UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE-FURG

PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

ANÁLISE DOS PROCESSOS DE NITRIFICAÇÃO, DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E COMUNIDADE MICROBIANA NO CULTIVO DE *Litopenaeus vannamei* COM O USO DE LUZ LED SUPLEMENTAR, DIFERENTES FOTOPERÍODOS E RESTRIÇÃO PARCIAL DE LUZ EM SISTEMA BFT

WELLICA GOMES DOS REIS

Rio Grande, RS

2023

Universidade Federal do Rio Grande
Programa de Pós-graduação em Aquicultura
Tese de doutorado

Análise dos processos de nitrificação, desempenho zootécnico e comunidade microbiana no cultivo de *Litopenaeus vannamei* com o uso de luz led suplementar, diferentes fotoperíodos e restrição parcial de luz em sistema BFT

Discente: Ma. Wellica Gomes dos Reis

Orientador: Prof. Dr. Dariano Krummenauer (FURG)
Co-orientador: Prof. Dr. Wilson Wasielesky jr (FURG)

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

Rio Grande, RS-Brasil
Fevereiro, 2023

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha Catalográfica
Catalogação na Fonte: Bibliotecária Rita Moraes CRB 10/2506

Ficha Catalográfica

R375a Reis, Wellica Gomes.
Análise dos processos de nitrificação, desempenho zootécnico e comunidade microbina no cultivo de . Litopenaeus vannamei com o uso de luz led suplementar, diferentes fotoperíodos e restrição parcial de luz em sistema BFT / Wellica Gomes dos Reis – 2023.
133f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Aquicultira, Rio Grande/RS, 2023.
Orientador: Dr. Dariano Krummenauer
Coorientador: Dr. Wilson Wasielesky Junior.

1. Luminosidade 2. Iluminação artificial 3. Nitrificação 4. Sistema superintensivo de aquacultura 5. Produção interna I. Krummenauer, Dariano II. Wasielesky Junior, Wilson. IIITítulo.

CDU 639.512

Catalogação na Fonte: Bibliotecária Rita Moraes CRB 10/2506

ATA DE DEFESA

Pós Graduação em AQUICULTURA
Universidade Federal do Rio Grande - FURG

ATA 03/2023

DE DEFESA DA 60ª TESE DE DOUTORADO EM AQUICULTURA
No dia vinte e oito de fevereiro de dois mil e vinte e três, às treze horas e trinta minutos, reuniu-se a Banca Examinadora de Tese de Doutorado em Aquicultura, da WELLICA GOMES DOS REIS, orientada pelo Prof. Dr. Dariano Krummenauer composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. Dariano Krummenauer (orientador – IO/FURG), Prof. Dr. Wilson Wasielesky (co orientador – IO/FURG), Prof. Dr. Marcelo Borges Tesser (IO/FURG), Dr.ª Bárbara Linhares Hostins (Inve aquaculture - Bélgica) e o Prof. Dr. Luke Roy (Auburn University - EUA). Título da Tese: "ANÁLISE DOS PROCESSOS DE NITRIFICAÇÃO, DESEMPENHO ZOOTÉCNICO, COMUNIDADE MICROBIANA NO CULTIVO DE *Litopenaeus vannamei* COM LUZ LED SUPLEMENTAR, DIFERENTES FOTOPERÍODOS E RESTRIÇÃO PARCIAL DE LUZ EM SISTEMA BFT" Dando início à defesa, o Coordenador Adjunto do PPGAq Prof. Dr. Luciano de Oliveira Garcia, passou a presidência da sessão ao Prof. Dr. Dariano Krummenauer, que na qualidade de orientador, passou a palavra para o candidato apresentar a Tese. Após ampla discussão entre os membros da Banca e candidata, a Banca se reuniu sob a presidência do Coordenador em Exercício. 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 WELLICA GOMES DOS REIS 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 adjunto do PPGAq.

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

PROF. DR. WILSON WASIELESKY (CO ORIENTADOR - IO/FURG)

PROF. DR. MARCELO BORGES TESSER (IO/FURG)

DR.ª BÁRBARA LINHARES HOSTINS (Inve aquaculture - Bélgica)

PROF. DR. LUKE ROY (Auburn University - EUA)

WELLICA GOMES DOS REIS

PROF. DR. LUCIANO DE OLIVEIRA GARCIA (Coordenador Adjunto do PPGAq)

ÍNDICE

Dedicatória VII

Agradecimentos VIII

Resumo. IX

Abstract XI

Introdução geral 13

Objetivos 17

Objetivos Específicos 17

Referências 19

CAPÍTULO I 16

The influence of different light wavelengths in the culture of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in BFT using led lights 23

Resumo 23

Abstract 24

Introduction 26

Material and methods 27

Statistical Analysis 32

Results 32

Discussion 43

Conclusion 49

References 50

CAPÍTULO II 59

A influência de diferentes fotoperíodos com iluminação verde artificial (LED) em sistema de bioflocos sobre o crescimento e estresse oxidativo do *Litopenaeus vannamei* 59

Resumo 60

Introdução 61

Material e métodos 62

Análises Estatísticas 68

Resultados 68

Discussão 80

Conclusão 86

Referências 87

A influência da restrição parcial de luz natural no cultivo do camarão branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei* em sistema BFT 98

Resumo 99

Introdução 100

Material e métodos 102

Análises Estatísticas 106

Resultados 106

Discussão 120

Conclusão 126

Referências 127

Conclusão Geral 133

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese ao meu esposo Aneilton, um homem que admiro muito, como pessoa e profissional, o qual foi e continua sendo fundamental em toda minha trajetória acadêmica e na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, eu agradeço ao meu esposo (Aneilton) e minha família (Marlene, Wanderlei, Wellington, Wemerson, Diva, Alessandra, Fátima, Ailton e Adriel), pelo apoio incondicional, compreensão, paciência na fase de desenvolvimento desta tese.

A meu orientador Dariano Krummenauer, pelos ensinamentos e confiança em todas as etapas desse estudo. Ao professor Wilson Wasielesky, José Monserrat e Paulo Cesar Abreu (em memória), pelos ensinamentos e auxílios a minha pesquisa.

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq, FAPERGS e FINEP pela concessão das bolsas e pelos recursos concedidos que possibilitam a execução da ciência no Brasil.

Um especial agradecimento aos nossos apoiadores Guabi, Trevisan, AllAqua, Inve e Aquatec pelo suporte e apoio irrestrito em todas as etapas deste trabalho, os quais são indispensáveis para realização das nossas pesquisas.

Ao programa de Pós-graduação em Aquicultura, em nome de todos os professores e pesquisadores da Estação Marinha de Aquacultura, principalmente ao Projeto Camarão pela oportunidade dada e enorme aprendizagem adquirida nesse tempo de trabalho.

Aos colegas e amigos da EMA, como Helly, Missileny, Rafa, Alan, Bianca, Jun, Mariana, Elisa, Aline os quais em tantos momentos estiveram comigo me ajudando em tudo que foi preciso na pesquisa. Além disso, eu agradeço os auxílios particulares que foram essenciais ao longo da minha estrada no mestrado e doutorado, principalmente ao Helly, Missileny, Elisa, Andrea e Bianca.

