

1UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
2INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
3PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

4

5

6

7

8

9

10

11

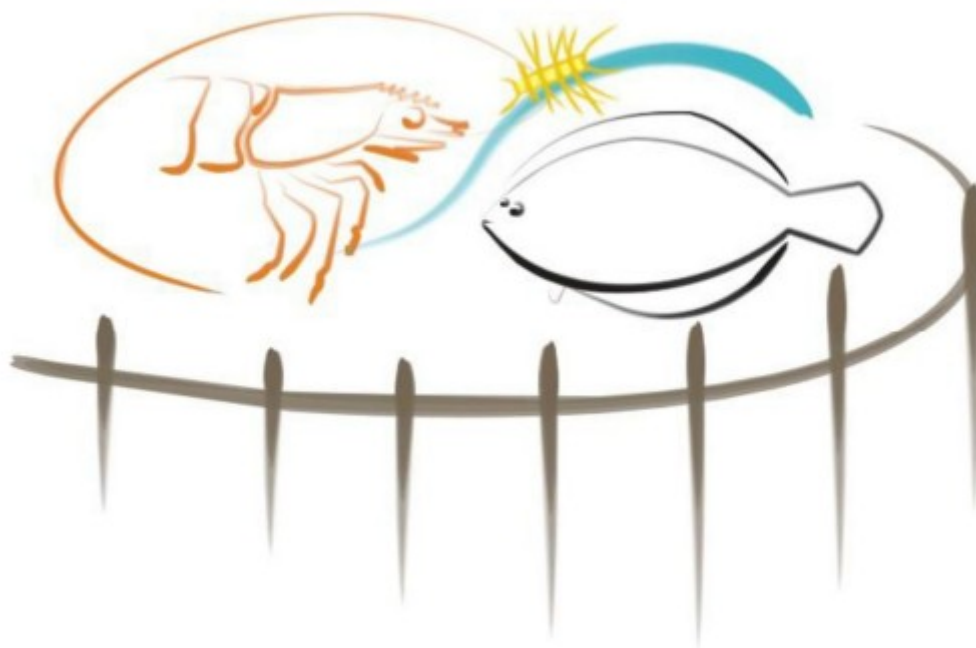
12

13

14

15

16



17EFEITO DA FERTILIZAÇÃO ORGÂNICA E INORGÂNICA NO
18ESTABELECIMENTO DE BACTÉRIAS NITRIFICANTES EM UM CULTIVO
19INTEGRADO DE *Penaeus vannamei* E *Oreochromis niloticus* E SUA INTERAÇÃO
20COM A COMUNIDADE MICROBIANA

21

22

23

24

25RAYSA PÂMELA OLIVEIRA SENA

26

27

28

29

30RIO GRANDE, RS

312024

1

2

32UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG

33INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA

34PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

35

36

37

38EFEITO DA FERTILIZAÇÃO ORGÂNICA E INORGÂNICA NO

39ESTABELECIMENTO DE BACTÉRIAS NITRIFICANTES EM UM CULTIVO

40INTEGRADO DE *Penaeus vannamei* E *Oreochromis niloticus* E SUA INTERAÇÃO

41COM A COMUNIDADE MICROBIANA

42

43

44RAYSA PÂMELA OLIVEIRA SENA

45

46

47ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIS HENRIQUE DA SILVA POERSCH

48COORIENTADOR: Prof. Dr. DARIANO KRUMMENAUER

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61RIO GRANDE, RS

622024

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Aquicultura pelo Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande.

ATA 07/2024
DE DEFESA DA 236ª DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AQUICULTURA

No dia vinte e nove de fevereiro de dois mil e vinte e quatro, às quatorze horas, reuniu-se a Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado em Aquicultura, da **RAYSA PAMELA OLIVEIRA SENA**, orientada pelo **PROF. DR. LUIS HENRIQUE DA SILVA POERSCH** composta pelos seguintes membros: **PROF. DR. DARIANO KRUMMENAUER** (Coorientador – IO/FURG), o **PROF. DR. MARCELO HIDEO OKAMOTO** (IO/FURG) e a **PROF. DR. DELANO DIAS SCHLEDER** (IFC). Título da dissertação: “EFEITO DA FERTILIZAÇÃO ORGÂNICA E INORGÂNICA NO ESTABELECIMENTO DE BACTÉRIAS NITRIFICANTES EM UM CULTIVO INTEGRADO DE *Penaeus vannamei* E *Oreochromis niloticus* E SUA INTERAÇÃO COM A COMUNIDADE MICROBIANA”. Dando início à defesa, o Coordenador Adjunto do PPGAq, Prof. Dr. Luciano de Oliveira Garcia, passou a presidência da sessão ao Prof. Dr. Luis Henrique da Silva Poersch, que na qualidade de orientador, passou a palavra para a candidata apresentar a Dissertação. Após ampla discussão entre os membros da Banca e a candidata, a Banca se reuniu sob a presidência do Coordenador. Durante esse encontro ficou estabelecido que as sugestões dos membros da Banca Examinadora devem ser incorporadas na versão final da dissertação, ficando a cargo do Orientador o cumprimento desta decisão. A candidata **RAYSA PAMELA OLIVEIRA SENA** foi considerada **APROVADA**, devendo a versão definitiva da Dissertação ser entregue a Secretaria do PPGAq, no prazo estabelecido nas Normas Complementares do Programa. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, será assinada pela Banca Examinadora, pela candidata e pelo Coordenador Adjunto do PPGAq

Documento assinado digitalmente
gov.br LUIS HENRIQUE DA SILVA POERSCH
Data: 28/03/2024 17:07:23-0300
Verifique em <https://validar.j5.gov.br>

- **PROF. DR. LUIS HENRIQUE DA SILVA POERSCH (Orientador IO/ FURG)**

Documento assinado digitalmente
gov.br DARIANO KRUMMENAUER
Data: 14/03/2024 08:56:03-0300
Verifique em <https://validar.j5.gov.br>

- **PROF. DR. DARIANO KRUMMENAUER (Coorientador– IO/FURG)**

- **PROF. DR. DELANO DIAS SCHLEDER (IFC)** **gov.br** DELANO DIAS SCHLEDER
Data: 14/03/2024 17:03:38-0300
Verifique em <https://validar.j5.gov.br>

- **PROF. DR. MARCELO HIDEO OKAMOTO (IO/FURG)** **gov.br** MARCELO HIDEO OKAMOTO
Data: 14/03/2024 18:25:38-0300
Verifique em <https://validar.j5.gov.br>

- **RAYSA PAMELA OLIVEIRA SENA** **gov.br** RAYSA PAMELA OLIVEIRA SENA
Data: 14/03/2024 17:38:56-0300
Verifique em <https://validar.j5.gov.br>

Documento assinado digitalmente
gov.br LUCIANO DE OLIVEIRA GARCIA
Data: 13/03/2024 15:53:33-0300
Verifique em <https://validar.j5.gov.br>

- **PROF. DR. LUCIANO DE OLIVERIA GARCIA(Coordenador Adjunto do PPGAq)**

63

64

65

66

67

68

69

5

6

70

71**ficha**

72

73

74

75

76

77

78

79

80

81

82

83

84

85

86

87

88

89

90

91

92

93

94

95

96

97

98

99

100

7

8

102	Índice	
103	Agradecimentos	6
104	Lista de tabelas	7
105	Lista de figuras	8
106	1. Introdução	11
107	2. Materiais e métodos	14
108	2.1. <i>Delineamento e condições experimentais</i>	14
109	2.2. <i>Fertilização</i>	15
110	2.3. <i>Manejo alimentar</i>	15
111	2.4. <i>Qualidade de água</i>	16
112	2.5. <i>Composição da comunidade planctônica e de bactérias nitrificantes</i>	16
113	2.6. <i>Análise dos dados</i>	17
114	3. Resultados	18
115	3.1. <i>Qualidade de água</i>	18
116	3.2. <i>Composição do fitoplâncton e zooplâncton</i>	19
117	3.3. <i>Composição da comunidade de bactérias nitrificantes</i>	22
118	3.4. <i>Correlação entre variáveis de qualidade de água e composição microbiana</i>	24
119	3.5. <i>Crescimento do camarão e da tilápia</i>	25
120	4. Discussão	25
121	5. Conclusão	29
122	Referências	30
123		
124		

125Agradecimentos

126 Primeiramente, agradeço à minha mãe, Maria Soledade, às minhas irmãs Paola,
127Pietra e Cecília, pela compreensão, ao serem privadas em muitos momentos da minha
128companhia e atenção. Obrigada, mãe, por desejar sempre o melhor para mim, pelo
129esforço que fez para que eu pudesse sonhar em conquistar o mundo.

130 Ao meu amigo Otávio Augusto Lacerda por toda orientação, correção e
131explicação. Não há palavras que expressem toda minha gratidão por ti. Obrigada
132também por ter sido um amigo incrível. Além de colega de laboratório, você fez minha
133estadia em Rio Grande ser muito mais feliz.

134 Ao meu amigo de alojamento/pós-graduação Pedro Anderson por ter sido meu
135suporte em dias difíceis, por todas as risadas, idas ao supermercado, perrengues (falta de
136luz, água) e por ser meu fiel escudeiro nessa jornada. Obrigada por não ter deixado eu
137desistir da academia.

138 À minha grande amiga, Bianca Ramiro, por todos os momentos felizes que
139passamos juntas. Acredito que as pessoas não se conhecem por acaso, e nós duas somos
140a prova disso. Tu és uma irmã para mim. Ninguém me conhece tão bem quanto você.
141Obrigada por ser minha confidente, alguém que me ouve sem julgamento, que acredita
142em mim e no meu futuro. Conte sempre comigo.

143 À Aline pela orientação, auxílio na bancada e artigos enviados, obrigada!

144 Aos meus colegas de trabalho do campus SVP/FURG, Marilda, Fernando
145Martinote, Fernando Comiran, Alice Lopes, Eliezer Monte e Siuza Guedes por toda
146compreensão e apoio ao me ver tentar conciliar o trabalho com a pós, além dos cafés e
147passeios descontraídos. Vocês são incríveis.

148 Ao meu orientador, Luis Poersch, pela oportunidade e orientação.

149 Ao meu coorientador, Dariano Krummenauer, pelo apoio e disponibilidade, pela
150compreensão e sensibilidade em diversas situações.

151 Agradeço às agências de fomento, CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de
152Pessoal de Nível Superior) e projeto ASTRAL, que financiaram a pesquisa e a bolsa de
153estudo.

