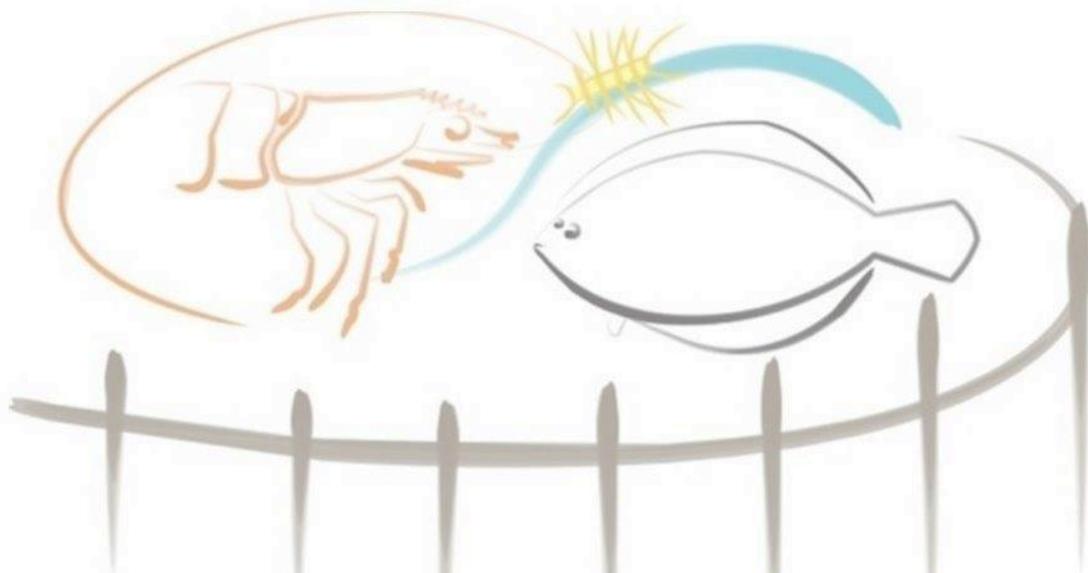




**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE**  
**INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA**



**PROCESSO DE NITRIFICAÇÃO EM DIFERENTES SISTEMAS INTENSIVOS  
NA PRODUÇÃO DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei***

**FABIANE DA PAZ SERRA**

**Rio Grande, 2022**

**Universidade Federal do Rio Grande**  
**Instituto de Oceanografia**

**Processo de nitrificação em diferentes sistemas intensivos na  
produção do camarão *Litopenaeus vannamei***

Aluna: Fabiane da Paz Serra

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Abreu (*in memoriam*)

Co-orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dionéia Evangelista Cesar

Co-orientador: Prof. Dr. Dariano Krummenauer

Tese apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do grau de  
Doutora em Aquicultura no  
Programa de Pós-Graduação em  
Aquicultura da Universidade Federal  
do Rio Grande

**Rio Grande, RS**  
**Novembro de 2022**

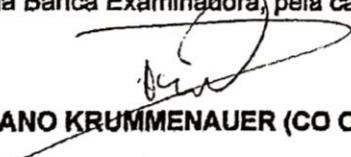
## Ata de aprovação



ATA 06/2022

### DE DEFESA DA 77ª TESE DE DOUTORADO EM AQUICULTURA

No dia sete de novembro de dois mil e vinte e dois, às quatorze horas, reuniu-se a Banca Examinadora de Tese de Doutorado em Aquicultura, da **FABIANE DA PAZ SERRA**, orientada pelo Prof. Dr. Paulo Cesar Oliveira Vergne de Abreu (in memoriam) composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. Dariano Krummenauer (Co orientador – IO/FURG), Prof.ª Dr.ª Dioneia Cesar (Co orientadora – UFJF), Prof. Dr. Wilson Wasielesky Junior (IO/FURG), Prof. Dr. Rodrigo Schweitzer (UNIFESP) e o Prof. Dr. Manuel Angel Valenzuela Jimenez (UNAM/MEXICO). Título da Tese: “**PROCESSO DE NITRIFICAÇÃO EM DIFERENTES SISTEMAS INTENSIVOS NA PRODUÇÃO DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei***.” Dando início à defesa, o Coordenador do PPGAq Prof. Dr. Dariano Krummenauer, na qualidade de co orientador, passou a palavra para a candidata apresentar a Tese. 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 Tese, ficando a cargo do Orientador o cumprimento desta decisão. A candidata **FABIANE DA PAZ SERRA** foi considerada **APROVADA**, devendo a versão definitiva da Tese 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 do PPGAq.

  
PROF. DR. DARIANO KRUMMENAUER (CO ORIENTADOR – IO/FURG)

PROF.ª DR.ª DIONEIA CESAR (CO ORIENTADORA - UFJF) 

  
PROF. DR. WILSON WASIELESKY JUNIOR (IO/FURG)

PROF. DR. RODRIGO SCHWEITZER (UNIFESP) 

PROF. DR. MANUEL ANGEL VALENZUELA JIMENEZ (UNAM/MEXICO) 

  
FABIANE DA PAZ SERRA

  
PROF. DR. DARIANO KRUMMENAUER (Coordenador do PPGAq)

## Índice

<b>Dedicatória</b> .....	vi
<b>Agradecimentos</b> .....	vii
<b>Resumo geral</b> .....	viii
<b>Introdução geral</b> .....	10
<b>Objetivos</b> .....	12
Objetivos gerais .....	12
Objetivos específicos .....	12
<b>Referências</b> .....	13
<b>Capítulo 1: Fertilização com sais de nitrogênio versus disponibilidade de substratos: duas estratégias para otimizar o processo nitrificação durante a produção do camarão branco <i>Litopenaeus vannamei</i>.....</b>	17
Resumo .....	18
Introdução .....	19
Material e métodos .....	21
Resultados .....	24
Discussão .....	36
Conclusão .....	41
Referências .....	41
<b>Capítulo 2: Fatores que influenciam o estabelecimento das bactérias nitrificantes durante a inicialização de diferentes sistemas na produção do <i>Litopenaeus vannamei</i>.....</b>	47
Resumo .....	48
Introdução .....	48
Material e métodos.....	51
Resultados .....	53
Discussão .....	57
Conclusão .....	60

Referências .....	61
<b>Capítulo 3: Dinâmica do nitrogênio e das bactérias nitrificantes em sistemas baseados em bioflocos e biofilme maduros na produção do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> .....</b>	<b>67</b>
Resumo .....	68
Introdução .....	68
Material e métodos .....	70
Resultados .....	72
Discussão .....	78
Conclusão .....	81
Referências .....	82
<b>Conclusões gerais .....</b>	<b>89</b>

## **Dedicatória**

*Dedico esta tese ao eterno orientador  
e amigo Paulo Abreu (in memoriam)*

## **Agradecimentos**

Ao Paulo Abreu, por todos os ensinamentos, aprendizados e por toda dedicação ao longo desses 9 anos no qual tive o imenso privilégio de trabalhar ao lado desse excepcional pesquisador, professor e ser humano admirável.

Aos meus queridos co-orientadores, Dionéia e Dariano, incansáveis nesses últimos meses. Por acreditam mais em mim do que eu mesma! Serei imensamente grata por todo empenho, dedicação e pelas palavras de motivação quando tudo parecia perdido.

Aos amores da minha vida, meus pais e minha filha Laura, dedico a vocês mais essa conquista, de conseguir finalizar a tese! A final, chegar em casa e receber todo amor e carinho de vocês, só me fortaleceu. É graças a vocês que estou finalizando mais uma etapa! Ao meu irmão, minha cunhada e sobrinhos, que mesmo longe se fizeram presentes! Sem vocês, eu não conseguiria!

Aos amigos do Lab Fito, Rafa, Vir e Clarisse! Obrigada por me acolherem, pelas palavras de motivação e os momentos descontraídos na hora do café!

Aos amigos que a FURG me presenteou: Savênia e Verinha, que não fazem ideia o que um simples café da manhã fazia toda a diferença. As boas risadas, as conversas no meio do campo, além dos puxões de orelhas que só me fortaleceram. E aos que mesmo longe se fizeram presentes: Gaona, Camu e Ana! Amo vocês!

Ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura, pela oportunidade de cursar o doutorado. Ao Laboratório de Carcinocultura e ao Laboratório de Ecologia de Microorganismos Aplicada à Aquicultura. Aos professores, especialmente ao Dariano e Wilson Wasielesky por terem disponibilizado os laboratórios e terem contribuído para realização dos experimentos, análises e os manuscritos da tese.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

O meu muito obrigada a todos!

## **Resumo geral**

Um dos maiores desafios dos sistemas aquícolas são os resíduos gerados durante a produção, sendo uma das principais causas do impacto ambiental da atividade, no qual tende aumentar à medida em que a produção é intensificada. Diante disso, o controle do nitrogênio (N) é fundamental para o sucesso da produção, principalmente a amônia e nitrito, compostos de maior toxicidade aos organismos produzidos. Neste contexto, pesquisas têm sido desenvolvidas a fim de otimizar os sistemas de produção intensivos e superintensivos. Sistemas baseados em microorganismos, são alternativas promissoras para a intensificação da produção, contribuindo com a sustentabilidade e biossegurança da atividade aquícola. Dentre esses, destacam-se os baseados em bioflocos e biofilme. Em ambos os sistemas, o manejo adequado é necessário para a proliferação e estabelecimento das bactérias nitrificantes, principais responsáveis pela remoção biológica do N tóxico. Para isso, é necessário o entendimento sobre a dinâmica da N e da comunidade bacteriana nos diferentes sistemas de produção. Diante do exposto, a tese foi dividida em três capítulos baseados na dinâmica do N e das bactérias nitrificantes. No primeiro capítulo avaliamos a disponibilidade de N e substratos para a melhoria do processo de nitrificação, durante a maturação do sistema e na produção dos camarões em três diferentes sistemas - água clara, bioflocos e biofilme. Diante dos resultados evidenciamos que a fertilização inorgânica prévia aliada a presença de substratos, principalmente substratos artificiais para a formação do biofilme, resultou na maior eficiência do processo de nitrificação e maior biomassa final dos camarões. No segundo e terceiro capítulo foi utilizada a técnica de FISH (Hibridização *in situ* Fluorescente) para avaliar a composição e quantificação das bactérias nitrificantes, e assim, apoiar os achados do primeiro capítulo, no qual era baseado apenas na dinâmica do N. No segundo capítulo, avaliamos os fatores que influenciam o estabelecimento das bactérias nitrificantes durante a inicialização de diferentes sistemas de produção. A quantificação das bactérias nitrificantes evidenciou que o aumento excessivo de amônia e nitrito estão diretamente relacionados à ausência e baixa densidade de bactérias nitrificantes, resultantes das renovações da água, ausência de substrato e a adição de carbono orgânico, durante a inicialização do sistema. No terceiro capítulo, comparamos a dinâmica do N e das bactérias nitrificantes em sistemas de bioflocos e biofilmes maduros. Neste caso, ambas são estratégias eficientes para manter as concentrações de amônia e nitrito em níveis seguros para os camarões. Entretanto, a dinâmica do N aliado as análises de FISH evidenciaram que a eficiência do processo de nitrificação foi em resposta a densidade das

bactérias nitrificantes, resultantes dos manejos realizados tanto para a maturação dos sistemas quanto durante a produção.

## **Introdução geral**

A intensificação dos sistemas aquícolas visa maior eficiência quanto ao uso de recursos, menores áreas e uso limitado de água para a produção. Entretanto, um dos maiores desafios da atividade é o impacto ambiental causado pelo acúmulo N (nitrogênio) inorgânico. Isso está relacionado a elevada densidade de estocagem que implica no maior aporte de alimento inerte, ocasionando a deterioração da qualidade de água e toxicidade aos organismos produzidos (Boyd et al., 2020; Crab et al. 2007; Romano and Zeng, 2013).

O sucesso da produção depende do controle do N, especialmente a amônia e nitrito, devido a maior toxicidade aos organismos produzidos, uma vez que dependendo das concentrações e período de exposição aos organismos, pode resultar em perdas significativas a produção. No caso do camarão *Litopenaeus vannamei*, o nível de segurança para amônia e nitrito é de 3.55, 15.2 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, em salinidade 25, enquanto o nitrato é de 177 mg L<sup>-1</sup> em salinidade 23 (Furtado et al., 2014; Lin & Chen, 2001, 2003; Romano & Zeng, 2013).

Diante do exposto, são necessárias estratégias de manejo para evitar que as concentrações do N excedam os limites toleráveis para as espécies produzidas. A renovação de água é uma estratégia de manejo utilizada em sistemas convencionais a fim de manter as concentrações do N dentro do nível seguro para a espécie produzida, e assim, evitar mortalidades aos organismos atribuídas a toxicidade desses compostos. Entretanto, essa estratégia pode ser ineficaz para a manutenção da qualidade da água, além de resultar no aumento nos custos de produção e ser a principal causa dos impactos ambientais da atividade (Hopkins et al., 1993; Piedrahita, 2003).

Neste contexto, sistemas baseados em microrganismos permitem mitigar os desafios ambientais e econômicos ocasionados pela intensificação, uma vez que é possível aproveitar a produtividade natural do sistema, o que resulta na limitação de troca de água e menor uso de alimento inerte, tornando os sistemas mais sustentáveis e biosseguros. Dentre esses, destacam-se os baseados em bioflocos e biofilme, amplamente utilizados na produção intensiva e superintensiva de camarões (Avnimelech, 1999; Ballester et al., 2007; Boyd et al., 2020; Wasielesky et al., 2006).

Sistemas baseados em bioflocos e biofilme são formados por uma complexa comunidade microbiana. O crescimento e estabilização das bactérias nitrificantes estão associados a disponibilidade de N inorgânico, i.e., amônia e nitrito, e substratos, sejam suspensos na coluna da água ou aderidos a uma superfície, i.e., bioflocos e biofilme,

respectivamente (Serra et al., 2021). A disponibilidade de nitrogênio inorgânico, mais intensificada nesses sistemas, fornece energia para o crescimento e proliferação da comunidade bacteriana. Desta forma, os substratos contribuem com o estabelecimento da comunidade bacteriana, aumentando a área de superfície e fornecendo locais para sua fixação (Alexandre, 1977; Pandey et al., 2014). Diante disso, é de extrema relevância entender a dinâmica e vias de remoção do N nos diferentes sistemas de produção, para estabelecer estratégias de manejo para a proliferação e estabelecimento da comunidade microbiana, uma vez que a eficiência do sistema é dependente da atividade, principalmente das bactérias nitrificantes (Crab et al., 2007; Hargreaves, 2006).

A nitrificação é o processo chave do ciclo do N e amplamente estudado e aplicado na aquicultura intensiva e superintensiva. Esse processo é realizado por dois grupos filogeneticamente distintos de bactérias, no qual realizam coletivamente o processo de nitrificação em duas etapas. Primeiramente, as AOB (bactérias amônio oxidantes) realizam a oxidação da amônia ao nitrito. Posteriormente, as NOB (bactérias nitrito oxidantes) realizam a etapa final desse processo, com a oxidação do nitrito ao nitrato, composto de menor toxicidade aos organismos produzidos (Arp, 2009; Bock e Wagner, 2006; Hagopian e Riley, 1998; Timmons e Ebeling, 2010; Ward, 2013).

A inicialização do sistema é considerada um desafio, uma vez que depende do estabelecimento e atividade das bactérias nitrificantes. A formação dos bioflocos é dependente da manipulação da relação C:N, sendo a assimilação heterotrófica a principal via de remoção da amônia, resultando no rápido incremento do nitrito. Enquanto a maturação do biofilme é processo lento e caracterizado por concentrações elevadas de amônia e nitrito, até que ocorra a colonização e sucessão das bactérias nitrificantes. Nestes casos, a renovação de água pode ser uma estratégia a ser considerada a fim de evitar mortalidades atribuídas a toxicidade de amônia e nitrito durante a produção. Entretanto, essa estratégia pode ser ineficaz, principalmente durante o período de estabilização e colonização das bactérias nitrificantes, resultando na remoção dessas juntamente a renovação de água (Avnimelech, 2007; Ruiz et al., 2019; Sesuk et al., 2009; Serra et al., 2021; Zhu and Chen, 2001).

Em busca por alternativas sustentáveis, iniciar a produção com as bactérias nitrificantes estabelecidas no ambiente de produção, é de extrema relevância, visto que essas possuem o crescimento lento e baixo rendimento celular. A proliferação e composição desta comunidade é influenciada pela disponibilidade de N e substratos, fornecendo fonte de energia para as bactérias nitrificantes e fixação para a proliferação

destas. Pesquisas demonstram a eficiência da utilização de água rica em bioflocos de um sistema preestabelecido e o biofilme nitrificante previamente maturados com sais de N inorgânico, como cloreto de amônio e nitrito de sódio. Essas estratégias eliminam o tempo necessário para estabelecimento das bactérias nitrificantes, comparado a inicialização do sistema (Ferreira et al., 2020; Krummenauer et al., 2014; de Lara et al., 2021; Morais et al., 2020; Moura et al., 2021).

Dada a extrema importância dos sistemas baseados em microorganismos, técnicas de biologia molecular permitem uma melhor compreensão da sucessão ecológica de bactérias envolvidas no processo de nitrificação, essencial para estabelecer estratégias de melhoria para tornar os sistemas mais eficientes e sustentáveis. O estudo da diversidade microbiana é baseado na filogenia molecular do RNA ribossomal, da menor subunidade, o gene 16S rRNA. Este gene é o mais utilizado como marcador filogenético e evolutivamente conservado, sendo importante nos estudos de evoluções e filogenia bacteriana (Woese 1987; Buller 2004).

Uma técnica que vem sendo utilizada para a caracterização e quantificação da comunidade bacteriana em aquicultura é a Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH) (Azevedo et al., 2018; Del'Duca et al., 2019; Oliveira et al., 2006; Santos et al., 2019). Esta técnica fornece um método independente de cultivo no monitoramento de populações bacterianas. O uso de marcadores moleculares, sondas fluorescentes específicas, ligadas a oligonucleotídeos complementares ao rRNA de bactérias, permite a visualização, identificação e contagem direta de espécies ou grandes grupos de bactérias, através da microscopia de epifluorescência após a hibridização (Amann et al. 1990).

## **Objetivos**

### **Objetivo geral:**

– Avaliar a dinâmica do N e caracterizar as bactérias nitrificantes através da técnica de Hibridização *in situ* Fluorescente em diferentes sistemas intensivos durante a produção do camarão *L. vannamei*.

### **Objetivos específicos:**

– Avaliar a eficiência da disponibilidade de N e substratos no estabelecimento das bactérias nitrificantes e eficiência do processo de nitrificação;

- Avaliar a dinâmica do N e a sucessão ecológica das bactérias nitrificantes durante a inicialização de diferentes sistemas de produção;
- Avaliar a dinâmica do N e das bactérias nitrificantes em sistemas baseados em bioflocos e biofilme maduros.

## Referências

- Amann, R.I., B.J. Binder, R.J. Olson, S.W. Chisholm, R. Devereus and D.A. Stahl. 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1919-1925.
- Arp, D.J., 2009. Nitrification. *Encycl. Life Sci.* 1–6. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0021154>
- Avnimelech, Y., 1999. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture* 176, 227–235. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00085-X](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00085-X)
- Avnimelech, Y., 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bioflocs technology ponds. *Aquaculture* 264, 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.11.025>
- Azevedo, R.S., Del’Duca, A., Rodrigues, E.M., Freato, T.A., Cesar, D.E., 2018. Theory of microbial ecology: Applications in constructing a recirculating aquaculture system. *Aquac. Res.* 49, 3898–3908. <https://doi.org/10.1111/are.13860>
- Ballester, E.L.C., Wasielesky, W., Cavalli, R.O., Abreu, P.C., 2007. Nursery of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* in cages with artificial substrates: Biofilm composition and shrimp performance 269, 355–362. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.003>
- Bock, E., Wagner, M., 2006. Oxidation of inorganic nitrogen compounds as an energy source, in: *The Prokaryotes: Prokaryotic Physiology and Biochemistry*. pp. 457–495. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-30141-4\\_64](https://doi.org/10.1007/978-3-642-30141-4_64)
- Boyd, C.E., D’Abramo, L.R., Glencross, B.D., Huyben, D.C., Juarez, L.M., Lockwood, G.S., McNevin, A.A., Tacon, A.G.J., Teletchea, F., Tomasso, J.R., Tucker, C.S., Valenti, W.C., 2020. Achieving sustainable aquaculture: Historical and current perspectives and future needs and challenges. *J. World Aquac. Soc.* 51, 578–633. <https://doi.org/10.1111/jwas.12714>

- Crab, R., Avnimelech, Y., Defoirdt, T., Bossier, P., Verstraete, W., 2007. Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture* 270, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.05.006>
- de Lara, G.R., Poersch, L.H., Wasielesky, W., 2021. The quantity of artificial substrates influences the nitrogen cycle in the biofloc culture system of *Litopenaeus vannamei*. *Aquac. Eng.* 94, 102171. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2021.102171>
- Del'Duca, A., Cesar, D.E., Freato, T.A., Azevedo, R.S., Rodrigues, E.M., Abreu, P.C., 2019. Variability of the nitrifying bacteria in the biofilm and water column of a recirculating aquaculture system for tilapia (*Oreochromis niloticus*) production. *Aquac. Res.* 50, 2537–2544. <https://doi.org/10.1111/are.14211>
- Ferreira, G.S., Silva, V.F., Martins, M.A., da Silva, A.C.C.P., Machado, C., Seiffert, W.Q., Vieira, F.N., 2020a. Strategies for ammonium and nitrite control in *Litopenaeus vannamei* nursery systems with bioflocs. *Aquac. Eng.* 88. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2019.102040>
- Furtado, P.S., Campos, B.R., Serra, F.P., Klosterhoff, M., Romano, L.A., Wasielesky, W., 2014. Effects of nitrate toxicity in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, reared with biofloc technology (BFT). *Aquac. Int.* 23, 315–327. <https://doi.org/10.1007/s10499-014-9817-z>
- Hagopian, D.S., Riley, J.G., 1998. A closer look at the bacteriology of nitrification. *Aquac. Eng.* 18, 223–244. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2015.05.012>
- Hargreaves, J.A., 2006. Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. *Aquac. Eng.* 34, 344–363. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2005.08.009>
- Hayatsu, M., Tago, K., & Saito, M., 2008. Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Science and Plant Nutrition*, 54(1), 33–45. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2007.00195.x>
- Hopkins, J.S., Hamilton, R.D., Sandifer, P.A., Browdy, C.L., Stokes, A.D., 1993. Effect of water exchange rate on production, water quality, effluent characteristics and nitrogen budgets of intensive shrimp ponds. *J. World Aquac. Soc.* 24, 304–320. <https://doi.org/10.1111/j.17497345.1993.tb00162.x>
- Krummenauer, D., Samocha, T.M., Poersch, L.H.S., Lara, G.R., Wasielesky Jr., W., 2014. The reuse of water on the culture of pacific white shrimp, *Litopenaeus*

- vannamei*, in BFT system. J. World Aquac. Soc. 45, 3–14.  
<https://doi.org/10.1111/jwas.12093>
- Lin, Y and Chen, J., 2001. Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* Boone juveniles at different salinity levels. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 259, 109–119
- Lin, Y and Chen, J., 2003. Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels. Aquaculture 224, 193–201.  
[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00220-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00220-5)
- Morais, A.P., Abreu, P.C., Wasielesky, W., Krummenauer, D., 2020. Effect of aeration intensity on the biofilm nitrification process during the production of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in Biofloc and clear water systems. Aquaculture 514, 734516. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734516>
- Moura, P.S., Wasielesky, W., Serra, F.P., Braga, A., Poersch, L., 2021. Partial seawater inclusion to improve *Litopenaeus vannamei* performance in low salinity biofloc systems. Aquaculture 531, 735905.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735905>
- Oliveira, S.S., Wasielesky, W., Ballester, E., Abreu, P.C., 2006. Caracterização da assembléia de bactérias nitrificantes pelo método “fluorescent in situ hybridization” (fish) no biofilme e água de larvicultura do Camarão-Rosa *Farfantepenaeus paulensis*. Atlântica 28, 33–45.
- Piedrahita, R.H., 2003. Reducing the potential environmental impact of tank aquaculture effluents through intensification and recirculation. Aquaculture 226, 35–44.  
[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00465-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00465-4)
- Romano, N., Zeng, C., 2013. Toxic effects of ammonia, nitrite, and nitrate to decapod crustaceans: A review on factors influencing their toxicity, physiological consequences, and coping mechanisms. Rev. Fish. Sci. 21, 1–21.  
<https://doi.org/10.1080/10641262.2012.753404>
- Ruiz, P., Vidal, J.M., Sepúlveda, D., Torres, C., Villouta, G., Carrasco, C., Aguilera, F., Ruiz-Tagle, N., Urrutia, H., 2019. Overview and future perspectives of nitrifying bacteria on biofilters for recirculating aquaculture systems. Rev. Aquac. 1–17.  
<https://doi.org/10.1111/raq.12392>
- Santos, N.B.V. dos, Furtado, P.S., César, D.E., Wasielesky, W., 2019. Assessment of the nitrification process in a culture of pacific white shrimp, using artificial substrate and bacterial inoculum in a biofloc technology system (BFT). Ciência Rural 49, 1–10. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180306>

- Serra, F., Wasielesky, W., Abreu, P.C., 2021. Nitrogen salt fertilization vs. substrate availability: Two strategies to improve nitrification during the production of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 543, 10. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736997>
- Sesuk, T., Powtongsook, S., Nootong, K., 2009. Inorganic nitrogen control in a novel zero-water exchanged aquaculture system integrated with airlift-submerged fibrous nitrifying biofilters. *Bioresour. Technol.* 100, 2088–2094. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.10.027>
- Timmons, M.B., Ebeling, J.M., 2010. *Recirculating Aquaculture*, 2nd ed, Aquaculture. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.2008.01032.x>
- Wasielesky, W., Atwood, H., Stokes, A., Browdy, C.L., 2006. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 258, 396–403. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.030>
- Wood P.M., 1986. Nitrification as a bacterial energy source. In: J. I. Prosser (Ed.) *Nitrification*. IRL Press. Oxford, UK.
- Zhu, S., Chen, S., 2001. Effects of organic carbon on nitrification rate in fixed film biofilters. *Aquacult. Eng.* 25, 1-11. [https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(01\)00071-1](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(01)00071-1)

## CAPÍTULO 1

### **FERTILIZAÇÃO COM SAIS DE NITROGÊNIO VERSUS DISPONIBILIDADE DE SUBSTRATOS: DUAS ESTRATÉGIAS PARA OTIMIZAR O PROCESSO DE NITRIFICAÇÃO DURANTE A PRODUÇÃO DO CAMARÃO BRANCO *Litopenaeus vannamei*.**

Fabiane da Paz Serra \*, Wilson Wasielesky Jr, Paulo Cesar Abreu

Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Instituto de Oceanografia, Universidade  
Federal do Rio Grande – FURG

\* Autor correspondente

*Artigo publicado na revista Aquaculture: 543 (2021) 736997*

*doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.736997*

## Resumo

Este trabalho teve como objetivo avaliar o uso de sais inorgânicos (cloreto de amônio –  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e/ou nitrito de sódio –  $\text{NaNO}_2$ ) e a disponibilidade de substratos (biofilme e bioflocos) no estabelecimento das bactérias nitrificantes e eficiência do processo de nitrificação, antes e durante a produção dos camarões. Foram realizados três experimentos em diferentes sistemas de produção denominados: água clara, biofilme e bioflocos, divididos em duas fases: 1) fertilização inorgânica e 2) produção dos camarões, ambas realizadas em tanques de 200 L e salinidade 25. Cada experimento foi composto pelos seguintes tratamentos: 1)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – adição de cloreto de amônio, com concentração final de  $1,75 \text{ mg TAN L}^{-1}$ ; 2)  $\text{NaNO}_2$  – adição de nitrito de sódio, com concentração final de  $7,6 \text{ mg NO}_2^- \text{-N L}^{-1}$ ; e 3)  $\text{NH}_4\text{Cl} + \text{NaNO}_2$  – adição de cloreto de amônio e nitrito de sódio, com concentrações finais de  $1,75 \text{ mg TAN L}^{-1}$  e  $7,6 \text{ mg NO}_2^- \text{-N L}^{-1}$ . Na fase de fertilização inorgânica os experimentos água clara e biofilme iniciaram com água do mar previamente tratada, em oposição ao experimento bioflocos, no qual foi utilizado 10% de água rica em bioflocos. Nos três experimentos, a fertilização inorgânica foi realizada nos três primeiros dias experimentais. Na segunda fase, os camarões foram estocados nas unidades experimentais previamente fertilizadas, sendo adicionado um tratamento denominado controle, tendo início em água do mar previamente tratada. Entretanto, a adição de substratos artificiais não maturados e carbono orgânico foram utilizados para a formação do biofilme e bioflocos, respectivamente. Os experimentos biofilme e bioflocos resultaram no incremento do nitrato ao final da fase de fertilização inorgânica. Este resultado foi em contraste com o experimento água clara, onde não houve diminuição de nitrito, com concentrações  $\geq 6 \text{ mg NO}_2^- \text{-N L}^{-1}$  no final do experimento, em ambos os tratamentos que foram adicionados o nitrito de sódio. Após a estocagem dos camarões, o experimento biofilme apresentou maior eficiência no processo de nitrificação, resultando em menores concentrações de nitrito, com picos de aproximadamente  $3 \text{ mg NO}_2^- \text{-N L}^{-1}$ , considerando que no experimento bioflocos foram de aproximadamente  $10 \text{ mg NO}_2^- \text{-N L}^{-1}$ . O experimento biofilme resultou na maior biomassa final de camarões em comparação ao experimento bioflocos. Assim, este estudo demonstrou a importância de estimular previamente as bactérias nitrificantes com adição de sais de nitrogênio. No entanto, ambos os experimentos com uso de substratos, foram capazes de manter as concentrações de amônia e nitrito em níveis seguros durante a produção de *L. vannamei*,

principalmente o biofilme, provavelmente devido às melhores condições para o estabelecimento e atividade das bactérias nitrificantes.