RESUMO GERAL

Em um sistema de bioflocos existem mudanças nas comunidades microbianas durante o ciclo de cultivo de camarão. Quando a água é exposta à luz solar em ambientes, como estufas e viveiros podem mudar abruptamente de um sistema heterotrófico (principalmente bactérias e protozoários), para um sistema predominantemente fotoautotróficos (dominado por microalgas). Por outro ladro lado, existe também os cultivos em ambientes internos, como galpões que podem se beneficiar com luz suplementar artificial. No entanto, não há muita informação sobre a nitrificação, quantificação da comunidade de microrganismos no cultivo do camarão branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei* em sistema de bioflocos com o uso de luz LED suplementar com diferentes comprimentos de ondas, diferentes fotoperíodos. Além disso, a influência da restrição parcial de luz natural no cultivo e principalmente a contribuição desses microrganismos no desempenho zootécnico do camarão, tornando-se de suma importância estudos para elucidar essa lacuna. Dessa forma, a tese foi estrutura em 3 capítulos: No **Capítulo I**, teve como objetivo avaliar a influência dos diferentes comprimentos de ondas com o uso suplementar de luz LED na comunidade de microrganismos, qualidade de água e desempenho zootécnico do *L. vannamei*. Dessa forma, foi delineado cinco tratamentos com três repetições, com densidade de 500 camarões m^{-3}. Nesse capítulo, o comprimento de onda verde teve melhor nitrificação, influenciou positivamente na comunidade de microrganismos e no desempenho zootécnico do *L. vannamei*, quando comparado ao controle. No **capítulo II**, o objetivo foi avaliar a influência da cor de luz verde com o uso de luz suplementar LED com diferentes fotoperíodos na qualidade de água, comunidade de microrganismos, estresse oxidativo e desempenho zootécnico do *L. vannamei.* Desse modo, foi realizado um experimento com quatro tratamentos e quatro repetições, com densidade de 500 camarões m^{-3}. Nesse estudo, não houve diferença significativa para a qualidade de água entre os diferentes fotoperíodos, porém houve diferença para a comunidade de microrganismos, estresse oxidativo e desempenho zootécnico, principalmente para o fotoperíodo 8 horas de luz verde/16 escuro. No **capítulo III**, teve por objetivo avaliar a restrição parcial de luz natural em diferentes concentrações de nitrato e no decréscimo do nitrito na qualidade de água, comunidade de microrganismos e desempenho zootécnico do *L. vannamei.* Nesse sentido, foi delineado seis tratamentos e três repetições com densidade de estocagem de 770 camarões m^{-3}. Deste modo, o uso da restrição parcial de luz natural influenciou positivamente qualidade de água, na abundância dos microrganismos, além disso não influenciou negativamente no desempenho zootécnico, quando comparado ao controle. Portanto, de acordo com os resultados obtidos na presente tese, pode-se concluir que

tanto os comprimentos de luz suplementar LED e os diferentes fotoperíodos, como a restrição parcial de luz natural podem influenciar positivamente na qualidade de água, comunidade de microrganismos, estresse oxidativo e desempenho zootécnico do *L. vannamei* a fim de contribuir para elucidação dessas variáveis no sistema de bioflocos.

Palavras chaves: Luminosidade, Iluminação artificial, Colorida, Nitrificação, Sistema superintensivos de aquacultura, Produção interna.

ABSTRACT

Changes in microbial communities during shrimp culture cycle usually occur in a biofloc system, especially when exposed to sunlight, which could abruptly change from a heterotrophic system (mainly bacteria and protozoa) to a predominantly photoautotrophic system (dominated by microalgae). On the other hand, exposure to light could be beneficial in indoor facilities with light restrictions, such as sheds, that could profit from artificial supplemental light. However, there is not much information regarding nitrification, quantification of the microorganism community using supplemental LED light with different wavelengths, different photoperiods, and restriction of natural light in the cultivation of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in a biofloc system, and the contribution of these microorganisms to the zootechnical performance of shrimp, making studies of paramount importance to elucidate this gap. Thus, this thesis was structured into 3 chapters: **Chapter I** aimed to evaluate the influence of different wavelengths using artificial light (LED) on the community of microorganisms, water quality, and zootechnical performance of *L. vannamei.* Thus, five treatments with three replicates were designed, with a density of 500 shrimp m-3. In this chapter, the green wavelength improved nitrification and positivelyinfluenced the microorganism community and the zootechnical performance of *L. vannamei* compared to the control treatment. **Chapter II** aimed to evaluate the influence of artificial green light (using LED lamps) under different photoperiods on water quality, the microorganism community, oxidative stress, and zootechnical performance of *L. vannamei* reared in a bioflocsystem. Thus, an experiment was carried out with four treatments and four replicates, at a density of 500 shrimp m-3. In this study, there was no significant difference in water quality between the different photoperiods, but there were significant differences in microorganisms community, oxidative stress, and zootechnical performance, mainly for the photoperiod 8 hoursof green light/16 hours of dark. **Chapter III** aimed to evaluate the partial restriction of daylightat different concentrations of nitrate and the decrease of nitrite in water quality, the communityof microorganisms, and the zootechnical performance of *L. vannamei*. In this sense, six treatments and three replications were designed with a stocking density of 770 shrimp m^{-3}. Thus, the use of partial restriction of natural light positively influenced water quality, and the abundance of microorganisms, in addition, it did not negatively influence the zootechnical performance compared to the control. Therefore, according to the results obtained in this thesis,it can be concluded that both the LED supplementary light "wavelengths and the different photoperiods, as well as the partial light restriction, can positively influence the water quality,

microorganism community, oxidative stress, and zootechnical performance of *L. vannamei* in order to contribute to the elucidation of these variables in the biofloc system.

Keywords: Luminosity, Artificial lightning, Colors, Nitrification, Super intensive aquaculture, Indoors production

INTRODUÇÃO GERAL

O sistema BFT (Biofloc Technology System) é uma tecnologia projetada para aumentar a produtividade, enquanto melhora o controle ambiental sobre a produção dos animais cultivados, reduz ou elimina a troca de água, diminui os efluentes, minimiza as áreas de cultivo, restringe a disseminação de doenças e, desta forma, aumenta a biossegurança (Krummenauer et al., 2014; Avnimelech., 2015; Samocha et al., 2017). Os agregados microbianos que são chamados de bioflocos. Estes consistem em um grupo de microrganismos que quando agrupados são colonizados por uma comunidade bacteriana, microalgas, protozoários, zooplâncton, nematoides, rotíferos bem como fezes e restos de ração não consumida (Hargreaves, 2013; Lara et al., 2017; Reis et al., 2022). Quando formados, podem servir como fonte complementar de alimento para organismos cultivados, refletindo em maior crescimento, ganho de peso, menor conversão alimentar e maior sobrevivência (Wasielesky et al., 2006; Ballester et al., 2010).