154Lista de tabelas

Tabela 1. Sondas de oligonucleotídeos usadas para identificação da comunidade de bactérias nitrificantes durante um cultivo multitrófico de <i>Penaeus vannamei</i> e <i>Oreochromis niloticus</i> em meio a bioflocos predominantemente quimioautotrófico e heterotrófico	17
Tabela 2. Variáveis de qualidade de água durante um cultivo multitrófico de <i>Penaeus vannamei</i> e <i>Oreochromis niloticus</i> em meio a bioflocos predominantemente quimioautotrófico e heterotrófico	18
Tabela 3. Crescimento do camarão <i>Penaeus vannamei</i> e da tilápia <i>Oreochromis niloticus</i> ao final de um cultivo multitrófico em meio a bioflocos predominantemente quimioautotrófico e heterotrófico	25

155Lista de figuras

Figura 1. Esquema do sistema de cultivo multitrófico de <i>Penaeus vannamei</i> e <i>Oreochromis niloticus</i> em meio a bioflocos predominantemente quimioautotrófico e heterotrófico	15
Figura 2. Abundância relativa dos principais grupos componentes do zooplâncton (a)	

e bactérias nitrificantes (b) durante um cultivo multitrófico de *Penaeus vannamei* e *Oreochromis niloticus* em meio a bioflocos predominantemente quimioautotrófico e heterotrófico 20

Figura 3. Abundância (organismos mL⁻¹, média ± desvio padrão) de microalgas (a), flagelados (b) e ciliados (c) durante um cultivo multitrófico de *Penaeus vannamei* e *Oreochromis niloticus* em meio a bioflocos predominantemente quimioautotrófico e heterotrófico 21

Figura 4. Abundância (organismos mL⁻¹, média ± desvio padrão) total de bactérias (a), de bactérias oxidantes de amônia (AOB, b) e bactérias oxidantes de nitrito (NOB, c) durante um cultivo multitrófico de *Penaeus vannamei* e *Oreochromis niloticus* em meio a bioflocos predominantemente quimioautotrófico e heterotrófico 23

Figura 5. Matriz de correlação de Spearman entre as variáveis de qualidade de água a composição microbiana durante um cultivo multitrófico de *Penaeus vannamei* e *Oreochromis niloticus* em meio a bioflocos predominantemente quimioautotrófico e heterotrófico. Números dentro das caixas correspondem ao coeficiente de correlação..... 24

157Resumo

158O presente estudo avaliou o efeito da fertilização orgânica e inorgânica no
159estabelecimento de bactérias oxidantes de amônia (AOB) e de nitrito (NOB) em um
160cultivo integrado de *Penaeus vannamei* e *Oreochromis niloticus* e sua interação com a
161comunidade microbiana. Foi realizado um experimento com duração de 43 dias em uma
162estufa aquícola, utilizando um sistema de cultivo composto por seis tanques de 20 m³ e
163seis tanques de 4 m³ cada, nos quais foram estocados os camarões (400 camarões m⁻²) e
164juvenis de tilápia (45 peixes m⁻³). O experimento foi composto por dois tratamentos,
165com três repetições cada, e dispostos em um delineamento experimental inteiramente
166casualizado: tratamento Químioautotrófico e tratamento Heterotrófico. A identificação e
167quantificação da comunidade do fitoplâncton e zooplâncton foi realizada por meio de
168contagem direta dos microrganismos em câmara de sedimentação ao início e ao final do
169período experimental. A quantificação da comunidade de bactérias nitrificantes foi
170realizada por meio da técnica de hibridização *in situ* fluorescente ao início e ao final do
171experimento. Ao final do ensaio, o peso e a sobrevivência dos camarões e tilápias foram
172avaliados. Ao final do período experimental, em ambos os tratamentos, o sistema foi
173dominado por protozoários flagelados. A abundância de microalgas e ciliados foi maior
174no tratamento químioautotrófico. A abundância relativa das AOB e NOB em relação a
175abundância total foi menor que 0,1%. Não foram observadas diferenças significativas na
176abundância de AOB e NOB entre os tratamentos. Ao final do período experimental, o
177peso do camarão foi maior no tratamento químioautotrófico. O peso das tilápias esteve
178entre 171,60 e 180,80g nos tratamentos químioautotrófico e heterotrófico,
179respectivamente. O uso de sistemas de bioflocos predominantemente químioautotrófico
180e heterotróficos não altera significativamente o estabelecimento da comunidade de AOB
181e NOB em cultivos multitrófico integrado de *Penaeus vannamei* e *Oreochromis*
182*niloticus*. As duas estratégias de fertilização são igualmente eficientes para o
183desenvolvimento da alça microbiana e para o processo de nitrificação nesses tipos de
184sistema de cultivo.

185

186**Palavras-chave:** IMTA; Fitoplâncton; Zooplâncton; Bactérias químioautotróficas.

187

188Abstract

189The aim of this study was to evaluate the effect of organic and inorganic fertilization on
190the establishment of ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and nitrite-oxidizing bacteria
191(NOB) in a *Penaeus vannamei* and *Oreochromis niloticus* integrated culture and their
192interaction with the microbial community. The study was carried out for 43 days in a
193greenhouse, using a system consisting of a six 20 m³ tank and a six 4 m³ tank, in which
194shrimp (400 shrimp m⁻²) and juvenile tilapia (45 fish m⁻³) were stocked. The experiment
195consisted of two treatments, with three repetitions each, and arranged in a completely
196randomized experimental design: Chemoautotrophic treatment and Heterotrophic
197treatment. The identification and quantification of the phytoplankton and zooplankton
198community were carried out through direct counting of microorganisms in a
199sedimentation chamber at the beginning and end of the experiment. The quantification
200of the nitrifying bacteria community was carried out using the fluorescence in situ
201hybridization at the beginning and end of the trial. At the end of the experimental time,
202the final weight and survival of shrimp and tilapia were evaluated. At the end of the
203trial, in both treatments, the system was dominated by flagellated protozoa. The
204abundance of microalgae and ciliates was higher in the chemoautotrophic treatment.
205The relative abundance of AOB and NOB in relation to the total abundance was less
206than 0.1%. No significant differences were observed in the abundance of AOB and
207NOB between treatments. At the end of the experimental time, the shrimp final weight
208was higher in the chemoautotrophic treatment. The tilapia weight was between 171.60
209and 180.80g in the chemoautotrophic and heterotrophic treatments, respectively. The
210use of biofloc systems predominantly chemoautotrophic and heterotrophic does not
211significantly alter the establishment of the AOB and NOB community in a *Penaeus*
212*vannamei* and *Oreochromis niloticus* multitrophic culture. The two fertilization
213strategies are equally efficient for the microbial loop development and for the
214nitrification process in this system.

215

216**Keywords:** IMTA; Phytoplankton; Zooplankton; Chemoautotrophic bacteria.

2171. Introdução

218 A aquicultura é um setor de produção de pescados de alto valor nutricional,
219rendimento e uma fonte de subsistência significativa para centenas de milhões de
220pessoas ao redor do mundo, tornando-se o principal meio de obtenção de organismos
221marinhos e continentais (Emerenciano *et al.*, 2017; Tacon, 2019). O setor tem uma
222grande importância na economia, contribuindo para a geração de empregos e renda. No
223ano de 2018, a atividade foi responsável por uma produção equivalente a 87,5 milhões
224de toneladas de pescado (FAO, 2022).

225 Essa atividade pode ser realizada em diferentes tipos de produção, como o
226extensivo, semi-intensivo e intensivo (Oliveira *et al.*, 2006). A criação de organismos
227aquáticos em sistemas abertos convencionais usa alimento natural e dietas comerciais
228(Oliveira *et al.*, 2006). Nesse tipo de sistema, a manutenção da qualidade é alcançada
229por meio de constantes renovações de água (Burford *et al.*, 2003). Entretanto, estas
230constantes renovações geram uma grande quantidade de efluentes, que se lançados nos
231ambientes naturais podem provocar impactos ambientais, deteriorar a qualidade da água
232e levar à perda de espécies funcionais, além de elevar o custo de produção (Western,
2332001; Burford *et al.*, 2003; Wasielesky *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2008).

234 Assim, para que a aquicultura possa manter o seu crescimento, é necessário procurar
235estratégias inovadoras que possam reduzir o impacto sobre o meio ambiente e
236maximizar a sua eficiência e produção em larga escala (Suneetha e Padmavathi, 2019).
237Dessa forma, faz-se necessário que os sistemas de produção conciliem a
238sustentabilidade ecológica, econômica e social (Crab *et al.*, 2012). Para tal, é
239fundamental adotar estratégias que permitam não só a reutilização da água, mas também
240a de nutrientes, de modo que os impactos ecológicos e sociais sejam minimizados,
241promovendo uma maior segurança ambiental (Suneetha e Padmavathi, 2019).

242 Estratégias de cultivo com mínima ou nenhuma renovação de água, com base na
243produtividade natural, estão sendo desenvolvidas com excelentes resultados de
244crescimento e principalmente na redução de descarga dos efluentes e redução do uso de
245água (Panigrahi *et al.*, 2018; Costa e Streit Junior, 2019). Como um exemplo, o sistema
246de bioflocos (BFT), que é uma técnica baseada no estímulo e estabelecimento de uma
247comunidade microbiana específica buscando proporcionar uma maior reciclagem de
248nutrientes, principalmente nitrogênio dissolvido, e manter uma boa qualidade da água
249(Avnimelech e Kochba, 2009; Avnimelech, 2012). O uso desse sistema proporciona o

250crescimento de agregados microbianos compostos por bactérias heterotróficas,
251microalgas, ciliados, flagelados, protozoários, bactérias nitrificantes, exoesqueletos,
252fezes e matéria orgânica (De Schryver *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2020). Esses
253microrganismos, além de contribuírem para a manutenção da qualidade da água do
254sistema, controlando a concentração de amônia e nitrito, servem como fonte
255suplementar de alimento para os animais cultivados, melhorando a taxa de crescimento,
256a conversão alimentar e o ganho de peso (Wasielesky *et al.*, 2006; Panigrahi *et al.*,
2572014). Ainda, o uso desse sistema permite a redução de mais de 90% das trocas de água,
258sem comprometer a qualidade da água (Wasielesky *et al.*, 2006; Manan *et al.*, 2017) e
259ainda proporciona, através da intensificação do cultivo, reduzir o uso de área
260(Krummenauer *et al.*, 2011).