**Palavras-chave:** Água clara, Biofilme, Bioflocos, Cloreto de amônio, Nitrito de sódio

## **1. Introdução**

Em sistemas de produção intensiva, o nitrogênio (N) é um nutriente essencial para os microorganismos, entretanto em excesso, torna-se prejudicial aos organismos produzidos devido à sua toxicidade, principalmente a amônia e o nitrito (Lin & Chen, 2001, 2003). Nesses casos, podem ocorrer perdas significativas na produção, dependendo das concentrações e período de exposição a estes compostos nitrogenados, principalmente em elevadas densidades de estocagem (Avnimelech, 2007; Romano & Zeng, 2013).

Sistemas com mínima ou nenhuma renovação de água, permite a intensificação da produção e favorecem a proliferação e o estabelecimento de microorganismos, como bactérias heterotróficas e/ou nitrificantes. Desta forma, grupos específicos de bactérias envolvidas no ciclo do N, são responsáveis pela remoção biológica do N. Por exemplo, a assimilação da amônia pode ocorrer pela ação de bactérias heterotróficas, que transformam esse elemento em biomassa bacteriana. Além disso, a biomassa microbiana gerada é fonte natural de alimento para os organismos produzidos, contribuindo para sua nutrição e beneficiando seu desempenho zootécnico (Wasielesky et al., 2006; Abreu et al., 2007). No entanto, a transformação completa de amônia e nitrito em nitrato, ocorre apenas pela atividade das bactérias nitrificantes.

Na tecnologia de bioflocos (BFT), a remoção biológica do N é realizada por microalgas e bactérias heterotróficas e nitrificantes (Ebeling et al., 2006). No entanto, as duas principais vias são realizadas por bactérias heterotróficas e nitrificantes, uma vez que as microalgas não podem existir por muito tempo nesses sistemas devido à limitação de luz. Em relação às bactérias heterotróficas, a assimilação da amônia é estimulada após a adição de uma fonte de carbono orgânico, como o melaço (Avnimelech, 1999; Ebeling et al., 2006; Hargreaves, 2006; Serra et al., 2015). Devido ao rápido crescimento e maior produção bacteriana, a amônia é rapidamente assimilada e imobilizada em biomassa bacteriana. Entretanto, a amônia pode retornar rapidamente ao sistema quando as bactérias forem pastadas por protozoários (Silva et al.,

2013). Além disso, a ação das bactérias heterotróficas é limitada à assimilação da amônia, uma vez que não atuam na remoção do nitrito. Somente as bactérias nitrificantes são capazes de remover biologicamente a amônia e o nitrito, através da oxidação desses elementos a nitrato, em um processo conhecido como nitrificação.

A nitrificação começa quando a amônia está disponível, promovendo a proliferação das bactérias amônio oxidantes (AOB), que produzem nitrito como subproduto. Em seguida, as bactérias nitrito oxidantes (NOB) realizam a segunda etapa do processo de nitrificação, com a oxidação do nitrito a nitrato, menos nocivo aos organismos produzidos (Arp, 2009; Ebeling et al., 2006; Ward, 2013). No entanto, durante a oxidação da amônia a nitrato, o fornecimento de energia gerado é relativamente baixo em relação ao substrato oxidado. Isso ocorre porque as bactérias nitrificantes fixam seu próprio carbono inorgânico e dependem exclusivamente de amônia e nitrito como única fonte de energia, AOB e NOB, respectivamente, resultando no crescimento lento e baixo rendimento celular (Wood, 1986; Winogradsky, 1891).

Devido aos problemas ocasionados pela intensificação dos sistemas aquícolas, é de extrema importância acelerar o estabelecimento e a atividade das bactérias nitrificantes, no intuito de manter o sistema em equilíbrio. Estratégias de manejo são necessárias para minimizar o aumento excessivo do N tóxico, e manter as concentrações em níveis seguros para os organismos durante a produção.

Como mencionado anteriormente, as bactérias nitrificantes utilizam o N inorgânico como fonte de energia para realizar o processo de nitrificação. Assim, ao disponibilizar previamente amônia e nitrito na forma de sais de cloreto de amônio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) e nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ), as AOB e NOB, respectivamente, podem ser beneficiadas, acelerando sua proliferação e o processo de nitrificação. Esse manejo de fertilização inorgânica tem sido utilizado na produção intensiva do camarão *L. vannamei*, com o intuito de estimular previamente as bactérias nitrificantes (Ferreira et al., 2020a, Ferreira et al., 2020b; Lara et al., 2016; Morais et al., 2020; Ootshi et al., 2011).

Por outro lado, a atividade das bactérias nitrificantes tem sido associada à disponibilidade de substratos, na forma de bioflocos e biofilmes, disponibilizando maior área de superfície, e desta forma, contribuindo com o estabelecimento e colonização das bactérias nitrificantes e melhor atividade desses microorganismos na metabolização dos compostos nitrogenados. Os bioflocos também promovem a fixação e colonização de microorganismos, aumentando sua capacidade metabólica. No entanto,

microorganismos aderidos a uma superfície fixa, como o biofilme, são mais eficientes do que aqueles aderidos em substratos suspensos na coluna da água (bioflocos), devido a maior área de superfície disponível para a colonização de bactérias de crescimento lento, como as nitrificantes (Hargreaves, 2006; Robles-Porchas et al., 2020; Wang et al., 2020).

Nesse contexto, diferentes estratégias, como adição de sais de nitrogênio e/ou disponibilidade de substrato, devem ser testadas a fim de controlar o N tóxico mediante o processo de nitrificação durante a produção dos camarões em elevadas densidades de estocagens. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência da adição de sais de nitrogênio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  e/ou  $\text{NaNO}_2$ ) e a disponibilidade de substratos (biofilmes e bioflocos) no estabelecimento das bactérias nitrificantes e eficiência do processo de nitrificação, antes e após a estocagem do *L. vannamei*.

## **2. Material e métodos**

### *2.1. Local e instalações*

Este estudo foi realizado na Estação Marinha de Aquicultura, no Instituto de Oceanografia da Universidade Federal do Rio Grande (EMA – FURG).

### *2.2. Delineamento experimental*

Foram realizados três experimentos em três sistemas de produção distintos, divididos em duas fases experimentais. Ambas as fases experimentais foram realizadas em tanques circulares de 200 L em salinidade 25, aerados continuamente por meio de mangueiras microperfuradas (Aerotubes®). Cada fase experimental teve a duração de 30 dias, totalizando 60 dias de estudo.

Na primeira fase, definida como fertilização inorgânica, foram adicionados sais de cloreto de amônio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) e/ou nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) no intuito de estimular as bactérias nitrificantes. As fertilizações foram realizadas durante os três dias iniciais, em concentrações equivalentes à metade do nível de segurança para a espécie *L. vannamei* em salinidade 25 (Lin & Chen, 2001, 2003). Neste período, as concentrações de amônia e nitrito eram mensuradas diariamente, sendo posteriormente realizada a adição de sais com base nas diferenças das concentrações definidas para manter em  $1,75 \text{ mg TAN L}^{-1}$  e  $7,6 \text{ mg NO}_2^- \text{-N L}^{-1}$ .

Na segunda fase do experimento, definida como produção dos camarões, esses foram estocados nas mesmas unidades experimentais previamente fertilizadas, além do

tratamento controle. O manejo da amônia foi realizado por meio de renovações de água no experimento de água clara, sempre que as concentrações excedessem o nível de segurança para a espécie *L. vannamei*, ou seja, 3,55 mg TAN L<sup>-1</sup> (Lin & Chen, 2001). No experimento bioflocos, quando as concentrações excediam 1 mg TAN L<sup>-1</sup>, a fertilização orgânica com melaço foi realizada na relação C:N de 6:1 (Serra et al., 2015). Nenhum manejo foi realizado no experimento biofilme.

### 2.2.1 – Experimento água clara

Os tanques foram preenchidos com água do mar filtrada, clorada e declorada. O experimento consistiu em quatro tratamentos com três repetições cada, denominados: 1) NH<sub>4</sub>Cl – concentração final de 1,75 mg TAN L<sup>-1</sup>; 2) NaNO<sub>2</sub> – concentração final de 7,6 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N L<sup>-1</sup>; 3) NH<sub>4</sub>Cl+NaNO<sub>2</sub> – concentrações finais de 1,75 mg TAN L<sup>-1</sup> e 7,6 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N L<sup>-1</sup>, respectivamente; e 4) Controle – com água do mar filtrada, clorada e declorada e sem fertilização inorgânica. Este quarto tratamento só foi estabelecido na fase de produção dos camarões.

Após 30 dias, os camarões (0,19 ± 0,03 g) foram estocados nas unidades experimentais na densidade de 1000 m<sup>-3</sup> (200 camarões por tanque). Os camarões foram alimentados com dietas comerciais contendo 40% de proteína bruta (Guabi, Campinas, Brasil) duas vezes ao dia (Jory et al., 2001).

### 2.2.2 – Experimento biofilme

Os substratos artificiais utilizados para a colonização das bactérias nitrificantes no biofilme foram Needlona® não flutuante, composto por 100% de fibra de poliéster, cobrindo 200% da área lateral do tanque. Os tanques foram preenchidos com água do mar filtrada, clorada e declorada e a adição de substratos artificiais não maturados. O experimento consistiu em quatro tratamentos com três repetições cada, denominados: 1) NH<sub>4</sub>Cl – concentração final de 1,75 mg TAN L<sup>-1</sup>; 2) NaNO<sub>2</sub> – concentração final de 7,6 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N L<sup>-1</sup>; 3) NH<sub>4</sub>Cl+NaNO<sub>2</sub> – concentrações finais de 1,75 mg TAN L<sup>-1</sup> e 7,6 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N L<sup>-1</sup>, respectivamente; e 4) Controle – com adição de substrato artificial não maturado e sem fertilização inorgânica, tendo início apenas na fase de produção dos camarões.

Na fase de produção, os camarões (4,40 ± 0,12 g) foram estocados nas unidades experimentais na densidade de 300 m<sup>-3</sup> (60 camarões por tanque). Os camarões foram

alimentados com dietas comerciais contendo 38% de proteína bruta (Guabi, Campinas, Brasil) duas vezes ao dia (Jory et al., 2001).

### 2.2.3 – *Experimento bioflocos*

A formação dos bioflocos, foi realizado 30 dias antes do início do experimento, para serem utilizados como inóculo bacteriano na fase de fertilização inorgânica. A amônia era indetectável e a concentração de nitrito do inóculo era de 44,30 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N L<sup>-1</sup>. Dez por cento do volume total foi adicionado como inóculo às unidades experimentais, resultando na concentração final de 4,73 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N L<sup>-1</sup>.

Na fase de fertilização inorgânica, os tanques foram preenchidos com 180 L de água do mar filtrada, clorada e declorada e 20 L de inóculo bacteriano. O experimento consistiu em quatro tratamentos com três repetições cada: 1) NH<sub>4</sub>Cl – concentração final de 1,75 mg TAN L<sup>-1</sup>; 2) NaNO<sub>2</sub> – concentração final de 7,6 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N L<sup>-1</sup>; 3) NH<sub>4</sub>Cl+NaNO<sub>2</sub> – concentrações finais de 1,75 mg TAN L<sup>-1</sup> e 7,6 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N L<sup>-1</sup>, respectivamente; e 4) controle – água do mar filtrada, clorada e declorada e fertilização orgânica para a formação dos bioflocos. A fertilização orgânica foi realizada com adição de melão, mantendo a relação C:N de 15:1 durante os três primeiros dias experimentais (Serra et al., 2015).

A densidade de estocagem dos camarões (2,92 ± 0,11 g) foi de 300 m<sup>-3</sup> (60 camarões por tanque). Os camarões foram alimentados duas vezes ao dia com dietas comerciais contendo 38% de proteína bruta (Guabi, Campinas, Brasil) (Jory et al., 2001).

### 2.3. *Qualidade de água*

Nos três experimentos e em ambas as fases experimentais, temperatura, oxigênio dissolvido, pH e salinidade foram mensurados diariamente. As concentrações de amônia (TAN) e nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N) foram mensurados diariamente, seguindo as metodologias descritas por UNESCO (1983) e Aminot e Chaussepied (1983), respectivamente. A alcalinidade total foi mensurada duas vezes por semana de acordo com a APHA (2012) e as concentrações de nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N) uma vez por semana de acordo com García-Robledo et al. (2014). Os sólidos suspensos totais (SST) foram mensurados no experimento bioflocos no início e no final da fase com camarões de acordo com Strickland e Parsons (1972).

#### 2.4. Desempenho zootécnico

O desempenho zootécnico dos camarões foi avaliado através de biometrias semanais. Ao final dos experimentos, o peso final (g), biomassa final (g) e taxa de sobrevivência foram calculados para todos os camarões de acordo com as seguintes equações:

Biomassa final (g) = peso médio x população final.

Sobrevivência (%) = (número final de camarão/número inicial de camarão) x 100.

#### 2.5. Análise estatística

A validade das análises foi confirmada com testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Levene). Após testar essas premissas, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) para detectar possíveis diferenças entre os tratamentos. Quando ocorreram diferenças significativas, foi aplicado o teste post hoc de Tukey. Por outro lado, se os pressupostos estatísticos não foram confirmados, a análise dos dados foi avaliada pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de um teste de comparação múltipla. Todas as análises estatísticas foram realizadas com nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ) (ZAR, 2010).

### 3. Resultados

#### 3.1 – Experimento água clara

Durante a fase de fertilização inorgânica os parâmetros de qualidade de água variaram da seguinte forma: temperatura ( $26,45 \pm 0,07 - 27,09 \pm 0,08$ ), oxigênio dissolvido ( $7,45 \pm 0,03 - 7,50 \pm 0,05 \text{ mg L}^{-1}$ ), pH ( $8,54 \pm 0,00 - 8,55 \pm 0,00$ ) e alcalinidade ( $170,83 \pm 1,79 - 177,17 \pm 1,62 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ ). Essas variáveis não diferiram entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ). No entanto, foram observadas diferenças estatísticas nos compostos nitrogenados (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores médios ( $\pm$  erro padrão) dos compostos nitrogenados durante ambas as fases dos experimentos água clara, biofilme e bioflocos.

Experimentos	Fases	Parâmetros (mg L <sup>-1</sup> )	Tratamentos			
			NH <sub>4</sub> Cl	NaNO <sub>2</sub>	NH <sub>4</sub> Cl+NaNO <sub>2</sub>	Controle
Água clara	Fertilização inorgânica	TAN	0.72 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	0.03 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.74 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	
		NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N	0.03 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	7.14 $\pm$ 0.21 <sup>b</sup>	7.33 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>	
		NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	1.09 $\pm$ 0.43 <sup>b</sup>	1.30 $\pm$ 0.43 <sup>b</sup>	
	Produção dos camarões	TAN	1.66 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	2.98 $\pm$ 0.62 <sup>b</sup>	2.27 $\pm$ 0.39 <sup>a</sup>	2.34 $\pm$ 0.47 <sup>b</sup>
		NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N	4.43 $\pm$ 0.94 <sup>b</sup>	3.57 $\pm$ 1.16 <sup>bc</sup>	5.13 $\pm$ 1.06 <sup>c</sup>	0.14 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>
		NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	0.62 $\pm$ 0.23 <sup>b</sup>	1.31 $\pm$ 0.70 <sup>bc</sup>	1.97 $\pm$ 0.97 <sup>c</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
Biofilme	Fertilização inorgânica	TAN	0.43 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.52 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>	
		NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N	0.30 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	5.79 $\pm$ 0.44 <sup>b</sup>	6.26 $\pm$ 0.70 <sup>c</sup>	
		NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	0.46 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	2.50 $\pm$ 0.30 <sup>b</sup>	2.46 $\pm$ 0.48 <sup>b</sup>	
	Produção dos camarões	TAN	0.33 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	1.41 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup>	0.35 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	2.74 $\pm$ 0.18 <sup>c</sup>
		NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N	0.77 $\pm$ 0.32 <sup>a</sup>	1.18 $\pm$ 0.66 <sup>a</sup>	1.15 $\pm$ 0.55 <sup>a</sup>	8.41 $\pm$ 0.35 <sup>b</sup>
		NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	8.44 $\pm$ 2.16 <sup>a</sup>	14.41 $\pm$ 2.39 <sup>a</sup>	15.07 $\pm$ 1.90 <sup>a</sup>	0.13 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>
Bioflocos	Fertilização inorgânica	TAN	0.11 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.12 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	
		NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N	3.70 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	4.56 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	5.77 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	
		NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	0.53 $\pm$ 0.10	1.60 $\pm$ 0.64	0.44 $\pm$ 0.10	
	Produção dos camarões	TAN	0.14 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.23 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.22 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	1.56 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>
		NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N	4.30 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>	4.04 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	4.21 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	9.50 $\pm$ 0.20 <sup>b</sup>
		NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	11.28 $\pm$ 1.35 <sup>b</sup>	13.44 $\pm$ 0.96 <sup>b</sup>	11.57 $\pm$ 0.86 <sup>b</sup>	1.19 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). TAN: nitrogênio amoniacal total, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N: nitrito e NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N: nitrato.

A suplementação com sais inorgânicos nos três dias iniciais na fase de fertilização inorgânica resultou no aumento inicial das concentrações de amônia e/ou nitrito. Os tratamentos NH<sub>4</sub>Cl e NH<sub>4</sub>Cl+NaNO<sub>2</sub> resultaram em concentrações mais elevadas de amônia, diferindo estatisticamente do tratamento NaNO<sub>2</sub> ( $p < 0,05$ ). Da mesma forma, ambos os tratamentos com adição de NaNO<sub>2</sub>, resultaram em maiores concentrações de nitrito e nitrato, diferindo estatisticamente do tratamento NH<sub>4</sub>Cl ( $p < 0,05$ ). No entanto, diferentemente da amônia, que permaneceu indetectável ao final do experimento (Figura 1 – A), ambos os tratamentos com adição de NaNO<sub>2</sub> apresentaram concentrações estáveis de nitrito. Ao final do experimento as concentrações foram de 0,04, 6,00 e 6,21 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N L<sup>-1</sup> nos tratamentos NH<sub>4</sub>Cl, NaNO<sub>2</sub> e NH<sub>4</sub>Cl+NaNO<sub>2</sub>, respectivamente (Figura 1 – B). As concentrações de nitrato ao final desta fase permaneceram próximas a 1 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N L<sup>-1</sup> nos tratamentos com adição de NaNO<sub>2</sub> e indetectáveis no tratamento NH<sub>4</sub>Cl (Figura 1 – C).

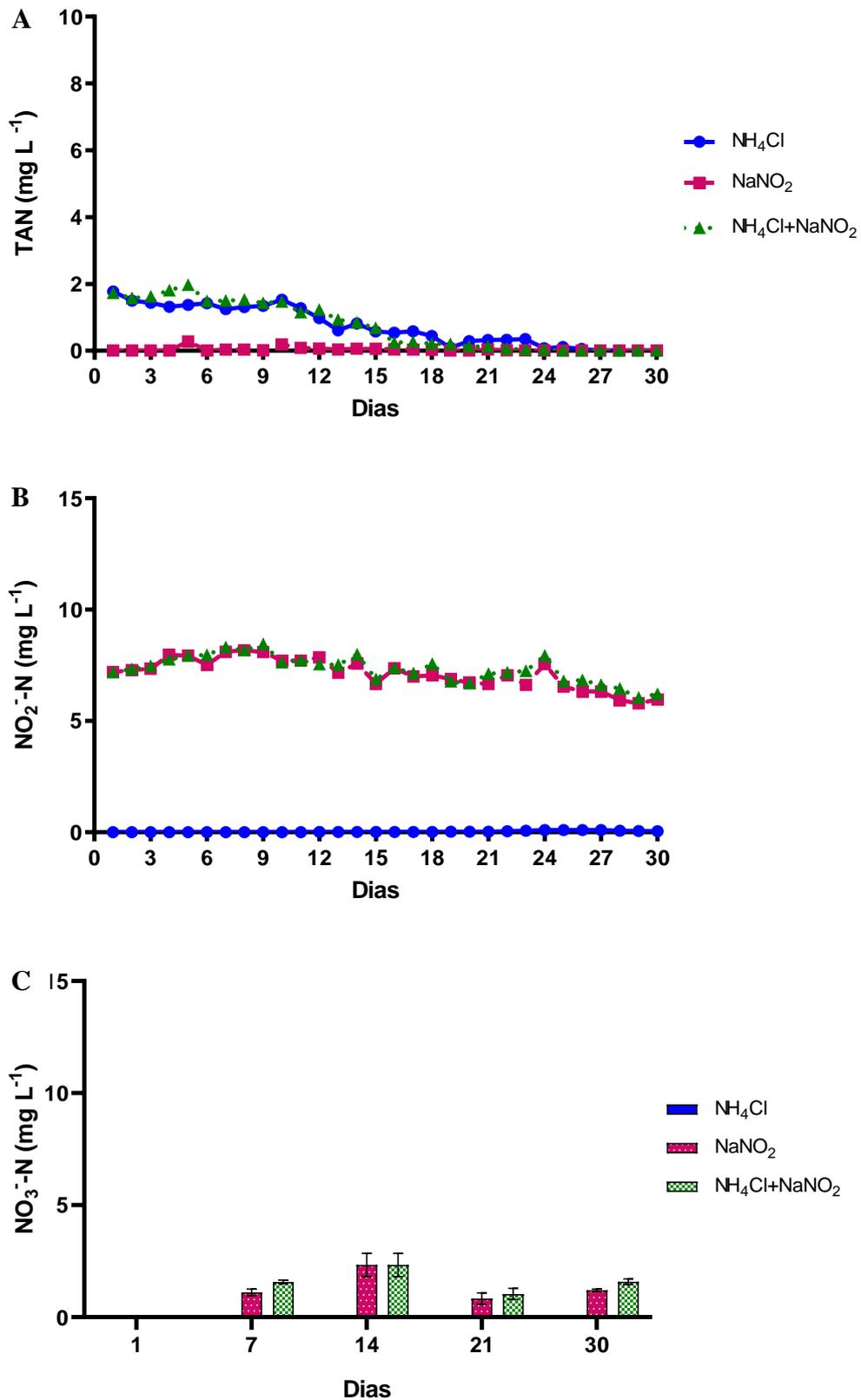


Figura 1 - Valores médios ( $\pm$  erro padrão) dos compostos nitrogenados durante a fase de fertilização inorgânica no experimento água clara. A) Amônia, B) Nitrito e C) Nitrato.

Na fase de produção dos camarões, a temperatura ( $25,70 \pm 0,15 - 26,12 \pm 0,07$ ), pH ( $8,34 \pm 0,01 - 8,37 \pm 0,01$ ) e alcalinidade ( $152,50 \pm 2,50 - 169,76 \pm 1,31$  mg  $\text{CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ ) não diferiram entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ). No entanto, as concentrações de oxigênio dissolvido ( $6,70 \pm 0,03 - 7,33 \pm 0,05$  mg  $\text{L}^{-1}$ ) foram inferiores no tratamento controle ( $p < 0,05$ ).

Após a estocagem dos camarões às unidades experimentais, as concentrações de amônia tenderam ao incremento, exigindo renovações de 50% do volume total de água em todos os tratamentos. Nos tratamentos previamente fertilizados, foram necessárias três renovações de água, sendo mais intensa no tratamento controle (três vezes mais). Ambos os tratamentos com adição de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  resultaram nas menores concentrações de amônia ( $p > 0,05$ ). Entretanto, apesar do tratamento  $\text{NaNO}_2$  e o controle não diferirem estatisticamente, no último dia experimental as concentrações de amônia passou a ser indetectável no tratamento  $\text{NaNO}_2$ , enquanto no tratamento controle tendeu ao incremento, com concentração final de  $3,66$  mg TAN  $\text{L}^{-1}$  (Figura 2 – A), resultando em menores concentrações de nitrito e nitrato, diferindo dos demais tratamentos ( $p < 0,05$ ). Os tratamentos  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e  $\text{NH}_4\text{Cl}+\text{NaNO}_2$  diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ), resultando em concentrações finais de  $18,24$  e  $16,96$  mg  $\text{NO}_2^- \text{-N L}^{-1}$ , respectivamente, no qual não diferiram do  $\text{NaNO}_2$  ( $p > 0,05$ ), com concentração final de  $13,41$  mg  $\text{NO}_2^- \text{-N L}^{-1}$ . Da mesma forma, as concentrações de nitrato diferiram estatisticamente entre os tratamentos  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e  $\text{NH}_4\text{Cl}+\text{NaNO}_2$  ( $p < 0,05$ ), com concentrações finais de  $2,15$  e  $4,73$  mg  $\text{NO}_3^- \text{-N L}^{-1}$ , respectivamente, não diferindo do  $\text{NaNO}_2$  ( $p > 0,05$ ), com concentração final de  $0,96$  mg  $\text{NO}_3^- \text{-N L}^{-1}$ . Ao final do experimento, o nitrito continuou a aumentar nos tratamentos previamente fertilizados, e o nitrato permaneceu indetectável no tratamento controle (Figuras 2 – B e C).