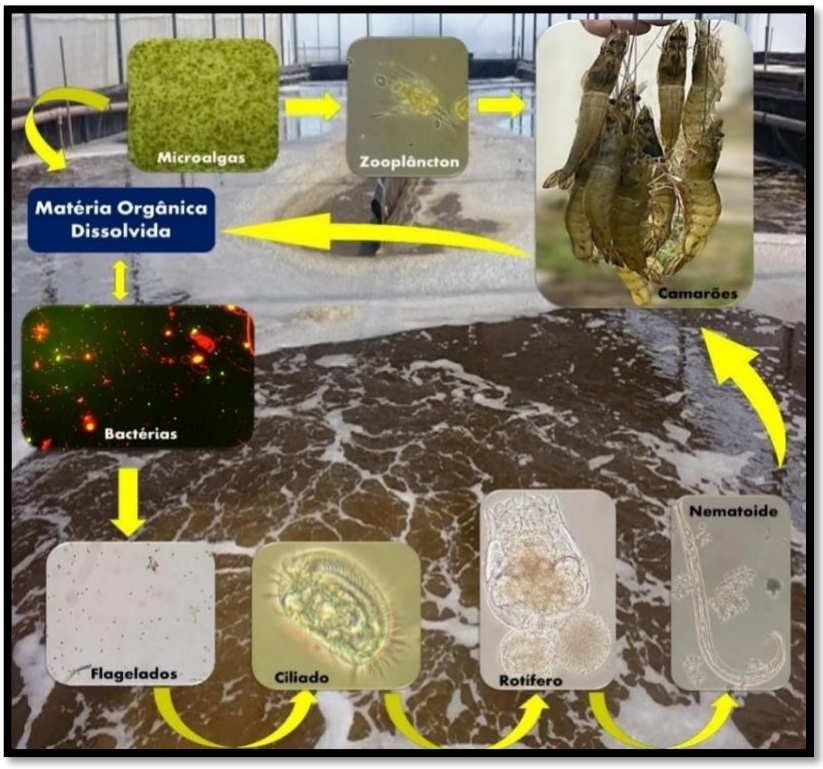

Imagem 1. Conceito de Alça Microbiana sugerido por Azam et al., 1983 adaptado por Wellica Gomes dos Reis em 2021 (Fotos: Wellica Reis, Mariana Holanda e Dariano Krummenauer).

Os bioflocos podem contribuir com cerca de 37 a 40% da produtividade natural que é gerada no sistema, o que por sua vez estimula as atividades das enzimas digestivas; este aumento de atividade pode contribuir para promover o crescimento de camarões criados em

bioflocos (Cardona et al., 2015). Além disso, a técnica de isótopos estáveis comprovou que os bioflocos podem contribuir com 22-43% de carbono e 0-43% de nitrogênio para a composição do tecido do camarão *L. vannamei* durante a fase do berçário, enquanto na fase de crescimento, a contribuição dos bioflocos variaram entre 63 e 100% de carbono e 35-86% de nitrogênio (Krummenauer et al., 2020).

No cultivo BFT, ocorrem mudanças de comunidades microbianas durante o ciclo. Normalmente, ocorre uma mudança de uma comunidade fotoautotrófica para uma quimioautotrófica dependendo do manejo empregado. Muitas vezes, especialmente quando exposto à luz solar pode mudar abruptamente de um sistema heterotrófico (dominado por bactérias e protozoários principalmente), (Kirk, 2010; Hargreaves, 2013), para um sistema predominantemente fotoautotrófico (dominado por microalgas).

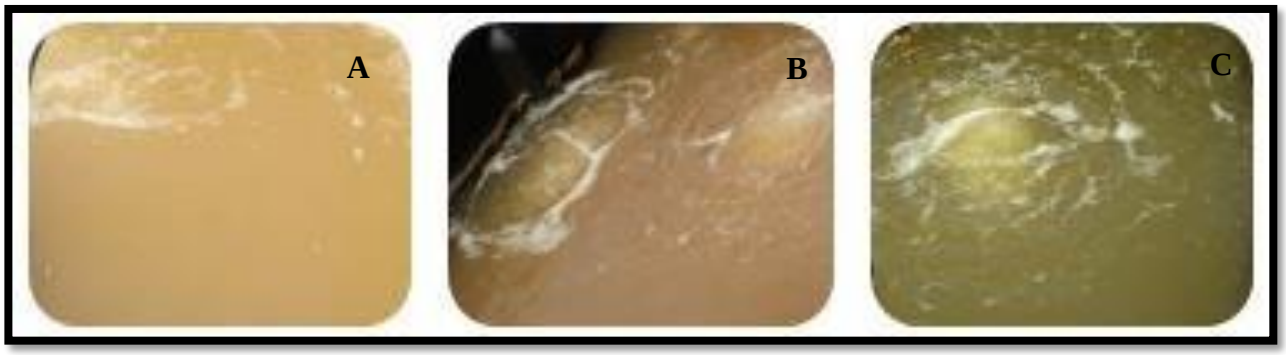

Imagem 2. A: tanque sem exposição solar; **B**: tanque exposto à luz solar após 10 dias; **C**: tanque exposto à luz solar com 30 dias (fotos: Wellica Gomes dos Reis).

A importância relativa de cada processo fotoautotrófico e heterotrófico depende de muitos fatores, tais como: taxa de alimentação diária, concentração de sólidos em suspensão, concentração de amônia, intensidade de luz e a relação carbono-nitrogênio C/N (Avnimelech, 1999; 2015). Nos bioflocos existem organismos que podem controlar os compostos nitrogenados, como bactérias fotoautotróficas, autotróficas nitrificantes e heterotróficas (Ebeling et al., 2006; Crab et al., 2012).

O processo heterotrófico baseia-se na remoção do nitrogênio amoniacal pela incorporação deste elemento na biomassa bacteriana na forma de proteína. Esta incorporação se dá por meio da manipulação das relações de C/N no sistema, isto é, por meio da adição de uma fonte de carbono na forma de carboidrato (Avnimelech 2009). A utilização dessa estratégia permite acelerar os processos de retirada do nitrogênio inorgânico de uma forma rápida e eficiente, diminuindo as concentrações de amônia total dissolvida na água (Ebeling et al., 2006). Entretanto, logo após a incorporação pode ocorrer um novo aumento nos níveis de amônia

devido a predação das bactérias produzidas por protozoários que as digerem e excretam amônia para o meio e a excreção continua dos camarões (Silva et al., 2013).

No processo quimioautotrófico, devido à lenta taxa de crescimento das bactérias nitrificantes, pequenas quantidades de biomassa bacteriana são produzidas, essas bactérias realizam a oxidação da amônia a nitrito (Bactérias amônio-oxidantes - AOB), e posteriormente a nitrato (Bactérias nitrito-oxidantes - NOB) (Ebeling et al., 2006; Crab et al., 2007). Mesmo assim, é difícil ter um total controle sobre as comunidades bacterianas que irão se formar ao longo do cultivo, devido à complexidade das interações que ocorrem dentro dos sistemas de cultivo (Hargreaves, 2013).

As bactérias nitrificantes possuem respostas à luz de maneiras distintas e possuem uma fotossensiblidade ocasionando inibição da atividade das bactérias nitrificantes quando expostas diretamente à luz solar, porém o efeito da luz sobre as bactérias não depende apenas do tipo da bactéria, mas também das condições ambientais. A restrição de luz proporciona um melhor processo de nitrificação no sistema de cultivo evitando uma fotoinibição das bactérias nitrificantes, gerando assim, melhor qualidade da água e crescimento de bactérias heterotróficas (Guerrero 1996; Vergara et al., 2016; Reis et al., 2019).

O sistema BFT quando exposto predominantemente à luz solar ocorre uma floração densa de organismos fotoautotróficos (microalgas) que se desenvolvem em resposta à luz e também à carga de nutrientes que advém da alimentação e matéria orgânica em decomposição, como por exemplo, algas mortas, fezes e ração não consumida (Hargreaves, 2013; Samocha et al., 2017). A taxa de absorção desse organismo fotoautotróficos no sistema BFT é principalmente influenciada pela intensidade de luz subaquática. Sendo que, quando temos uma dependência primária por organismos fotoautotróficos nesse sistema pode ocorrer picos na concentração de amônia em condições de tempo nublado e também uma flutuação na concentração de oxigênio dissolvido e no pH, apesar do aporte extra de aeração (Avnimelech, 2015).

