Res.* 40(2): 166-171.

Yearsley, R. D., C. L. Jones, P. J. Britz & N. G. Vine. 2011. Integrated culture of silver kob *Argyrosomus inodorus* and bloodworm *Arenicola loveni loveni* in abalone farm effluent. *Afr. J. Marine Science.* 33(2): 223-228.

Yogev, U., K. R. Sowers, N. Mozes, & A. Gross. 2017. Nitrogen and carbon balance in a novel near-zero water exchange saline recirculating aquaculture system. *Aquaculture*. 467: 118-126.

Yokoyama, H. 2013. Growth and food source of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* cultured below fish cages — potential for integrated multi-trophic aquaculture. *Aquaculture*. 372: 28-38.

Zapata-Hernández, G., J. Sellanes, M. Thiel, C. Henríquez, S. Hernández, J. Fernández & E. Hajdu. 2016. Community structure and trophic ecology of megabenthic fauna from the deep basins in the Interior Sea of Chiloé, Chile (41–43° S). *Cont. Shelf Res.* 130: 47-67.

Zhang, S. Y., G. Li, H. B. Wu, X. G. Liu, Y. H. Yao, L. Tao & H. Liu. 2011. An integrated recirculating aquaculture system (RAS) for land-based fish farming: The effects on water quality and fish production. *Aquacult. Eng.* 45(3): 93-102.

Zhang, X., H. Spanjers & J. B. van Lier. 2013. Potentials and limitations of biomethane and phosphorus recovery from sludges of brackish/marine aquaculture recirculation systems: A review. *J. Environ. Manag.* 131: 44-54.

ANEXOS

Anexo 1. Dimensionamiento sistemas de biofiltración del sistema de remediación II.

Para este cálculo se utilizó el incremento máximo obtenido en la concentración de NAT en los ensayos realizados en el sistema I, siguiendo el procedimiento descrito por Drennan *et al.*, (2006).

- 1) El incremento máximo diario en la concentración de NAT fue de 21,85 mg/l, obtenido en las unidades con implementación de 10% de lodo acuícola.
- 2) Teniendo en cuenta el número máximo de poliquetos a implementar en el sistema II (serie de unidades con 200 organismos/m²), resulta en una tasa máxima de excreción por *A. pusilla* de 7,52 g NAT/día.
- 3) Para calcular la superficie necesaria para la adherencia de las bacterias nitrificantes, se debe dividir este resultado entre la tasa de remoción de NAT que posee el biofiltro. Este dato fue calculado en el biofiltro implementado en el SRA de *Seriola lalandi*, y se utilizó como referencia para el dimensionamiento de los biofiltros del sistema de remediación II. Resultó ser de 0,113 g NAT removidos/m² día. Su cálculo se detalla más adelante (*).
- 4) La superficie para las bacterias nitrificantes deberá ser, por tanto, de 66,27 m². Debido a que los portadores de biofilm utilizados poseen una superficie específica de 800 m²/m³, los biofiltros a implementar deberán tener como mínimo 0,082 m³ (82,8 litros).

NAT máximo excretado en sistema I	NAT máximo excretado en sistema II	Remoción biofiltro <i>S. lalandi</i>	Superficie	Biomedios	Volumen biofiltro	
g TAN / día	g TAN / día	g TAN/m ² /día	m ²	m ² /m ³	m ³	Litros
Control		0,113*		800		
0,065						
<i>Ab. pusilla</i>						
0,230						
Total						
0,294	7,521		66,267		0,0828	82,8

(*) Tasa de remoción de NAT del biofiltro

- Para el cálculo de la tasa de remoción de NAT del biofiltro de *S. lalandi* se realizaron mediciones de la concentración de este compuesto en el agua de entrada y de salida del mismo. La tasa promedio de remoción fue de $1,05 \pm 0,11$ mg/l (media \pm SD, n = 10).
- El caudal de agua a la entrada y salida del biofiltro es de 1 litro por segundo. Por tanto, el tiempo de renovación del agua en el mismo es de 0,28 horas.
- Debido a que el biofiltro posee un volumen de 1 m³, la remoción alcanzada es de 1.051 mg de TAN (1,051 g). Esta remoción se logra en su tiempo de renovación dentro del biofiltro (0,28 horas).
- Se obtiene así que 90,81 g de NAT son removidos por día en este biofiltro. Los portadores de biofilm utilizados poseen una superficie específica de 800 m²/m³, por lo que su tasa de remoción es de 0,113 g de NAT / m² día.