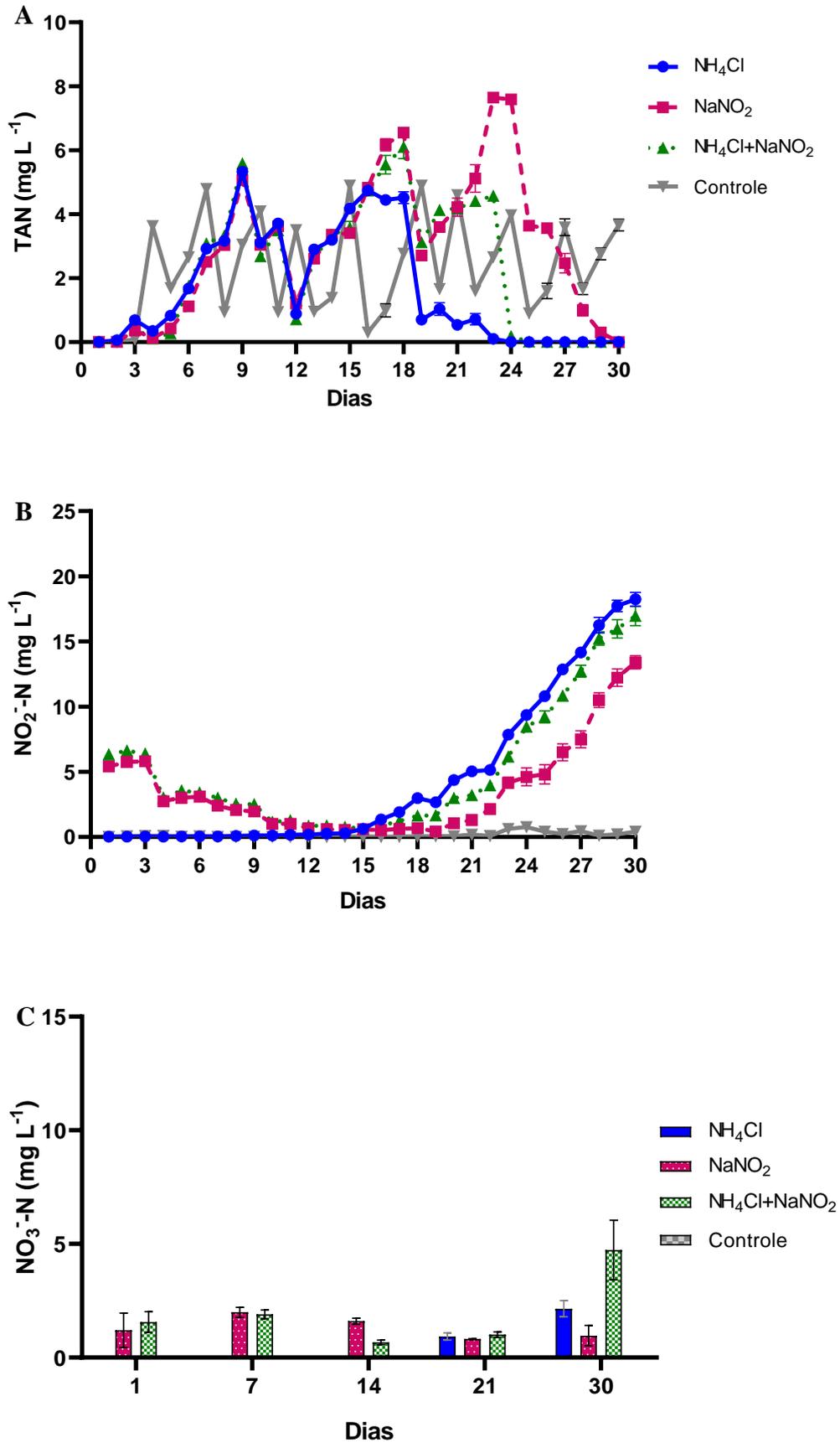


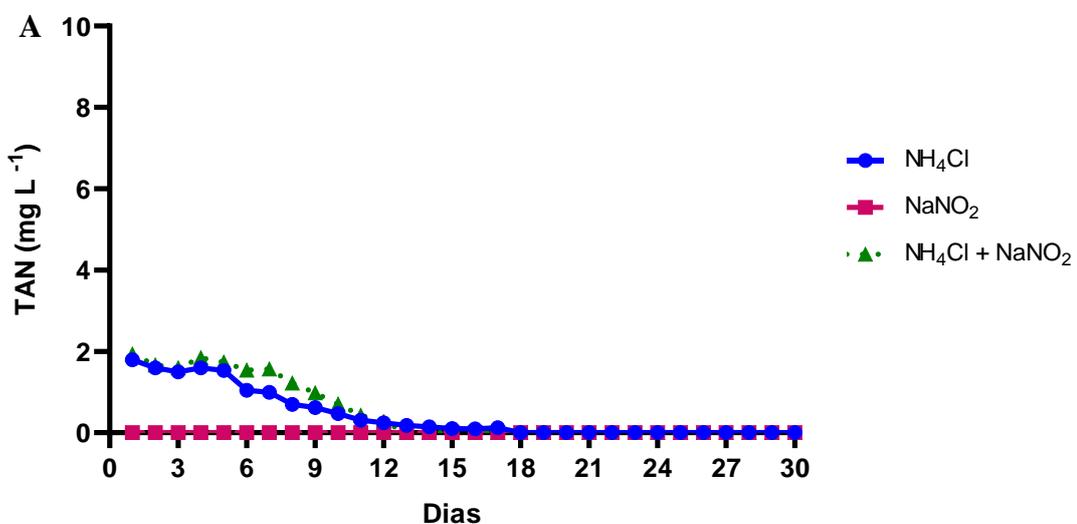
Figura 2 - Valores médios ( $\pm$  erro padrão) dos compostos nitrogenados durante a fase de produção dos camarões no experimento água clara. A) Amônia, B) Nitrito e C) Nitrato.

Os parâmetros zootécnicos dos camarões não diferiram ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos (Tabela 2).

### 3.2 – Experimento biofilme

Durante a fase de fertilização inorgânica, a temperatura ( $27,55 \pm 0,05 - 27,69 \pm 0,06$ ), oxigênio dissolvido ( $7,46 \pm 0,02 - 7,56 \pm 0,04 \text{ mg L}^{-1}$ ), pH ( $8,40 \pm 0,01 - 8,41 \pm 0,01$ ) e alcalinidade ( $170,83 \pm 1,79 - 177,17 \pm 1,62 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ ) não diferiram entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ). Diferenças estatísticas foram observadas entre os compostos nitrogenados em ambas as fases (Tabela 1).

Em ambos os tratamentos com adição de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , as concentrações de amônia foram significativamente superiores ao tratamento  $\text{NaNO}_2$  ( $p < 0,05$ ) (Figura 3 – A). O nitrito diferiu significativamente entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ), com concentrações mais elevadas no tratamento que recebeu ambos os sais ( $\text{NH}_4\text{Cl} + \text{NaNO}_2$ ), seguido pelos tratamentos  $\text{NaNO}_2$  e  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . A oxidação do nitrito a nitrato ocorreu na última semana experimental onde foi adicionado o  $\text{NaNO}_2$ , com concentrações finais de  $6,25$  e  $6,95 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$  nos tratamentos  $\text{NaNO}_2$  e  $\text{NH}_4\text{Cl} + \text{NaNO}_2$ , respectivamente, diferindo estatisticamente do tratamento  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $p < 0,05$ ), com concentração final abaixo de  $1 \text{ mg NO}_3^- \text{-N L}^{-1}$  (Figura 3 – B e C).



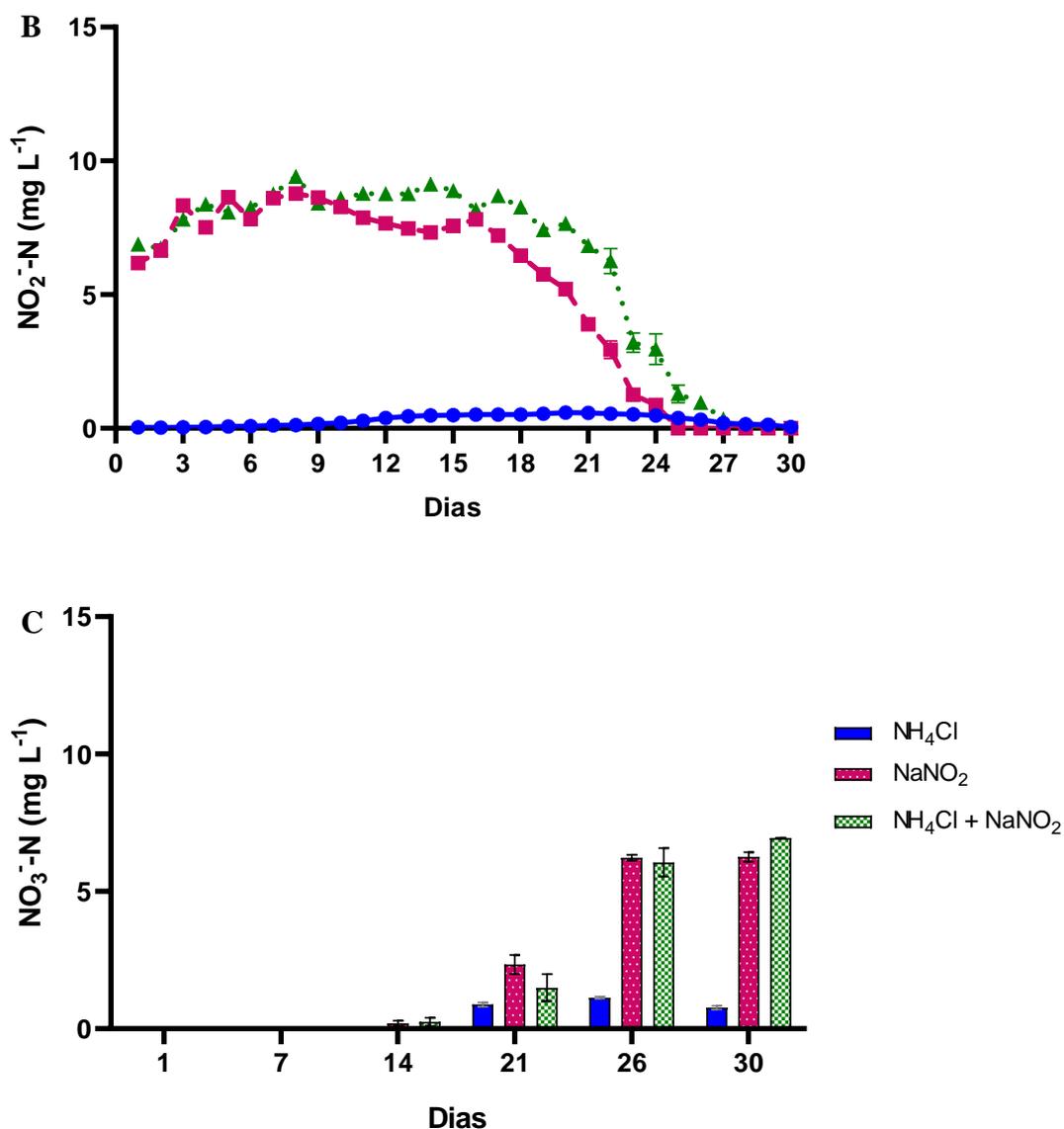
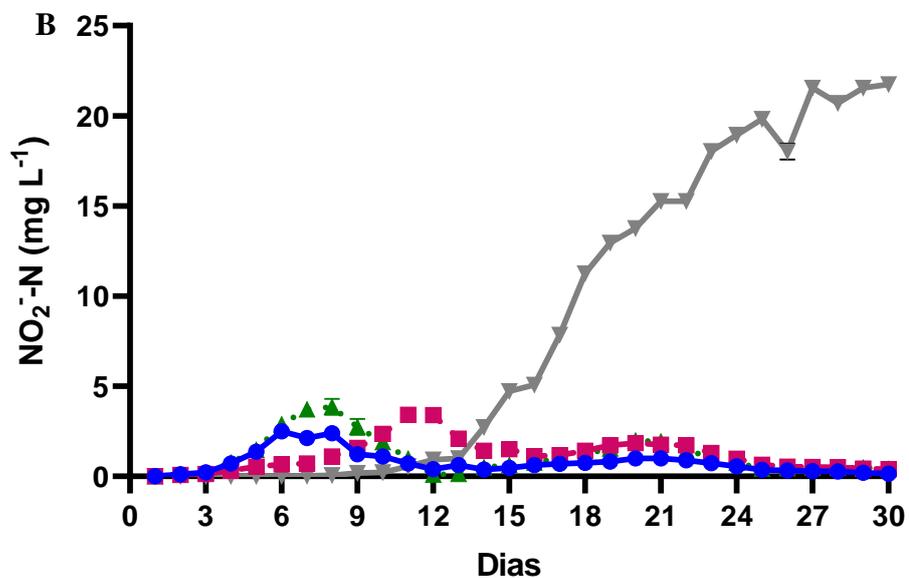
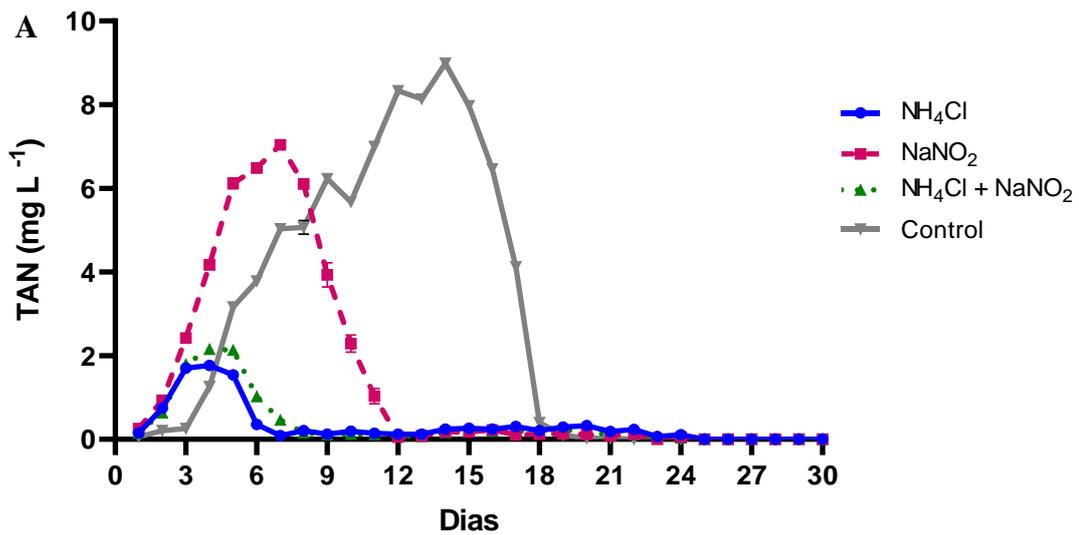


Figura 3 - Valores médios ( $\pm$  erro padrão) dos compostos nitrogenados durante a fase de fertilização inorgânica no experimento biofilme. A) Amônia, B) Nitrito e C) Nitrato.

Na fase de produção dos camarões, a temperatura ( $28,18 \pm 0,06 - 28,38 \pm 0,05$ ), oxigênio dissolvido ( $7,28 \pm 0,03 - 7,35 \pm 0,03 \text{ mg L}^{-1}$ ), pH ( $8,32 \pm 0,01 - 8,40 \pm 0,02$ ) e alcalinidade ( $169,00 \pm 2,65 - 188,50 \pm 2,01 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ ) não diferiram entre os tratamentos testados ( $p > 0,05$ ).

Na segunda fase, após a estocagem dos camarões, houve o aumento nas concentrações de amônia em todos os tratamentos testados. Os tratamentos NH<sub>4</sub>Cl e NH<sub>4</sub>Cl+NaNO<sub>2</sub> resultaram em menores concentrações, com valores máximos de 1,77 e 2,15 mg TAN L<sup>-1</sup>, respectivamente, não diferindo estatisticamente entre eles ( $p > 0,05$ ). As diferenças foram observadas entre os tratamentos NaNO<sub>2</sub> e controle ( $p <$

0,05), com valores máximos de 7,04 e 8,99 mg TAN L<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 4 – A). Os tratamentos com o biofilme previamente maturado, resultaram em menores concentrações de nitrito e maiores concentrações de nitrato, ambos os compostos diferindo estatisticamente do tratamento controle ( $p < 0,05$ ). As concentrações máximas foram de 2,49, 3,41, 3,85 e 21,75 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N L<sup>-1</sup> e 20,42, 27,77, 23,94 e 0,00 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N L<sup>-1</sup> nos tratamentos NH<sub>4</sub>Cl, NaNO<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub>Cl+NaNO<sub>2</sub> e controle, respectivamente (Figura 4 – B e C).



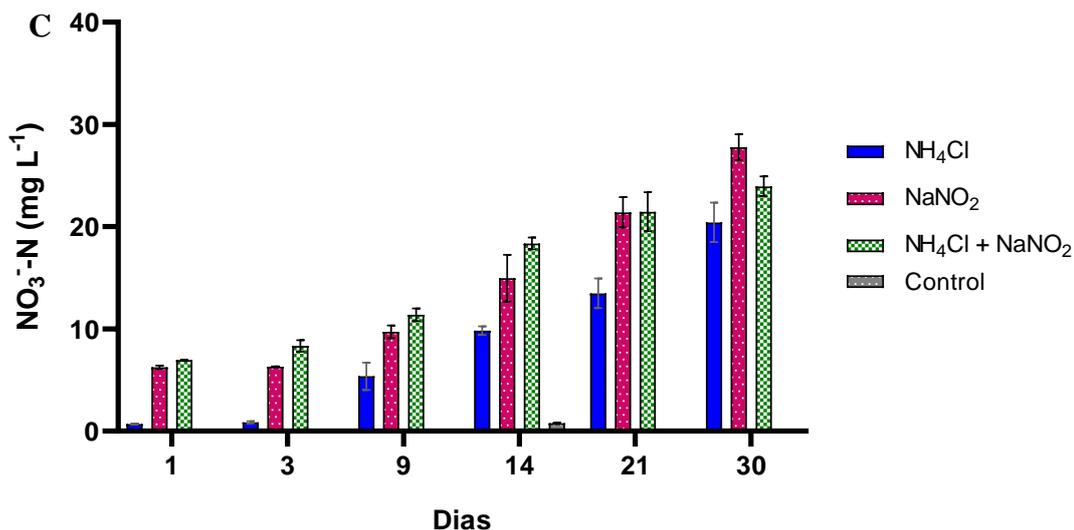


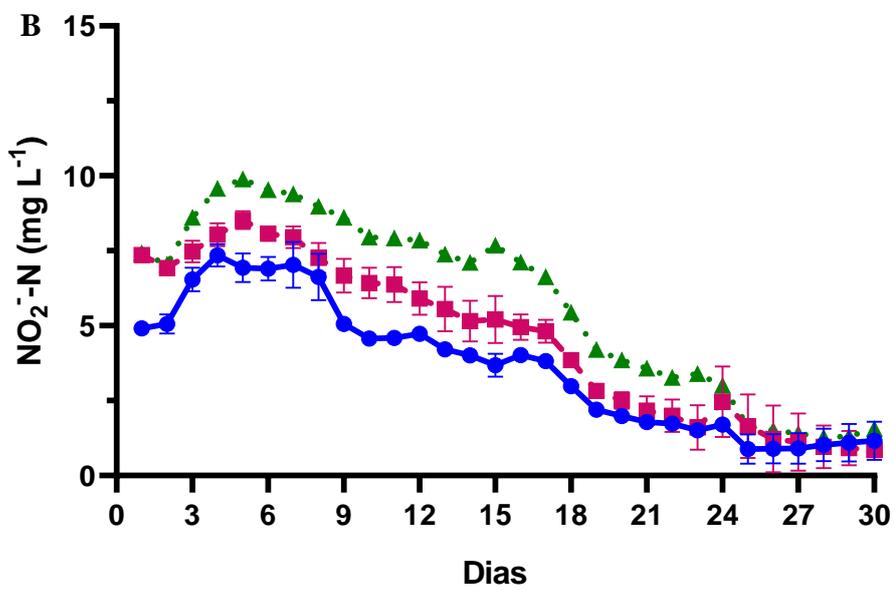
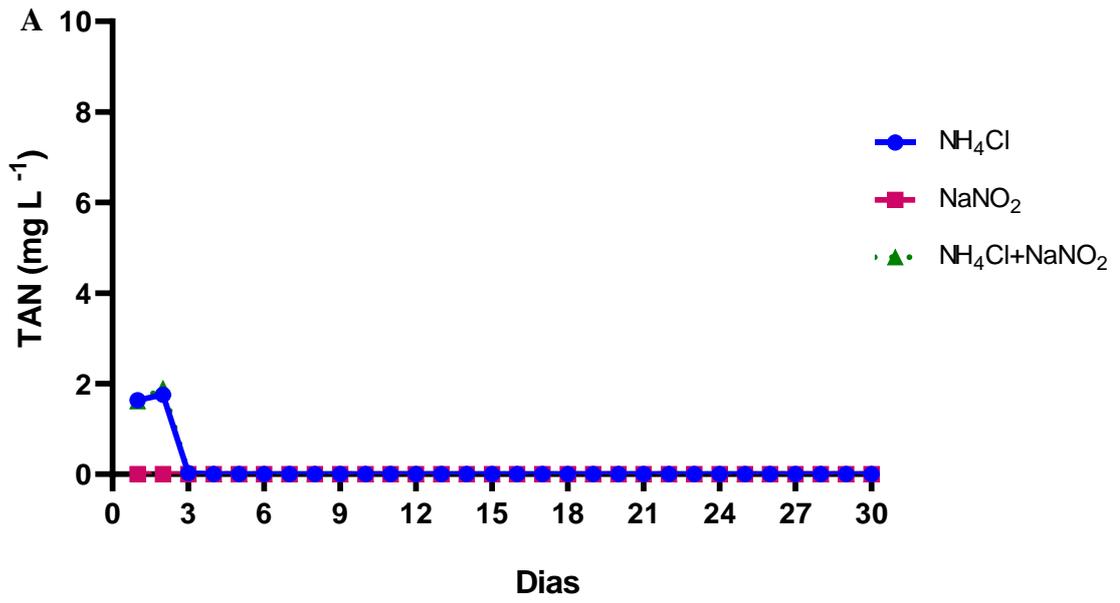
Figura 4 - Valores médios ( $\pm$  erro padrão) dos compostos nitrogenados durante a fase de produção dos camarões no experimento biofilme. A) Amônia, B) Nitrito e C) Nitrato.

Em relação aos parâmetros zootécnicos dos camarões, apenas a biomassa final diferiu estatisticamente entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ), sendo menor no controle (Tabela 2).

### 3.3 – Experimento bioflocos

Na fase de fertilização inorgânica, a temperatura ( $27,74 \pm 0,07 - 28,07 \pm 0,10$ ), oxigênio dissolvido ( $7,14 \pm 0,05 - 7,24 \pm 0,05 \text{ mg L}^{-1}$ ), pH ( $8,56 \pm 0,01 - 8,61 \pm 0,01$ ) e alcalinidade ( $167,00 \pm 1,41 - 177,17 \pm 1,62 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ ) não diferiram entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ). Diferenças estatísticas foram observadas entre os compostos nitrogenados em ambas as fases (Tabela 1).

Os tratamentos com cloreto de amônio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  e  $\text{NH}_4\text{Cl} + \text{NaNO}_2$ ) resultaram em maiores concentrações de amônia, diferindo estatisticamente tratamento  $\text{NaNO}_2$ , o qual permaneceu indetectável durante o período experimental (Figura 5 – A). Em relação ao nitrito, o tratamento  $\text{NH}_4\text{Cl} + \text{NaNO}_2$  resultou em maiores concentrações ( $p < 0,05$ ), diferindo estatisticamente dos demais tratamentos ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  e  $\text{NaNO}_2$ ), com concentrações finais inferiores a  $1 \text{ mg NO}_2^- \text{-N L}^{-1}$  em todos os tratamentos testados (Figura 5 – B). O nitrato não diferiu entre os tratamentos testados ( $p > 0,05$ ), com concentrações finais de  $1,16, 4,30$  e  $0,34 \text{ mg NO}_3^- \text{-N L}^{-1}$  nos tratamentos  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NaNO}_2$  e  $\text{NH}_4\text{Cl} + \text{NaNO}_2$ , respectivamente (Figura 5 – C).



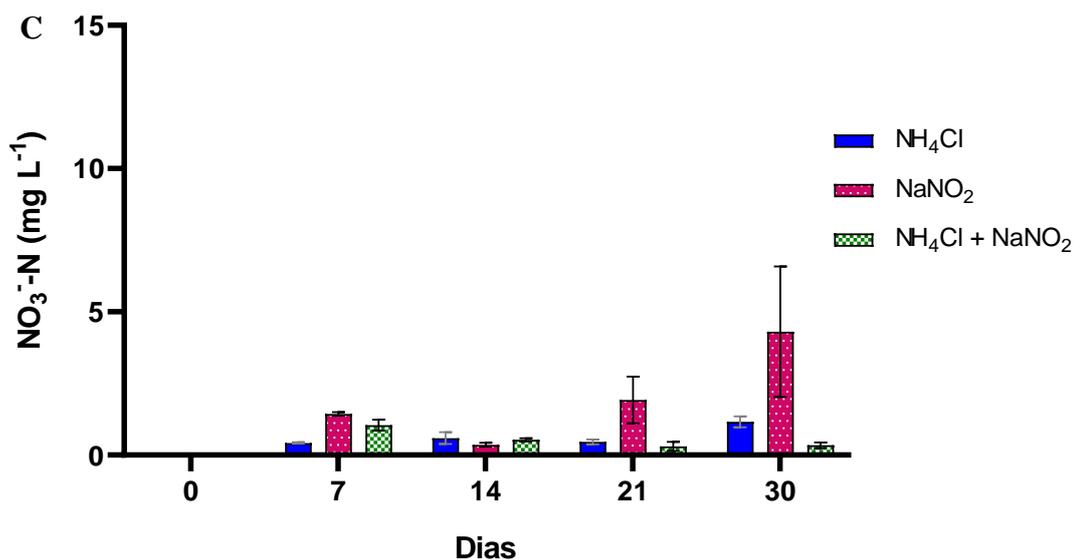
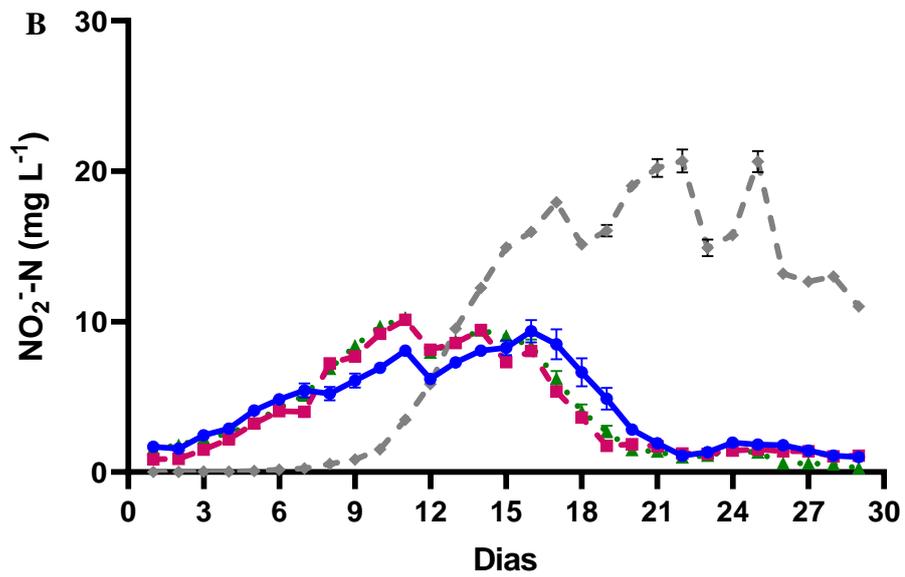
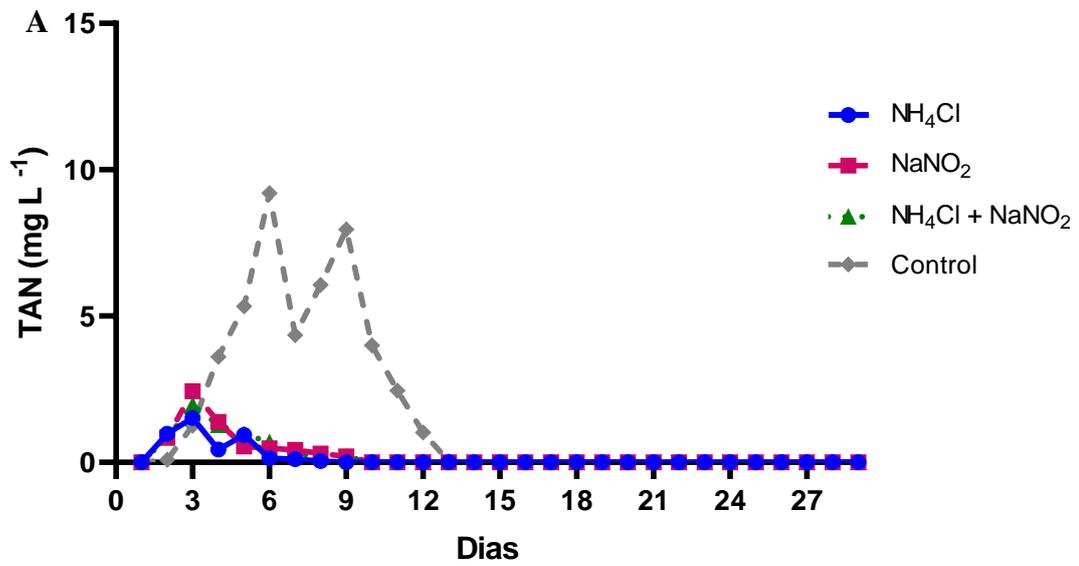


Figura 5 - Valores médios ( $\pm$  erro padrão) dos compostos nitrogenados durante a fase de fertilização inorgânica no experimento bioflocos. A) Amônia, B) Nitrito e C) Nitrato.