261 No sistema BFT, os principais grupos de bactérias que compõem a comunidade dos
262bioflocos são, em termos gerais, as bactérias heterotróficas e as quimioautotróficas, que
263controlam os compostos nitrogenados tóxicos da água (Samocha *et al.*, 2017; Souza *et*
264*al.*, 2019). As bactérias heterotróficas crescem rapidamente, degradando a amônia e a
265matéria orgânica, transformando-as em biomassa através de um processo no qual
266exigem uma fonte de carbono orgânico, nitrogênio e oxigênio (Serra *et al.*, 2015).
267Quando o sistema apresenta predominância de bactérias heterotróficas, o acúmulo de
268sólidos suspensos totais (SST) pode ser elevado devido ao rápido crescimento deste
269grupo, aumentando consequentemente a demanda do sistema por oxigênio (Fleckenstein
270*et al.*, 2020). As bactérias quimioautotróficas possuem papel fundamental no processo
271de nitrificação no sistema BFT, pois um grupo específico dessas bactérias (bactérias
272oxidantes de amônia – AOB) atua oxidando a amônia em nitrito e que, posteriormente, é
273utilizado pelas bactérias oxidantes de nitrito (NOB) formando o nitrato que é
274considerado o composto menos tóxico para o camarão marinho (Avnimelech e Kochba,
2752009; Otsoshi e Moss, 2011; Avnimelech, 2015).

276 Apesar do BFT ser um sistema com inúmeras vantagens, este necessita de alguns
277cuidados específicos, principalmente em relação a concentração de SST (Fleckenstein *et*
278*al.*, 2020). A biomassa bacteriana quando não aproveitada no sistema acaba gerando a
279formação de um efluente com elevada carga de matéria orgânica, rica em nitrogênio e
280fósforo, que não sendo descartado de maneira adequada pode ser um problema
281ambiental (Ray *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2013). Há relatos de efeitos negativos sobre a
282saúde e o desempenho dos organismos cultivados quando o sistema apresenta altas
283concentrações de sólidos, como o aumento da demanda biológica de oxigênio e oclusão

284de brânquias, podendo comprometer índices de crescimento e sobrevivência (Gaona *et*
285*al.*, 2011; Schweitzer *et al.*, 2013; Furtado, 2015; Lara *et al.*, 2016). O excesso de SST
286pode ser reduzido com o uso de um sistema predominantemente quimioautotrófico, uma
287vez que essas bactérias têm uma taxa máxima de crescimento significativamente menor
288do que as heterotróficas. Em cultivos com BFT predominantemente heterotrófico, o uso
289de altas relações carbono:nitrogênio (C:N) faz com que ocorra um aumento na produção
290de bactérias heterotróficas, exigindo a remoção do excesso dessas bactérias. Uma
291desvantagem do uso desse sistema é que o alto crescimento de bactérias heterotróficas
292inibe o desenvolvimento das bactérias nitrificantes, podendo causar problemas no
293processo de nitrificação do sistema (Ebeling *et al.*, 2006). Uma alternativa que pode ser
294utilizada para reduzir o excedente de SST no sistema de cultivo é a integração com
295outras espécies de interesse na aquicultura que podem atuar controlando a concentração
296dos sólidos, contribuindo para melhorar as condições de cultivo (Chopin *et al.*, 2012;
297Troell *et al.*, 2009).

298 Nos sistemas multitrófico integrados (*Integrated Multitrophic Aquaculture* – IMTA),
299a utilização de organismos de diferentes níveis tróficos em um mesmo sistema de
300produção, recria as interações que acontecem no meio natural (Bakke, 2017). O objetivo
301do IMTA é diversificar a produção através da utilização de espécies de diferentes níveis
302tróficos, podendo, para além de peixes, incluir bivalves, equinodermes, crustáceos e
303algas, maximizando a utilização dos nutrientes, enquanto limita a utilização de água e o
304risco de impacto ecológico da produção (Barrington *et al.*, 2009; Poli *et al.*, 2019). Os
305nutrientes não utilizados pelos animais da cadeia trófica mais elevada passam a
306constituir um recurso que permite a produção de organismos de níveis tróficos
307inferiores. Assim, não só aumenta o valor econômico da produção, já que com a mesma
308quantidade de alimento é possível produzir mais espécies de valor econômico, como
309também melhora a qualidade da água e diminui a concentração de nutrientes do efluente
310(Neori *et al.*, 2004; Suneetha *et al.*, 2018; Mansour *et al.*, 2022).

311 Tanto os sistemas IMTA como BFT proporcionam vantagens, como: otimização da
312utilização dos recursos naturais, redução do uso de terra e água, permite o aumento da
313produtividade do cultivo devido ao uso de elevadas densidades de estocagem, reduz os
314impactos ambientais, diversifica a produção, proporciona vantagens financeiras para os
315produtores e pode melhorar a visão social da aquicultura (Avnimelech, 2012; Liu *et al.*,
3162014; La Macchia Pedra *et al.*, 2017; Mendoza-López *et al.*, 2017; Poli *et al.*, 2018;
317Campos *et al.*, 2019; Mansour *et al.*, 2022).

318 Levando em consideração a importância dos microrganismos para o cultivo e a falta
319de informações acerca da composição microbiana de sistemas IMTA, faz-se necessário
320entender os efeitos do uso de um sistema BFT predominantemente quimioautotrófico e
321heterotrófico sobre a estrutura da comunidade planctônica e de bactérias nitrificantes,
322buscando elucidar a função e atividade dessas comunidades e melhorar o manejo desse
323sistema. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da fertilização
324orgânica e inorgânica no estabelecimento de bactérias oxidantes de amônia (AOB) e de
325nitrito (NOB) em um cultivo integrado de *Penaeus vannamei* e *Oreochromis niloticus* e
326sua interação com a comunidade microbiana.

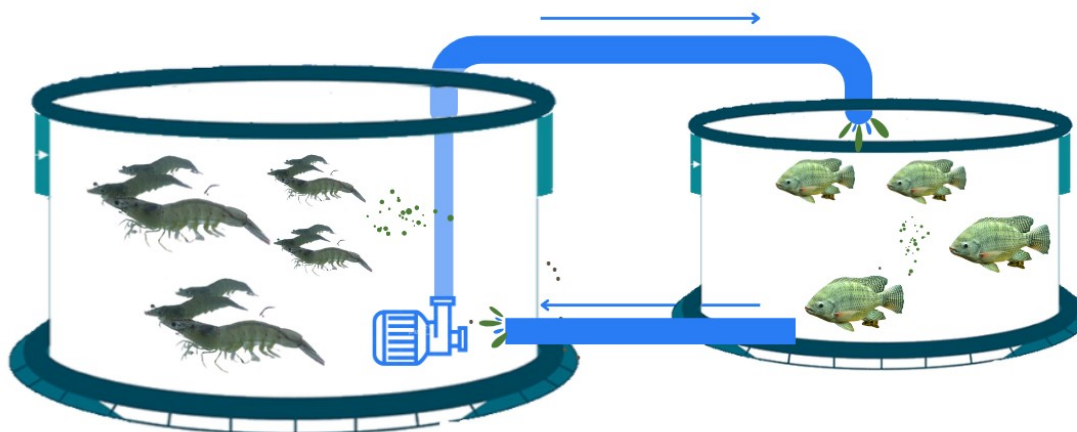
3272. Materiais e métodos

328 O estudo foi realizado por 43 dias na Estação Marinha de Aquicultura, Universidade
329Federal do Rio Grande -FURG, Brasil. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e
330Comitê de Bem-Estar Animal da FURG (Processo nº: 23116.005895/2016-42).

3312.1. Delineamento e condições experimentais

332 O experimento foi realizado em estufa aquícola. Cada sistema de cultivo era
333composto por um tanque de 20 m³ e um de 4 m³, nos quais foram estocados os camarões
334*Penaeus vannamei* (400 camarões m⁻²) e os juvenis de tilápia *Oreochromis niloticus* (45
335peixes m⁻³), respectivamente. As pós-larvas de camarão foram adquiridas de larvicultura
336comercial. Os camarões foram inicialmente mantidos em um berçário e foram estocados
337quando atingiram um peso médio de 1g. Os alevinos de tilápia (25g) foram adquiridos
338de uma piscicultura comercial e mantidos em uma estufa em dois tanques de 4 m³ de
339volume útil com água clara e aeração constante. Previamente ao início do experimento,
340durante 10 dias, os alevinos foram aclimatados para a salinidade de 20 g L⁻¹. Para isso,
34110% da água doce era substituída por água do mar a cada dois dias.

342 Em cada sistema, os tanques foram interligados para a recirculação de água através
343de uma bomba submersa com vazão de 2000 L h⁻¹ (Sarlo Better®, SB 2700C) instalada
344no tanque dos camarões para o tanque das tilápias que, por gravidade, retornava para o
345tanque dos camarões (Figura 1). O experimento teve dois tratamentos, todos com três
346repetições e em um delineamento inteiramente casualizado: tratamento
347Quimioautotrófico e tratamento Heterotrófico.



348

349**Figura 1.** Esquema do sistema de cultivo multitrófico de *Penaeus vannamei* e
 350*Oreochromis niloticus* em meio a bioflocos predominantemente quimioautotrófico e
 351heterotrófico (Fonte: o autor).

3522.2. Fertilização

353 Para o desenvolvimento do sistema quimioautotrófico, 45 dias prévios a estocagem
 354dos animais, os três tanques de 20 m³ foram fertilizados, uma vez ao dia, com 1 mg L⁻¹
 355de cloreto de amônio (NH₄Cl) e 1 mg L⁻¹ nitrito de sódio (NaNO₂) para estimular o
 356crescimento das bactérias nitrificantes (Ferreira *et al.*, 2021).

357 No tratamento heterotrófico, o cultivo foi iniciado com água clara e, após a
 358estocagem dos animais, a concentração de nitrogênio amoniacal total (NAT) foi
 359monitorada diariamente até que atingisse 1 mg L⁻¹. A partir deste momento, melaço de
 360cana de açúcar foi utilizado como fonte de carbono orgânico, mantendo uma a relação
 361carbono:nitrogênio de 15:1 (Avnimelech, 1999; Ebeling *et al.*, 2006). Esta fertilização
 362foi realizada até a estabilização da concentração do NAT.

3632.3. Manejo alimentar

364 Durante o período experimental, os animais foram alimentados duas vezes ao dia
 365(8:00 e 16:00 horas), com ração comercial Guabi, com 36% de proteína bruta, para as
 366tilápias e ração Guabi com 40% de proteína bruta para os camarões. A quantidade de
 367ração ofertada foi determinada de acordo com Jory *et al.* (2001). As tilápias foram
 368subalimentadas com 1% da biomassa do tanque para estimular o consumo de bioflocos.

3692.4. *Qualidade de água*

370 Temperatura (°C), oxigênio dissolvido (OD, mg L⁻¹; oxímetro YSI modelo Pro-20),
371pH (pHmetro Mettler Toledo, FEP20) nitrogênio amoniacal total (NAT, mg L⁻¹)
372(UNESCO, 1983) e nitrogênio do nitrito (N-NO₂⁻, mg L⁻¹) (Aminot e Chaussepied,
3731983) foram monitorados diariamente. Nitrogênio do nitrato (N-NO₃⁻, mg L⁻¹) (García-
374Robledo *et al.*, 2014), ortofosfato (PO₄³⁻, mg L⁻¹) (Aminot e Chaussepied, 1983),
375alcalinidade (mg L⁻¹) (APHA, 2012), salinidade (g L⁻¹) (Multiparametro Hanna, modelo
376HI98194), sólidos suspensos totais (TSS, mg L⁻¹) (Strickland e Parsons, 1972) e sólidos
377sedimentáveis (SS, mL L⁻¹) (Eaton *et al.*, 1995) foram analisados semanalmente.