À luz é um dos fatores que podem alterar a abundância de microalgas dos grupos cianobactérias, diatomáceas, clorofíceas, dinoflagelados, entre outros, ocasionando no cultivo florações de espécies muitas vezes tóxicas, prejudicando a qualidade da água, comprometendo o desenvolvimento do animal além de produzir toxinas que podem causar estresse fisiológico e até mesmo mortalidade dos camarões. (Alonso-Rodriguez et al., 2003; Samocha et al., 2017).
Uma mistura complexa de processos entre algas e bactérias controla a qualidade da água nos bioflocos. Basicamente, existem dois tipos de produção com bioflocos: aqueles que estão expostos à luz natural como nos viveiros e tanques ao ar livre (cultivos intensivos), localizados

normalmente em regiões tropicais ou subtropicais, onde há abundância de luz natural e ocorre predominância de organismos fotoautotróficos ocasionando consequentemente uma água de cor esverdeada (Ebeling et al., 2006; Prangnell et al., 2016).

Imagem 3. Raceway em uma estufa na Estação Marinha de Aquacultura (foto: Wellica Gomes dos Reis).

Cultivos realizados dentro de prédios fechados, com pouca ou sem exposição à luz natural e geralmente em ambientes nas regiões temperadas podem se beneficiar com a utilização de luz suplementar artificial. Além disso, nos sistemas de bioflocos a cor da água tende a adquirir uma coloração marrom, em que predominam os processos bacterianos que controlama qualidade da água (Hargreaves, 2013; Samocha et al., 2017). Entretanto, essa variação na corda água irá depender exclusivamente da composição microbiana de cada cultivo, não sendo a cor da água um indicativo preciso de maturidade do sistema (Hargreaves, 2013).

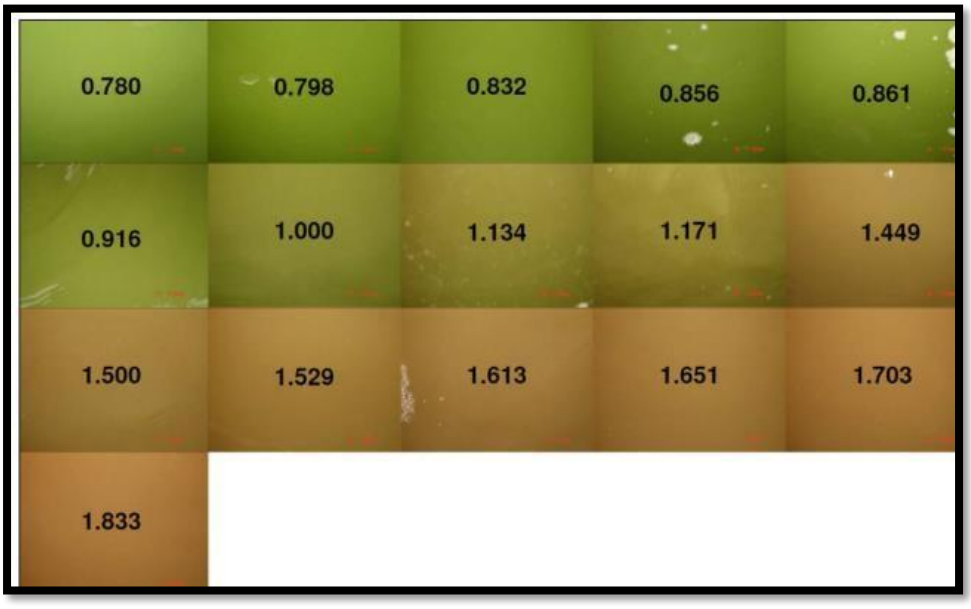

Imagem 4. O Índice de Cor da Comunidade Microbiana (MCCI) indicando a transição de um sistema composto por algas para um sistema bacteriano à medida que a carga de alimentação aumenta (D.E. Brune e K. Kirk).

À luz é considerada um fator abiótico de suma importância para organismos. Estudos mostram diferenças significativas no comportamento, crescimento, ingestão de alimento, maturação, reprodução e possivelmente mudanças na atividade natatória dos camarões peneídeos quando expostos a diferentes condições de luminosidade, ou seja, a intensidade luminosa, comprimento de onda podem afetar diretamente os animais que estão sendo cultivados. A presença de luz também influencia positivamente a abundância de microrganismos refletindo sobre melhor desempenho de *L. vannamei* (Gardner et al., 1998; Wasielesky et al., 2012; Guerra-Santos et al., 2017; Reis et al., 2019).

A produção em sistemas BFT pode ser realizada tanto em viveros ou em tanques em ambientes com abundância de luz natural, bem como em ambientes fechados, como prédios com iluminação artificial (Boyd e Clay, 2002; Burford et al., 2003; Cohen et al., 2005; Fleckenstein et al., 2019). Os sistemas de produção de camarões internos ou aqueles que não têm uma abundância de luz natural em determinadas épocas do ano podem se beneficiar com o uso de iluminação artificial suplementar, como luzes de diodo emissor de luz (LED), que são mais eficientes do que a maioria dos outros fontes artificiais de luz, como lâmpadas incandescentes e fluorescentes, pois têm uma vida longa, baixo consumo de energia e baixa dissipação de calor (Das et al., 2011; Chevremont et al., 2012).

As variáveis, como diferentes espectros de luz, diferentes fotoperíodos, quando adequada para os cultivos de camarões fornecem vantagens como a redução de custos de produção, alimentação, eletricidade e aumento da produtividade (Correia et al., 2007; Coyle et al., 2011; Reis et al., 2019; Fleckenstein et al., 2019). Entretanto, há pouca informação sobre a nitrificação, quantificação de microrganismos no cultivo do camarão branco do Pacífico *L. vannamei* em sistema de bioflocos com o uso de luz suplementar LED com diferentes comprimentos de ondas, diferentes fotoperíodos e restrição parcial de luz em ambientes com abundância de luz natural.

OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos de luz LED suplementar, diferentes fotoperíodos e restrição parcial de luz natural sobre a produção do *L. vannamei* em sistema BFT.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Observar o efeito dos diferentes fotoperíodos no processo de nitrificação.
- Avaliar a restrição parcial de luz no processo de nitrificação.

- Analisar luz LED suplementar colorida no processo de nitrificação.
- Avaliar a comunidade de microrganismos submetidos aos tratamentos.
- Averiguar o desempenho zootécnico dos camarões submetidos aos experimentos.
- Avaliar o estresse oxidativo gerado nos camarões submetido aos tratamentos.

REFERÊNCIAS

Amado LL, Garcia ML, Ramos PB, Freitas RF, Zafalon B, Ferreira JLR, Yunes JS, Monserrat JM. 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxyl radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. Sci Total Environ. 407:2115–2123.

Alonso-Rodrıguez R, Paez-Osuna F (2003) Nutrients, phytoplankton and harmful algal blooms\rin shrimp ponds: a review with special the situation in the Gulf of California. Aquaculture 219:317–336. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00509-4

APHA/AWWA/WEF (2012) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Stand Methods 541. https://doi.org/ISBN 9780875532356

Avnimelech Y (2015) Biofloc technology – A practical guide book.