Anexo 2. Determinación número mínimo de poliquetos a implementar en el sistema de remediación II. (Fernández, 1996).

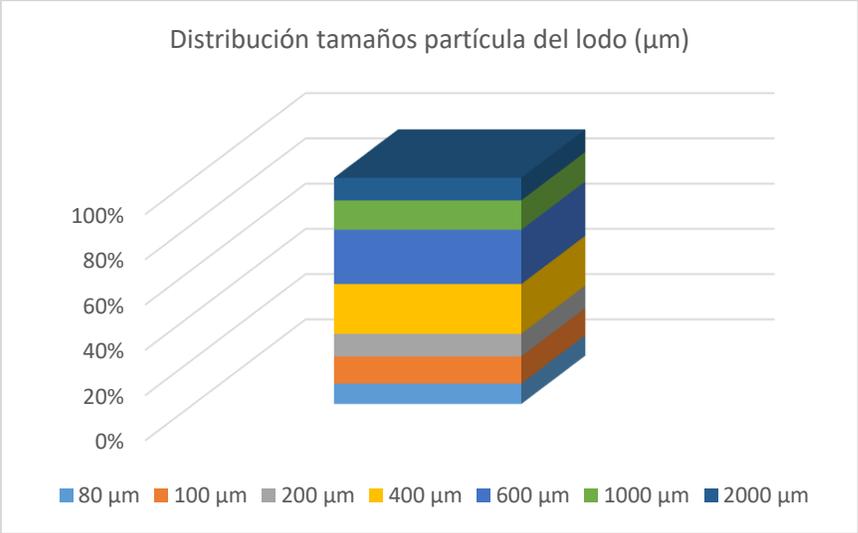
Z_{α}	1,645			
Z_{β}	1,282			
	Serie 1	Serie 2	Serie 3	Serie 4
S	3,304	3,668	1,781	6,862
d		5		
	Serie 1	Serie 2	Serie 3	Serie 4
$(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2$	8,567	8,567	8,567	8,567
S2	10,916	13,454	3,172	47,087
$2 * (Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 * S2$	187,049	230,534	54,350	806,820
n	7,482	9,221	2,174	32,273

Anexo 3. Perfiles isotópicos utilizados para análisis de asimilación orgánica en los ensayos realizados en el sistema de remediación II.