Na fase de produção dos camarões, a temperatura ( $28,07 \pm 0,10 - 28,53 \pm 0,08$ ), pH ( $8,02 \pm 0,02 - 8,06 \pm 0,02$ ) e alcalinidade ( $167,00 \pm 2,09 - 171,11 \pm 1,27$  mg  $\text{CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ ) não diferiram entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ). No entanto, as concentrações de oxigênio dissolvido ( $5,98 \pm 0,02 - 6,66 \pm 0,07$  mg  $\text{L}^{-1}$ ) foram inferiores no tratamento controle, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos ( $p < 0,05$ ). Os SST no início desta fase não diferiram entre os tratamentos previamente fertilizados ( $103,3 \pm 12,30 - 111,6 \pm 11,25$  mg  $\text{TSS L}^{-1}$ ) e foi indetectável no tratamento controle. Ao final do experimento, as concentrações não diferiram entre os tratamentos ( $485,1 \pm 23,80 - 515,5 \pm 33,15$  mg  $\text{TSS L}^{-1}$ ).

Após a estocagem dos camarões nas unidades experimentais, foram necessárias fertilizações orgânicas com melão para o controle da amônia. Nos tratamentos previamente fertilizados, a adição de melão foi realizada nos dias 2, 3 e 4, enquanto no tratamento controle, foram necessários quatro vezes mais. As concentrações máximas foram de 1,52, 2,43, 1,96 e 9,20 mg  $\text{TAN L}^{-1}$  nos tratamentos  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NaNO}_2$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl} + \text{NaNO}_2$  e controle, respectivamente (Figura 6 – A). Os tratamentos com adição de sais resultaram em menores concentrações de nitrito, com valores máximos de 9,35, 10,11, 10,25 e 20,68 mg  $\text{NO}_2^- \text{-N L}^{-1}$  nos tratamentos  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NaNO}_2$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl} + \text{NaNO}_2$  e controle, respectivamente (Figura 6 – B). As maiores concentrações de nitrato foram observadas nos tratamentos previamente fertilizados, com valores máximos de 30,91,

28,56, 29,92 e 6,84 mg  $\text{NO}_3^-$ -N  $\text{L}^{-1}$  nos tratamentos  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NaNO}_2$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}+\text{NaNO}_2$  e controle, respectivamente (Figura 6 – C).



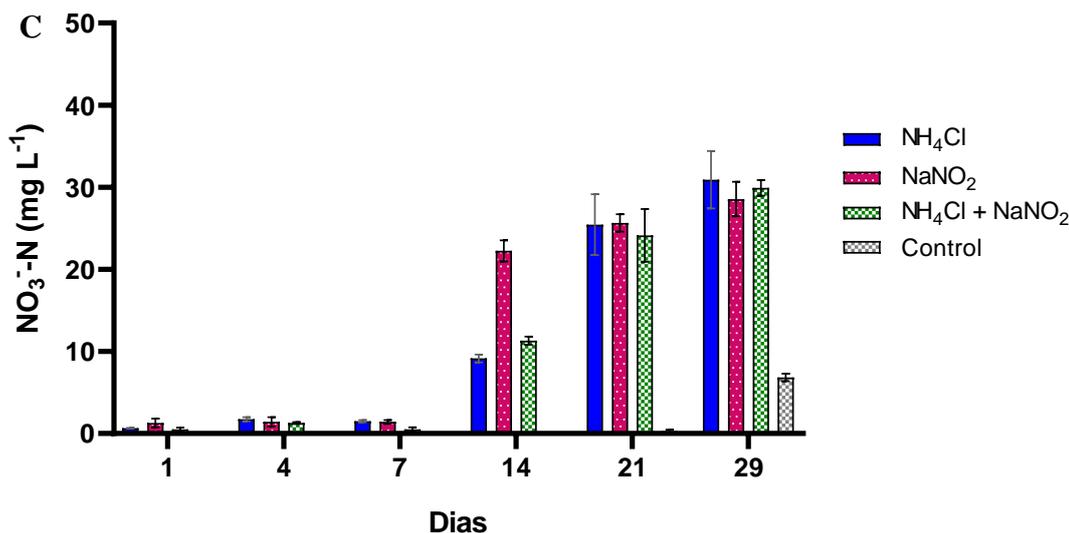


Figura 6 - Valores médios ( $\pm$  erro padrão) dos compostos nitrogenados durante a fase de produções dos camarões no experimento bioflocos. A) Amônia, B) Nitrito e C) Nitrato.

Os parâmetros zootécnicos dos camarões apresentaram diferenças significativas na sobrevivência e biomassa final, com o tratamento controle apresentando valores inferiores aos demais tratamentos (Tabela 2).

Tabela 02 – Valores médios ( $\pm$  erro padrão) dos parâmetros zootécnicos dos camarões nos experimentos água clara, biofilme e bioflocos.

Experimento	Parâmetros	Tratamentos			
		NH <sub>4</sub> Cl	NaNO <sub>2</sub>	NH <sub>4</sub> Cl+NaNO <sub>2</sub>	Controle
Água clara	Peso inicial (g)	0.19 $\pm$ 0.09	0.19 $\pm$ 0.09	0.19 $\pm$ 0.09	0.19 $\pm$ 0.09
	Peso final (g)	1.33 $\pm$ 0.36	1.39 $\pm$ 0.48	1.49 $\pm$ 0.39	1.28 $\pm$ 0.36
	Sobrevivência (%)	97.17 $\pm$ 0.76	97.17 $\pm$ 1.89	95.56 $\pm$ 3.66	96.56 $\pm$ 2.16
	Biomassa final (g)	256.00 $\pm$ 25.60	271.00 $\pm$ 19.20	282.30 $\pm$ 19.79	243.26 $\pm$ 23.21
Biofilme	Peso inicial (g)	4.40 $\pm$ 0.64	4.40 $\pm$ 0.64	4.40 $\pm$ 0.64	4.40 $\pm$ 0.64
	Peso final (g)	7.00 $\pm$ 1.40	7.71 $\pm$ 1.14	7.00 $\pm$ 1.45	6.13 $\pm$ 1.20
	Sobrevivência (%)	90.00 $\pm$ 10.00	89.17 $\pm$ 8.25	96.11 $\pm$ 4.19	77.50 $\pm$ 3.56
	Biomassa final (g)	377.29 $\pm$ 38.69 <sup>b</sup>	382.27 $\pm$ 49.40 <sup>b</sup>	360.57 $\pm$ 22.25 <sup>b</sup>	285.57 $\pm$ 39.50 <sup>a</sup>
Bioflocos	Peso inicial (g)	2.92 $\pm$ 0.58	2.92 $\pm$ 0.58	2.92 $\pm$ 0.58	2.92 $\pm$ 0.58
	Peso final (g)	5.22 $\pm$ 0.81	5.33 $\pm$ 0.66	5.58 $\pm$ 0.83	5.26 $\pm$ 1.00
	Sobrevivência (%)	91.11 $\pm$ 11.10 <sup>b</sup>	87.78 $\pm$ 4.81 <sup>b</sup>	86.67 $\pm$ 6.41 <sup>b</sup>	64.44 $\pm$ 7.70 <sup>a</sup>
	Biomassa final (g)	283.49 $\pm$ 19.13 <sup>b</sup>	280.84 $\pm$ 22.53 <sup>b</sup>	290.48 $\pm$ 45.09 <sup>b</sup>	204.10 $\pm$ 25.31 <sup>a</sup>

Letras diferentes na mesma linha representam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0.05$ ).

#### 4. Discussão

A suplementação de sais inorgânicos de amônia e/ou nitrito é a estratégia utilizada para maturar previamente os biofiltros em sistemas de recirculação de água (RAS), e mais recentemente vem sendo utilizada em sistemas de bioflocos (Ferreira et al., 2021, 2020; Lara et al., 2016; Moura et al., 2020; Otoshi et al., 2011). Outra

alternativa para estimular a proliferação e atividade de bactérias nitrificantes é através da disponibilidade de substratos, sejam suspensos ou aderidos, na forma de bioflocos ou biofilmes, respectivamente ( Krummenauer et al., 2014 ; Thompson et al., 2002 ).

Substratos artificiais para formação de biofilme têm sido amplamente utilizados em sistemas de bioflocos e em água clara para controlar os compostos nitrogenados (Ferreira et al., 2016; Morais et al., 2020; Thompson et al., 2002). Com o mesmo intuito, em sistemas de bioflocos, o uso de água rica em bioflocos como inóculo bacteriano de um sistema maduro, ou seja, com a nitrificação já está estabelecida e funcional, possibilita o início da produção com a comunidade bacteriana nitrificante estabelecida, evitando o incremento excessivo das concentrações de amônia e nitrito e seus efeitos tóxicos aos organismos produzidos (Krummenauer et al., 2014).

No presente estudo, a adição de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e/ou  $\text{NaNO}_2$  resultou no incremento inicial de amônia e/ou nitrito em todos os experimentos. Em alguns casos, houve a diminuição desses compostos nitrogenados ao final de ambas as fases experimentais, indicando a nitrificação efetiva. Por outro lado, a presença de substratos resultou na estabilização das bactérias nitrificantes, e conseqüentemente na eficiência no processo de nitrificação. Parece que as AOB foram estimuladas e conseguiram utilizar a amônia disponível. No entanto, o mesmo não ocorreu quando foi adicionado apenas o  $\text{NaNO}_2$ , como observado no experimento água clara, sem nenhum benefício direto as NOB.

Além das NOB serem dependentes das atividades das AOB e energeticamente menos favoráveis, a ausência de substratos resultou no acúmulo de nitrito no experimento de água clara. Sesuk et al. (2009) relataram que a maturação previa com  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , beneficiou a colonização das AOB no biofiltro. Entretanto, houve uma tendência de acúmulo de nitrito até o estabelecimento das NOB, numa densidade suficiente para metabolizar este composto. Além disso, Del'Duca et al. (2019) demonstraram que quando aderidas a um substrato, as bactérias nitrificantes são as responsáveis por otimizar o processo de nitrificação. O mesmo não foi observado em bactérias suspensas na coluna d'água. Assim, apesar da disponibilidade de nitrogênio, no qual possivelmente beneficiou apenas AOB, a ausência de substratos resultou no atraso do processo de nitrificação, sem a diminuição do nitrito. Isso fica evidente ao comparar os experimentos biofilme e água clara. Neste caso, a oxidação da amônia ocorreu entre os dias 25 e 27 no experimento água clara, o mesmo tempo necessário para o que o processo de nitrificação ocorresse no experimento biofilme.

Para melhorar a eficiência da remoção biológica de nitrogênio, o uso de substratos tem sido amplamente empregado. Em ambos os experimentos com substratos, ou seja, biofilmes ou bioflocos, combinado a adição de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e/ou  $\text{NaNO}_2$ , parece ter beneficiado as AOB e NOB, resultando no incremento do nitrato ao final de ambos os experimentos. No entanto, o biofilme parece ser mais eficiente, resultando no processo de nitrificação mais ativo do que observado no experimento bioflocos.

Na segunda fase, a estocagem dos camarões, nas unidades experimentais resultou no incremento da amônia nos três experimentos, devido às atividades metabólicas dos camarões. No entanto, as maiores concentrações de amônia estão diretamente relacionadas à fase anterior, ou seja, a de fertilização prévia com sais de N inorgânico. Desta forma, o aporte extra de N após a estocagem não foi imediatamente absorvido pela comunidade bacteriana nitrificante. Neste caso, essas não foram capazes de metabolizar o excesso de N, levando ao incremento excessivo da amônia, como observado no experimento água clara. Portanto, a disponibilidade de substratos beneficiou o estabelecimento das bactérias nitrificantes, sendo essa, uma excelente alternativa para mitigar os efeitos negativos dos compostos de maior toxicidade aos camarões, conforme observado nos experimentos biofilme e bioflocos.

No experimento água clara, foram necessárias renovações de água como estratégia de manejo a fim de manter as concentrações de amônia dentro dos níveis seguros para o *L. vannamei* (Hopkins et al., 1993; Lin & Chen, 2001). A ineficiência da estratégia de fertilização inorgânica, aliada às renovações de água, provavelmente não permitiu o estabelecimento da comunidade bacteriana nitrificante, ocasionando o acúmulo de nitrito durante a produção dos camarões. Por outro lado, as concentrações de amônia no tratamento controle permaneceram em níveis elevados durante todo o período experimental.

No experimento biofilme, os tratamentos  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e  $\text{NH}_4\text{Cl}+\text{NaNO}_2$  resultaram em menores concentrações de amônia, provavelmente devido à presença das AOB no início da produção. Desta forma, após a estocagem dos camarões, essas bactérias foram capazes de metabolizar a amônia, mantendo as concentrações abaixo dos níveis seguros para a espécie produzida. No entanto, no tratamento  $\text{NaNO}_2$ , onde apenas NOB foram estimuladas na fase de fertilização, as concentrações de amônia ultrapassaram o nível seguro para *L. vannamei* (Lin & Chen, 2001). No entanto, após a estocagem dos camarões, as AOB provavelmente foram estimuladas pela disponibilidade de amônia

oriunda da excreção dos camarões e ração não consumida. As concentrações de nitrito nos tratamentos previamente fertilizados permaneceram abaixo do nível seguro para *L. vannamei* (Lin & Chen, 2003), em oposição ao tratamento controle, devido ao substrato não estar colonizado por bactérias nitrificantes. Nesses casos, a colonização e maturação natural do biofilme pode levar de 4 a 8 semanas (Ruiz et al., 2019). Durante este período, houve um aumento excessivo nas concentrações de amônia e nitrito, como observado no tratamento controle.

No experimento bioflocos, foram necessárias adições de melaço para evitar aumentos excessivos de amônia em todos os tratamentos. No entanto, Zhu & Chen (2001) verificaram que o aumento da relação C:N reduz a eficiência da taxa de nitrificação por favorecer a proliferação de bactérias heterotróficas, que são capazes de superar as bactérias nitrificantes em biomassa e atividade. Isso ficou evidente no tratamento controle, uma vez que recebeu o maior aporte de carbono, resultando em elevadas concentrações de amônia e nitrito, quando comparado com os tratamentos previamente fertilizados.

Moura et al. (2021) verificaram que a supressão do aporte de carbono orgânico, combinada com a adição de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  durante a formação dos bioflocos, resultou no menor aporte de matéria orgânica, favorecendo a estabilização de bactérias nitrificantes e evitando picos de amônia e nitrito durante a produção de *L. vannamei*. Assim, o menor aporte de carbono orgânico limita o crescimento das bactérias heterotróficas, favorecendo as bactérias nitrificantes em sistemas de bioflocos. A maior oferta de carbono orgânico e a ausência de substratos no início da produção, resultaram em elevadas concentrações de nitrito no tratamento controle, como observado por Serra et al. (2015).

Devido às elevadas concentrações de nitrito em sistemas de bioflocos, pesquisas têm sido realizadas com fertilização inorgânica, a fim de acelerar a proliferação e o estabelecimento das bactérias nitrificantes anteriormente a produção dos camarões. Ferreira et al., 2020, 2021 demonstraram que tanto a fertilização inorgânica prévia, quanto o uso de água rica em bioflocos, são estratégias eficientes para manter as concentrações de amônia e nitrito em níveis baixos, como observado no presente estudo. Lara et al. (2016) evidenciaram que a adição prévia de  $\text{NaNO}_2$  em sistemas de bioflocos, não contribuiu para a diminuição das concentrações de nitrito. No entanto, neste último estudo, não foi utilizado inóculo bacteriano, o que provavelmente resultou em concentrações de nitrito duas vezes mais elevadas que o presente estudo,

evidenciando a importância do uso de substratos, como biofilmes ou bioflocos, resultando na maior eficiência do processo de nitrificação.

Os resultados desse estudo indicam que o estabelecimento de bactérias nitrificantes e a eficiência do processo de nitrificação, estão relacionados ao tipo de substrato utilizado. Quando aderidas a substratos fixos, por meio da formação do biofilme, apresentam maior atividade metabólica e eficiência na remoção de metabólitos nitrogenados tóxicos, resultando no processo de nitrificação mais estável em comparação as suspensas na coluna d'água (bioflocos), no qual seu metabolismo aumenta de acordo com a agregação de partículas (Costerton et al., 1995; Grossart et al., 2007), como observado no presente estudo. Assim, a maturação prévia do biofilme foi capaz de sustentar a nitrificação durante a produção do camarão, resultando em concentrações de amônia e nitrito inferiores às observadas no experimento bioflocos, conforme observado por Morais et al. (2020).

Os demais parâmetros de qualidade da água, como salinidade, temperatura, oxigênio dissolvido, pH, alcalinidade e SST, permaneceram dentro da faixa ideal para o *L. vannamei* (Furtado et al., 2015; Gaona et al., 2011; Ponce-Palafox et al., 1997; Van Wyk e Scarpa, 1999).

Sistemas baseados na proliferação de microrganismos, como biofilme e bioflocos, o N é transformado em biomassa microbiana, que é consumida pelos camarões produzidos (Martínez-Córdova et al., 2015). Os bioflocos contribuem para o melhor desempenho zootécnico e nutrição dos organismos (Wasielesky et al., 2006), semelhante ao uso de substratos artificiais em sistemas em água clara e bioflocos (Abreu et al., 2007; Ballester et al., 2007; Bratvold e Browdy, 2001; Thompson et al., 2002). O desempenho zootécnico dos camarões foi afetado no tratamento controle, resultando na menor biomassa final e menores taxas de sobrevivência, principalmente no experimento com bioflocos. Isso provavelmente está relacionado à maior exposição a elevadas concentrações de amônia e nitrito, excedendo os níveis seguros para a espécie (Lin & Chen, 2001, 2003).

Estudos têm demonstrado que o uso de substratos artificiais resulta nas melhores taxas de desempenho zootécnico do *L. vannamei* em sistemas de bioflocos e água clara (Ferreira et al., 2016; Morais et al., 2020; Schweitzer et al., 2013). Substratos artificiais permitem aumentar a área superficial dos tanques e, conseqüentemente, reduzir a densidade relativa de estocagem, reduzindo o estresse e o canibalismo entre os camarões (Schweitzer et al., 2013). Em nosso estudo, os substratos artificiais colonizados com

biofilme resultaram em maior biomassa do camarão, como observado por Morais et al. (2020).

## 5. Conclusão

Diante dos resultados aqui obtidos, podemos concluir que a fertilização inorgânica foi uma boa estratégia para o estabelecimento das bactérias nitrificantes e eficiência do processo de nitrificação em sistemas de produção. Entretanto, os melhores resultados foram obtidos na presença de substratos, fixos em superfícies submersas (biofilme) ou suspensos na coluna d'água (bioflocos).

Essas duas estratégias foram eficientes para manter as concentrações de amônia e nitrito em níveis seguros para a espécie, em oposição ao experimento água clara, onde não foram adicionados substratos. Notavelmente, o experimento biofilme resultou na maior eficiência na nitrificação, resultando em níveis inferiores de amônia e nitrito e maior biomassa final dos camarões. Neste caso, as concentrações do N tóxico permaneceram baixas e mais estáveis, indicando que o uso de biofilme, juntamente a adição de sais de amônia e/ou nitrito, seria a melhor estratégia para acelerar o crescimento e manter as bactérias nitrificantes ativas. Por outro lado, o experimento bioflocos mostrou que a presença de partículas suspensas foi eficiente principalmente no controle da amônia, mas não do nitrito.

## Referências

- Abreu, P.C., Ballester, E.L.C., Odebrecht, C., Wasielesky, W., Cavalli, R.O., Granéli, W., Anesio, A.M., 2007. Importance of biofilm as food source for shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*) evaluated by stable isotopes ( $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$ ). J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 347, 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2007.03.012>
- Aminot, A., Chaussepied, M., 1983. Manuel des analyses chimiques en milieu marin. CNEXO, Brest, Paris, 395 pp
- APHA (American Public Health Association), 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd ed, Washington, DC, 1496 pp
- Arp, D.J., 2009. Nitrification. Encycl. Life Sci. 1–6. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0021154>

- Avnimelech, Y., 1999. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture* 176, 227–235. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00085-X](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00085-X)
- Avnimelech, Y., 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bioflocs technology ponds. *Aquaculture* 264, 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.11.025>
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J., Gray, J., Meyer-Reil, L., Thingstad, F., 1983. The Ecological Role of Water-Column Microbes in the Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 10, 257–263. <https://doi.org/10.3354/meps010257>
- Ballester, E.L.C., Wasielesky, W., Cavalli, R.O., Abreu, P.C., 2007. Nursery of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* in cages with artificial substrates: Biofilm composition and shrimp performance 269, 355–362. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.003>
- Bratvold, D., Browdy, C.L., 2001. Effects of sand sediment and vertical surfaces (AquaMats™) on production, water quality, and microbial ecology in an intensive *Litopenaeus vannamei* culture system. *Aquaculture* 195, 81–94. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00538-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00538-X)
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., D.R., K., Lappin-Scott, H., 1995. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 711–745. <https://doi.org/10.1201/9780203500224>
- Del’Duca, A., Cesar, D.E., Freato, T.A., Azevedo, R.S., Rodrigues, E.M., Abreu, P.C., 2019. Variability of the nitrifying bacteria in the biofilm and water column of a recirculating aquaculture system for tilapia (*Oreochromis niloticus*) production. *Aquac. Res.* 50, 2537–2544. <https://doi.org/10.1111/are.14211>
- Ebeling, J.M., Timmons, M.B., Bisogni, J.J., 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture* 257, 346–358. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.03.019>
- Ferreira, L.M.H., Lara, G., Wasielesky, W., Abreu, P.C., 2016. Biofilm versus biofloc: Are artificial substrates for biofilm production necessary in the BFT system? *Aquac. Int.* 24, 921–930. <https://doi.org/10.1007/s10499-015-9961-0>
- Ferreira, G.S., Silva, V.F., Martins, M.A., da Silva, A.C.C.P., Machado, C., Seiffert, W.Q., Vieira, F.N., 2020a. Strategies for ammonium and nitrite control in

- Litopenaeus vannamei* nursery systems with bioflocs. *Aquac. Eng.* 88. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2019.102040>
- Ferreira, G.S., Santos, D., Schmachtl, F., Machado, C., Fernandes, V., Bögner, M., Schleder, D.D., Seiffert, W.Q., Vieira, F.N., 2020b. Heterotrophic, chemoautotrophic and mature approaches in biofloc system for pacific white shrimp. *Aquaculture* 736099. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736099>
- Furtado, P.S., Campos, B.R., Serra, F.P., Klosterhoff, M., Romano, L.A., Wasielesky, W., 2014. Effects of nitrate toxicity in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, reared with biofloc technology (BFT). *Aquac. Int.* 23, 315–327. <https://doi.org/10.1007/s10499-014-9817-z>
- Furtado, P.S., Poersch, L.H., Wasielesky, W., 2015. The effect of different alkalinity levels on *Litopenaeus vannamei* reared with biofloc technology (BFT). *Aquac. Int.* 23, 345–358. <https://doi.org/10.1007/s10499-014-9819-x>
- Gaona, C.A.P., Poersch, L.H., Krummenauer, D., Foes, G.K., Wasielesky, W., 2011. The effect of solids removal on water quality, growth and survival of *Litopenaeus vannamei* in a Biofloc Technology culture system. *Int. J. Recirc. Aquac.* 12, 54–73. <https://doi.org/10.21061/ijra.v12i1.1354>
- García-Robledo, E., Corzo, A., Papaspyrou, S., 2014. A fast and direct spectrophotometric method for the sequential determination of nitrate and nitrite at low concentrations in small volumes. *Mar. Chem.* 162, 30–36.
- Grossart, H.P., Tang, K.W., Kiørboe, T., Ploug, H., 2007. Comparison of cell-specific activity between free-living and attached bacteria using isolates and natural assemblages. *FEMS Microbiol. Lett.* 266, 194–200. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00520.x>
- Hargreaves, J.A., 2006. Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. *Aquac. Eng.* 34, 344–363. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2005.08.009>
- Hopkins, J.S., Hamilton, R.D., Sandifer, P.A., Browdy, C.L., Stokes, A.D., 1993. Effect of water exchange rate on production, water quality, effluent characteristics and nitrogen budgets of intensive shrimp ponds. *J. World Aquac. Soc.* 24, 304–320. <https://doi.org/10.1111/j.17497345.1993.tb00162.x>
- Jory D.E., Cabrerías R.T., Durwood M.D., Fegan D., Lee G.P., Lawrence A.L., Jackson J.C., McIntosh P.R., Castañeda A.J., 2001. A global review of shrimp feed management: status and perspectives. In: Browdy, C.L., Jory, D.E. (Eds.), *The*

- New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture 2001. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, pp. 104–152.
- Krummenauer, D., Samocha, T.M., Poersch, L.H.S., Lara, G.R., Wasielesky Jr., W., 2014. The reuse of water on the culture of pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in BFT system. J. World Aquac. Soc. 45, 3–14. <https://doi.org/10.1111/jwas.12093>
- Lara, G., Furtado, P.S., Hostins, B., Poersch, L., Wasielesky, W., 2016. Addition of sodium nitrite and biofilm in a *Litopenaeus vannamei* biofloc culture system. Lat. Am. J. Aquat. Res. 44, 760–768. <https://doi.org/10.3856/vol44-issue4-fulltext-11>
- Lin, Y and Chen, J., 2001. Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* Boone juveniles at different salinity levels. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 259, 109–119
- Lin, Y and Chen, J., 2003. Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels. Aquaculture 224, 193–201. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00220-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00220-5)
- Martínez-Córdova, L.R., Emerenciano, M.G.C., Miranda-Baeza, A., Martínez-Porchas, M., 2015. Microbial-based systems for aquaculture of fish and shrimp: An updated review. Rev. Aquac. 7, 131–148. <https://doi.org/10.1111/raq.12058>
- Morais, A.P., Abreu, P.C., Wasielesky, W., Krummenauer, D., 2020. Effect of aeration intensity on the biofilm nitrification process during the production of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in Biofloc and clear water systems. Aquaculture 514, 734516. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734516>
- Moura, P.S., Wasielesky, W., Serra, F.P., Braga, A., Poersch, L., 2021. Partial seawater inclusion to improve *Litopenaeus vannamei* performance in low salinity biofloc systems. Aquaculture 531, 735905. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735905>
- Otoshi, C. a, Rodriguez, N., Moss, S.M., 2011. Establishing nitrifying bacteria in super-intensive biofloc shrimp production. Glob. Aquac. Advocate
- Pomeroy, L.R., le Williams, P.J.B., Azam, F., Hobbie, J.E., 2007. The microbial loop. Oceanography 20, 28–33. <https://doi.org/10.5670/oceanog.2007.45>
- Ponce-Palafox, J., Martinez-Palacios, C.A., Ross, L.G., 1997. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus*