3782.5. *Composição da comunidade planctônica e de bactérias nitrificantes*

379 Amostras da água dos tanques de camarão e peixe foram coletadas ao início e ao
380final do ensaio, na superfície e no fundo (com o auxílio de garrafa de Niskin), para
381identificação e quantificação da comunidade microbiana do sistema.

382 O fitoplâncton e zooplâncton foi identificado e quantificado com câmara de
383sedimentação em um microscópio invertido (Nikon Eclipse TS100) em uma
384magnificação final de 200× (Utermöhl, 1958). A abundância dos microrganismos foi
385expressa em organismos mL⁻¹.

386 A quantificação da comunidade de bactérias nitrificantes foi realizada por meio da
387técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), seguindo a metodologia proposta
388por Cottrell e Kirchman (2003). Previamente, as amostras foram sonicadas (Qsonica
389sonicators, modelo Q55) com três pulsos de 30 segundos usando uma frequência de 10
390kHz. Foram adotados intervalos de 1 minuto entre os pulsos. Posteriormente, as
391amostras foram filtradas em filtro de 0,2 µm de retenção média e hibridizados com
392sondas oligonucleotídicas para identificar e quantificar bactérias oxidantes de amônia
393(AOB: *Nitrossomonas* e *Nitrosospira*) e nitrito (NOB: *Nitrobacter* e *Nitrospira*) (Tabela
3941). Todas as sondas foram marcadas com fluorocromo Cy3. Um controle negativo
395(NON) feito com uma sonda sem qualquer especificidade para bactérias foi utilizado
396para avaliar a eficiência da hibridização. A abundância total de bactérias foi determinada
397a partir da contagem das bactérias coradas com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole).
398Abundância bacteriana foi obtida a partir da contagem direta usando um microscópio de

399epifluorescência (AxioPlan Zeiss) em uma magnificação final de 1000×. A abundância
400das bactérias foi expressa em organismos mL⁻¹.

401**Tabela 1:** Sondas oligonucleotídicas usadas para identificação da comunidade de
402bactérias nitrificantes durante um cultivo multitrófico de *Penaeus vannamei* e
403*Oreochromis niloticus* em meio a bioflocos predominantemente quimioautotrófico e
404heterotrófico.

Sonda	Especificidade	Sequência 5' → 3'	%F	Referência
NON	Controle negativo	TAGTGACGCCGTCGA	30	Yokokawa e Nagata, 2005
NEU	<i>Nitrosomonas</i>	CCCCTCTGCTGCACTCTA	40	Wagner <i>et al.</i> , 1995
NIT3	<i>Nitrobacter</i>	CCTGTGCTCCATGCTCCG	40	Wagner <i>et al.</i> , 1996
NSR447	<i>Nitrospira</i>	GGTTTCCCGTTCCATCTT	30	Schramm <i>et al.</i> , 1998
Nsv443	<i>Nitrosospira</i>	CCGTGACCGTTTCGTTCC G	30	Mobarry <i>et al.</i> , 1996

405%F: percentual de formamida na solução de hibridização.

4062.6. Análise dos dados

407 Os dados de qualidade de água foram testados para a normalidade, com o teste de
408Shapiro-Wilk, e homoscedasticidade, com o teste de Levene. As diferenças entre os
409tratamentos foram avaliadas com uma análise de variância (ANOVA) de medidas
410repetidas. Quando necessário, os dados foram transformados para atender aos
411pressupostos de normalidade de homoscedasticidade. Para os dados não paramétricos, o
412teste de Friedman foi utilizado para comparar os tratamentos.

413 Os dados de abundância dos principais grupos do plâncton, abundância total de
414bactérias, abundância de AOB e NOB, peso final e sobrevivência dos camarões e
415tilápias foram testados para a normalidade, com o teste de Shapiro-Wilk, e
416homoscedasticidade, com o teste de Levene. As diferenças entre os tratamentos foram
417avaliadas com teste T. Os dados percentuais de sobrevivência foram arco seno
418transformados antes da análise (Zar, 2010). Quando necessário, os dados foram
419transformados para atender aos pressupostos aos pressupostos de normalidade e
420homoscedasticidade. Para os dados não paramétricos, o teste de Wilcoxon foi utilizado
421para comparar os grupos.

Uma correlação de Spearman foi calculada para verificar a existência de correlações entre as principais variáveis de qualidade de água e a composição da comunidade microbiana do sistema.

Os gráficos e os testes de Friedman, teste T, Wilcoxon e a correlação de Spearman foram realizados no software R (R Core Team, 2023), usando os pacotes car (Fox e Weisberg, 2019), stats (R Core Team, 2023), rstatix (Kassambara, 2023), corrplot (Wei e Simko, 2021), Hmisc (Harrell Jr, 2023) e ggplot2 (Wickham, 2016). A ANOVA de medidas repetidas foi realizada no software Past 4.03 2020 (Hammer *et al.*, 2001).

3. Resultados

3.1. Qualidade de água

Durante o período experimental, a temperatura média variou entre 28,87 e 29,00 °C entre os tratamentos. O oxigênio dissolvido foi mantido acima de 5 mg L⁻¹ e o pH médio esteve próximo a 7.8 (Tabela 2).

A concentração de NAT foi maior no tratamento heterotrófico, enquanto a concentração de N-NO₃⁻ foi maior no tratamento quimioautotrófico (Tabela 2).

437

Tabela 2. Variáveis de qualidade de água durante um cultivo multitrófico de *Penaeus vannamei* e *Oreochromis niloticus* em meio a bioflocos predominantemente quimioautotrófico e heterotrófico.

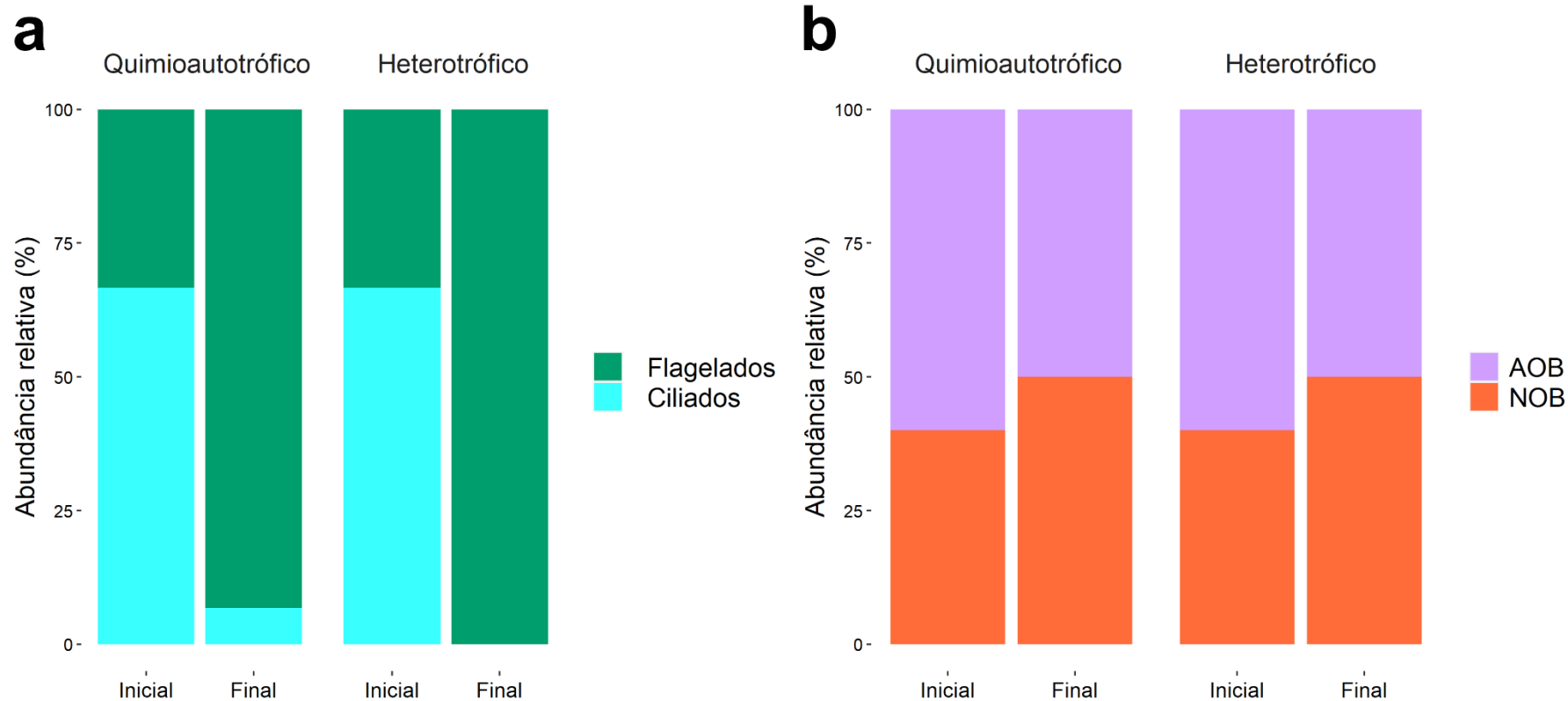
Variáveis	Tratamentos	
	Quimioautotrófico	Heterotrófico
Temperatura (°C)	28,87 ± 1,14	29,00 ± 1,33
OD (mg L ⁻¹)	5,77 ± 0,45	5,82 ± 0,49
pH	7,81 ± 0,12	7,83 ± 0,15
Salinidade (g L ⁻¹)	21,84 ± 2,61	25,39 ± 1,41
NAT (mg L ⁻¹)	0,92 ± 1,36 ^b	2,21 ± 2,63 ^a
N-NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	4,57 ± 4,38	9,35 ± 7,62
N-NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	33,17 ± 12,53 ^a	9,70 ± 7,00 ^b
PO ₄ ³⁻ (mg L ⁻¹)	1,22 ± 1,05	0,93 ± 0,64
Alcalinidade (mg L ⁻¹)	177,40 ± 24,24	160,20 ± 25,25
SST (mg L ⁻¹)	254,50 ± 80,91	238,30 ± 76,20
SS (ml L ⁻¹)	6,54 ± 3,66	5,30 ± 3,82

441 Os dados são média $\pm$ desvio padrão. OD: oxigênio dissolvido, NAT: nitrogênio
442 amoniacal total, N-NO₂⁻: nitrogênio do nitrito, N-NO₃⁻: nitrogênio do nitrato, PO₄³⁻:
443 ortofosfato, SST: sólidos suspensos totais, SS: sólidos sedimentáveis.