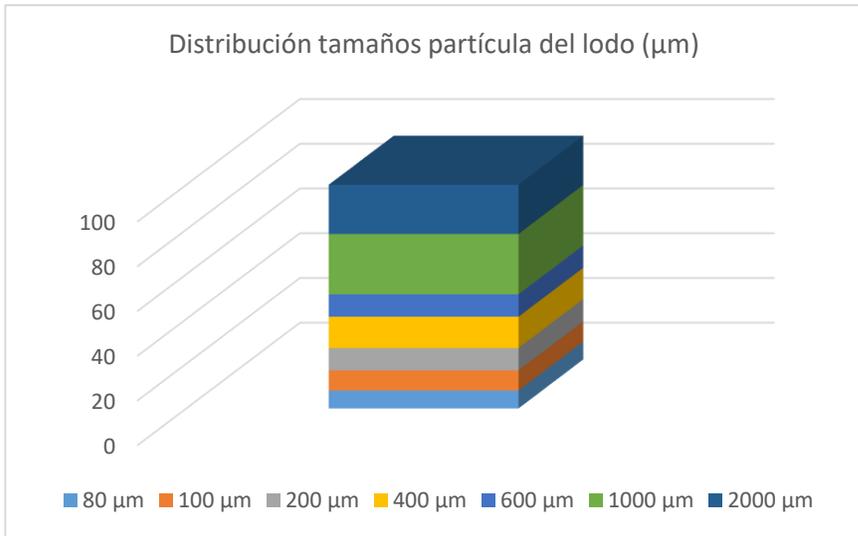
	$\delta^{13}C$	SD	$\delta^{15}N$	SD	$\delta^{15}N$	$\delta^{13}C$
Lodo <i>S. lalandi</i>	-19,614		5,987		6,524	-19,437
	-19,261		7,061			
<i>A. pusilla</i> inicial	-13,988		14,913		14,539	-12,985
	-12,772		14,593			
	-12,324		14,464			
	-12,855		14,185			
	-14,135		13,849		13,584	-12,999
	-12,708		13,237			
	-12,450		13,487			
	-12,702		13,761			
<i>A. pusilla</i> final	-14,565		16,834		14,468	-14,165
	-12,842		14,339			
	-14,185		13,761			
	-14,547		14,704			
	-14,164		13,391			
	-14,686		13,782			
Balsas jaula	-25,560	0,41	2,840	1,39		
Mayr et al., 2011						
<i>Nereidae</i>	-16,4		11,2			-16,5421053
<i>Nereis callaona</i>	-21,5					
<i>Nereis callaona</i>	-16,3	0,10	12,6	0,50		
<i>Nicolea chilensis</i>	-15,8		11,7			
Andrade et al., 2016						
<i>Perinereis vallata</i>	-18,5	1,70	10,9	0,70		
Zapata-Hernández et al., 2016						
<i>Eunicidae sp</i>	-16,1	0,80	14,2	1,20		
<i>Lumbrineridae sp</i>	-13,4		18,7			
<i>Lumbrineridae sp</i>	-15,2		17,6			
<i>Maldanidae sp1</i>	-16,3		15,5			
<i>Maldanidae sp2</i>	-15,4		14,2			
<i>Maldanidae sp3</i>	-15,5		14,5			
<i>Onuphidae</i>	-17,7		12,2			
<i>Orbiniidae sp</i>	-18	4,40	13,4	1,90		
<i>Orbiniidae sp</i>	-16	0,40	13,6	0,80		
<i>Pisionidae sp</i>	-16,8		14,1			
<i>Polynoidae sp</i>	-16,5	0,40	11,6	1,20		
<i>Serpulidae sp</i>	-16,6		14,2			
<i>Syllidae sp</i>	-16,2	0,80	12,2	5,40		
<i>Onuphidae sp</i>	-16,1	0,20	14,2	1,20		
Leduc et al., 2006						
<i>Abarenicola affinis</i>	-14,3		12,8			
<i>Abarenicola affinis</i>	-14,8		12,3			

Anexo 4. Distribución de los tamaños de partícula presentes en el lodo acuícola. Lodo utilizado en los ensayos del sistema de remediación I (Figura A). Lodo utilizado en los ensayos del sistema II (Figura B).