- vannamei*, Boone, 1931. *Aquaculture* 157, 107–115.  
[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00148-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00148-8)
- Robles-Porchas, G.R., Gollas-Galván, T., Martínez-Porchas, M., Martínez-Cordova, L.R., Miranda-Baeza, A., Vargas-Albores, F., 2020. The nitrification process for nitrogen removal in biofloc system aquaculture. *Rev. Aquac.* 1–22.  
<https://doi.org/10.1111/raq.12431>
- Romano, N., Zeng, C., 2013. Toxic effects of ammonia, nitrite, and nitrate to decapod crustaceans: A review on factors influencing their toxicity, physiological consequences, and coping mechanisms. *Rev. Fish. Sci.* 21, 1–21.  
<https://doi.org/10.1080/10641262.2012.753404>
- Ruiz, P., Vidal, J.M., Sepúlveda, D., Torres, C., Villouta, G., Carrasco, C., Aguilera, F., Ruiz-Tagle, N., Urrutia, H., 2019. Overview and future perspectives of nitrifying bacteria on biofilters for recirculating aquaculture systems. *Rev. Aquac.* 1–17.  
<https://doi.org/10.1111/raq.12392>
- Schweitzer, R., Arantes, R., Baloi, M.F., Costódio, P.F.S., Arana, L.V., Seiffert, W.Q., Andreatta, E.R., 2013. Use of artificial substrates in the culture of *Litopenaeus vannamei* (Biofloc System) at different stocking densities: Effects on microbial activity, water quality and production rates. *Aquac. Eng.* 54, 93–103.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2012.12.003>
- Serra, F.P., Gaona, C., Furtado, P.S., Poersch, L.H., Wasielesky, W., 2015. Use of different carbon sources for the biofloc system adopted during the nursery and grow-out culture of *Litopenaeus vannamei*. *Aquac. Int.* 23, 1325–1339.  
<https://doi.org/10.1007/s10499-015-9887-6>
- Sesuk, T., Powtongsook, S., Nootong, K., 2009. Inorganic nitrogen control in a novel zero-water exchanged aquaculture system integrated with airlift-submerged fibrous nitrifying biofilters. *Bioresour. Technol.* 100, 2088–2094.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.10.027>
- Silva, K.R., Wasielesky, W., Abreu, P.C., 2013. Nitrogen and phosphorus dynamics in the Biofloc production of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *J. World Aquac. Soc.* 44, 30–41. <https://doi.org/10.1111/jwas.12009>
- Strickland, J.D.H., Parsons, T.R., 1972. *A Practical Handbook of Seawater Analysis*. Fishery Research Board Canada, Ottawa, 310 pp

- Thompson, F.L., Abreu, P.C., Wasielesky, W., 2002. Importance of biofilm for water quality and nourishment in intensive shrimp culture. *Aquaculture* 203, 263–278. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00642-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00642-1)
- UNESCO, 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring. In: *Manual and Guides 12. Intergovernmental Ocean. Commission, Paris, France*
- Van Wyk, P., Scarpa, J., 1999. Water Quality Requirements and Management, in: *Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems*. pp. 141–161
- Wang, S., Parajuli, S., Sivalingam, V., Bakke, R., 2020. Biofilm in Moving Bed Biofilm Process for Wastewater Treatment, in: Dincer, S. (Ed.), *Bacterial Biofilms*. p. 38. <https://doi.org/10.5772/intechopen.82929>
- Ward, B.B., 2013. Nitrification. *Ref. Modul. Earth Syst. Environ. Sci.* 1–8. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.00697-7>
- Wasielesky, W., Atwood, H., Stokes, A., Browdy, C.L., 2006. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 258, 396–403. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.030>
- Winogradsky S. 1891. Recherches sur les organismes de la nitrification. *Ann Inst Pasteur* 5: 577–616.
- Wood P.M., 1986. Nitrification as a bacterial energy source. In: J. I. Prosser (Ed.) *Nitrification*. IRL Press. Oxford, UK.
- ZAR, J.H., 2010. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, Upper Saddle River.
- Zhu, S., Chen, S., 2001. Effects of organic carbon on nitrification rate in fixed film biofilters. *Aquacult. Eng.* 25, 1-11. [https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(01\)00071-1](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(01)00071-1)

## CAPÍTULO 2

### FATORES QUE INFLUENCIAM O ESTABELECIMENTO DAS BACTÉRIAS NITRIFICANTES DURANTE A INICIALIZAÇÃO DE DIFERENTES SISTEMAS NA PRODUÇÃO DO *Litopenaeus vannamei*

Fabiane da Paz Serra<sup>a\*</sup>, Dariano Krummenauer<sup>a</sup>, Wilson Wasielesky Jr.<sup>a</sup>, Dionéia Evangelista<sup>b</sup>, Paulo Cesar Abreu<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande – FURG

<sup>b</sup>Departamento de Biologia. Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF

\* Autor correspondente

*Artigo submetido a revista Aquaculture*

## **Resumo**

A inicialização dos sistemas de produção é caracterizada pelo aumento excessivo do nitrogênio (N) inorgânico, que precisa ser removido, seja por renovação de água ou remoção biológica de N, a fim de evitar prejuízos a produção. Este estudo teve como objetivo avaliar a dinâmica do N e das bactérias nitrificantes durante a inicialização do sistema de produção. O estudo teve duração de 30 dias e consistiu nos seguintes tratamentos: 1) água clara; 2) biofilme – com adição de substratos artificiais para a formação do biofilme; e 3) bioflocos – com fertilização orgânica na relação C:N 15:1 para formação de bioflocos. A quantificação das bactérias nitrificantes pela técnica de Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH) evidenciou que o aumento excessivo de amônia e nitrito está diretamente relacionado à ausência e baixa densidade de bactérias nitrificantes. As estratégias utilizadas para remoção de N influenciaram a dinâmica do N e o estabelecimento de bactérias nitrificantes. A renovação da água foi a estratégia utilizada para remover o excesso de amônia no tratamento água clara. Em oposição, os tratamentos bioflocos e biofilme, a amônia foi removida por bactérias heterotróficas e nitrificantes, respectivamente. No entanto, devido à ausência de NOB (bactérias nitrito oxidantes), a renovação da água foi necessária para controlar o nitrito no tratamento bioflocos. Com base nesses resultados, a adição de substratos artificiais e a não renovação da água favoreceram o estabelecimento de AOB (bactérias amônio oxidantes) e NOB, como observado no tratamento biofilme. No entanto, devido à baixa densidade de NOB, o nitrito tendeu ao incremento até o final do experimento, resultando na nitrificação parcial. Desta forma, os principais fatores que influenciaram no estabelecimento de bactérias nitrificantes foram a renovação da água, ausência de substrato e adição de carbono orgânico.

**Palavras-chave** – Água clara, Biofilme, Bioflocos, Carbono orgânico, Renovação de água, Substratos.

## **1. Introdução**

A intensificação dos sistemas aquícolas visa maior produtividade, sustentabilidade e biossegurança. No entanto, uma limitação intrínseca é o rápido aumento do N inorgânico, principalmente a amônia e nitrito, devido à maior toxicidade aos organismos produzidos. Nesse contexto, estratégias de manejo são necessárias para

evitar que as concentrações de N excedam os limites toleráveis para as espécies produzidas (Boyd et al., 2020; Romano e Zeng, 2013).

A renovação da água é a estratégia de manejo realizada em sistemas convencionais, no intuito de remover o excesso de nitrogênio do ambiente de produção. No entanto, pode ser ineficaz para a manutenção da qualidade da água, além de resultar no aumento dos custos de produção e ser a principal causa dos impactos ambientais da atividade (Hopkins et al., 1993; Piedrahita, 2003). Em contraste, sistemas baseados em microrganismos *in situ*, ou seja, biofilmes e bioflocos, permite mitigar os desafios ambientais e econômicos enfrentados pelos sistemas convencionais.

Sistemas baseados em biofilmes e bioflocos, são formados por uma complexa comunidade bacteriana, responsáveis pela remoção biológica de N, além de contribuir nutricionalmente com os organismos produzidos. Entretanto, o maior desafio é o equilíbrio entre a produção e a remoção de N, dificilmente alcançada durante a inicialização do sistema. Isso está associado à ausência ou desequilíbrio da comunidade bacteriana durante a formação dos bioflocos e biofilme, resultando no rápido incremento do N tóxico. Para isso, é necessária a manipulação do ambiente de produção e o manejo adequado para a proliferação e estabelecimento da comunidade bacteriana, sendo de extrema relevância entender a dinâmica do N e da comunidade bacteriana nos diferentes sistemas de produção. (Abreu et al., 2007; Martínez-Córdova et al., 2015; Serra et al., 2021; Wasielesky et al., 2006).

Os sistemas de bioflocos são dependentes da manipulação da relação C:N para a proliferação de bactérias heterotróficas e sua formação. A remoção biológica do N é realizada por duas principais vias, assimilação heterotrófica seguido do processo de nitrificação. As bactérias heterotróficas são inicialmente estimuladas no sistema pela adição de carbono orgânico, devido sua maior eficiência na remoção de amônia. Isso está associado ao rápido crescimento e rendimento celular quando comparado as bactérias nitrificantes. Entretanto, esse manejo é paliativo, uma vez que as bactérias heterotróficas atuam apenas na remoção de amônia e não no controle do nitrito. Diante disso, o entrave do sistema é o aumento excessivo do nitrito, uma vez que somente após o estabelecimento das bactérias nitrificantes, este será removido mediante o processo de nitrificação (Avnimelech, 1999; Ebeling et al., 2006; Hargreaves, 2006; Serra et al., 2015).

O principal processo da remoção biológica do N é o de nitrificação, na qual as bactérias nitrificantes atuam transformando as formas tóxicas, ou seja, amônia e nitrito,

a menos nociva aos organismos produzidos, o nitrato. Dois grupos de bactérias filogeneticamente distintos realizam coletivamente o processo de nitrificação. As AOB (bactérias amônio oxidantes) realizam a primeira etapa deste processo, a oxidação da amônia a nitrito. Posteriormente, as NOB (bactérias nitrito oxidantes) realizam a etapa final desse processo, a oxidação do nitrito a nitrato. Diante disso, são definidas como quimiolitotóxicas devido sua capacidade em utilizar o N inorgânico, ou seja, amônia e nitrito, como fonte de energia para imobilizar carbono inorgânico, ou seja, CO<sub>2</sub> ou HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, em biomassa bacteriana (Arp, 2009; Bock e Wagner, 2006; Hagopian e Riley, 1998; Timmons e Ebeling, 2010; Ward, 2013).

As bactérias nitrificantes tendem a formar aglomerados para acelerar seu crescimento, formando o biofilme. No entanto, devido ao crescimento lento e baixo rendimento celular das bactérias nitrificantes, o uso de substratos artificiais para a formação de biofilme tem sido uma estratégia amplamente utilizada na produção intensiva e superintensiva de camarões. Em sistemas em água clara, a eficiência do processo de nitrificação está associada principalmente à disponibilidade de N e substrato para a proliferação e fixação de bactérias nitrificantes. Entretanto, a maturação do biofilme é um processo lento, caracterizado pelo incremento excessivo do N, uma vez que depende da colonização e sucessão de bactérias nitrificantes (Bassin et al., 2012; Morais et al., 2020; Serra et al., 2021; Thompson et al., 2002; Zhu et al., 2016).

Dada a extrema importância das bactérias nitrificantes, técnicas de biologia molecular permitem o melhor entendimento com a avaliação da sucessão ecológica das bactérias envolvidas no processo de nitrificação. Neste estudo, foi utilizada a técnica de Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH) para caracterizar a comunidade bacteriana em aquicultura (Azevedo et al., 2018; Del'Duca et al., 2019; Oliveira et al., 2006; Santos et al., 2019). Nesta técnica, o uso de sondas fluorescentes específicas, ligadas a oligonucleotídeos complementares ao rRNA de bactérias nitrificantes, permite a visualização, identificação e contagem direta de espécies ou grandes grupos de bactérias, através de microscopia de epifluorescência após hibridização (Amann et al. 1990).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência das diferentes estratégias de manejo na dinâmica do N e no estabelecimento das bactérias nitrificantes, utilizando a técnica de FISH, durante a inicialização dos sistemas em água clara, biofilme e bioflocos.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1. Delineamento experimental

Este estudo foi realizado na Estação Marinha de Aquicultura - Instituto de Oceanografia da Universidade Federal do Rio Grande (EMA - FURG).

As unidades experimentais consistiam em tanques circulares de 200 L, com água do mar clorada e dechlorada em salinidade de 25 e com aeração contínua alimentada por um soprador (Ibranh®) e mangueiras microperfuradas (Aerotube®). O estudo teve a duração de 30 dias, durante a produção intensiva do camarão *Litopenaeus vannamei*.

O experimento consistiu em três tratamentos com três repetições cada, denominados: 1) água clara; 2) biofilme – com a adição de substratos artificiais não flutuantes (Needlona®) equivalentes a 200% da área lateral do tanque para formação de biofilme; e 3) bioflocos – com fertilizações orgânicas na relação C:N 15:1 para a formação dos bioflocos (Avnimelech, 1999; Serra et al., 2015).

### 2.2. Qualidade da água

A temperatura, oxigênio dissolvido, salinidade e pH foram mensurados diariamente. As concentrações de amônia (TAN) e nitrito ( $\text{NO}_2^-$ -N) foram mensurados diariamente, seguindo as metodologias de UNESCO (1983) e Aminot e Chaussepied (1983), respectivamente, enquanto as concentrações de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ -N) foram mensuradas uma vez por semana, de acordo com García-Robledo et al. (2014). A alcalinidade total foi mensurada duas vezes por semana de acordo com a APHA (2012).

### 2.3. Manejos para o controle de amônia e nitrito

Foram utilizadas estratégias de manejo para minimizar o incremento excessivo de amônia e nitrito, sempre que as concentrações excediam os níveis seguros para os camarões, ou seja,  $3,55 \text{ mg TAN L}^{-1}$  e  $15,2 \text{ mg NO}_2^- \text{-N L}^{-1}$  (Lin & Chen, 2001, 2003). A renovação da água (50% do volume dos tanques) foi realizada nos tratamentos de água clara e bioflocos para a remoção de amônia e nitrito, respectivamente. A água de reposição foi previamente tratada com  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de hipoclorito de sódio e posteriormente dechlorada com  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido ascórbico.

No tratamento bioflocos, o controle da amônia foi realizado por meio de fertilizações orgânicas com melaço mantendo a relação C:N 6:1, quando as concentrações de amônia excederam  $1 \text{ mg TAN L}^{-1}$  (Avnimelech, 1999). No tratamento biofilme, nenhum manejo foi adotado para o controle de ambos os compostos. No

entanto, a adição de substratos artificiais foi a estratégia utilizada para colonização e retenção de biomassa bacteriana nitrificante.

#### 2.4. Hibridização *in situ* Fluorescente – FISH

A quantificação das bactérias nitrificantes foi realizada através da técnica FISH (Cottrell & Kirchman, 2003), utilizando-se sondas de oligonucleotídeos complementares ao rRNA de bactérias para identificar e quantificar as bactérias envolvidas no ciclo do nitrogênio (Tabela 1). As amostras de água nos tratamentos água clara e bioflocos e os substratos no tratamento biofilme, foram coletados e fixados em paraformaldeído (concentração final de 2%) nos dias 7, 15 e 30. As amostras foram sonicadas três vezes (variação de 50 a 60° por 60 segundos) e posteriormente, filtradas em filtros de policarbonato (Nuclepore® - 0,2 µm).

A abundância dos procariotos foi obtida por contagem direta com o uso de microscópio de epifluorescência (Zeiss Axioplan) com aumento de 1000X. As células coradas com DAPI representam a abundância total de procariotos, enquanto as células hibridizadas com sondas específicas, representam bactérias nitrificantes.

Tabela 1 - Sondas de oligonucleotídeos utilizadas neste estudo para identificação e quantificação das bactérias nitrificantes. Todas as sondas foram marcadas com fluorocromo Cy3.

Sondas	Especificidade	Sequência → (5'3')	%FA	Referência
NON	Controle negativo	TAGTGACGCCGTCGA	30	Yokokawa & Nagata, 2005
NEU	<i>Nitrosomonas</i> – AOB	CCCCTGCTGCACTCTA	40	Wagner et al., 1995
Nsv443	<i>Nitrosospira</i> – AOB	CCGTGACCGTTTCGTTCCG	30	Mobarry et al., 1996
NSMR76	<i>Nitrospira marina</i> – like – AOB	CCCCCTCTTCTGGATAC	20	Burrel et al., 2001
NIT3	<i>Nitrobacter</i> – NOB	CCTGTGCTCCATGCTCCG	40	Wagner et al., 1996
NSR447	<i>Nitrospira</i> – NOB	GGTTTCCCGTTCCATCTT	30	Schramm et al., 1998
Ntcoc84	<i>Nitrococcus mobilis</i> – NOB	TCGCCAGCCACCTTT CCG	10	Juretschk, 2000
Ntspn693	<i>Nitrospina gracilis</i> – NOB	TTCCCAATATCAACGCATTT	20	Juretschk, 2000

%FA = porcentagem de formamida (FA) na solução de hibridização *in situ*.

#### 2.5. Análise estatística

A validade das análises foi confirmada com testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Levene). Após a verificação desses pressupostos, a análise de variância (ANOVA) foi utilizada para detectar possíveis diferenças entre os tratamentos. Quando ocorreram diferenças significativas, aplicou-se o teste post hoc de Tukey. Em contraste, se os pressupostos estatísticos não foram confirmados, o teste não

paramétrico de Kruskal-Wallis foi seguido por um teste de comparação múltipla. Todas as análises estatísticas foram realizadas com nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ) (ZAR, 2010).

### 3. Resultados

Os parâmetros de qualidade da água diferiram estatisticamente entre os tratamentos testados ( $p < 0,05$ ). O tratamento biofilme apresentou valores mais elevados de temperatura, oxigênio dissolvido, pH e alcalinidade. Em contraste, o tratamento água clara resultou em menores valores de temperatura e alcalinidade, enquanto os valores de oxigênio dissolvido e pH foram inferiores no tratamento bioflocos (Tabela 2). Os compostos nitrogenados diferiram estatisticamente entre os tratamentos testados ( $p < 0,05$ ). As diferenças apresentadas estão diretamente relacionadas aos sistemas testados, nos quais diferem em termos de manejo.

Tabela 2 - Valores médios ( $\pm$ DP) dos parâmetros de qualidade de água ao longo do período experimental, nos tratamentos água clara, bioflocos e biofilme.

Parâmetros	Tratamentos		
	Água clara	Bioflocos	Biofilme
Temperatura ( $^{\circ}$ C)	24,68 $\pm$ 0,80 <sup>a</sup>	27,40 $\pm$ 0,39 <sup>b</sup>	28,21 $\pm$ 0,16 <sup>c</sup>
OD ( $\text{mg L}^{-1}$ )	6,75 $\pm$ 0,16 <sup>b</sup>	6,08 $\pm$ 0,27 <sup>a</sup>	7,28 $\pm$ 0,11 <sup>c</sup>
pH	8,36 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	8,05 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>	8,40 $\pm$ 0,06 <sup>c</sup>
Alcalinidade ( $\text{mg CaCO}_3 \text{L}^{-1}$ )	152,50 $\pm$ 12,28 <sup>a</sup>	169,00 $\pm$ 9,19 <sup>b</sup>	188,50 $\pm$ 6,37 <sup>c</sup>
TAN ( $\text{mg L}^{-1}$ )	2,34 $\pm$ 0,47 <sup>b</sup>	1,35 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>	2,74 $\pm$ 0,18 <sup>c</sup>
$\text{NO}_2^{-}\text{-N}$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	0,14 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	10,21 $\pm$ 1,70 <sup>c</sup>	8,41 $\pm$ 0,35 <sup>b</sup>
$\text{NO}_3^{-}\text{-N}$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	1,79 $\pm$ 0,38 <sup>c</sup>	0,20 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>

Letras diferentes dentro de cada linha indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). DO: oxigênio dissolvido, TAN: nitrogênio amoniacal total,  $\text{NO}_2^{-}\text{-N}$ : nitrito e  $\text{NO}_3^{-}\text{-N}$ : nitrato.

A ausência de manejo para a remoção de N no tratamento biofilme resultou em maiores concentrações de amônia entre os tratamentos testados, com valor máximo de  $8,99 \pm 0,20 \text{ mg de TAN L}^{-1}$  no dia 14. A oxidação da amônia ocorreu no dia 20, permanecendo indetectável até o final do experimento. Após a diminuição da amônia, as concentrações de nitrito tenderam ao incremento rapidamente, atingindo o valor máximo de  $21,75 \pm 1,02 \text{ NO}_2^{-}\text{-N mg L}^{-1}$  e, apesar do aumento inicial de nitrato no dia 14 ( $0,77 \pm 0,13 \text{ NO}_3^{-}\text{-N mg L}^{-1}$ ), permaneceram indetectáveis no último dia experimental.

Dentre os tratamentos onde foram realizados o manejo para o controle da amônia, o tratamento água clara resultou nas maiores concentrações de amônia, enquanto no tratamento bioflocos, as concentrações foram inferiores entre os tratamentos testados. Embora o tratamento bioflocos tenha resultado em um pico máximo de amônia ( $9,20 \pm 1,23$  mg de TAN L<sup>-1</sup>) superior aos demais, as concentrações permaneceram indetectáveis a partir do dia 13. Em contraste, as concentrações de amônia oscilaram ao longo do período experimental no tratamento água clara. A redução da amônia só ocorria mediante as renovações de água, com intervalos que variaram entre 1 e 3 dias, chegando a  $3,66 \pm 1,02$  mg TAN L<sup>-1</sup> ao final do experimento. Desta forma, as concentrações de nitrito no tratamento água clara permaneceram baixas, com valor máximo de  $0,76 \pm 0,23$  mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N mg L<sup>-1</sup> no dia 24, e as concentrações de nitrato permaneceram indetectáveis.

No tratamento bioflocos, as concentrações de nitrito aumentaram rapidamente após a diminuição das concentrações de amônia. Quando as concentrações atingiram 20 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N mg L<sup>-1</sup>, foram realizadas renovações de água, totalizando três, entre os dias 17 e 25, atuando de forma eficiente para reduzir esse composto, com concentração final de  $11,01 \pm 1,71$  mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N mg L<sup>-1</sup>. No entanto, resultou em concentrações médias superiores aos demais tratamentos, atingindo concentração máxima de  $23,01 \pm 4,96$  mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N mg L<sup>-1</sup> no dia 22. Com a diminuição das concentrações de nitrito na última semana experimental, as concentrações de nitrato tenderam ao incremento, com concentração final de  $6,83 \pm 1,15$  mg de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N mg L<sup>-1</sup> (Figura 1 – A, B e C).

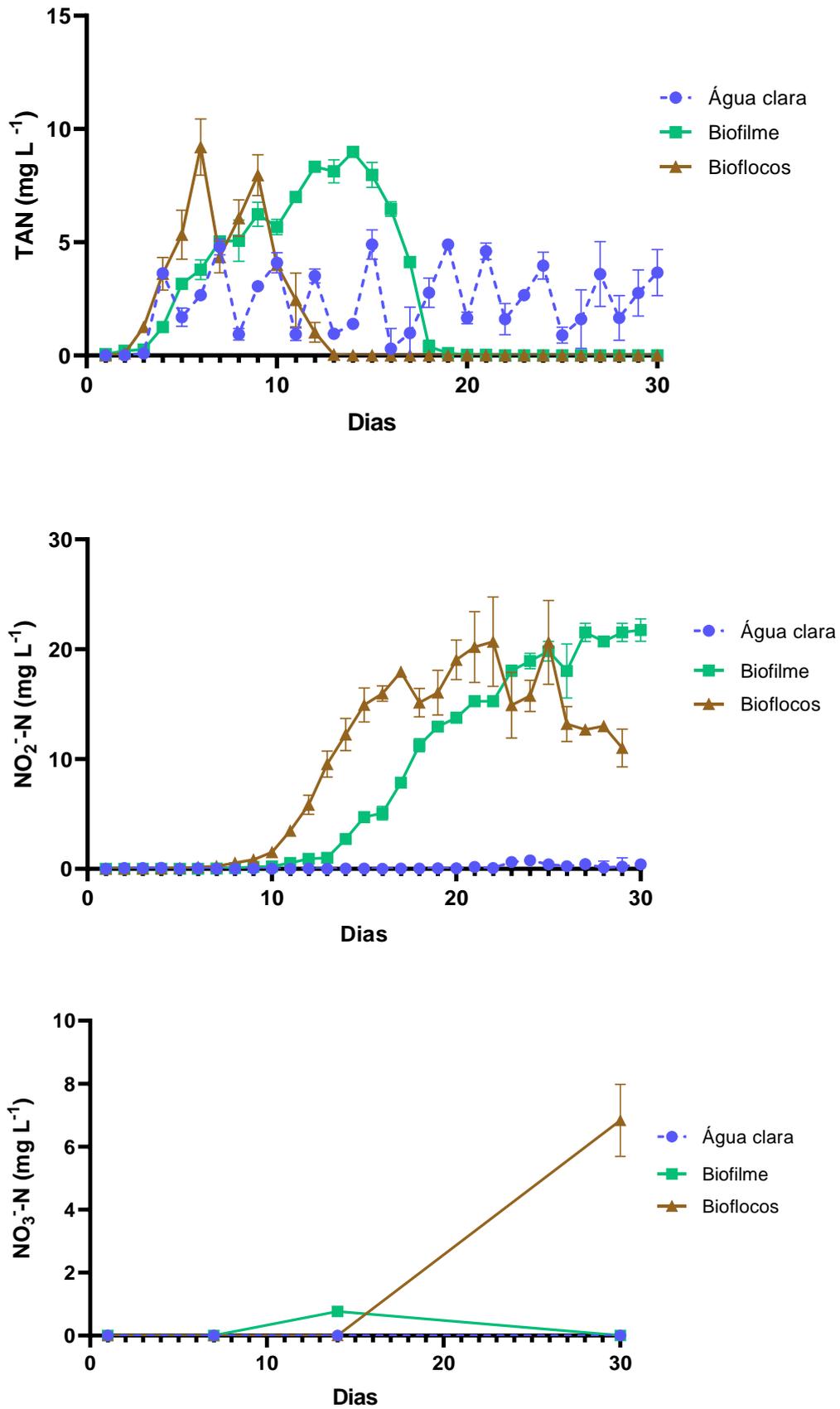


Figura 1 - Média ( $\pm$ DP) dos compostos nitrogenados ao longo do período experimental nos tratamentos água clara, bioflocos e biofilme. A) TAN: nitrogênio amoniacal total, B)  $\text{NO}_2^-$ -N: nitrito e C)  $\text{NO}_3^-$ -N: nitrato.

A abundância de procariotos totais resultou no aumento durante o período experimental (Figura 2). No entanto, no tratamento água clara manteve-se estável, resultando na menor densidade, variando entre  $0,66 \pm 0,05$  e  $1,49 \pm 0,34$  células  $10^6 \text{ mL}^{-1}$ , diferindo estatisticamente dos demais tratamentos ( $p < 0,05$ ). No tratamento biofilme, a densidade foi superior nos dias 7 e 30, diferindo estatisticamente dos demais ( $p < 0,05$ ). No entanto, este não diferiu estatisticamente do tratamento bioflocos no dia 15 ( $p > 0,05$ ). Em oposição ao tratamento bioflocos no qual permaneceu estável entre os dias 15 e 30, variando entre  $14,16 \pm 3,87$  e  $14,72 \pm 1,64$  células  $10^6 \text{ mL}^{-1}$ , a densidade de procariotos totais no tratamento biofilme resultou no aumento ao longo do período experimental de  $7,70 \pm 0,70$  a  $30,44 \pm 1,89$  células  $10^6 \text{ g}^{-1}$ .