444 3.2. *Composição do fitoplâncton e zooplâncton*

445 Ao início do ensaio, o ambos os tratamentos foram dominados por protozoários
446 ciliados (Figura 2a). Na amostra final, os tratamentos quimioautotrófico e heterotrófico
447 foram dominados por flagelados (Figura 2a).

448 Ao final do período experimental, a abundância de microalgas e protozoários
449 ciliados foi maior no tratamento quimioautotrófico (Figura 3 a e c).



450

451 **Figura 2.** Abundância relativa dos principais grupos componentes do zooplâncton (a) e bactérias nitrificantes (b) durante um cultivo multitrófico
 452 de *Penaeus vannamei* e *Oreochromis niloticus* em meio a bioflocos predominantemente quimioautotrófico e heterotrófico. AOB: bactérias
 453 oxidantes de amônia; NOB: bactérias oxidantes de nitrito.

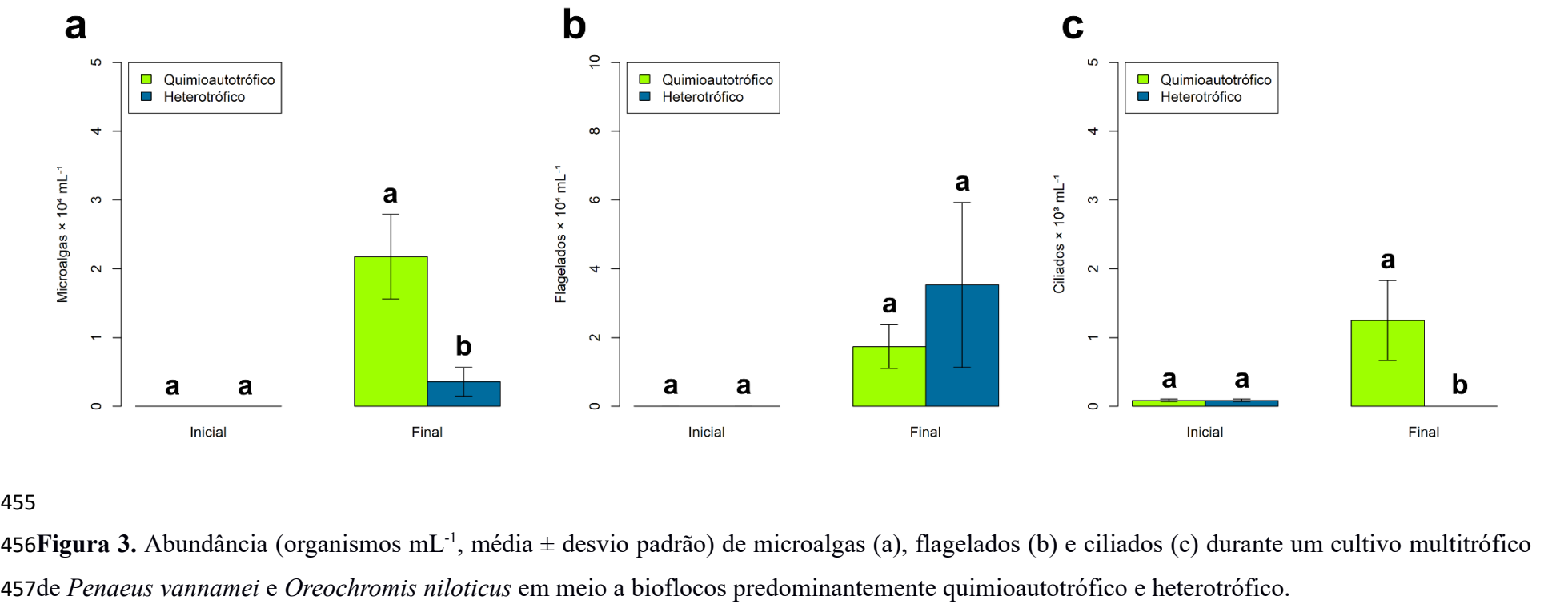
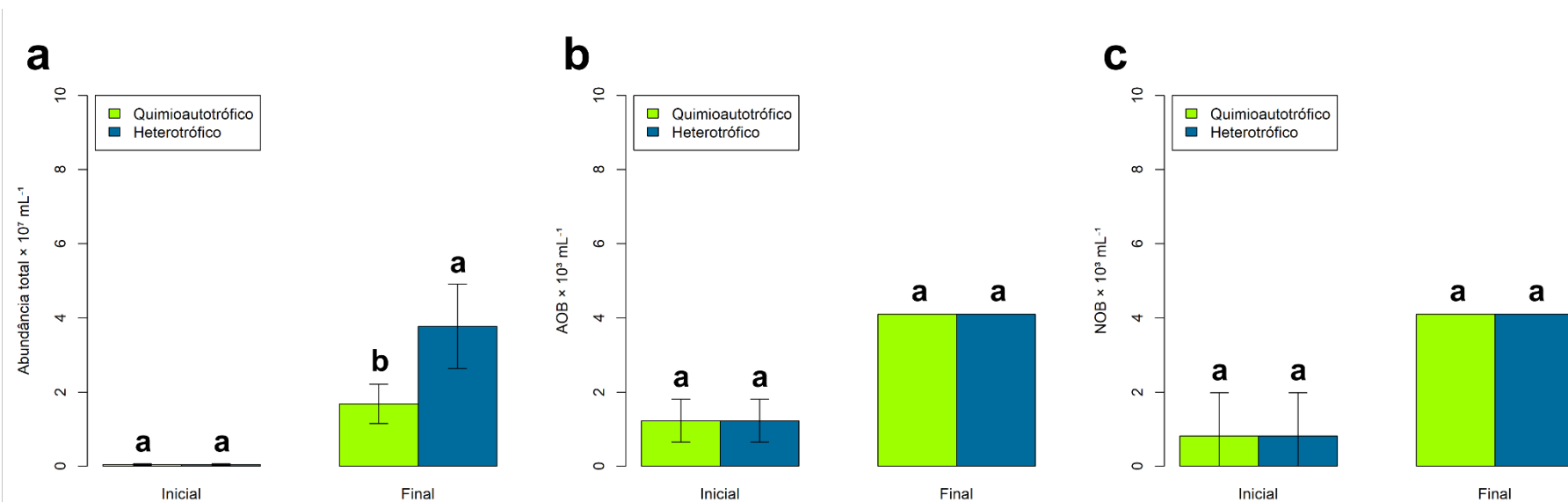


Figura 3. Abundância (organismos mL⁻¹, média ± desvio padrão) de microalgas (a), flagelados (b) e ciliados (c) durante um cultivo multitrófico de *Penaeus vannamei* e *Oreochromis niloticus* em meio a bioflocos predominantemente quimioautotrófico e heterotrófico.

4583.3. *Composição da comunidade de bactérias nitrificantes*

459 Ao início do período experimental, em ambos os tratamentos, o sistema foi
460dominado por bactérias AOB (Figura 2b). Ao final do experimento, a abundância
461relativa das AOB e NOB correspondeu a 50% em ambos os tratamentos (Figura 2b). A
462abundância relativa das bactérias AOB e NOB em relação a abundância total de
463bactérias foi de 0,43% ao início do ensaio. Ao final do período experimental, a
464abundância relativa dos dois grupos de bactérias em relação a abundância total foi
465menor que 0,1% nos tratamentos quimioautotrófico e heterotrófico.

466 Ao final do período experimental, a abundância total de bactéria foi maior no
467tratamento heterotrófico (Figura 4a). Não foram observadas diferenças significativas na
468abundância AOB e NOB entre os tratamentos ao início e ao final do ensaio (Figura 4b e
469c).

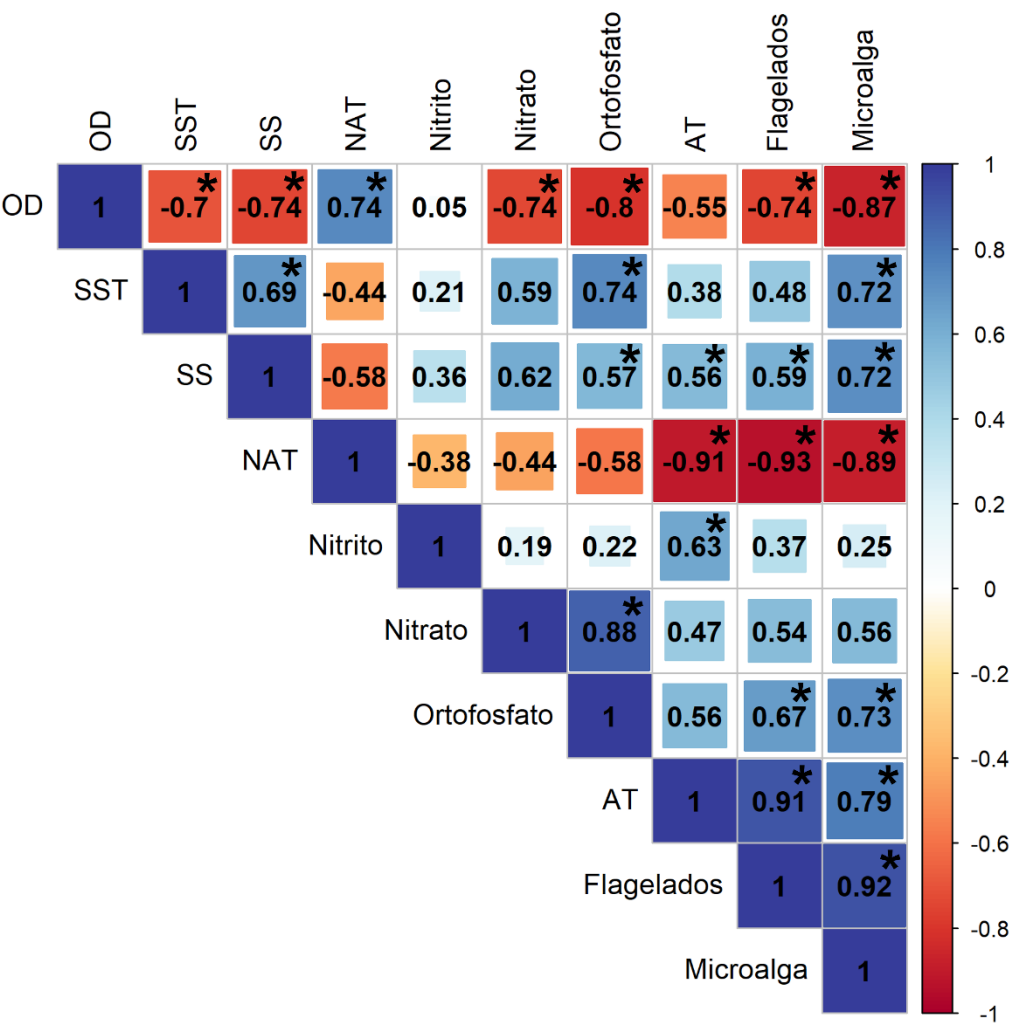


470

471**Figura 4.** Abundância (organismos mL⁻¹, média ± desvio padrão) total de bactérias (a), de bactérias oxidantes de amônia (AOB, b) e bactérias
 472oxidantes de nitrito (NOB, c) durante um cultivo multitrófico de *Penaeus vannamei* e *Oreochromis niloticus* em meio a bioflocos
 473predominantemente quimioautotrófico e heterotrófico.