Avnimelech Y, Kochba M (2009) Evaluation of nitrogen uptake and excretion by tilapia in biofloc tanks , using 15 N tracing. Aquaculture 287:163–168. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.10.009

Ballester ELC, Abreu PC, Cavalli RO, et al (2010) Effect of practical diets with different protein levels on the performance of *Farfantepenaeus paulensis* juveniles nursed in a zero exchange suspended microbial flocs intensive system. Aquac Nutr 16:163–172. https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00648.x

C. Vergara, Jeison D, R.Muñoz, et al (2016) In fl uence of light intensity on bacterial nitrifying activity in algal- bacterial photobioreactors and its implications for microalgae-based wastewater treatment. 114:116–121. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.06.006

Cardona E, Lorgeoux B, Geffroy C, et al (2015) Relative contribution of natural productivity and compound feed to tissue growth in blue shrimp (Litopenaeus stylirostris) reared in biofloc : Assessment by C and N stable isotope ratios and effect on key digestive enzymes. Aquaculture 448:288–297. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.05.035

Correia ES, Suwannatous S, New MB (2007) Flow-through Hatchery Systems and Management. Freshw Prawn Cult Farming *Macrobrachium Rosenbergii* 52–68. https://doi.org/10.1002/9780470999554.ch5

Coyle SD, Bright LA, Wood DR, et al (2011) Performance of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, reared in zero-exchange tank systems exposed to different light sources and intensities. J World Aquac Soc 42:687–695. https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2011.00512.x

Crab R, Avnimelech Y, Defoirdt T (2007) Nitrogen removal techniques in aquaculture for a

sustainable production. 270:1–14. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.05.006 Crab R, Defoirdt T, Bossier P, Verstraete W (2012) Bio fl oc technology in aquaculture : Bene fi cial effects and future challenges. Aquaculture 356–357:351–356. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.04.046

Da Silva KR, Wasielesky W, Abreu PC (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

de Yta AG, Rouse DB, Davis Da (2004) Influence of Nursery Period on the Growth and Survival of Litopenaeus vannamei Under Pond Production Conditions. J World Aquac Soc 35:357–365. https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2004.tb00099.x

Furtado PS, Poersch LH, Wasielesky W (2011) Effect of calcium hydroxide, carbonate and sodium bicarbonate on water quality and zootechnical performance of shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in bio-flocs technology (BFT) systems. Aquaculture 321:130–135. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.08.034

Gaona CAP, Poersch LH, Krummenauer D, et al (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

Gardner C, Maguire GB (1998) Effect of photoperiod and light intensity on survival, development and cannibalism of larvae of the Australian giant crab Pseudocarcinus gigas (Lamarck). Aquaculture 165:51–63. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00245-2

Guerra-Santos B, López-Olmeda JF, de Mattos BO, et al (2017) Synchronization to light and mealtime of daily rhythms of locomotor activity, plasma glucose and digestive enzymes in the Nile tilapia (Oreochromis niloticus). Comp Biochem Physiol -Part A Mol Integr Physiol 204:40–47. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.11.006

Guerrero MA, Jones RD (1996) Photoinhibition of marine nitrifying bacteria. I. Wavelength-dependent response. Mar Ecol Prog Ser 141:183–192. https://doi.org/10.3354/meps141183

Hargreaves JA (2013) Biofloc Production Systems for Aquaculture. 1–12

Hobbie JE, Daley RJ, Jasper S (1977) Use of nuclepore filter counting bacteria by fluoroscence microscopy. Appl Environ Microbiol Microbiol 33:1225–1228. https://doi.org/citeulike-article-id:4408959

Jory DE, Cabrera TR, Dugger DM, et al (2001) a Global Review of Shrimp Feed Management : Status and Perspectives. Aquaculture 104–152

Kirk KR (2010) Modeling microbial and nutrient dynamics in zero-discharge aquaculture systems

Krummenauer D, Samocha T, Poersch L, et al (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, Krummenauer D, Abreu PC, et al (2017) The use of different aerators on *Litopenaeus vannamei* biofloc culture system: effects on water quality, shrimp growth and biofloc composition. Aquac Int 25:147–162. https://doi.org/10.1007/s10499-016-0019-8

Prangnell DI, Castro LF, Ali AS, et al (2016) Some Limiting Factors in Superintensive Production of Juvenile Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in No-water-exchange, Biofloc-dominated Systems. J World Aquac Soc 47:396–413. https://doi.org/10.1111/jwas.12275

Reis WG, Wasielesky W, Abreu PC, et al (2019) Rearing of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in BFT system with different photoperiods: Effects on the microbial community, water quality and zootechnical performance. Aquaculture. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.067

Samocha TM, Prangnell DI, Hanson TR, et al (2017). Samocha, TM, DI Prangnell, TR Hanson, GD Treece, TC Morris, LF Castro & N Staresinic. 2017. Design and Operation of Super Intensive, Biofloc-Dominated Systems for Indoor Production of the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei* – The Texas A&M AgriLife

Strickland JDH, Parsons TR (1972) A Practical Handbook of Seawater Analysis. A Pract Handb seawater Anal 167:185. https://doi.org/10.1002/iroh.19700550118

UNESCO (1983) Chemical Methods for Use in Marine Environmental Monitoring. 53

Utermöhl H (1958) Zur Vervollkommung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. Int Vereinigung für Theor und Angew Limnol Kom für Limnol Methoden 9:1–39 Wasielesky

W, Abreu PC, Poersch LH, et al (2012) Influence of light intensity on biofilm formation and the performance of pink shrimp Farfantepenaeus paulensis juveniles reared in cages. Aquac Res 43:706–712. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02878.x

Wasielesky W, Atwood H, Stokes A, Browdy CL (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

Welschmeyer NA (1994) Fluorometric analysis of chlorophyll a in the presence of chlorophyll

b and pheopigments. Limnol Oceanogr 39:1985–1992. https://doi.org/10.4319/lo.1994.39.8.1985

Yun H, Shahkar E, Katya K, et al (2016) Effects of bioflocs on dietary protein requirement in juvenile whiteleg Shrimp, Litopenaeus vannamei. Aquac Res 47:3203–3214. https://doi.org/10.1111/are.12772

Zhang K, Pan L, Chen W, Wang C (2017) Effect of using sodium bicarbonate to adjust the pH to different levels on water quality , the growth and the immune response of shrimp Litopenaeus vannamei reared in zero-water exchange biofloc-based culture tanks. 1194–1208. https://doi.org/10.1111/are.12961

CAPITULO I

The influence of different light wavelengths on the culture of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in BFT using led lights

Wellica G. Reis[a]; Wilson Wasielesky Jr[b]; Paulo C. Abreu[a]; Hellyjúnyor Brandão[b]; Dariano Krummenauer[a],*

[a]Laboratory of Ecology of Microorganisms Applied to Aquaculture, Institute of Oceanography, Federal University of Rio Grande - FURG, C. P. 474, Rio Grande, RS CEP 96201-900, Brazil
*E-mail address: darianok@gmail.com (D. Krummenauer).

[b] Laboratory of Marine Shrimp Culture, Institute of Oceanography, Federal University of Rio Grande - FURG, C. P. 474, Rio Grande, RS CEP 96201-900, Brazil

Artigo publicado na revista aquaculture.
https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738924

Observação: As tabelas e as figuras foram inseridas no corpo do texto para facilitar a leitura da tese.