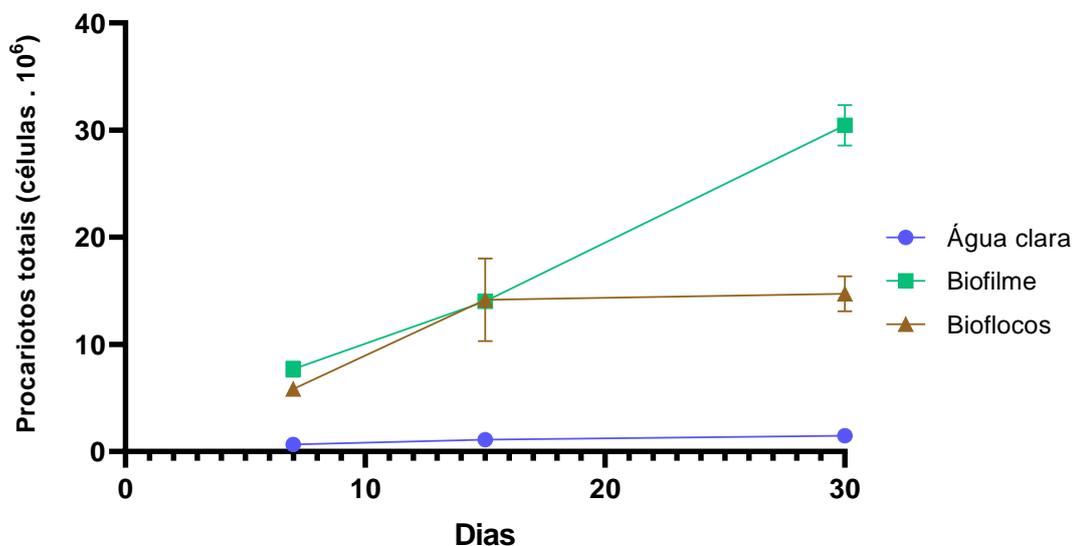


Figura 2 - Valores médios ( $\pm$ DP) da densidade de procariotos totais nos tratamentos água clara, bioflocos e biofilme.

As bactérias nitrificantes não foram detectadas no tratamento água clara. No tratamento bioflocos, apenas as AOB foram detectadas em baixas densidades ( $0,05 \pm 0,00$  células  $10^6 \text{ mL}^{-1}$ ) no último dia do experimento, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos ( $p < 0,05$ ). Em contrapartida, no tratamento biofilme, ambos os grupos de bactérias já estavam presentes no 15º dia, resultando no aumento ao final do experimento (Figura 3 – A e B). A abundância de AOB variou de  $0,49 \pm 0,08$  e  $0,58 \pm 0,16$  células  $10^6 \text{ g}^{-1}$ , enquanto as NOB foi de  $0,20 \pm 0,09$  e  $0,35 \pm 0,13$  células  $10^6 \text{ g}^{-1}$ .

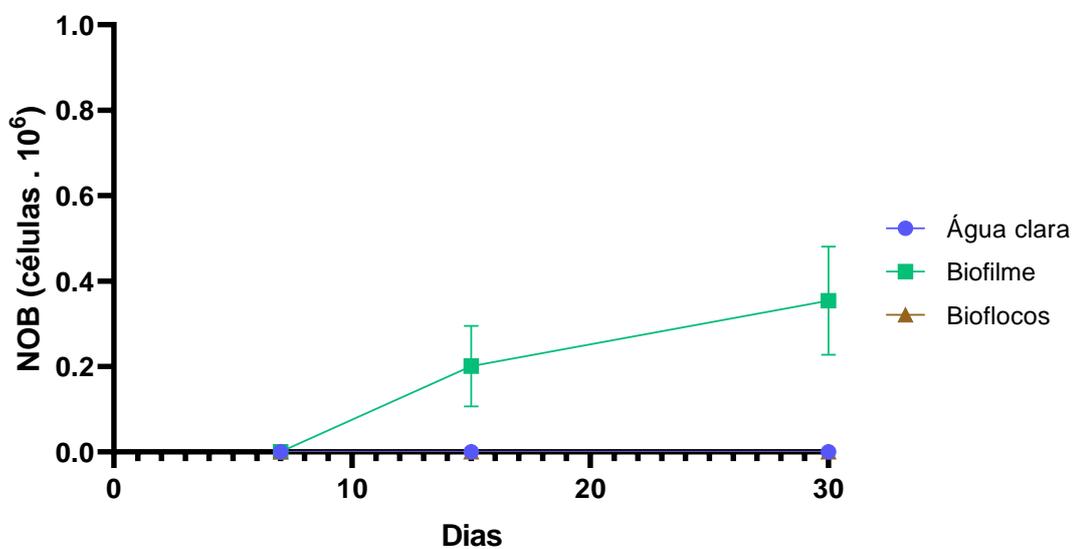
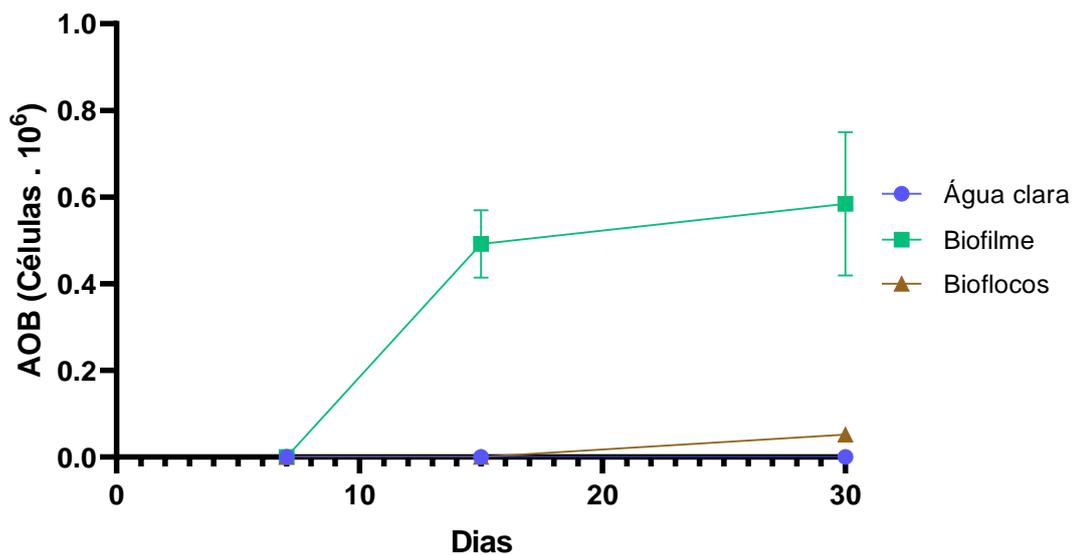


Figura 3 – Valores médios ( $\pm$  DP) da densidade de bactérias nitrificantes nos tratamentos água clara, bioflocos e biofilme. A) AOB: bactérias amônio oxidantes e B) NOB: bactérias nitrito oxidantes

#### 4. Discussão

As bactérias nitrificantes desempenham um papel crucial em sistemas intensivos. No entanto, a inicialização do sistema é caracterizada pelo rápido incremento de amônia e nitrito, uma vez que a eficiência em relação à remoção de ambos os compostos ocorre somente após a estabilização das bactérias nitrificantes, que possuem crescimento lento, baixo rendimento celular e são suscetíveis a diversos fatores

ambientais e operacionais. Este estudo evidenciou através da dinâmica do N e da comunidade bacteriana, que o incremento excessivo do N estão associados à ausência ou baixa densidade de bactérias nitrificantes, como demonstrado através da quantificação das bactérias nitrificantes pela técnica de FISH, resultantes das estratégias de manejo utilizadas nos diferentes sistemas testados.

A renovação da água pode se tornar a única estratégia eficiente para lidar com o rápido incremento do N durante a colonização ou desequilíbrio das bactérias nitrificantes, a fim de evitar mortalidades aos organismos atribuídas à toxicidade do N. No tratamento água clara, constantes renovações de água não foi uma estratégia eficaz para a manutenção da qualidade da água, permitindo apenas manter as concentrações de amônia em níveis seguros para os camarões, resultando em um aumento progressivo durante o período experimental. Esse manejo é comumente utilizado para a remoção de amônia em sistemas convencionais, no qual as concentrações de nitrito e nitrato permanecem baixas ou indetectáveis, como o presente estudo (Barraza-Guardado et al., 2015; Chen et al., 2018; Hopkins et al., 1993).

As renovações de água resultaram em efeitos deletérios sobre a comunidade bacteriana nitrificante no tratamento água clara, resultando na baixa densidade de procariotos totais e ausência de bactérias nitrificantes. Diante disso, as constantes renovações de água impactaram significativamente a qualidade da água e o estabelecimento de bactérias nitrificantes, além de resultarem em aumento dos custos de produção. Estudos associam as renovações de água com a retirada das bactérias nitrificantes do ambiente de produção, sendo mais acentuada na fase inicial da produção e em altas taxas de renovações, como o presente estudo. Além disso, é sugerido a adição de substratos artificiais como uma estratégia eficiente, contribuindo com a imobilização e retenção de biomassa bacteriana, evitando a eliminação das bactérias nitrificantes durante as renovações de água (Dempsey, 2011; Diab et al., 1992; Hopkins et al., 1993; Steinberg et al., 2018; Tierney e Ray, 2018).

O uso de substratos artificiais para a formação de biofilme é uma estratégia que tem sido amplamente utilizada em sistemas em água clara, uma vez que é o principal mecanismo de retenção de bactérias de crescimento lento, como as nitrificantes. Entretanto, a maturação do biofilme durante a produção dos camarões resultou em elevadas concentrações de amônia até a metade do período experimental. Nesse mesmo período, as concentrações de nitrito aumentaram constantemente, sem o incremento do

nitrito ao final do experimento, indicando a nitrificação parcial devido à imaturidade do biofilme (Chen et al., 2021; Serra et al., 2021; Zhu et al., 2016).

A proliferação e estabilização de bactérias nitrificantes dependem da disponibilidade de N e superfície para apoiar o seu crescimento. A adição de substratos artificiais favoreceu a imobilização e retenção de biomassa bacteriana. Esta estratégia, combinada com a não renovação da água, resultou no aumento constante, tanto de procariotos totais quanto das bactérias nitrificantes no tratamento de biofilme, em oposição aos demais tratamentos, nos quais a renovação da água resultou na remoção da comunidade bacteriana. Desta forma, quinze dias do início do experimento, verificamos a presença de AOB e NOB, que aumentaram continuamente até o final do experimento.

O aumento da densidade das bactérias nitrificantes ocorre simultaneamente ao incremento de amônia e nitrito, da mesma forma em que a eficiência do processo de nitrificação, como observado neste estudo (Audelo-Naranjo et al., 2010; Bassin et al., 2012; Bratvold et al., 1999; Del'Duca et al., 2019). No entanto, a colonização de forma gradual das bactérias nitrificantes no novo substrato, resultou na nitrificação parcial. Desta forma, é necessário a estabilização e o equilíbrio constante entre as bactérias nitrificantes, a fim de evitar o acúmulo do N inorgânico, uma vez que o processo de nitrificação envolve dois grupos mutuamente dependentes, as AOB e NOB (Graham et al., 2007; Knapp e Graham, 2007).

Durante a inicialização do sistema de bioflocos, as concentrações de amônia facilmente excedem o nível seguro para os camarões durante a primeira semana, no qual tende a diminuir rapidamente à medida que as bactérias heterotróficas se estabelecem no sistema, como observado neste estudo (Ferreira et al., 2020; Morais et al., 2020). No entanto, a problemática durante a inicialização do sistema é o incremento excessivo do nitrito, uma vez que a ação das bactérias heterotróficas é limitada a amônia. Desta forma, renovações da água tornam-se necessárias para a remoção desse composto (Serra et al. 2015). Após as renovações da água, as concentrações de nitrito foram mantidas abaixo do nível seguro, com incrementos do nitrito ao final do experimento.

A inicialização requer uma maior entrada de carbono orgânico para estimular a proliferação das bactérias heterotróficas e a formação dos bioflocos (Avnimelech, 1999; De Schryver e Verstraete, 2009). Diante disto, as bactérias heterotróficas foram responsáveis por produzir uma quantidade significativa de biomassa bacteriana, devido à adição de melaço durante os doze dias iniciais, resultando no aumento na densidade

de procariotos totais, permanecendo estáveis a partir do dia 15. A partir desse período, é possível relacionar a estabilização dos procariotos totais com a cessar das de fertilizações orgânicas e renovações de água, realizadas para remoção do nitrito.

É importante destacar que as bactérias heterotróficas irão assimilar a amônia de forma mais rápida e eficiente que as AOB (Avnimelech, 1999; Ebeling et al., 2006; Hargreaves, 2006). Isso está associado ao crescimento mais rápido e, conseqüentemente, maior geração de biomassa bacteriana heterotrófica comparado as bactérias nitrificantes. Portanto, a adição contínua de carbono orgânico, até que a amônia fosse totalmente assimilada, favoreceu a dominância heterotrófica, enquanto as bactérias nitrificantes foram fortemente inibidas pela alta carga orgânica. No entanto, à medida que em que são cessadas as fertilizações orgânicas, aliado a renovação de água, o carbono se torna o nutriente limitante para as bactérias heterotróficas, favorecendo o estabelecimento das bactérias nitrificantes. Como resultado, apenas uma pequena população de AOB foi detectada ao final do experimento e a ausência de NOB, evidenciando que a via de remoção biológica do N foi a assimilação heterotrófica

É importante ressaltar que os demais parâmetros de qualidade da água permaneceram dentro da faixa ideal para bactérias nitrificantes (Antonίου et al., 1990; Ebeling et al., 2006; Stenstrom e Poduska, 1980; Villaverde et al., 1997). Sendo assim, através da dinâmica do N e da comunidade bacteriana, é possível evidenciar que a eficiência do processo de nitrificação é em resposta à abundância das bactérias nitrificantes, como observado no tratamento com biofilme. Neste caso, a amônia foi removida gradualmente conforme as AOB colonizavam o novo biofilme. No entanto, o mesmo não ocorreu com as NOB, devido ao crescimento mais lento e à dependência das atividades das AOB.

## **5. Conclusão**

Através da quantificação de bactérias nitrificantes pela técnica FISH, evidenciamos que o incremento excessivo de amônia e nitrito durante a inicialização do sistema é resultado da ausência e baixa densidade das bactérias nitrificantes. Os resultados evidenciam que a dinâmica do N e o estabelecimento das bactérias nitrificantes estão diretamente associados aos manejos utilizados para o controle do N, resultando em diferentes vias de remoção do N.

As constantes renovações de água no início da produção, não permitiu o estabelecimento das bactérias nitrificantes. Em contraste, a remoção biológica é um

desafio na inicialização do sistema, uma vez que a eficiência do processo de nitrificação está diretamente relacionada à abundância, o que controla a atividade das bactérias nitrificantes.

Este estudo evidenciou que a manipulação da relação C:N é o principal fator que inibe o estabelecimento de bactérias nitrificantes e torna o processo de nitrificação crítico, especialmente durante a inicialização dos sistemas de bioflocos.

O uso de substratos artificiais, combinado com a não renovação da água, resultou em imobilização e maior retenção de biomassa bacteriana. No entanto, o biofilme é dependente da colonização e sucessão de bactérias nitrificantes no novo substrato. Como resultado, os NOB não estavam em uma densidade suficiente para a remoção de nitrito, resultando em nitrificação parcial.

Em geral, as constantes renovações de água, a ausência de substratos e a manipulação da relação C:N, foram os fatores que impactaram o estabelecimento de bactérias nitrificantes.

## Referências

- Abreu, P.C., Ballester, E., Odebrecht, C., Wasielesky, W., Cavalli, R.O., Granéli, W., Anesio, A.M., 2007. Importance of biofilm as food source for shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*) evaluated by stable isotopes ( $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$ ). J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 347, 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2007.03.012>
- Aminot, A., Chaussepied, M., 1983. Manuel des analyses en milieu marin 395.
- Amann, R.I., B.J. Binder, R.J. Olson, S.W. Chisholm, R. Devereus and D.A. Stahl. 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. Appl. Environ. Microbiol. 56:1919-1925.
- Antoniou, P., Hamilton, J., Koopman, B., Jain, R., Holloway, B., Lyberatos, G., Svoronos, S.A., 1990. Effect of temperature and ph on the effective maximum specific growth rate of nitrifying bacteria. Water Res. 24, 97–101. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(90\)90070-M](https://doi.org/10.1016/0043-1354(90)90070-M)
- Arp, D.J., 2009. Nitrification. Encycl. Life Sci. 1–6. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0021154>
- APHA (American Public Health Association), 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd ed, Washington, DC, 1496 pp

- Audelo-Naranjo, J.M., Martínez-Córdova, L.R., Voltolina, D., 2010. Nitrogen budget in intensive cultures of *Litopenaeus vannamei* in mesocosms, with zero water exchange and artificial substrates. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 45, 519–524. <https://doi.org/10.4067/s0718-19572010000300017>
- Avnimelech, Y., 1999. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture* 176, 227–235. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00085-X](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00085-X)
- Azevedo, R.S., Del’Duca, A., Rodrigues, E.M., Freato, T.A., Cesar, D.E., 2018. Theory of microbial ecology: Applications in constructing a recirculating aquaculture system. *Aquac. Res.* 49, 3898–3908. <https://doi.org/10.1111/are.13860>
- Barraza-Guardado, R.H., Arreola-lizárraga, J.A., Miranda-baeza, A., Juárez-garcía, M., Juvera-hoyos, A., Casillas-hernández, R., 2015. Enhancing Ecoefficiency in Shrimp Farming through Interconnected Ponds. *Biomed Res. Int.* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/873748>
- Bassin, J.P., Kleerebezem, R., Rosado, A.S., Van Loosdrecht, M.C.M., Dezotti, M., 2012. Effect of different operational conditions on biofilm development, nitrification, and nitrifying microbial population in moving-bed biofilm reactors. *Environ. Sci. Technol.* 46, 1546–1555. <https://doi.org/10.1021/es203356z>
- Bock, E., Wagner, M., 2006. Oxidation of inorganic nitrogen compounds as an energy source, in: *The Prokaryotes: Prokaryotic Physiology and Biochemistry*. pp. 457–495. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-30141-4\\_64](https://doi.org/10.1007/978-3-642-30141-4_64)
- Boyd, C.E., D’Abramo, L.R., Glencross, B.D., Huyben, D.C., Juarez, L.M., Lockwood, G.S., McNevin, A.A., Tacon, A.G.J., Teletchea, F., Tomasso, J.R., Tucker, C.S., Valenti, W.C., 2020. Achieving sustainable aquaculture: Historical and current perspectives and future needs and challenges. *J. World Aquac. Soc.* 51, 578–633. <https://doi.org/10.1111/jwas.12714>
- Burrell PC, Phalen CM, Hovanec TA (2001) Identification of bacteria responsible for ammonia oxidation in freshwater aquaria. *Appl Environ Microbiol* 67:5791–5800
- Chen, Z., Chang, Z., Wang, J., Liu, Y., Chen, S., Li, J., 2021. Water quality, microbial community and shrimp growth performance of *Litopenaeus vannamei* culture systems based on biofloc or biofilters. *Aquac. Res.* 52, 6656–6666. <https://doi.org/10.1111/are.15535>

- Chen, Z., Ge, H., Chang, Z., Song, X., Zhao, F., Li, J., 2018. Nitrogen Budget in Recirculating Aquaculture and Water Exchange Systems for Culturing *Litopenaeus vannamei*. J. Ocean Univ. China 17, 905–912. <https://doi.org/10.1007/s11802-018-3584-9>
- Cottrell MT, Kirchman DL. 2003. Contribution of major bacterial groups to bacterial biomass production (thymidine and leucine incorporation) in the Delaware estuary. Limnol Oceanogr. 48(1): 168-178.
- De Schryver, P., Verstraete, W., 2009. Nitrogen removal from aquaculture pond water by heterotrophic nitrogen assimilation in lab-scale sequencing batch reactors. Bioresour. Technol. 100, 1162–1167. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.08.043>
- Del'Duca, A., Cesar, D.E., Freato, T.A., Azevedo, R. dos S., Rodrigues, E.M., Abreu, P.C., 2019. Variability of the nitrifying bacteria in the biofilm and water column of a recirculating aquaculture system for tilapia (*Oreochromis niloticus*) production. Aquac. Res. 50, 2537–2544. <https://doi.org/10.1111/are.14211>
- Dempsey, M.J., 2011. Nitrification of raw or used water using expanded bed biofilm reactor technology, 1st ed, Methods in Enzymology. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386489-5.00010-5>
- Diab, S., Kochba, M., Mires, D., Avnimelech, Y., 1992. Combined intensive-extensive (CIE) pond system A: inorganic nitrogen transformations. Aquaculture 101, 33–39. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(92\)90230-I](https://doi.org/10.1016/0044-8486(92)90230-I)
- Ebeling, J.M., Timmons, M.B., Bisogni, J.J., 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia–nitrogen in aquaculture systems. Aquaculture 257, 346–358. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.03.019>
- Ferreira, G.S., Silva, V.F., Martins, M.A., da Silva, A.C.C.P., Machado, C., Seiffert, W.Q., do Nascimento Vieira, F., 2020. Strategies for ammonium and nitrite control in *Litopenaeus vannamei* nursery systems with bioflocs. Aquac. Eng. 88, 102040. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2019.102040>
- García-Robledo, E., Corzo, A., Papaspyrou, S., 2014. A fast and direct spectrophotometric method for the sequential determination of nitrate and nitrite at low concentrations in small volumes. Mar. Chem. 162, 30–36.

- Graham, D.W., Knapp, C.W., Van Vleck, E.S., Bloor, K., Lane, T.B., Graham, C.E., 2007. Experimental demonstration of chaotic instability in biological nitrification. *ISME J.* 1, 385–393. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.45>
- Hagopian, D.S., Riley, J.G., 1998. A closer look at the bacteriology of nitrification. *Aquac. Eng.* 18, 223–244. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2015.05.012>
- Hargreaves, J.A., 2006. Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. *Aquac. Eng.* 34, 344–363. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2005.08.009>
- Hopkins, J.S., Hamilton, R.D., Sandier, P.A., Browdy, C.L., Stokes, A.D., 1993. Effect of Water Exchange Rate on Production, Water Quality, Effluent Characteristics and Nitrogen Budgets of Intensive Shrimp Ponds. *J. World Aquac. Soc.* 24, 304–320. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1993.tb00162.x>
- Lin, Y and Chen, J., 2003. Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels 224, 193–201. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00220-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00220-5)
- Lin, Y and Chen, J., 2001. Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* Boone juveniles at different salinity levels. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 259, 109–119.
- Mobarry B, Wagner M, Urbain V, Rittmann B, Stahl D (1996) Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Appl Environ Microbiol* 62: 2156-2162.
- Martínez-Córdova, L.R., Emerenciano, M., Miranda-Baeza, A., Martínez-Porchas, M., 2015. Microbial-based systems for aquaculture of fish and shrimp: An updated review. *Rev. Aquac.* 7, 131–148. <https://doi.org/10.1111/raq.12058>
- Morais, A.P.M., Abreu, P.C., Wasielesky, W., Krummenauer, D., 2020. Effect of aeration intensity on the biofilm nitrification process during the production of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in Biofloc and clear water systems. *Aquaculture* 514, 734516. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734516>
- Oliveira, S.S., Wasielesky, W., Ballester, E., Abreu, P.C., 2006. Caracterização da assembléia de bactérias nitrificantes pelo método “fluorescent in situ hybridization” (fish) no biofilme e água de larvicultura do Camarão-Rosa *Farfantepenaeus paulensis*. *Atlântica* 28, 33–45.
- Piedrahita, R.H., 2003. Reducing the potential environmental impact of tank aquaculture effluents through intensification and recirculation. *Aquaculture* 226, 35–44. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00465-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00465-4)

- Romano, N., Zeng, C., 2013. Toxic Effects of Ammonia, Nitrite, and Nitrate to Decapod Crustaceans: A Review on Factors Influencing their Toxicity, Physiological Consequences, and Coping Mechanisms. *Rev. Fish. Sci.* 21, 1–21. <https://doi.org/10.1080/10641262.2012.753404>
- Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F., 2012. The prokaryotes: Prokaryotic communities and ecophysiology. *Prokaryotes Prokaryotic Communities Ecophysiol.* 1–528. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-30123-0>
- Santos, N.B.V. dos, Furtado, P.S., César, D.E., Wasielesky, W., 2019. Assessment of the nitrification process in a culture of pacific white shrimp, using artificial substrate and bacterial inoculum in a biofloc technology system (BFT). *Ciência Rural* 49, 1–10. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180306>
- Schramm, A., De Beer, D., Wagner, M., Amann, R., 1998. Identification and activities in situ of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. as dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3480–3485.
- Serra, F., Wasielesky, W., Abreu, P.C., 2021. Nitrogen salt fertilization vs. substrate availability: Two strategies to improve nitrification during the production of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 543, 10. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736997>
- Serra, F.P., Gaona, C.A.P., Furtado, P.S., Poersch, L.H., Wasielesky, W., 2015. Use of different carbon sources for the biofloc system adopted during the nursery and grow-out culture of *Litopenaeus vannamei*. *Aquac. Int.* 23, 1325–1339. <https://doi.org/10.1007/s10499-015-9887-6>
- Steinberg, K., Zimmermann, J., Meyer, S., Schulz, C., 2018. Start-up of recirculating aquaculture systems: How do water exchange rates influence pikeperch (*Sander lucioperca*) and water composition? *Aquac. Eng.* 83, 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2018.10.006>
- Stenstrom, M.K., Poduska, R.A., 1980. The effect of dissolved oxygen concentration on nitrification. *Water Res.* 14, 643–649.
- Thompson, F.L., Abreu, P.C., Wasielesky, W., 2002. Importance of biofilm for water quality and nourishment in intensive shrimp culture. *Aquaculture* 203, 263–278. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00642-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00642-1)
- Tierney, T.W., Ray, A.J., 2018. Comparing biofloc, clear-water, and hybrid nursery systems (Part I): Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production, water quality, and

- stable isotope dynamics. *Aquac. Eng.* 82, 73–79.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2018.06.002>
- Timmons, M.B., Ebeling, J.M., 2010. *Recirculating Aquaculture*, 2nd ed, Aquaculture.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.2008.01032.x>
- UNESCO, 1983. *Chemical Methods for Use in Marine Environmental Monitoring*. Paris Intergov. Oceanogr. Comm. 53 pp.
- Villaverde, S., García-Encina, P.A., Fdz-Polanco, F., 1997. Influence of pH over nitrifying biofilm activity in submerged biofilters. *Water Res.* 31, 1180–1186.  
[https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(96\)00376-4](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(96)00376-4)
- Wagner, M., Rath, G., Koops, H.P., Flood, J., Amann, R., 1996. In situ analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. *Water Sci. Technol.* 34, 237–244.  
[https://doi.org/10.1016/0273-1223\(96\)00514-8](https://doi.org/10.1016/0273-1223(96)00514-8)
- Wagner, M., Rath, G., Amann, R., Koops, H.-P., Schleifer, K.-H., 1995, “In-situ identification of ammonia-oxidizing bacteria”, *Systematic and Applied Microbiology*, v. 18, pp. 251-264.
- Ward, B.B., 2013. Nitrification. *Ref. Modul. Earth Syst. Environ. Sci.* 1–8.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.00697-7>
- Wasielesky, W., Atwood, H., Stokes, A., Browdy, C.L., 2006. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 258, 396–403. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.030>
- Yokokawa, T., Nagata, T., 2005. Growth and grazing mortality rates of phylogenetic groups of bacterioplankton in coastal marine environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6799–6807. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6799-6807.2005>
- ZAR, J.H., 2010. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, Upper Saddle River.
- Zhu, S., Shen, J., Ruan, Y., Guo, X., Ye, Z., Deng, Y., Shi, M., 2016. The effects of different seeding ratios on nitrification performance and biofilm formation in marine recirculating aquaculture system biofilter. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 14540–14548. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6609-1>

## CAPÍTULO 3

### **DINÂMICA DO NITROGÊNIO E DAS BACTÉRIAS NITRIFICANTES EM SISTEMAS BASEADOS EM BIOFLOCOS E BIOFILME MADUROS NA PRODUÇÃO DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei***

Fabiane da Paz Serra<sup>a</sup>, Dariano Krummenauer<sup>a</sup>, Wilson Wasielesky Jr.<sup>a</sup>, Dionéia Evangelista<sup>b</sup>, Paulo Cesar Abreu<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande – FURG

<sup>b</sup>Departamento de Biologia, Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF

*Artigo será submetido a revista Aquaculture*

## **Resumo**

Este estudo teve como objetivo comparar a dinâmica do N (nitrogênio) e das bactérias nitrificantes em sistemas baseados em bioflocos e biofilme maduros, durante a produção intensiva do camarão *Litopenaeus vannamei*. No tratamento bioflocos foi utilizado água rica em bioflocos, enquanto o tratamento biofilme, substratos artificiais foram previamente maturados com sais de amônio e nitrito em água clara. Com base na dinâmica do N e na densidade de AOB (bactérias amônio oxidantes) e NOB (bactérias nitrito oxidantes), evidenciamos que ambos os tratamentos tiveram início com a nitrificação estabelecida, ou seja, a oxidação da amônia e do nitrito, resultando no incremento do nitrato. O estudo teve duração de 30 dias. Quanto a dinâmica do N, no tratamento bioflocos a amônia foi rapidamente assimilada após a adição de carbono orgânico, enquanto a oxidação do nitrito a nitrato, foi lenta, resultando em maiores concentrações de nitrito. Em oposição, o tratamento biofilme resultou na maior eficiência do processo de nitrificação, uma vez que menores concentrações de nitrito e o maior incremento do nitrato foram observadas. As análises de FISH (Hibridização *in situ* Fluorescente) foram realizadas para quantificar as bactérias nitrificantes. No tratamento bioflocos, a adição de carbono orgânico favoreceu as bactérias heterotróficas, resultando na menor densidade de bactérias nitrificantes e instabilidade no processo de nitrificação. A maior eficiência no tratamento biofilme é resultante das condições favoráveis para as bactérias nitrificantes, resultando na maior densidade. Nossos resultados indicam que o manejo realizado para a maturação de ambos os tratamentos refletiu na dinâmica do sistema.