4743.4. Correlação entre variáveis de qualidade de água e composição microbiana

475 A abundância total de bactérias foi positivamente correlacionada com SS, nitrito,
476abundância de flagelados e microalgas e negativamente correlacionada com a
477concentração de nitrogênio amoniacal total (Figura 3). A abundância de flagelados foi
478positivamente correlacionada com SS, ortofosfato e com a abundância de microalgas e
479negativamente correlacionada com a concentração do nitrogênio amoniacal total e
480oxigênio dissolvido (Figura 3). A abundância de microalgas foi positivamente
481correlacionada com SST, SS e ortofosfato e negativamente correlacionada com a
482concentração de oxigênio dissolvido e nitrogênio amoniacal total (Figura 3).



483

484**Figura 5.** Matriz de correlação de Spearman entre as variáveis de qualidade de água a
485composição microbiana durante um cultivo multitrófico de *Penaeus vannamei* e
486*Oreochromis niloticus* em meio a bioflocos predominantemente quimioautotrófico e

heterotrófico. Números dentro das caixas correspondem ao coeficiente de correlação. * correlações significativas (p -valor < 0,05). OD: oxigênio dissolvido; SST: sólidos suspensos totais; SS: sólidos sedimentáveis; NAT: nitrogênio amoniacal total; AT: abundância total de bactérias.

3.5. Crescimento do camarão e da tilápia

Ao final do período experimental, o peso do camarão foi maior no tratamento quimioautotrófico. A sobrevivência dos camarões foi superior a 90% em ambos os tratamentos (Tabela 3).

O peso final médio das tilápias variou entre 171,60 e 180,80g, sem diferenças significativas entre os tratamentos. A sobrevivência variou entre 76,19 e 83,81%, sem diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 3).

498

Tabela 3. Crescimento do camarão *Penaeus vannamei* e da tilápia *Oreochromis niloticus* ao final de um cultivo multitrófico em meio a bioflocos predominantemente quimioautotrófico e heterotrófico.

Camarão		
	Tratamentos	
	Quimioautotrófico	Heterotrófico
Peso final (g)	6,63 ± 0,14 ^a	4,80 ± 0,12 ^b
Sobrevivência (%)	95,17 ± 2,69	92,54 ± 2,98
Tilápia		
	Tratamentos	
	Quimioautotrófico	Heterotrófico
Peso final (g)	171,60 ± 17,81	180,80 ± 9,23
Sobrevivência (%)	76,19 ± 25,42	83,81 ± 8,93

Os dados são média ± desvio padrão.

503

4. Discussão

Os microrganismos são uma parte essencial da vida de qualquer ecossistema (Lopez e Zaballo, 2005). Muitos grupos microbianos encontrados em sistemas aquícolas podem ter efeitos positivos no cultivo, como no tratamento da qualidade da água e na disponibilidade de proteína microbiana, servindo como fonte suplementar de alimento (De Schryver *et al.*, 2008; Emerenciano *et al.*, 2017). A comunidade microbiana em sistemas de bioflocos pode influenciar diretamente na composição da flora intestinal e

511na saúde dos organismos aquáticos (Chaiyapechara *et al.*, 2012; Cardona *et al.*, 2016).
512No sistema de bioflocos predominantemente heterotrófico, as bactérias heterotróficas
513desempenham um papel importante para a estabilidade do sistema, pois estão
514envolvidas na digestão de excretas, alimentos não consumidos e matéria orgânica morta
515(Ebeling *et al.*, 2006; Monroy-Dosta *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2021). Em sistemas de
516bioflocos predominantemente quimioautotrófico, as bactérias quimioautotróficas
517possuem efeito direto sobre a qualidade da água, uma vez que atuam no processo de
518nitrificação, sendo capaz de oxidar os compostos nitrogenados tóxicos em formas
519menos tóxicas para os animais (Musyoka, 2016). Sistemas quimioautotróficos
520consomem menos oxigênio e liberam menos CO₂ do que os sistemas
521predominantemente heterotróficos e geram uma biomassa bacteriana menor que a
522quimioautotrófica (Ebeling *et al.*, 2006).

523 Em sistemas de cultivo de camarão, a amônia é o principal produto do catabolismo
524das proteínas provenientes da ração ofertada (Timmons *et al.*, 2002). Este composto é o
525resultado da excreção dos animais cultivados e da mineralização de detritos orgânicos
526como a ração não consumida e fezes (Lin e Chen, 2001). O nitrito é um produto
527intermediário do processo de nitrificação (Thurston *et al.*, 1978). As bactérias que
528convertem amônia em nitrito têm uma taxa de crescimento mais rápido do que aquelas
529que convertem nitrito em nitrato, especialmente em água salgada (Madigan *et al.*, 2016).
530Os picos de compostos nitrogenados podem causar estresse aos animais, além de
531prejudicar o crescimento (Cohen *et al.*, 2005). Durante o experimento, tanto o
532tratamento quimioautotrófico quanto o heterotrófico mantiveram as variáveis de
533qualidade de água dentro dos limites aceitáveis para as espécies.

534 Neste estudo, a maior abundância de microalgas e protozoários ciliados no
535tratamento quimioautotrófico ao final do período experimental pode ser explicada pelas
536fertilizações com cloreto de amônia e nitrito de sódio realizadas previamente à
537estocagem dos camarões. Isso provavelmente beneficiou o desenvolvimento das
538microalgas e, conseqüentemente, o crescimento dos ciliados, que se comportam
539pastando sobre a comunidade fitoplânctônica. Em sistemas multitrófico com uso da
540tecnologia de bioflocos, a fertilização orgânica e/ou inorgânica, aliada a distribuição de
541nutrientes pelo sistema, podem se refletir em mudanças na estrutura da comunidade
542plânctônica do sistema, uma vez que a comunidade microbiana responde rapidamente às
543mudanças nos parâmetros ambientais. Em que pese essas mudanças sejam difíceis de
544observar, elas podem se manifestar na mudança da composição, estrutura e

545funcionalidade das comunidades microbianas (Bentzon *et al.*, 2016). Mudanças
546ambientais, incluindo fatores bióticos como a predação e fatores abióticos, como a
547salinidade, podem afetar a produção, as atividades de ciclagem de nutrientes e
548abundância dos microrganismos (Avnimelech, 2007). A proliferação das espécies
549também pode ser influenciada pelo tipo de cultivo, espécies, condições ambientais,
550disponibilidade de alimentos (Monroy-Dosta *et al.*, 2013). No estudo realizado por
551Vilani (2011), foi observado que, independentemente da fonte de carbono usada no
552processo de fertilização, foi possível observar o desenvolvimento da alça microbiana
553criando um ambiente rico em microrganismos como protozoários. O desenvolvimento
554de microrganismos é uma característica marcante do sistema de bioflocos (Ahmad *et*
555*al.*, 2019; Khanjani *et al.*, 2021).

556 Nesse sistema, os protozoários são um dos grupos de zooplâncton mais relevantes.
557Eles desempenham um papel essencial (juntamente com as bactérias) na reciclagem da
558matéria orgânica. Ambos os grupos são a base da transferência trófica de energia para os
559níveis mais elevados. São abundantes em muitos tipos de ambientes e muitas vezes são
560encontrados vivendo livremente na coluna d'água ou colonizando sedimentos
561(Emerenciano *et al.*, 2017). A presença destes protozoários no BFT se deve ao consumo
562da matéria orgânica e outros microrganismos (e.g., bactérias) como alimento e ao
563aproveitamento dos nutrientes para a produção de biomassa microbiana (Manan *et al.*,
5642017). De fato, isso pode ser observado neste estudo, uma vez que o volume de sólidos
565sedimentáveis e a abundância total de bactérias foi positivamente correlacionada com a
566abundância de protozoários flagelados. Esses resultados confirmam a interação entre
567esses microrganismos e os padrões de aumento da abundância de protozoários com o
568aumento da concentração matéria orgânica no sistema, o que é mais provável ocorrer
569nos estágios finais do cultivo.

570 No cultivo intensivo de camarão, a dominância das comunidades microbianas muda
571ao longo de um ciclo. Normalmente, ocorre a substituição de uma comunidade
572fotoautotrófica (dominada por algas) por uma comunidade heterotrófica (Kirk, 2010;
573Hargreaves, 2013). Essa mudança faz com que a cor da água mude de tons mais
574esverdeados para tons mais acastanhados (Hargreaves, 2013). Del Giorgio (1997)
575aponta que essa mudança ocorre quando a quantidade de carbono de origem alóctone
576ultrapassa a quantidade de carbono fornecida pelo fitoplâncton para suportar o
577crescimento microbiano. O aumento da relação C:N favorece a dominância da
578comunidade heterotrófica no sistema e a assimilação dos compostos nitrogenados para

579 produção de proteína microbiana (Avnimelech, 1999; Burford; Lorenzen, 2004). Essas
580 alterações de dominância microbiana, muitas vezes, implicam em alterações
581 significativas nas condições de qualidade de água, como aumento da concentração de
582 sólidos suspensos totais e nutrientes como carbono, nitrogênio e fósforo (Pimentel *et*
583 *al.*, 2023). Neste estudo foi observada uma correlação positiva do SST e SS com a
584 abundância de microalgas. Uma elevada carga de microalgas foi produzida nos dois
585 tratamentos, em especial no quimioautotrófico, e isso pode ser explicado pela incidência
586 de luz no sistema. Segundo Coyle *et al.* (2011) a interferência na luminosidade pode
587 afetar tanto os animais cultivados quanto a microbiota existente no ambiente de cultivo.
588 Outro fator que também pode ter impulsionado o crescimento das microalgas no sistema
589 foi a presença de ortofosfato (correlação positiva entre ortofosfato e abundância de
590 microalgas). Na presença de luz e nutrientes, as microalgas encontram as condições
591 perfeitas para o crescimento, servindo como base da cadeia alimentar para o
592 desenvolvimento do zooplâncton, representando uma importante fonte de alimento
593 suplementar para os camarões (Ju *et al.*, 2008).