RESUMO

A Tecnologia de Bioflocos (BFT) permite que a produção seja realizada em locais como viveiros e estufas com muita iluminação natural, bem como em ambientes fechados, como galpões com iluminação artificial. Os sistemas de produção de camarão realizados em galpões ou aqueles que não têm uma abundância de luz natural durante certas épocas do ano podem se beneficiar com o uso de iluminação suplementar. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de diferentes comprimentos de onda da luz fornecida por lâmpadas LED na qualidade da água, na comunidade de microrganismos e no desempenho zootécnico de camarões-branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei* criados em sistema BFT. O estudo foi realizado em uma sala interna retangular de alvenaria com 15 tanques (120 L), utilizando-se uma densidade populacional de 500 m-³ de camarão e um peso inicial de 0,37g. O experimento foi delineado com cinco tratamentos e três repetições cada, diferindo nos comprimentos de onda da luz: verde, azul, vermelho, amarelo e branco (controle). Foram encontradas diferenças significativas entre os parâmetros de qualidade da água em nitrito, PAR (radiação fotossinteticamente ativa) em todas as profundidades, luz (Ix) e quantidade total de água utilizada para produção ($p < 0,05$). Os tratamentos na cor verde apresentaram um melhor processo de nitrificação do que o tratamento controle, o mesmo ocorreu para abundância geral de microrganismos: diferenças significativas foram encontradas na abundância de bactérias como cocóide livre, filamentosa livre, filamentosa aderida, vibrio e bacilo ($p < 0,05$); abundância de flagelados, ciliados,rotíferos e nematoides também foi maior no tratamento verde ($p < 0,05$). Além disso, as amebasnão foram encontradas no tratamento verde, enquanto apresentaram maior abundância em todosos outros tratamentos ($p < 0,05$). O tratamento verde apresentou maior peso final de camarão quando comparado aos tratamentos com espectro azul, amarelo e branco. Assim, apenas o comprimento de onda verde teve influência positiva tanto na qualidade da água, quanto nos microrganismos e no desempenho zootécnico de *L. vannamei* no sistema BFT.

Palavras chave: Luminosidade; Iluminação aritficial; Cores; Nitrificação; Superintensivos Aquicultura; Produção interna.

ABSTRACT

The Biofloc Technology Culture System (BFT System) allows production to be carried out in places such as ponds and greenhouses with plenty of natural lighting, as well as in closed environments such as sheds with artificial lighting. Indoor shrimp production systems or those that do not have an abundance of natural light during certain times of the year can benefit from the use of supplemental lighting. The objective of this study was to evaluate the influence of different wavelengths of light provided by LED lamps on water quality, microorganism community, and the zootechnical performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in BFT system. The study was carried out in an indoor room with 15 tanks (120 L), using a stocking density of 500 shrimp m^{-3} and an initial weight of 0.37g. The experiment was designed with five treatments and three replicates each, differing in the light wavelengths: green, blue, red, yellow, and white - control. Significant differences were found between the water quality parameters in nitrite, PAR (Photosynthetically active radiation) at all depths, light (Ix), and total amount of water used for production ($p < 0.05$). The green treatments showed a better nitrification process than the control treatment. The green treatment presented an overall higher abundance of microorganisms: significant differences were found in the abundance of bacteria such as free coccoid, free filamentous, attached filamentous, vibrio, and bacillus ($p < 0.05$); abundance of flagellates, ciliates, rotifers, and nematodes were also higher in the green treatment ($p < 0.05$). Furthermore, amoebas were not found in the green treatment, whereas they presented a higher abundance in every other treatment ($p < 0.05$). Green treatment had higher final shrimp weight when compared to treatments with blue, yellow, and white spectrum. Thus, only the green wavelength had a positive influence both on the water quality, as well as on the microorganisms and zootechnical performance of *L. vannamei* in the BFT system.

Key words: Luminosity; artificial lightning; colors; nitrification; super intensive aquaculture; indoors production.

1. INTRODUCTION

The Biofloc Technology Culture System (BFT system) consists of a technology that enables increased productivity, and reduced areas for production while improving environmental control over production, restricting the spread of diseases, and, in this way, increasing biosecurity (Krummenauer et al., 2014; Avnimelech, 2015; Samocha et al., 2017). Bioflocs are aggregates colonized by communities of bacteria, protozoa, and other groups of microorganisms, such as zooplankton, flagellates, ciliates, rotifers, and nematodes, as well as feces and leftover feed (Hargreaves, 2013; Lara et al., 2017; Reis et al., 2019). In addition, they. can serve as a supplementary food source for reared organisms, contributing to higher growth, weight gain, survival, and lower feed conversion (Wasielesky et al., 2006; Ballester et al., 2010; Krummenauer et al., 2020).

Several parameters influence the establishment of a BFT system and farmed animals' performance. One of these parameters is light, which is an abiotic factor of paramount importance for organisms that live in the aquatic environment. Variations in the rearing environment, such as nutrients concentrations, natural competition between communities of different species, and light, can influence both primary productivity and the predominance of specific groups of microorganisms more adapted to the established environmental conditions (Irigoien and Castel, 1997; Pereira Neto et al., 2008; Khanjani et al., 2022). In addition, Penaeid shrimp can show changes in behavior, growth, food intake, and reproduction when exposed to different light conditions (Gardner and Maguire, 1998; Wang et al., 2004; Guerra- Santos et al., 2017).

Aquaculture production systems with shrimp exposed to plenty of natural light may perform better than systems with low light levels due to the growth of photosynthetic microorganisms. Added to this, the presence of light also positively influences the abundance of microorganisms, reflected in better performance of *L. vannamei* (Gardner and Maguire, 1998; Wasielesky et al., 2012; Guerra-Santos et al., 2017; Reis et al., 2019), in addition, the use of artificial lights has been successfully used in fish farming (Lopez-Betancur et al., 2020; Waycott, 2021). Production in BFT systems can be carried out both in outdoor ponds or tanks and raceways or tanks in greenhouses with plenty of natural lighting, as well as in closed environments such as buildings with artificial lighting (Boyd and Clay, 2002; Burford et al., 2003; Cohen et al., 2005; Fleckenstein et al., 2019). Indoor shrimp production systems or those that do not have an abundance of natural light at certain times of the year can benefit from the use of supplemental artificial lighting, such as Light-Emitting Diode (LED) lights, which are

more efficient than most other artificial light sources, such as incandescent and fluorescent lamps, as they have a long life, low energy consumption and low heat dissipation (Das et al., 2011; Chevremont et al., 2012).

Besides the presence or intensity of light, the color of the light seems to have an important role in aquatic environments. Color is defined as the wavelengths of light in the visible spectrum (from 380 to 770 nm) that are detected by the human retina. In aquatic environments, the spectra of colors can be influenced by several factors, causing them to present different behaviors. In this way, shrimp that live in natural waters move in different layers of water and thus experience different colors of light (Guo et al., 2012).

Several studies supported that the color of light is one of the main environmental factors that influence the behavior, maturation, feeding, metabolism, and growth of different species of crustaceans (Le Reste, 1970; Caillouet, 1973; Wurts, 1984; Xu et al., 2003; Wang et al., 2004; Guo et al., 2012). Even though the effect of light colors on shrimp and other crustaceans has been substantially investigated in natural and clean aquatic environments, information on production systems is still lacking.

This is even more relevant when it comes to more turbid systems, such as the BFT system, characterized by high levels of suspended solids and dissolved organic matter in the water column, that can contribute to the scattering and absorption of transmitted light and promote changes in the spectrum of light changing, as happens in coastal waters (Blaxter, 1968; Mcfarland, 1986). These changes in the spectra of light might influence not only the animals' performance but the whole microorganism community, including processes of crucial importance for the BFT, such as nitrification.

Therefore, the objective of this study was to evaluate the influence of different wavelengths of light on water quality, microorganism community and zootechnical performance of shrimp *L. vannamei* reared in BFT system, and with that, the results can provide a better understanding to clarify this gap.