## **1. Introdução**

Um dos maiores desafios da intensificação dos sistemas aquícolas está associado aos impactos ambientais ocasionados pelo acúmulo excessivo do N inorgânico, considerado o segundo fator limitante da produção intensiva. Além disso, o controle da amônia e nitrito, compostos de maior toxicidade aos organismos, é fundamental para sucesso da produção. Neste contexto, sistemas baseados em microorganismos são alternativas promissoras para a produção intensiva, contribuindo com a sustentabilidade e biossegurança da atividade aquícola. Dentre esses, destacam-se os baseados em bioflocos e biofilme (Avnimelech, 1999; Crab et al., 2007; Ebeling et al., 2006; Hargreaves, 2006; Wasielesky et al., 2006).

Esses sistemas são caracterizados pela mínima ou nenhuma renovação de água e baseados na manipulação da comunidade bacteriana, bactérias heterotróficas e/ou bactérias nitrificantes, permitindo o maior controle da qualidade de água, além de contribuir nutricionalmente com os organismos produzidos. Entretanto, uma limitação intrínseca de ambos os sistemas é o incremento excessivo de amônia e nitrito durante a inicialização do sistema (Ebeling et al., 2006; Martínez-Córdova et al., 2015; Ward, 2013).

A formação dos bioflocos é dependente da manipulação da relação C:N, sendo a assimilação heterotrófica a principal via de remoção da amônia, resultando no rápido incremento do nitrito, uma vez que as bactérias heterotróficas atuam na remoção da amônia e não do nitrito. Enquanto a maturação do biofilme é processo lento e caracterizado por concentrações elevadas de amônia e nitrito, até que ocorra a colonização e sucessão das bactérias nitrificantes (Avnimelech, 2007; Ruiz et al., 2019; Sesuk et al., 2009; Serra et al., 2021).

A nitrificação é o processo chave do ciclo do N e amplamente estudado e aplicado na aquacultura intensiva. Esse processo é realizado por bactérias nitrificantes no qual realizam oxidação dos compostos de maior toxicidade aos organismos, amônia e nitrito, ao menos nocivo aos organismos, o nitrato. Neste caso, dois grupos filogeneticamente distintos de bactérias realizam coletivamente o processo de nitrificação em duas etapas. Primeiramente, as AOB realizam a oxidação da amônia ao nitrito. Posteriormente, as NOB realizam a oxidação do nitrito a nitrato, etapa final desse processo (Arp, 2009; Bock e Wagner, 2006; Duan et al., 2021, Hagopian e Riley, 1998; Timmons e Ebeling, 2010; Ward, 2013).

Devido as exigências nutricionais restritas, ao crescimento lento e baixo rendimento celular das bactérias nitrificantes, o uso de água rica em bioflocos e biofilme nitrificante, são estratégias eficientes para acelerar o processo de nitrificação e limitar os potenciais picos do N tóxico durante a produção intensiva (Krummenauer et al., 2014; de Lara et al., 2021; Morais et al., 2020; Moura et al., 2021).

Em um estudo anterior, evidenciamos que o estabelecimento das bactérias nitrificantes e eficiência quanto ao processo de nitrificação é dependente da disponibilidade de N e substratos (Serra et al. 2021). Nesse mesmo estudo corroboramos com outras pesquisas que evidenciam que o biofilme permite maior controle e estabilidade da comunidade bacteriana, resultando na maior eficiência do processo de nitrificação. Em oposição, os sistemas de bioflocos são biologicamente complexos, o

que torna o processo de nitrificação instável, especialmente no que diz respeito ao nitrito, devido ao longo período no estabelecimento das bactérias nitrificantes (Fleckenstein et al., 2018; Morais et al., 2020; Ray et al., 2017; Tierney and Ray, 2018). Entretanto, esses estudos são baseados na dinâmica do N.

No presente estudo, a técnica de FISH foi utilizada para fornecer um melhor entendimento quanto a dinâmica das bactérias nitrificantes em sistemas maduros. Esta técnica utiliza sondas fluorescentes ligadas à oligonucleotídeos complementares ao RNA ribossomal das bactérias. Desta forma, o uso de sondas específicas, permite a visualização, identificação e contagem direta de espécies ou grandes grupos de bactérias, por meio de microscopia de epifluorescência após a hibridização (Amann et al. 1990). Essa técnica tem sido utilizada para caracterizar a comunidade bacteriana em aquicultura (Azevedo et al., 2018; Del'Duca et al., 2019; Oliveira et al., 2006; Santos et al., 2019).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a dinâmica do N e das bactérias nitrificantes em sistemas baseados em bioflocos e biofilme maduros.

## **2. Material e métodos**

### *2.1. Local e instalações*

O experimento foi realizado na Estação Marinha de Aquicultura, no Instituto de Oceanografia da Universidade Federal do Rio Grande (EMA – FURG).

### *2.2. Delineamento experimental*

As unidades experimentais foram compostas por tanques circulares com 200 L de volume útil em salinidade 25, com aeração contínua alimentada por um soprador (Ibranh®) e mangueiras microperfuradas (Aerotube®). O estudo teve a duração de 30 dias durante a produção do *L. vannamei* a uma densidade de  $300 \text{ m}^{-3}$  (60 camarões por tanque).

O experimento consistiu em dois tratamentos com três repetições cada, denominados: 1) biofilme – substrato artificial (Needlona®), na proporção de 200% da área lateral do tanque; e 2) bioflocos –100% de água rica em bioflocos de uma produção em andamento. Ambos os tratamentos tiveram início com a nitrificação estabelecida.

O biofilme foi previamente maturado com sais de cloreto de amônio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) e nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ), de acordo com a metodologia proposta por Serra et al. 2021.

### 2.3. Qualidade da água

A temperatura, o oxigênio dissolvido, pH e salinidade foram mensuradas diariamente. As concentrações de amônia (TAN) e nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N) foram mensuradas diariamente, seguindo as metodologias descritas pela UNESCO (1983) e Aminot e Chaussepied (1983), respectivamente. A alcalinidade total mensurada duas vezes por semana, e as concentrações de nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N) uma vez por semana, de acordo com a APHA (2012) e García-Robledo et al. (2014), respectivamente.

### 2.4. Hibridização *in situ* Fluorescente – FISH

As amostras de água foram coletadas nos dias 1, 7, 15 e 30 e fixadas com paraformaldeído 2% (concentração final). As amostras fixadas foram sônicas três vezes (amplitude de 50 a 60° por 60 segundos) e posteriormente filtradas em filtros de policarbonato (Nuclepore® - 0,2 µm). A quantificação das bactérias nitrificantes foi realizada utilizando o protocolo de FISH (Cottrell & Kirchman, 2003), com sondas de oligonucleotídeos para identificar as bactérias nitrificantes, AOB e NOB (Tabela 1).

**Tabela 1.** Sondas de oligonucleotídeos utilizadas neste estudo para identificação e quantificação das bactérias nitrificantes. Todas as sondas foram marcadas com fluorocromo Cy3.

Sonda	Especificidade	Seqüência (5'→3')	%FA	Referência
NON	Controle negativo	TAGTGACGCCGTCGA	30	Yokokawa & Nagata, 2005
NEU	<i>Nitrosomonas</i> – AOB	CCCCTCTGCTGCACTCTA	40	Wagner et al. 1995
Nsv443	<i>Nitrospira</i> – AOB	CCGTGACCGTTTCGTTCCG	30	Mobarry et al. 1996
NSMR76	<i>Nitrospira marina</i> – like – AOB	CCCCCTCTTCTGGATAC	20	Burrell et al. 2001
NIT3	<i>Nitrobacter</i> – NOB	CCTGTGCTCCATGCTCCG	40	Wagner et al. 1996
NSR447	<i>Nitrospira</i> – NOB	GGTTTCCCGTTCCATCTT	30	Schramm et al. 1998
Ntcoc84	<i>Nitrococcus mobilis</i> – NOB	TCGCCAGCCACCTTT CCG	10	Juretschk, 2000
Ntspn693	<i>Nitrospina gracilis</i> – NOB	TTCCCAATATCAACGCATTT	20	Juretschk, 2000

%FA = percentual de formamida na solução de hibridização *in situ*.

A densidade das bactérias foi obtida por contagem direta usando um microscópio de epifluorescência (Zeiss Axioplan) com aumento de 1000X. As células coradas com DAPI representam a densidade total de procariotos, enquanto as células hibridizadas, com sondas específicas, representam as bactérias nitrificantes.

### 2.5. Análise estatística

Os parâmetros de qualidade da água e os desempenhos zootécnicos nos diferentes tratamentos foram submetidos ao teste T para comparação de médias, levando

em consideração os pressupostos de homocedasticidade e normalidade (Levene e Kolmogorov-Smirnov) (ZAR, 2010).

### 3. Resultados

#### 3.1. Qualidade da água

A temperatura e alcalinidade não diferiram estatisticamente, em oposição, o oxigênio dissolvido, pH e os compostos nitrogenados diferiram entre os tratamentos testados (Tabela 2).

**Tabela 2:** Valores médios ( $\pm$ DP) dos parâmetros de qualidade de água ao longo do período experimental nos tratamentos bioflocos e biofilme.

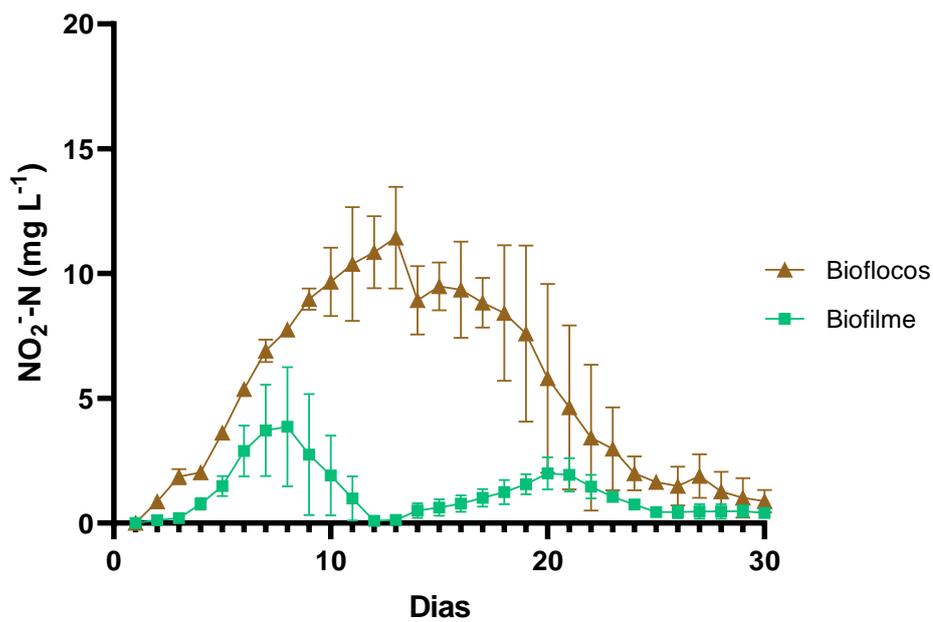
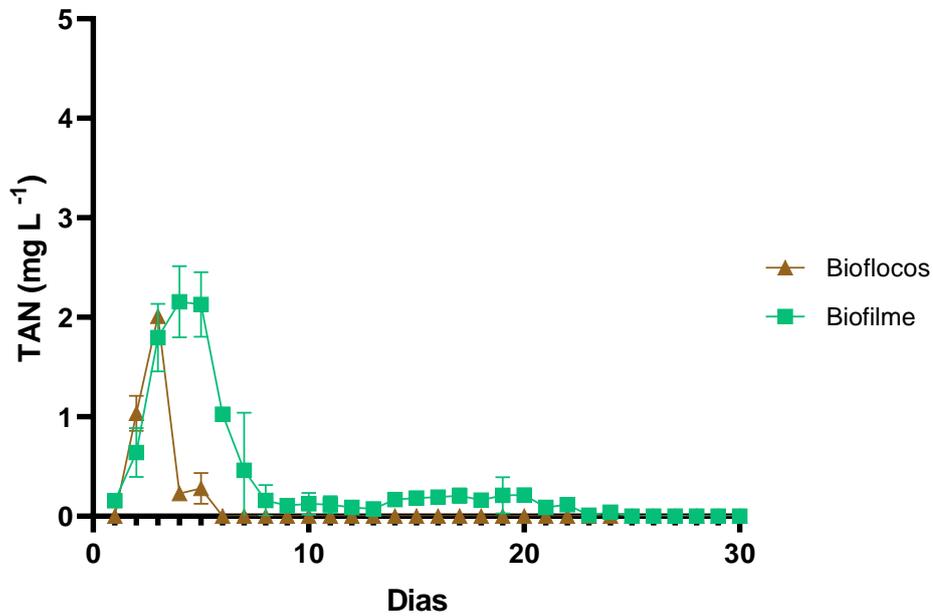
Parâmetros	Tratamentos	
	Bioflocos	Biofilme
Temperatura (°C)	28.21 $\pm$ 0.20	28.30 $\pm$ 0.13
OD (mg L <sup>-1</sup> )	6.18 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	7.33 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>
pH	8.05 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	8.36 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>
Alcalinidade (mg CaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> )	168.77 $\pm$ 15.40	163.03 $\pm$ 11.09
TAN (mg L <sup>-1</sup> )	0.12 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.35 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N (mg L <sup>-1</sup> )	5.41 $\pm$ 1.27 <sup>b</sup>	1.15 $\pm$ 0.44 <sup>a</sup>
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg L <sup>-1</sup> )	8.79 $\pm$ 0.56 <sup>a</sup>	15.07 $\pm$ 1.81 <sup>b</sup>

Letras diferentes de cada linha indicam diferenças significativas ( $p < 0.05$ ). OD: oxigênio dissolvido, TAN: nitrogênio amoniacal total, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N: nitrito e NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N: nitrato.

As concentrações iniciais de amônia e nitrito eram indetectáveis em ambos os tratamentos, enquanto o nitrato diferiu estatisticamente, com concentrações iniciais de 4.03 e 6.95 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N mg L<sup>-1</sup>, nos tratamentos bioflocos e biofilme, respectivamente. Ao longo do período experimental, os compostos nitrogenados diferiram estatisticamente. As menores concentrações de amônia e nitrato foram observadas no tratamento bioflocos, enquanto as menores concentrações de nitrito no tratamento biofilme (Figura 1).

No tratamento bioflocos foi necessário o manejo com a adição de melaço nos dias 2 e 3 para o controle da amônia. As concentrações máximas foram de 2.01 e 2.15 TAN mg L<sup>-1</sup> nos tratamentos bioflocos e biofilme, nos dias 3 e 4, respectivamente. As concentrações de nitrito no tratamento bioflocos foram mais elevadas, tendendo ao incremento até o dia 11, alcançando concentração máxima de 11.44 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N mg L<sup>-1</sup> neste período, com concentração final de 0.88 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N mg L<sup>-1</sup>. No tratamento biofilme, as

concentrações máxima e final foram de 3.85 (dia 8) e 0.40  $\text{NO}_2^-$ -N  $\text{mg L}^{-1}$ , respectivamente. As concentrações de nitrato foram inferiores no tratamento bioflocos, com concentrações finais de 19.01 e 25.86  $\text{NO}_3^-$ -N  $\text{mg L}^{-1}$ , nos tratamentos bioflocos e biofilme, respectivamente (Figura 1 – A, B, C).



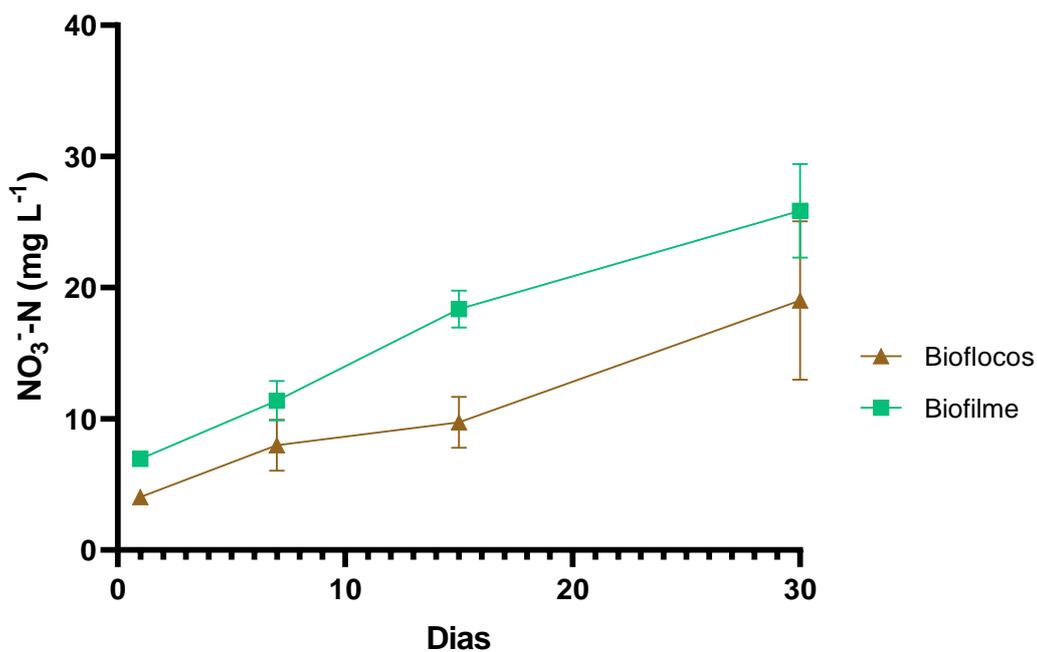


Figura 1 - Valores médios ( $\pm$ DP) dos compostos nitrogenados ao longo do período experimental nos tratamentos bioflocos e biofilme. A) TAN: nitrogênio amoniacal total, B) NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N: nitrito e C) NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N: nitrato.

Quanto a dinâmica da comunidade bacteriana, resultaram em diferenças significativas entre os tratamentos testados. Tanto a densidade de procariotos totais quanto das bactérias nitrificantes, foram superiores no tratamento biofilme.

A densidade total de procariotos no tratamento bioflocos tendeu ao decréscimo ao longo do período experimental, de 36.23 a 28.33 células 10<sup>6</sup> mL<sup>-1</sup>, enquanto o tratamento biofilme resultou no incremento de 50.76 a 203.04 células 10<sup>6</sup> g<sup>-1</sup> (Figura 2).

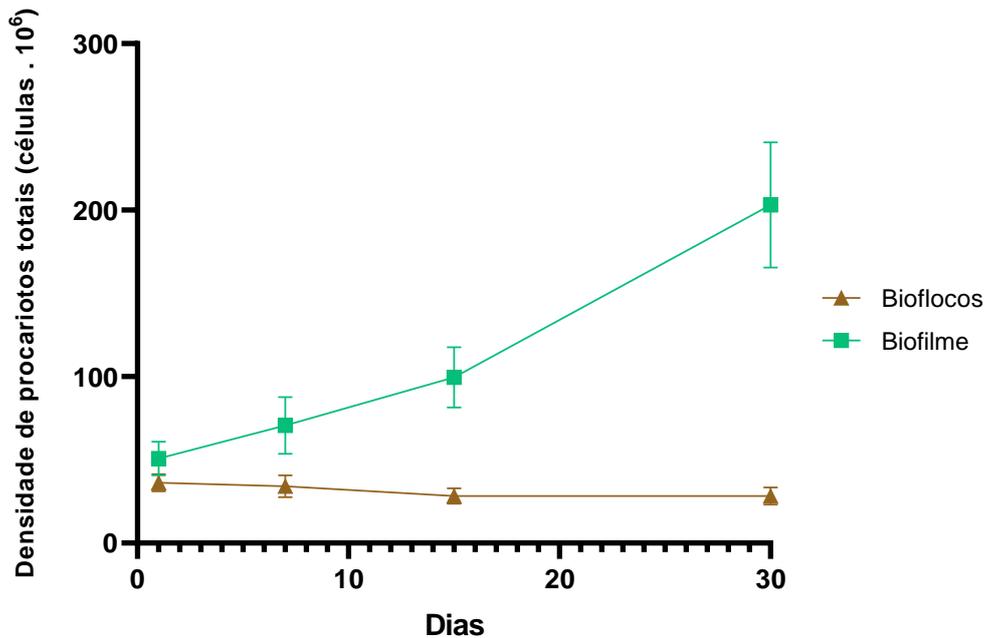


Figura 2 – Valores médios ( $\pm$ DP) da densidade de procariotos totais ao longo do período experimental nos tratamentos bioflocos e biofilme.

Em relação as bactérias nitrificantes, as AOB seguiram a mesma tendencia em ambos os tratamentos, entretanto, o mesmo padrão não foi observado nas NOB entre os tratamentos testados. A densidade inicial de AOB e NOB era de aproximadamente 10 e 20 vezes, respectivamente, maior no tratamento biofilme, comparado ao tratamento bioflocos.

No tratamento bioflocos, houve incremento da densidade de AOB na primeira semana experimental, atingindo densidades máximas de  $0.27 \text{ células } 10^6 \text{ mL}^{-1}$ , seguindo a diminuição da densidade após esse período. Entretanto, as NOB houve o aumento na densidade de 0.09 a  $0.015 \text{ células } 10^6 \text{ mL}^{-1}$  até o dia 15, seguido da diminuição, com a densidade de  $0.04 \text{ células } 10^6 \text{ mL}^{-1}$  ao final do experimento (Figura 2 – B). No tratamento biofilme, houve incremento das AOB conforme a disponibilidade amônia, atingindo densidades máximas de  $4.82 \text{ células } 10^6 \text{ g}^{-1}$  no dia 7. Após esse período, houve a diminuição na densidade até o final do período experimental. A densidade de NOB manteve-se estável até o dia 7, seguido do aumento conforme a oxidação do nitrito a nitrato, variando entre 1.61 e  $4.86 \text{ células } 10^6 \text{ g}^{-1}$  (Figura 3 – A e B).

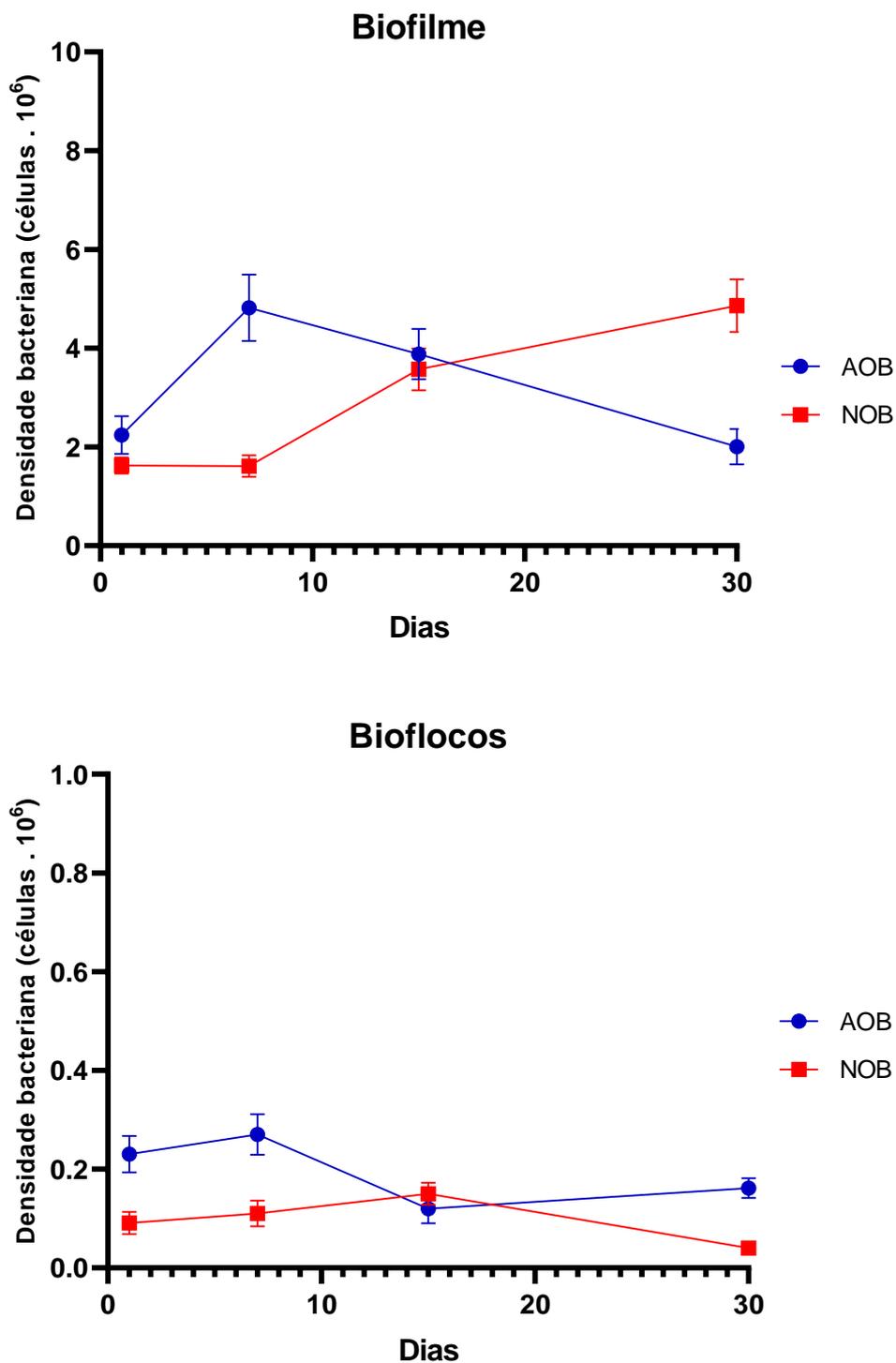


Figura 3 – Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) da densidade de bactérias nitrificantes ao longo do período experimental. A) biofilme e B) bioflocos. AOB: bactérias amônia oxidantes e NOB: bactérias nitrito oxidantes

A variação da proporção de AOB variou de 0.42% (dia 15) a 0.79% (dia 7), enquanto as NOB variaram de 0.14% (dia 30) a 0.52% (dia 15) em relação a densidade

total dos procariotos (Figura 4 – A). No tratamento biofilme, as variações de AOB foram de 0.99% (dia 30) a 6.81% (dia 7) e as NOB variaram de 2.28% (dia 7) a 3.59% (dia 15) em relação a densidade total dos procariotos (Figura 4 – B).