594 A maior abundância total de bactérias observadas no tratamento heterotrófico foi
595 esperada, uma vez que a produção de biomassa microbiana nesse sistema pode ser 40
596 vezes maior do que a produzida por um sistema predominantemente quimioautotrófico
597 (Ebeling *et al.*, 2006). Em sistemas de bioflocos, quando a via quimioautotrófica atua no
598 sistema, a amônia é oxidada a nitrito pelo grupo de bactérias AOB, que em sua maioria
599 pertencem aos gêneros *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus* e
600 *Nitrosovibrio* (Serra *et al.*, 2015). O nitrito é oxidado para nitrato pelo grupo de
601 bactérias NOB, que pertencem aos gêneros *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira* e
602 *Nitrospina* (CHEN *et al.*, 2006). Esse grupo de bactérias possui uma taxa de
603 crescimento mais lenta do que as AOB, acarretando o acúmulo ainda maior de nitrito no
604 sistema (Avnimelech, 2009). No presente estudo, a abundância relativa dos dois grupos
605 de bactérias (AOB e NOB) em relação a abundância total foi menor que 0,1%. Essas
606 bactérias possuem uma alta eficiência e, quando estão completamente estabelecidas no
607 sistema, todo o nitrogênio produzido na forma de amônia é imediatamente oxidado para
608 nitrato (Avnimelech, 2012). O estabelecimento da comunidade de nitrificantes pode ser
609 observado no tratamento quimioautotrófico, uma vez que apresentou menor NAT e
610 maior nitrato do que o tratamento heterotrófico. Esse melhor processo de nitrificação no
611 tratamento quimioautotrófico, observado através dos compostos nitrogenados, se deu
612 em função das fertilizações inorgânicas prévias ao início do experimento. Isso

613provavelmente fez com esse tratamento tivesse uma vantagem sobre o heterotrófico que
614foi iniciado com água clara e as fertilizações orgânicas foram feitas ao decorrer do
615experimento. Entretanto, a ausência de diferenças significativas na abundância de
616bactérias AOB e NOB entre os tratamentos mostra que ambos foram capazes de
617fornecer as condições necessárias para o desenvolvimento desse grupo de bactérias.
618Finalmente, o melhor controle dos compostos nitrogenados e a carga de microrganismos
619crescida no tratamento quimioautotrófico provou influenciar o crescimento dos
620camarões, comparado ao tratamento heterotrófico.

621

6225. Conclusão

623 O uso de sistemas de bioflocos predominantemente quimioautotrófico e
624heterotróficos não altera significativamente o estabelecimento da comunidade de AOB e
625NOB em cultivos multitróficos de *Penaeus vannamei* e *Oreochromis niloticus*. As duas
626estratégias de fertilização são igualmente eficientes para o desenvolvimento da alça
627microbiana e para o processo de nitrificação. Ainda, o crescimento do camarão foi
628maior no tratamento quimioautotrófico, que pode ter recebido influência da alta carga
629de microrganismos produzida nesse sistema.

630 Estudos ainda necessitam ser realizados para entender os padrões de
631desenvolvimento da alça microbiana e das bactérias nitrificantes ao longo de um ciclo
632de cultivo multitrófico e assim contribuir para melhorar as estratégias de manejo desse
633sistema através da manipulação da comunidade microbiana e otimizar a utilização dos
634recursos naturais.

635Referências

- 636AHMAD, I., LEYA, T., SAHARAN, N., MAJEEDKUTTY B.R.A., RATHORE, G.,
637 GORA, H., BHAT, I.A., VERMA, A.K., 2019. Carbon sources affect water
638 quality and haemato-biochemical responses of *Labeo rohita* in zero-water ractica
639 biofloc system. Aquac Res, 50, 10, 2879–2887.
- 640AMINOT, A., CHAUSSEPIED, M., 1983. Manuel des analyses chimiques en milieu
641 marin. CNEXO, Brest, Paris.
- 642APHA, 2012. Standard methods for the examination of water and wastewater (22nd
643 ed.). American Public Health Association. Washington, DC.
- 644AVNIMELECH, Y., 1999. Carbon: nitrogen ratio as a control element in aquaculture
645 systems. Aquaculture, 176, 227-235.
- 646AVNIMELECH, Y., 2009. Biofloc technology: A ractical guide book. Baton Rouge,
647 Louisiana – United States, The World Aquaculture Society. 182 p.
- 648AVNIMELECH, Y., KOCHBA, M., 2009 Evaluation of nitrogen uptake and excretion
649 by tilapia in bio floc tanks, using 15N tracing. Aquaculture, Amsterdam, 287, 1-2,
650 163-168.
- 651AVNIMELECH, Y., 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge
652 bioflocs technology ponds. Aquaculture 264, 140–147.
- 653AVNIMELECH, Y., 2012. Biofloc Technology – A Practical Guide Book, 2nd ed. The
654 World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, EUA. 272p.
- 655AVNIMELECH, Y., 2015. Biofloc technology – a practical guide book. 3nd ed. The
656 World Aquaculture Society. Baton Rouge. Louisiana, EU. 258 pp.
- 657BARRINGTON, K., CHOPIN, T., ROBINSON, S., 2009. Integrated multi-trophic
658 aquaculture (IMTA) in marine temperate waters. In D. Soto (ed.). Integrated
659 mariculture: a global review. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper, N°
660 529, 7-46.
- 661BENTZON, T.M., SONNENSCHN, E.C., GRAM, L., 2016. Monitoring and
662 managing microbes in aquaculture towards a sustainable industry. Microb.
663 Biotechnol. 9 (5), 576–584.

664BURFORD, M.A., THOMPSON, P.J., MCINTOSH, R.P., BAUMAN, R.H.,
665 PEARSON, D.C., 2003. Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-
666 exchange shrimp ponds in Belize. *Aquaculture*, 219, 1, 393-411.

667BURFORD, M.A., LORENZEN, K., 2004 Modeling nitrogen dynamics in intensive
668 shrimp ponds: the role of sediments remineralization. *Aquaculture*, 229, 1–4, 129-
669 145.

670CARDONA, E., GUEGUEN, Y., MAGRÉ, K., LORGEUX, B., PIQUEMAL, D.,
671 PIERRAT, F., 2016. Bacterial community characterization of water and intestine
672 of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system. *BMC Microbiol.* 16, 1,
673 1–9.

674CHAIYAPECHARA, S., RUNGRASSAMEE, W., SURİYACHAY, I., KUNCHARIN,
675 Y., KLANCHUI, A., KAROONUTHAISIRI, N., JIRAVANICHPAISAL, P., 2012.
676 Bacterial Community Associated with the Intestinal Tract of *P. monodon* in
677 Commercial Farms. *Microb. Ecol.*, 63, 938- 953.

678CHEN, S., LING, J., BLANCHETON, J. P., 2006. Nitrification kinetics of biofilm as
679 affected by water quality factors. *Aquaculture Engineering*, 34, 179 – 197.

680CHOPIN, T., COOPER, J., REID, G., CROSS, S., MOORE, S., 2012. Open water
681 integrated multi-trophic aquaculture: environmental biomitigation and economic
682 diversification of fed aquaculture by extractive aquaculture. *Reviews in*
683 *Aquaculture*, 4, 209–220.

684COYLE, S.D., BRIGHT, L.A., WOOD, D.R., NEAL, R.S., TIDWELL, J.H., 2011.
685 Performance of Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, Reared in Zero-
686 Exchange Tank Systems Exposed to Different Light Sources and Intensities.
687 *Journal of the World Aquaculture Society*, 42, 5, 687-695.

688CRAB, R., DEFOIRDT, T., BOSSIER, P., VERSTRAETE, W., 2012. Biofloc
689 technology in aquaculture: beneficial effects and future challenges. *Aquaculture*,
690 356, 351-356.

691COSTA, B.B., STREIT JÚNIOR., D.P., 2019. Cultivo De Camarões Em Sistema De
692 Bioflocos No Brasil: Uma Alternativa Sustentável Às Intensificações Na
693 Aquicultura. *Arquivos de Ciências do Mar*, 51, 2, 116.

694 DE SCHRYVER, P., CRAB, R., DEFOIRDT, T., BOON, N., VERSTRAETE, W., 2008.
 695 The basics of bioflocs technology: the added value for aquaculture. *Aquaculture*
 696 277 (3–4), 125–137.

697 DEL GIORGIO, P.A., COLE, J.J., CIMBLERIS, A., 1997. Respiration rates in bacteria
 698 exceed phytoplankton production in unproductive aquatic systems. *Nature*, 385:
 699 148–151.

700 EATON, D.E., CLESCERI, L.S., GREENBERG, A.E., 1995. Standard methods for the
 701 examination of water and wastewater. 19th ed. Publication Office, American
 702 Public Health Association, Washington, EUA.

703 EBELING, J.M., TIMMONS, M.B., BISOGNI, J.J., 2006. Engineering analysis of the
 704 stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of
 705 ammonia-nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*, 257, 346–358.

706 EMERENCIANO, M., MARTINEZ-CÓRDOVA, L.R., MARTÍNEZ-PORCHAS, M.,
 707 MIRANDABAEZA, A., 2017. Biofloc technology (BFT): a tool for water quality
 708 management in aquaculture. *Water Quality; InTech: London, UK*, 91–109.

709 FAO, 2022. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Sustainability in action.
 710 Rome.

711 FLECKENSTEIN, L.J., KRING, N.A., TIERNEY, T.W., FISK, J.C., LAWSON, B.C.,
 712 RAY, A.J., 2020. The effects of artificial substrate and stocking density on Pacific
 713 White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) performance and water quality dynamics in
 714 high tunnel-based biofloc systems. *Aquac. Eng.* 90: 102093.

715 FOX, J., WEISBERG, S., 2019. An R Companion to Applied Regression, Third edition.
 716 Sage, Thousand Oaks CA.
 717 <https://socialsciences.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion/>

718 GARCÍA-ROBLEDO, E., CORZO, A., PAPASPYROU, S., 2014. A fast and direct
 719 spectrophotometric method for the sequential determination of nitrate and nitrite
 720 at low concentrations in small volumes. *Marine Chemistry*, 162, 30–36.

721 GAONA, C.A.P., POERSCH, L.H., KRUMMENAUER, D., FOES, G.K.,
 722 WASIELESKY, W.J., 2011. The Effect of Solids Removal on Water Quality,
 723 Growth and Survival of *Litopenaeus vannamei* in a Biofloc Technology Culture
 724 System. *Int. J. Recirc. Aquac.* 12, 54–73.

725HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T., RYAN, P.D., 2001. PAST: Paleontological Statistics
 726 software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica* 4(1):
 727 9.

728HARGREAVES, J.A., 2013. Biofloc Production Systems for Aquaculture Southern
 729 regional aquaculture center. SRAC Publication, 4503, 1–12.

730HARRELL JR, F., 2023. HMISC: HARRELL MISCELLANEOUS. R package version
 731 5.0-1.

732JORY, D.E., 2001. Feed management practices for a healthy pond environment. In:
 733 BROWDY, C.L., JORY, D.E. (Eds.), 2001. *The New Wave, Proceedings of the*
 734 *Special Session on Sustainable Shrimp Culture*. The World Aquaculture Society,
 735 Baton Rouge, Louisiana, USA, 375, 118-143.

736JU, Z.Y., FORSTER, I., CONQUEST, L., DOMINY, W., KUO, W.C., HORGAN, F.D.,
 737 2008. Determination of microbial community structures of shrimp floc cultures by
 738 biomarkers and analysis of floc amino acid profiles. *Aquaculture and Research*,
 739 39, 118- 133.

740KASSAMBARA, A., 2023. Rstatix: Pipe-Friendly Framework for Basic Statistical
 741 Tests. R package version 0.7.2.

742KHANJANI, M.H., ALIZADEH, M., SHARIFINIA, M., 2021. Effects of different
 743 carbon sources on water quality, biofloc quality, and growth performance of Nile
 744 tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings in a heterotrophic culture system.
 745 *Aquaculture International*, 29, 1, 307–321.

746KIRK, K.R., 2010. Modeling microbial and nutrient dynamics in zero-discharge
 747 aquaculture systems.

748KRUMMENAUER, D., PEIXOTO, S., CAVALLI, R., POERSCH, L.H.,
 749 WASIELESKY, W., 2011. Superintensive culture of White shrimp, *Litopenaeus*
 750 *vannamei*, in a biofloc technology system in Southern Brazil at different stocking
 751 densities. *Journal of the World Aquaculture Society*, 42, 5, 726-733.

752LIN, Y.C., CHEN, J.C., 2001. Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei*
 753 Boone juveniles at different salinity levels. *Journal of Experimental Marine*
 754 *Biology and Ecology*, 259, 109-119.

755 LIU, L., HU, Z., DAI, X., AVNIMELECH, Y., 2014. Effects of addition of maize starch
 756 on the yield, water quality and formation of bioflocs in an integrated shrimp
 757 culture system. *Aquaculture*, 418, 79-86.

758 LOPEZ, L.A., ZABALLOS, A., 2005. Diversidad y actividad procariota en ecosistemas
 759 marinos. *Rev. Ecosistemas*, 14, 2, 30–40.

760 MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., BENDER, K.S., BUCKLEY, D.H., STAHL,
 761 D.A., 2016. *Microbiologia de Brock*, 14 ed. Artmed, Porto Alegre.

762 MANAN, H., MOH, J. H. Z., KASAN, N. A., SURATMAN, S., IKHWANUDDIN, M.,
 763 2017. Identification of biofloc microscopic composition as the natural
 764 bioremediation in zero water exchange of Pacific white shrimp, *Penaeus*
 765 *vannamei*, culture in closed hatchery system. *Applied Water Science*, 7, 5, 2437-
 766 2446.

767 MONROY-DOSTA, M.D.C., LARA-ANDRADE, D., CASTRO-MEJÍA, J., CASTRO-
 768 MEJÍA, G., EMERENCIANO, M.G., 2013. Microbiology community
 769 composition and abundance associated to biofloc in tilapia aquaculture. *Rev. Biol.*
 770 *Mar. Oceanogr.*, 48, 3, 511–520.

771 MUSYOKA, S., 2016. Concept of microbial bioremediation in aquaculture wastes;
 772 review. *Int. J. Adv. Sci. Tech. Res.*, 5, 1–10.

773 OLIVEIRA, S.S., WASIELESKY JR, W., BALLESTER, E.L.C., ABREU, P.C., 2006.
 774 Caracterização da assembléia de bactérias nitrificantes pelo método “fluorescent
 775 *in situ* hybridization” (fish) no biofilme e água de larvicultura do Camarão-Rosa
 776 *Farfantepenaeus paulensis*. *Atlântica*, 28, 1, 33–45.

777 OTOSHI, C.A., MOSS, N.R., 2011. Establishing Nitrifying Bacteria in Super-Intensive
 778 Biofloc Shrimp Production. *Global Aquaculture Advocate*, May-June.

779 PANIGRAHI, A., SUNDARAM, M., RAVICHANDRAN, P., GOPAL, C., 2014.
 780 Microbial soup-Eco based approach for shrimp culture and management. CIBA
 781 (Indian Council of Agricultural Research) ENVIS Centre Newsletter, 12, 2.

782 PANIGRAHI, R., SRIVASTAVA, P. R., SHARMA, D., 2018. Online Learning:
 783 Adoption, Continuance, and Learning Outcome—A Review of Literature.
 784 *International Journal of Information Management*, 43, 1-14.

785POLI, M.A., LEGARDA, E.C., DE LORENZO, M.A., MARTINS, M.A., DO
786 NASCIMENTO VIEIRA, F., 2018. Pacific white shrimp and Nile tilapia
787 integrated in a biofloc system under different fish-stocking densities. *Aquaculture*,
788 498, 83-89.

789POLI, M.A., LEGARDA, E.C., DE LORENZO, M.A., PINHEIRO, I., MARTINS,
790 M.A., SEIFFERT, W.Q., DO NASCIMENTO VIEIRA, F., 2019. Integrated
791 multitrophic aquaculture applied to shrimp rearing in a biofloc system.
792 *Aquaculture*, 511, 734274

793PIMENTEL, O.A.L.F., AMADO, A.M., THEY, N.H., 2023. Biofloc colors as an
794 assessment tool for water quality in shrimp farming with BFT systems.
795 *Aquacultural Engineering* 101, 102321.

796R CORE TEAM, 2023. R: A language and environment for statistical computing. R
797 Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

798RAY, A. J., SEABORN, G., LEFFLER, J.W., WILDE, S.B., LAWSON, A., BROWDY,
799 C.L., 2010. Characterization of microbial communities in minimal-exchange,
800 intensive aquaculture systems and the effects of suspended solids management.
801 *Aquaculture*, 310, 1-2, 130-138.

802SAMOCHA, T.M., PRANGNELL, D.I., HANSON, T.R., TREECE, G.D., MORRIS,
803 T.C., CASTRO, L.F., STARESINIC, N., 2017. Design and operation of super-
804 intensive biofloc-dominated systems for indoor production of the Pacific White
805 Shrimp. *Litopenaeus vannamei* – The Texas A&M AgriLife Research Experience.
806 The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana USA.

807SCHVEITZER, R., ARANTES, R., COSTODIO, P.F.S., SANTO, C.M.D., ARANA,
808 L.V., SEIFFERT, W.Q., ANDREATTA, E.R., 2013. Effect of different biofloc
809 levels on microbial activity, water quality and performance of *Litopenaeus*
810 *vannamei* in a tank system operated with no water exchange. *Aquacultural*
811 *Engineering*, 56, 59-70.

812SERRA, F.P., GAONA, C.A.P., FURTADO, P.S., POERSCH, L.H., WASIELESKY,
813 JR., W., 2015. Use of different carbon sources for the biofloc system adopted
814 during the nursery and grow-out culture of *Litopenaeus vannamei*. *Aquacult. Int.*
815 23, 6, 1325–1339.

816SILVA, K.R., WASIELESKY, W., JR., ABREU, P.C., 2013. Nitrogen and Phosphorus
817 Dynamics in the Biofloc Production of the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus*
818 *vannamei*. J World Aquacult Soc, 44, 30-41.

819STRICKLAND, J.D.H., PARSONS, T.R., 1972. A Practical Handbook of Seawater
820 Analysis, 2nd ed. Fisheries research board of Canada, Ottawwa, Canada

821SUNEETHA, K., PADMAVATHI, P., 2019. Sustainable Aquaculture through Recycling
822 of Waste Nutrients using Biofloc Technology. International Journal of Basic and
823 Applied Research

824TACON, A.G.J., 2019. Trends in Global Aquaculture and Aquafeed Production: 2000–
825 2017. Reviews in Fisheries Science & Aquaculture, 1–14.

826THURSTON, R.V., RUSSO, R.C., SMITH, C.E., 1978. Acute toxicity of ammonia and
827 nitrite to cutthroat trout fry. Transactions of the American Fisheries Society, 107,
828 2, 361-368.

829TIMMONS, M. B. EBELING, J. M., WHEATON, F. W., SUMMERFELT, S. T.,
830 VINCI, B. J., 2002. Recirculating aquaculture systems, 2nd Edition. Cayuga Aqua
831 Ventures, New York, 769.

832TROELL, M., JOYCE, A., CHOPIN, T., NEORI, A., BUSCHMANN, A.H., FANG,
833 J.G., 2009. Ecological engineering in aquaculture - Potential for integrated multi-
834 trophic aquaculture (IMTA) in marine offshore systems. Aquaculture. 297, 1–9.

835UNESCO, 1983. Chemical Methods for Use in Marine Environmental Monitoring,
836 Intergovernmental Oceanographic commission – Manuals and guides 12.

837VILANI, F.G., 2011. Uso do farelo de arroz na fertilização da água em sistema de
838 cultivo com bioflocos e seu efeito sobre o desempenho zootécnico de *Litopenaeus*
839 *vannamei*. Angewandte Chemie International Edition, 6, 11, 951–952.

840WAGNER, M., RATH, G., AMANN, R., KOOPS, H. P., SCHLEIFER, K. H., 1995. In
841 situ Identification of Ammonia-oxidizing Bacteria. Systematic and Applied
842 Microbiology, 18, 2, 251–264.

843WAGNER, M., RATH, G., KOOPS, H. P., FLOOD, J., AMANN, R., 1996. In situ
844 analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. Water Science and
845 Technology, 34, 1-2, 237–244.

846 WASIELESKY, W., ATWOOD, H., STOKES, A., BROWDY, C.L., 2006. Effect of
847 natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-
848 intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture,
849 258, 1, 396-403.

850 WEI, T., SIMKO, V., 2021. R package ‘corrplot’: Visualization of a Correlation Matrix
851 (Version 0.92).

852 WICKHAM, H., 2016. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag
853 New York.

854 YOKOKAWA, T., NAGATA, T., 2005. Growth and grazing mortality rates of
855 phylogenetic groups of bacterioplankton in coastal marine environments. Applied
856 and Environmental Microbiology, 71, 11, 6799–6807.

857 ZAR, J.H., 2010. Biostatistical Analysis, 5th ed. Pearson Prentice Hall, USA.

858

859