2. MATERIAL AND METHODS

The experiment was conducted from January 9 to March 19, 2020, in the facilities of the Marine Station of Aquaculture (EMA) of the Institute of Oceanography of the Federal University of Rio Grande - FURG, located in the city of Rio Grande, Cassino - RS, Brazil (32°19′S,52°15′W). Pacific white shrimp *L. vannamei* in nauplius stage were acquired from Aquatec® LTDA (Rio Grande do Norte). The shrimp were first kept in the hatchery facilities

of the Marine Shrimp Culture Laboratory, for approximately 20 days, until they reached an average weight of 0.37 ± 0.20g and were then transferred to the experimental units.

2.1. Experimental design

The water used in each experimental unit came from a reservoir, previously pumped from Cassino Beach (RS). The water for the experiment was chlorinated using 10 ppm of sodium hypochlorite and dechlorinated after four hours, with ascorbic acid (vitamin C) in the proportion of one gram for every thousand liters of water. Fifteen circular tanks with a capacity of 150 L and a culture volume of 120 L were used. In each experimental unit, an aeration system with microperforated hoses (Aerotube®) was installed. The stocking density used was 500 shrimp m^{-3}.

Five different wavelengths were used within the visible light spectrum whose lengths allow us to see the colors of light, which are between 400 and 700 nm, with three replicates for each treatment, including, Blue (B) approximately (~) 440-485 nm, Green (G) ~ 500-565 nm, Red (R) ~ 625-740 nm, Yellow (Y) ~ 565-590 nm and White (W - control) represent the superposition of the infinite colors of the visible spectrum.

All treatments were submitted to a 12h/12h photoperiod (12h with artificial lightning and 12h of darkness). In order to avoid lights colors mixing in the experimental units of different treatments, black geomembrane cones coated on the inside with aluminum foil were placed on the top of each tank. The illumination was supplied using colored LED light lamps (Foxlux®, 7 W) fixed in the upper center part of the cone, approximately 60 cm above the water surface (Fig. 1).

The penetration of light into the water column, as photosynthetically active radiation (PAR), was measured at different depths of the tanks: right below the surface of the water, in the middle (20 cm), and at the bottom (40 cm) of the tank, once a week, with the aid of a light sensor (LI-COR®, model LI-1400 dataLOGGER). The device sensor was attached to a ruler to ensure the different depths inside the experimental units. In addition, the amount of lux (lx) that reached the surface of the water was also measured with a lux meter device (Chauvin-Arnoux® - model C.A 810), at the beginning of the experiment. The amount of water to produce one kilogram of shrimp in each system was also measured.

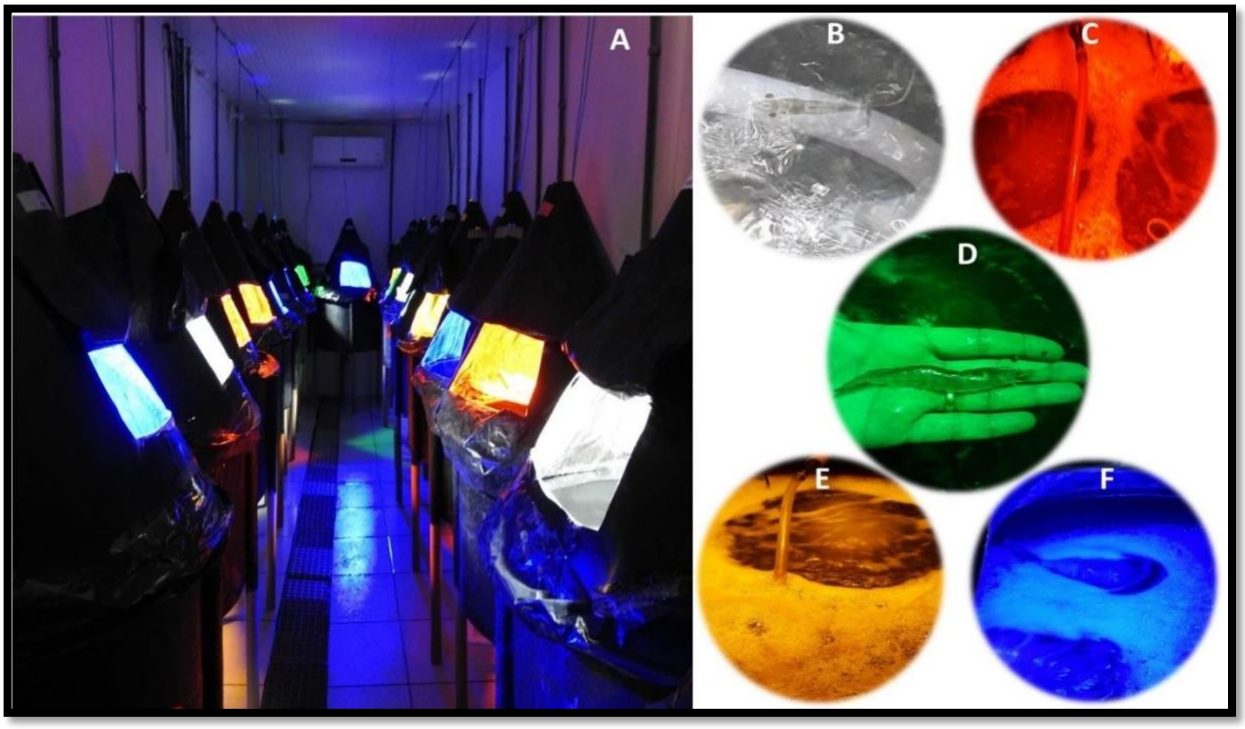

Fig. 1. Overview of experimental units (A). Tanks with different colored LED lights: White (B), red (C), green and a 15-days old shrimp (D), yellow (E), and blue (F).

2.2. Biofloc formation

Organic fertilization using sugarcane molasses with 37.27% of carbon was performed to stimulate the formation of bioflocs and control ammonia in the system. The addition of molasses was done in such a way as to maintain a C/N ratio of 15/1, by adding 6.0g of organic carbon for each gram of total ammonia nitrogen (TAN) in the water, as each gram of organic carbon is equivalent to approximately 2.5g of carbohydrate, hence, 15/1 ratio (Avnimelech, 1999; Ebeling et al., 2006). The fertilization was performed every time ammonia concentrations surpassed 1.0mg L^{-1}, calculated considering the volume of the tanks, concentration of organic carbon in the source, and C/N ratio (Brandão et al., 2021).

In addition, applications of commercial probiotics (INVE® Sanolife PRO-W) were performed once a week in the water using 0.5 g for every thousand liters of water, in order to help maintain water quality in all treatments.

2.3. Monitoring of water quality parameters

Physical and chemical parameters of water were monitored during the experiment: temperature and dissolved oxygen (YSI® PRO20) twice a day and pH once a day (pH meter®

FE 20/FG2). Salinity was checked every three days (Hach® HQ40d). The turbidity of the water was determined once a week with a turbidimeter (Hach® 2100P, Hach Company).

Water samples were collected daily to quantify the concentration of total ammonia nitrogen (TAN), and nitrite (NO_2^-N) determined according to (UNESCO, 1983) and Strickland and Parsons (1972), respectively. When nitrite concentrations exceeded the safety level of 26 mg L^{-1} allowed for the species (Lin and Chen, 2003), a water exchange of 20% of the tank volume was carried out.