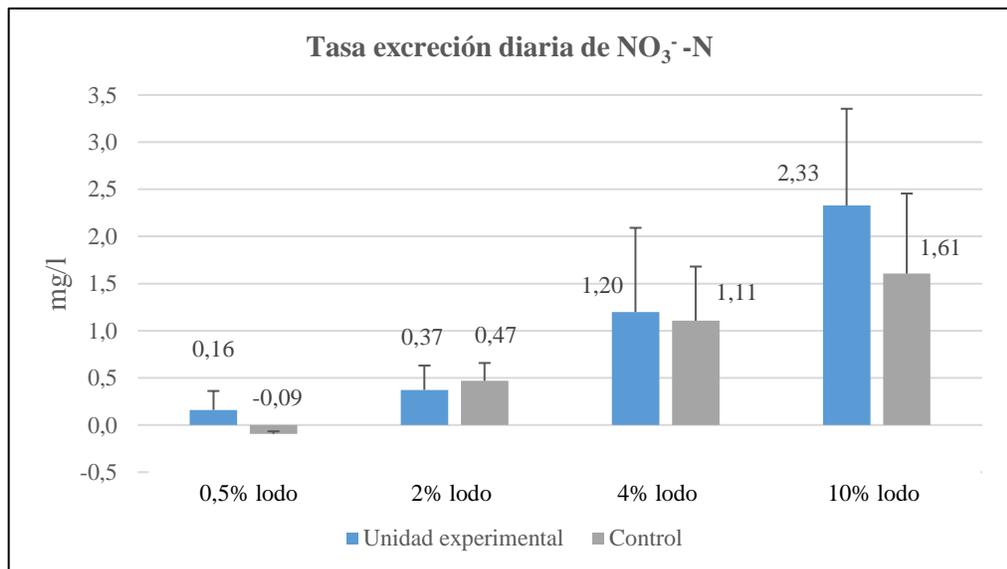
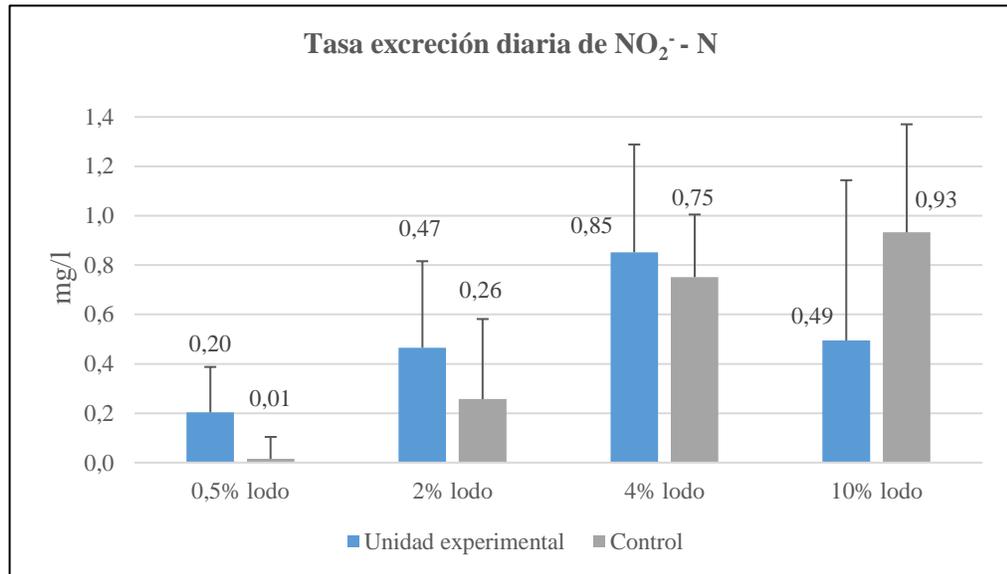
A