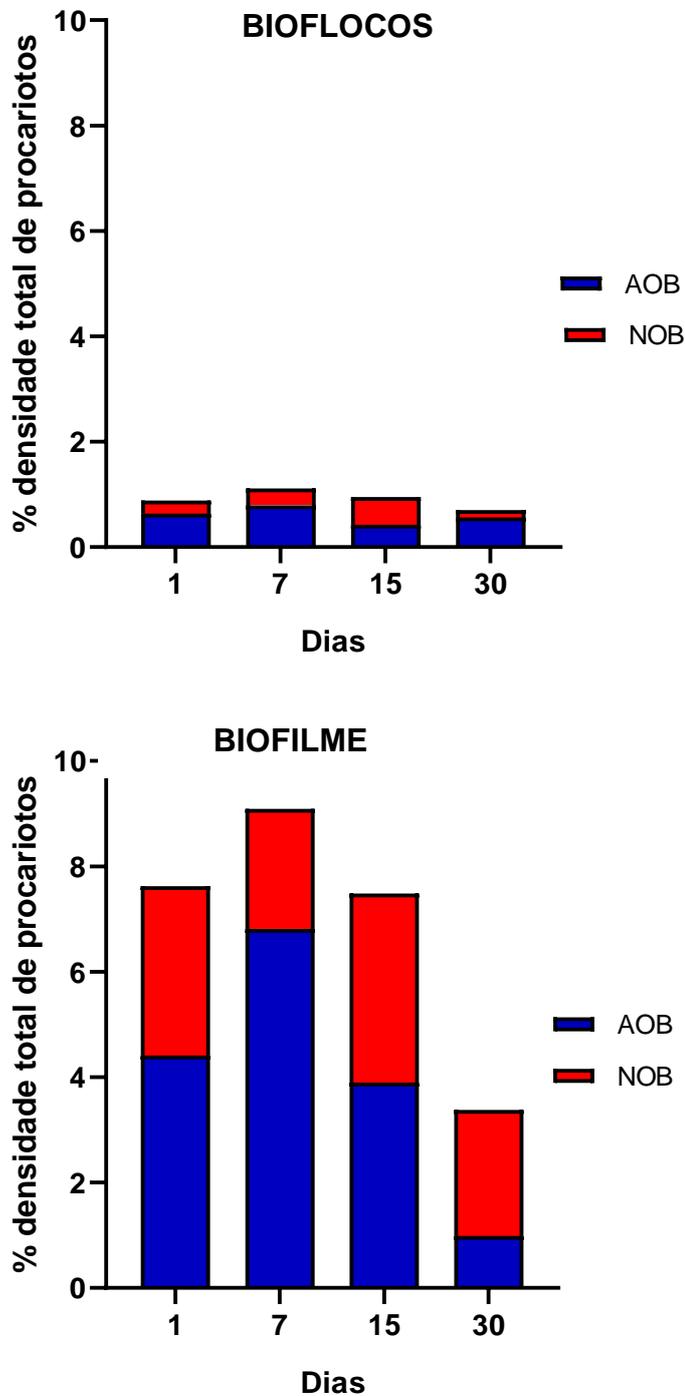


Figura 4 – Porcentagem média em relação a densidade total de procariotos de AOB e NOB ao longo do período experimental. A) bioflocos e B) biofilme. AOB: bactérias amônio oxidantes e NOB: bactérias nitrito oxidantes.

#### 4. Discussão

No presente estudo, a quantificação das bactérias nitrificantes forneceu o melhor entendimento sobre a dinâmica do N e das bactérias nitrificantes em sistemas baseados em bioflocos e biofilme maduros. No geral, a dinâmica do N e da comunidade bacteriana diferiu em ambos os tratamentos. As diferenças estão diretamente relacionadas aos manejos realizados na maturação de ambos os sistemas, principalmente em vias de remoção do N e o tempo necessário para alcançar a nitrificação, ou seja, a oxidação da amônia e nitrito, com o incremento do nitrato. No tratamento biofilme, 30 dias foram suficientes para o estabelecimento do processo de nitrificação, uma vez que apenas as bactérias nitrificantes foram estimuladas, através da adição de substratos e N. Enquanto no tratamento bioflocos, inicialmente a assimilação heterotrófica foi estimulada, sendo necessário o dobro do tempo para o estabelecimento da nitrificação. Diante disso, o manejo influenciou tanto a dinâmica do N quanto das bactérias nitrificantes ao longo do período experimental.

Quanto a dinâmica do N, no geral, o processo de nitrificação ocorreu em ambos os tratamentos, da mesma forma em que as concentrações dos compostos nitrogenados permaneceram em níveis seguros para a espécie produzida em salinidade 25. O controle do N tóxico é fundamental para o sucesso da produção. Para isso, é importante entender a dinâmica e vias de remoção do N (Ebeling et al., 2006; Lin and Chen, 2001, 2003).

No tratamento bioflocos, a assimilação heterotrófica foi estimulada como manejo no controle da amônia, resultando na rápida remoção deste composto. Entretanto, a nitratação foi relativamente lenta, uma vez que as concentrações de nitrito ultrapassaram  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , e menores concentrações de nitrato foram observadas, estando isso relacionado a manipulação da relação C:N, resultando no desequilíbrio das bactérias nitrificantes, conforme será discutido posteriormente.

Diante disso, a adição de carbono só deve ser realizada quando os picos de amônia precisam ser controlados, uma vez que a manipulação da relação C:N é um dos fatores mais críticos para o processo de nitrificação (Avnimelech, 1999). O incremento do nitrato indica que o processo de nitrificação ocorreu no período de 30 dias (Krummenauer et al., 2014). Entretanto, estudos indicam que mesmo em sistemas maduros, não houve o incremento do nitrato, indicando que as bactérias nitrificantes não estavam presentes numa densidade capaz de realizar a nitratação (Huang et al., 2021; Ray et al., 2017; Tierney and Ray, 2018).

Em oposição aos sistemas de bioflocos, o processo de nitrificação se mostrou mais eficiente no tratamento biofilme. Isso está associado as condições favoráveis para o estabelecimento e atividade das bactérias nitrificantes, tanto durante a maturação quanto no período de produção (Fleckenstein et al., 2018; Liu et al., 2021; Morais et al., 2020; Ray et al., 2017; Serra et al., 2021; Xu et al., 2020). Apesar das concentrações de amônia serem mais elevadas no tratamento biofilme, os valores máximos foram semelhantes em ambos os tratamentos. Isso indica que as AOB presentes no biofilme foram mais eficientes na remoção da amônia, uma vez que nenhum manejo foi realizado, e a amônia rapidamente oxidada a nitrito, e posteriormente a nitrato.

Quanto a dinâmica da comunidade bacteriana, no geral, o tratamento biofilme resultou na maior densidade de procariotos totais e bactérias nitrificantes, conforme indicado pelas análises de FISH, resultando na maior eficiência no processo de nitrificação. Enquanto no tratamento de bioflocos as condições foram mais favoráveis para as bactérias heterotróficas no início do experimento, restringindo o enriquecimento das bactérias nitrificantes ao longo do experimento.

No tratamento bioflocos, a densidade de procariotos totais foi maior na primeira semana experimental, período em que houve a manipulação da relação C:N. A partir desse período a densidade reduziu, mantendo-se estável, estando isso associado ao cessar das fertilizações orgânicas, uma vez que as bactérias heterotróficas representam a maior biomassa bacteriana em sistemas de bioflocos. À medida que o carbono orgânico se torna limitante no sistema, a tendência é que as bactérias heterotróficas sejam significativamente reduzidas ao longo do tempo. Em oposição, o tratamento biofilme resultou no aumento da densidade de procariotos totais ao longo do período experimental, sendo sete vezes maior ao final do experimento comparado ao tratamento bioflocos. Isso evidencia que o substrato artificial foi o principal mecanismo de retenção de biomassa bacteriana (Burford et al., 2003; Ebeling et al., 2006; Huang et al., 2021; Shao et al., 2017).

A remoção biológica do N está relacionada a diversidade, densidade e papel funcional das bactérias nitrificantes. Como mencionado anteriormente, o uso de sistemas maduros, são estratégias eficazes para acelerar o processo de nitrificação, devido à presença das bactérias nitrificantes no início da produção, como observado através análise de FISH. Cabe ressaltar que apesar do número de sondas serem limitantes a alguns grupos e espécie de bactérias nitrificantes. Entretanto, todas as sondas foram

hibridizadas em ambos os tratamentos, diferindo na densidade de bactérias nitrificantes, sendo significativamente inferior no tratamento bioflocos.

No geral, as AOB seguiram o mesmo padrão em ambos os tratamentos, com a diminuição conforme a limitação de amônia, porém com densidade superior no biofilme. Em oposição, as NOB não seguiram a mesma tendência, uma vez que no tratamento biofilme o aumento da densidade ocorreu conforme a oxidação do nitrato, em oposição ao tratamento bioflocos, que diminuiu a densidade neste mesmo período, chegando a ser 122 vezes inferior ao final do experimento.

O processo de nitrificação é um desafio em sistemas de bioflocos devido à complexidade das interações que ocorre no sistema. A manipulação da relação C:N é considerado um dos fatores mais críticos que afeta a dinâmica do N e tem grandes efeitos sobre a comunidade bacteriana (Chen et al., 2020; Ebeling et al., 2006; Ray et al., 2011; Serra et al., 2015). O tratamento bioflocos teve início com a nitrificação estabelecida, conforme evidenciado pela dinâmica do N. Entretanto, as análises de FISH confirmaram a baixa densidade inicial de bactérias nitrificantes.

Nossos resultados corroboram com outros estudos que evidenciam a baixa densidade de bactérias nitrificantes em sistemas de bioflocos maduros (Chen et al., 2020; Huang et al., 2021; Luo et al., 2020; Xu et al., 2021). Devido à baixa densidade inicial de AOB, foi necessário estimular a via heterotrófica para a assimilação da amônia. Ao estimular as bactérias heterotróficas que possuem maior taxa de crescimento e rendimento celular, essas são capazes de superar as bactérias nitrificantes. Neste caso, a amônia se torna o N limitante para AOB, uma vez que utilizam a amônia como única fonte de energia, inibindo sua proliferação e atividade. Isso refletiu nas concentrações elevadas de nitrito e baixa densidade de NOB, uma vez que dependem das AOB para fornecer o nitrito, no qual é removido biologicamente pelas NOB.

Mesmo a baixa densidade de NOB no tratamento bioflocos, o nitrito foi oxidado a nitrato, resultando em maiores concentrações de nitrito, conforme observado por Luo et al., 2020 e Xu et al., 2021. Luo et al. (2020) relatam que mesmo baixa a densidade de bactérias nitrificantes, o processo de nitrificação ocorreu, mesmo estas sendo indetectáveis após o estabelecimento da nitrificação. Enquanto, Huang et al. (2021) sugerem que a densidade inicial de bactérias nitrificantes em sistemas de bioflocos maduros, dificultou o estabelecimento das bactérias nitrificantes durante a produção.

O aumento na densidade das bactérias nitrificantes ocorre simultaneamente ao incremento do N, da mesma forma em que a eficiência do processo de nitrificação, como

observado no tratamento biofilme (Audelo-Naranjo et al., 2010; Bassin et al., 2012; Bratvold et al., 1999; Del’Duca et al., 2019; Oliveira et al., 2006). A densidade de bactérias nitrificantes foi maior desde o início do experimento no tratamento biofilme.

O incremento inicial de amônia refletiu no aumento na densidade das AOB, no qual a tendeu a diminuição até o final do experimento quando as concentrações de amônia diminuíram. Neste período, a amônia foi oxidada a nitrito, e a densidade das NOB tenderam ao incremento, conforme o nitrito estava sendo oxidado a nitrato. Desta forma, 30 dias forma suficientes para a colonização das bactérias nitrificantes no biofilme, numa densidade suficiente para sustentar o processo de nitrificação durante a produção dos camarões.

No estudo anterior, baseado na dinâmica do N, evidenciamos que as bactérias nitrificantes dependem de substratos para sua proliferação. Além disso sugerimos que a adição de carbono orgânico possivelmente impactou as NOB no sistema de bioflocos (Serra et al., 2021). O presente estudo evidenciou que a eficiência do processo de nitrificação está associada a densidade das bactérias nitrificantes, no qual controla sua atividade e atua com eficiência na remoção do N (Del’Duca et al., 2019). No tratamento bioflocos, as bactérias heterotróficas foram estimuladas e atuaram com eficiência na remoção da amônia, enquanto no tratamento biofilme, as AOB foram responsáveis pela remoção da amônia. Com isso, diferentes vias de remoção resultaram em comportamentos distintos na dinâmica do N. Com isso, a manipulação da relação C:N, torna o processo de nitrificação instável, resultando em maiores concentrações de nitrito e por período prolongado em sistemas de bioflocos.

Os demais parâmetros de qualidade de água permaneceram dentro da faixa ideal para as bactérias nitrificantes e a produção da camarão *L. vannamei* (Antonioni et al., 1990; Ebeling et al., 2006; Furtado et al., 2015; Ponce-Palafox et al., 1997; Stenstrom and Poduska, 1980; Van Wyk and Scarpa, 1999; Villaverde et al., 1997).

## **5. Conclusão**

Diante dos resultados obtidos através da dinâmica do N e das bactérias nitrificantes, o uso de sistemas maduros são estratégias eficientes para manter as concentrações de amônia e nitrito em níveis seguros para o camarão. Entretanto, a dinâmica do N aliado as análises de FISH evidenciaram que a eficiência do processo de nitrificação foi em resposta a densidade das bactérias nitrificantes, resultantes dos manejos realizados tanto para a maturação dos sistemas quanto durante a produção.

## Referências

- Aminot, A., Chaussepied, M., 1983. Manuel des analyses en milieu marin 395.
- Amann, R.I., B.J. Binder, R.J. Olson, S.W. Chisholm, R. Devereus and D.A. Stahl. 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1919-1925.
- Antoniou, P., Hamilton, J., Koopman, B., Jain, R., Holloway, B., Lyberatos, G., Svoronos, S.A., 1990. Effect of temperature and pH on the effective maximum specific growth rate of nitrifying bacteria. *Water Res.* 24, 97–101. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(90\)90070-M](https://doi.org/10.1016/0043-1354(90)90070-M)
- Arp, D.J., 2009. Nitrification. *Encycl. Life Sci.* 1–6. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0021154>
- APHA (American Public Health Association), 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd ed, Washington, DC, 1496 pp
- Audelo-Naranjo, J.M., Martínez-Córdova, L.R., Voltolina, D., 2010. Nitrogen budget in intensive cultures of *Litopenaeus vannamei* in mesocosms, with zero water exchange and artificial substrates. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 45, 519–524. <https://doi.org/10.4067/s0718-19572010000300017>
- Avnimelech, Y., 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bioflocs technology ponds. *Aquaculture* 264, 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.11.025>
- Avnimelech, Y., 1999. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture* 176, 227–235. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00085-X](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00085-X)
- Azevedo, R.S., Del’Duca, A., Rodrigues, E.M., Freato, T.A., Cesar, D.E., 2018. Theory of microbial ecology: Applications in constructing a recirculating aquaculture system. *Aquac. Res.* 49, 3898–3908. <https://doi.org/10.1111/are.13860>
- Bassin, J.P., Kleerebezem, R., Rosado, A.S., Van Loosdrecht, M.C.M., Dezotti, M., 2012. Effect of different operational conditions on biofilm development, nitrification, and nitrifying microbial population in moving-bed biofilm reactors. *Environ. Sci. Technol.* 46, 1546–1555. <https://doi.org/10.1021/es203356z>

- Bock, E., Wagner, M., 2006. Oxidation of inorganic nitrogen compounds as an energy source, in: *The Prokaryotes: Prokaryotic Physiology and Biochemistry*. pp. 457–495. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-30141-4\\_64](https://doi.org/10.1007/978-3-642-30141-4_64)
- Bratvold, D., Browdy, C.L., 2001. Effects of sand sediment and vertical surfaces (AquaMats™) on production, water quality, and microbial ecology in an intensive *Litopenaeus vannamei* culture system. *Aquaculture* 195, 81–94. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00538-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00538-X)
- Burford, M.A., Thompson, P.J., Bauman, H., Pearson, D.C., 2003. Microbial Communities Affect Water Quality, Shrimp Performance at Belize Aquaculture. *Glob. Aquac. Advocate* 64–65.
- Chen, Z., Chang, Z., Zhang, L., Wang, J., Qiao, L., Song, X., Li, J., 2020. Effects of carbon source addition on microbial community and water quality in recirculating aquaculture systems for *Litopenaeus vannamei*. *Fish. Sci.* 86, 507–517. <https://doi.org/10.1007/s12562-020-01423-3>
- Chen, Z., Chang, Z., Wang, J., Liu, Y., Chen, S., Li, J., 2021. Water quality, microbial community and shrimp growth performance of *Litopenaeus vannamei* culture systems based on biofloc or biofilters. *Aquac. Res.* 52, 6656–6666. <https://doi.org/10.1111/are.15535>
- Cottrell MT, Kirchman DL. 2003. Contribution of major bacterial groups to bacterial biomass production (thymidine and leucine incorporation) in the Delaware estuary. *Limnol Oceanogr.* 48(1): 168-178.
- Crab, R., Avnimelech, Y., Defoirdt, T., Bossier, P., Verstraete, W., 2007. Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture* 270, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.05.006>
- de Lara, G.R., Poersch, L.H., Wasielesky, W., 2021. The quantity of artificial substrates influences the nitrogen cycle in the biofloc culture system of *Litopenaeus vannamei*. *Aquac. Eng.* 94, 102171. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2021.102171>
- Del'Duca, A., Cesar, D.E., Freato, T.A., Azevedo, R. dos S., Rodrigues, E.M., Abreu, P.C., 2019. Variability of the nitrifying bacteria in the biofilm and water column of a recirculating aquaculture system for tilapia (*Oreochromis niloticus*) production. *Aquac. Res.* 50, 2537–2544. <https://doi.org/10.1111/are.14211>
- Duan, S., Zhang, Y., Zheng, S., 2021. Technology Heterotrophic nitrifying bacteria in wastewater biological nitrogen removal systems: A review biological nitrogen

- removal systems: A review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 0, 1–37.  
<https://doi.org/10.1080/10643389.2021.1877976>
- Ebeling, J.M., Timmons, M.B., Bisogni, J.J., 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia–nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture* 257, 346–358.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.03.019>
- Ferreira, G.S., Santos, D., Schmachtl, F., Machado, C., Fernandes, V., Bögner, M., Schleder, D.D., Seiffert, W.Q., Vieira, F.N., 2021. Heterotrophic, chemoautotrophic and mature approaches in biofloc system for Pacific white shrimp. *Aquaculture* 533. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736099>
- Fleckenstein, L.J., Tierney, T.W., Ray, A.J., 2018. Comparing biofloc, clear-water, and hybrid recirculating nursery systems (Part II): Tilapia (*Oreochromis niloticus*) production and water quality dynamics. *Aquac. Eng.* 82, 80–85.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2018.06.006>
- Furtado, P.S., Poersch, L.H., Wasielesky, W., 2015. The effect of different alkalinity levels on *Litopenaeus vannamei* reared with biofloc technology (BFT). *Aquac. Int.* 23, 345–358. <https://doi.org/10.1007/s10499-014-9819-x>
- García-Robledo, E., Corzo, A., Papaspyrou, S., 2014. A fast and direct spectrophotometric method for the sequential determination of nitrate and nitrite at low concentrations in small volumes. *Mar. Chem.* 162, 30–36.
- Hagopian, D.S., Riley, J.G., 1998. A closer look at the bacteriology of nitrification. *Aquac. Eng.* 18, 223–244. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2015.05.012>
- Hargreaves, J.A., 2006. Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. *Aquac. Eng.* 34, 344–363. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2005.08.009>
- Huang, H.H., Luo, T., Lei, Y.J., Kuang, W.Q., Zou, W.S., Yang, P.H., 2021. Water quality, shrimp growth performance and bacterial community in a reusing-water biofloc system for nursery of *Penaeus vananmei* rearing under a low salinity condition. *Aquac. Reports* 21, 100894.  
<https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100894>
- Krummenauer, D., Samocha, T.M., Poersch, L.H.S., Lara, G.R., Wasielesky Jr., W., 2014. The reuse of water on the culture of pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in BFT system. *J. World Aquac. Soc.* 45, 3–14.  
<https://doi.org/10.1111/jwas.12093>

- Lin, Y and Chen, J., 2003. Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels 224, 193–201. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00220-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00220-5)
- Lin, Y and Chen, J., 2001. Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* Boone juveniles at different salinity levels. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 259, 109–119.
- Liu, X.G., Shao, Z., Cheng, G., Lu, S., Gu, Z., Zhu, H., Shen, H., Wang, J., Chen, X., 2021. Ecological engineering in pond aquaculture: a review from the whole-process perspective in China. *Rev. Aquac.* 13, 1060–1076. <https://doi.org/10.1111/raq.12512>
- Luo, G., Xu, J., Meng, H., 2020. Nitrate accumulation in biofloc aquaculture systems. *Aquaculture* 520, 734675. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734675>
- Mobarry B, Wagner M, Urbain V, Rittmann B, Stahl D (1996) Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Appl Environ Microbiol* 62: 2156-2162.
- Martínez-Córdova, L.R., Emerenciano, M., Miranda-Baeza, A., Martínez-Porchas, M., 2015. Microbial-based systems for aquaculture of fish and shrimp: An updated review. *Rev. Aquac.* 7, 131–148. <https://doi.org/10.1111/raq.12058>
- Morais, A.P.M., Abreu, P.C., Wasielesky, W., Krummenauer, D., 2020. Effect of aeration intensity on the biofilm nitrification process during the production of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in Biofloc and clear water systems. *Aquaculture* 514, 734516. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734516>
- Moura, P.S., Wasielesky, W., Serra, F.P., Braga, A., Poersch, L., 2021. Partial seawater inclusion to improve *Litopenaeus vannamei* performance in low salinity biofloc systems. *Aquaculture* 531, 735905. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735905>
- Oliveira, S.S., Wasielesky, W., Ballester, E., Abreu, P.C., 2006. Caracterização da assembléia de bactérias nitrificantes pelo método “fluorescent in situ hybridization” (fish) no biofilme e água de larvicultura do Camarão-Rosa *Farfantepenaeus paulensis*. *Atlântica* 28, 33–45.
- Ponce-Palafox, J., Martinez-Palacios, C.A., Ross, L.G., 1997. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. *Aquaculture* 157, 107–115. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00148-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00148-8)

- Ray, A.J., Dillon, K.S., Lotz, J.M., 2011. Water quality dynamics and shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production in intensive, mesohaline culture systems with two levels of biofloc management. *Aquac. Eng.* 45, 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2011.09.001>
- Ray, A.J., Drury, T.H., Cecil, A., 2017. Comparing clear-water RAS and biofloc systems: Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production, water quality, and biofloc nutritional contributions estimated using stable isotopes. *Aquac. Eng.* 77, 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2017.02.002>
- Ruiz, P., Vidal, J.M., Sepúlveda, D., Torres, C., Villouta, G., Carrasco, C., Aguilera, F., Ruiz-Tagle, N., Urrutia, H., 2019. Overview and future perspectives of nitrifying bacteria on biofilters for recirculating aquaculture systems. *Rev. Aquac.* 1–17. <https://doi.org/10.1111/raq.12392>
- Santos, N.B.V. dos, Furtado, P.S., César, D.E., Wasielesky, W., 2019. Assessment of the nitrification process in a culture of pacific white shrimp, using artificial substrate and bacterial inoculum in a biofloc technology system (BFT). *Ciência Rural* 49, 1–10. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180306>
- Schramm, A., De Beer, D., Wagner, M., Amann, R., 1998. Identification and activities in situ of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. as dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3480–3485.
- Serra, F.P., Wasielesky, W., Abreu, P.C., 2021. Nitrogen salt fertilization vs. substrate availability: Two strategies to improve nitrification during the production of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 543, 10. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736997>
- Serra, F.P., Gaona, C.A.P., Furtado, P.S., Poersch, L.H., Wasielesky, W., 2015. Use of different carbon sources for the biofloc system adopted during the nursery and grow-out culture of *Litopenaeus vannamei*. *Aquac. Int.* 23, 1325–1339. <https://doi.org/10.1007/s10499-015-9887-6>
- Sesuk, T., Powtongsook, S., Nootong, K., 2009. Inorganic nitrogen control in a novel zero-water exchanged aquaculture system integrated with airlift-submerged fibrous nitrifying biofilters. *Bioresour. Technol.* 100, 2088–2094. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.10.027>
- Shao, Y., Shi, Y., Mohammed, A., Liu, Y., 2017. Wastewater ammonia removal using an integrated fixed-film activated sludge-sequencing batch biofilm reactor

- (IFAS-SBR): Comparison of suspended flocs and attached biofilm. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 116, 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.09.026>
- Stenstrom, M.K., Poduska, R.A., 1980. The effect of dissolved oxygen concentration on nitrification. *Water Res.* 14, 643–649.
- Tierney, T.W., Ray, A.J., 2018. Comparing biofloc, clear-water, and hybrid nursery systems (Part I): Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production, water quality, and stable isotope dynamics. *Aquac. Eng.* 82, 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2018.06.002>
- Timmons, M.B., Ebeling, J.M., 2010. *Recirculating Aquaculture*, 2nd ed, Aquaculture. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.2008.01032.x>
- UNESCO, 1983. *Chemical Methods for Use in Marine Environmental Monitoring*. Paris Intergov. Oceanogr. Comm. 53 pp.
- Van Wyk, P., Scarpa, J., 1999. Water Quality Requirements and Management. *Farming Mar. Shrimp Recirc. Freshw. Syst.* 141–161.
- Villaverde, S., García-Encina, P.A., Fdz-Polanco, F., 1997. Influence of pH over nitrifying biofilm activity in submerged biofilters. *Water Res.* 31, 1180–1186. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(96\)00376-4](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(96)00376-4)
- Wagner, M., Rath, G., Koops, H.P., Flood, J., Amann, R., 1996. In situ analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. *Water Sci. Technol.* 34, 237–244. [https://doi.org/10.1016/0273-1223\(96\)00514-8](https://doi.org/10.1016/0273-1223(96)00514-8)
- Wagner, M., Rath, G., Amann, R., Koops, H.-P., Schleifer, K.-H., 1995, “In-situ identification of ammonia-oxidizing bacteria”, *Systematic and Applied Microbiology*, v. 18, pp. 251-264.
- Ward, B.B., 2013. Nitrification. *Ref. Modul. Earth Syst. Environ. Sci.* 1–8. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.00697-7>
- Wasielesky, W., Atwood, H., Stokes, A., Browdy, C.L., 2006. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 258, 396–403. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.030>
- Xu, W., Morris, T.C., Samocha, T.M., 2016. Effects of C/N ratio on biofloc development, water quality, and performance of *Litopenaeus vannamei* juveniles in a biofloc-based, high-density, zero-exchange, outdoor tank system. *Aquaculture* 453, 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.11.021>

- Xu, W., Xu, Yu, Su, H., Hu, X., Xu, Yunna, Li, Z., Wen, G., Cao, Y., 2021. Production performance, inorganic nitrogen control and bacterial community characteristics in a controlled biofloc-based system for indoor and outdoor super-intensive culture of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 531. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735749>
- Yokokawa, T., Nagata, T., 2005. Growth and grazing mortality rates of phylogenetic groups of bacterioplankton in coastal marine environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6799–6807. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6799-6807.2005>
- ZAR, J.H., 2010. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, Upper Saddle River.

## **CONCLUSÕES GERAIS**

De acordo com os resultados obtidos na presente tese, podemos concluir que as estratégias de manejo realizadas durante a maturação do sistema e durante a produção dos camarões, influenciou a dinâmica do N e das bactérias nitrificantes.

O estabelecimento das bactérias nitrificantes e eficiência quanto ao processo de nitrificação é dependente da disponibilidade de N e substratos. Enquanto, a renovação da água, a ausência de substrato e adição de carbono orgânico foram os principais fatores que impactaram o estabelecimento das bactérias nitrificantes.