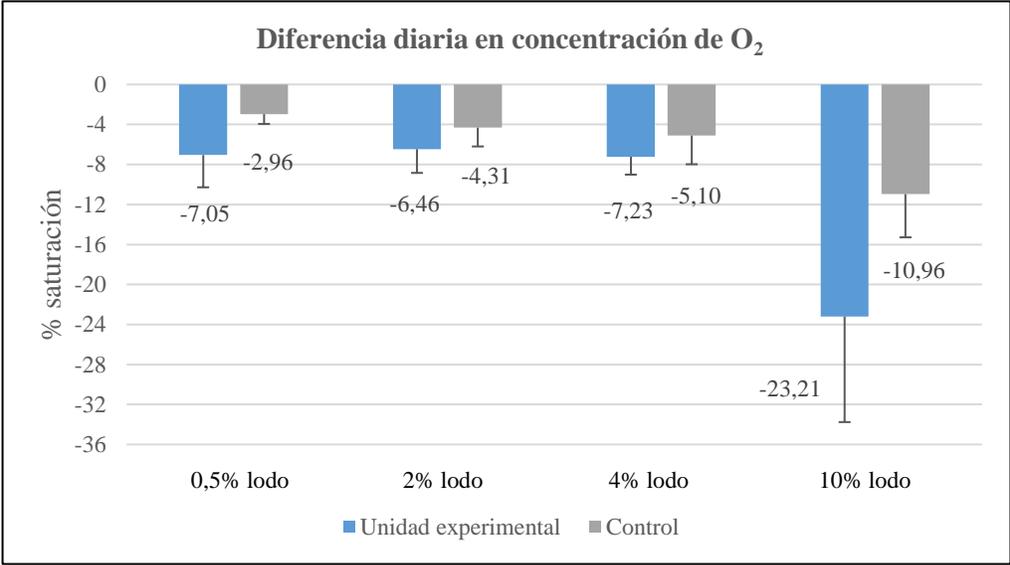


B



Anexo 5. Concentración de nitrito, nitrato y oxígeno en el agua superficial de las unidades en el sistema de remediación I. Los datos se muestran como diferencia diaria y están expresados en mg/l y porcentaje de saturación (Media \pm SD, 28 días).





Anexo 6. Parámetros de crecimiento y supervivencia de *A. pusilla* en los ensayos realizados en el sistema de remediación II. (Media \pm SD). n = 48 (ensayo 1), n = 96 (ensayo 2). 45 días. Las concentraciones de lodo añadido son: C1 = 500,11 g; C2 = 2.002,76 g; C3 = 4.003,16 g; 10.014,50 g por serie experimental.

	Ensayo 1			
Lodo añadido (g)	C1	C2	C3	C4
Tasa absoluta de crecimiento (g/m ² día)	7,14 \pm 0,42†	7,41 \pm 0,18†	8,48 \pm 0,74†	7,00 \pm 1,09†
SGR (μ) (día ⁻¹)	3,02 \pm 0,23†	3,00 \pm 0,26†	3,06 \pm 0,22†	2,58 \pm 0,51†
Supervivencia (%)	91,67 \pm 14,43†	91,67 \pm 14,43†	83,34 \pm 14,43†	66,67 \pm 14,43†
Relación P/B (año ⁻¹)	70,86 \pm 10,06†	69,91 \pm 11,52†	72,60 \pm 9,39†	67,49 \pm 29,88†
	Ensayo 2			
Densidad (organismos/m ²)	60	75	150	200
Tasa absoluta de crecimiento (g/m ² día)	6,39 \pm 1,10 ^a	6,89 \pm 0,46 ^a	8,57 \pm 0,06 ^b	8,72 \pm 0,42 ^b
SGR (μ) (día ⁻¹)	2,57 \pm 0,05 ^a	2,58 \pm 0,20 ^a	1,80 \pm 0,13 ^b	1,54 \pm 0,03 ^b
Supervivencia (%)	83,34 \pm 28,67†	80,00 \pm 20,00†	90,00 \pm 10,00†	76,92 \pm 7,69†
Relación P/B (año ⁻¹)	59,83 \pm 1,82 ^a	53,58 \pm 7,22 ^a	30,45 \pm 3,24 ^b	24,40 \pm 0,70 ^b

^a Diferencias significativas (p<0,05) con respecto a unidades con 150 y 200 organismos/m².

^b Diferencias significativas (p<0,05) con respecto a unidades con 60 y 75 organismos/m².

† Grupos no diferentes significativamente (p<0,05).

Anexo 7. Concentración de componentes nitrogenados y otros parámetros fisicoquímicos analizados en el agua superficial de las unidades experimentales del sistema de remediación II. Las series se corresponden con las concentraciones de lodo añadido: C1 = 500,11 g; C2 = 2.002,76 g; C3 = 4.003,16 g; C4 = 10.014,50 g. Los parámetros del agua inicial ingresada al sistema fueron: NAT = $0,16 \pm 0,03$ mg/l; $\text{NO}_2^- - \text{N} = 0,10 \pm 0,01$ mg/l; $\text{NO}_3^- - \text{N} = 0,40 \pm 0,03$ mg/l; pH = $7,80 \pm 0,01$; Temperatura = $18,2 \pm 0,09$ °C.