The concentrations of nitrate ($N\text{-}NO_3^-$), phosphate ($P\text{-}PO_4^{3-}$), and total suspended solids (mg L^{-1}) were analyzed weekly using the methodology proposed by Strickland and Parsons (1972), and for total suspended solids, the water samples were filtered with GF50-A fiberglass filters, using a vacuum pump (Prismatec®). Total suspended solids levels were maintained up to 500 mg L^{-1} as recommended by (Gaona et al., 2011), and when the values exceeded the recommended value, clarifiers were used. To clarify the tanks, a submerged pump removed part of the water with bioflocs from the tanks, directing it to the sedimentation tanks. Due to gravitational action, the particulate organic matter present in the water sedimented, and then the supernatant water - with lower TSS concentrations, was returned to the tanks also by gravity (Ray et al., 2010; Gaona et al., 2011;).

Alkalinity was analyzed every three days according to the methodology proposed by APHA (2012). When alkalinity reached values below 150 mg $CaCO_3$ L^{-1} and/or pH values below 7.6, adjustments were made with hydrated lime, following the methodology described by (Furtado et al., 2011) and (Zhang et al., 2017). Alkalinity and pH measurements were also used to determine carbon dioxide concentrations dissolved in the culture water according to the methodology proposed by Timmons and Ebeling (2010), as per the following calculation: $[CO_2]$ = alkalinity x $10^{(6,3\text{-}pH)}$.

The concentration of chlorophyll *a* was determined once a week from 10 mL samples of culture water filtered through GF 50-A glass fiber microfilters. The photosynthetic pigment was extracted by immersing the filters in 10 mL of 90% acetone (Merck® PA), placed in dark flasks, and kept in a freezer (- 12 ◦C). After a period of 24 h, the concentration of chlorophyll *a* was read using a fluorimeter (Turner Designs Trilogy) (Welschmeyer, 1994).

2.4. Microorganisms assessment

To quantify the microorganisms, present in the culture water, water samples were collected (18 mL) from each experimental unit, once a week. The samples were fixed in

formalin (final concentration of 4%) and kept in amber flasks for later counting and identification of the groups of microorganisms.

To determine the abundance of bacteria, aliquots of the fixed samples were filtered through polycarbonate membrane filters (Nucleopore, pore size: 0.2 μm; and 25 mm diameter) previously darkened with Irlan Black, and then stained with 1% Acridine Orange at the concentration of 1 μg ml^{-1} (Hobbie et al., 1977). The bacteria were photographed using a photographic camera coupled to an epifluorescence microscope (Axioplan-Zeiss, with 1000x magnification) for later counting of 30 randomly chosen fields. To determine the abundance of protozoa and other groups of microorganisms, aliquots of 0.5 mL of samples were placed in a sedimentation chamber and 30 random fields were counted in an inverted microscope (Nikon TS 100 with a final magnification of 200 x) (Utermohl, 1958).

The microorganisms were then classified into different groups, for bacteria: coccoids, free filamentous, attached filamentous, vibrios, and bacilli; for protozoa and other groups: flagellates, ciliates, nematodes, rotifers, and amoebas. All counts were performed at the Laboratory of Ecology of Microorganisms Applied to Aquaculture - FURG.

2.5. Feeding management

The shrimp were fed twice a day, using commercial diet (Potimar GUABI® - 40% protein) until they reached 1.0 g and then a feed containing 38% PB. To control consumption, 10% of the feed was placed in feeding trays and the remainder was distributed in the tank. The feeding rate was adjusted every week, according to the methodology described by Jory et al. (2001) until the animals reached 1.0 g and after that, the adjustments in the feeding rates were carried out following the methodology of Garza de Yta et al. (2004).

2.6. Shrimp growth perfomance

Shrimp growth performance was monitored through weekly biometrics of 20 animals per experimental unit, using a digital scale with a precision of 0.01 g (Marte® scientific AS5000C). Weekly weight gain (WWG) and apparent feed conversion rate (FCR) (Bagenal and Tesch, 1978; Van Wyk and Scarpa, 1999) were evaluated by the following calculations:

WWG = (Final Weight – Initial Weight) / number of weeks.

FCR = total feed offered/biomass gain.

Survival Rate: (final biomass / individual average weight) / number of individuals stocked x 100.

Productivity: (final biomass – initial biomass) / tank volume.

3. STATISTICAL ANALYSIS

Data were submitted to homoscedasticity analysis of variances and analysis of normality of data distribution. When the assumptions were not met, statistical transformations were used. Subsequently, a one-way analysis of variance – ANOVA ($\alpha = 0.05$) was performed followed by a post hoc Tukey test, when significant differences were found (Zar, 2010).

4. RESULTS

The mean values (± SD) of the chemical and physical parameters of water during the 70-day study period are shown in (Table 1). Variables such as nitrite, the total amount of water used for production, photosynthetically active radiation (PAR), and lux showed significant differences ($p < 0.05$) between treatments. It is also possible to add, a significant difference in the total amount of water to produce the same stocking density of shrimp ($p < 0.05$). The maximum was 495 L for the white treatment and the minimum of 320 L for the green treatment. No significant differences were found between treatments for temperature, dissolved oxygen, pH, TAN, nitrate, phosphate, alkalinity, CO_2, settleable solids, total suspended solids, and Chlorophyll *a* ($p > 0.05$).

Table 1

Physical and chemical parameters of water (mean values ± standard deviation) in the treatments: Green, blue, red, yellow, and white after 70 days. Different superscripted letters in a row denote significant differences ($p < 0.05$) between treatments.

Parameters	**Green**	**Blue**	**Red**	**Yellow**	**White**
Temperature	29.63 ± 1.60	29.50 ± 0.90	29.16 ± 1.10	29.17 ± 1.01	29.07 ± 1.41
D.O (mg L^{-1})	6.07 ± 0.68	6.10 ± 0.61	5.99 ± 0.69	6.10 ± 0.61	6.12 ± 0.57
Salinity (mg of $CaCO_3$ L^{-1})	30.95 ± 1.18	31.03 ± 1.21	30.81 ± 1.24	30.69 ± 0.96	30.77 ± 1.16
pH	7.94 ± 0.20	7.94 ± 0.19	7.96 ± 0.20	7.93 ± 0.20	7.97 ± 0.20
TA-N (mg L^{-1})	1.14 ± 2.02	1.13 ± 1.92	1.28 ± 1.93	1.19 ± 2.02	1.15 ± 1.95
$N\text{-}NO_2$ (mg L^{-1})	7.21 ± 10.14	7.46 ± 9.94	8.63 ± 10.29	8.76 ± 10.59	11.27 ± 10.96
$N\text{-}NO_2$ (mg L^{-1}) **	9.43 ± 9.76^{a}	9.65 ± 9.65^{ab}	11.17 ± 9.64^{ab}	11.34 ± 9.56^{ab}	14.57 ± 8.92^{b}
$N\text{-}NO_3$ (mg L^{-1})	30.53 ± 36.43	29.88 ± 36.91	26.47 ± 34.93	23.85 ± 30.74	19.20 ± 26.43
$PO_4^{3-}P$ (mg L^{-1})	2.19 ± 1.75	2.29 ± 1.76	2.32 ± 1.74	2.09 ± 1.60	1.75 ± 1.18
Alkalinity (mg L^{-1})	141.15 ± 24.52	143.10 ± 22.38	143.68 ± 24.78	146.44 ± 23.33	143.56 ± 24.49

Free CO_2 (mg L^{-1})	3.44	±	1.23	3.48	±	1.15	3.31	±	1.26	3.48	±	1.21	3.16	±	1.19
TSS (mg L^{-1})	425.21	±	124.76	390.00	±	137.24	365.00	±	108.14	418.33	±	90.91	325.21	±	150.21
Turbidity (NTU)	141.72	±	100.22	123.63	±	102.10	135.65	±	95.74	140.39	±	95.03	113.41	±	89.43
Settleable solids (mL L^{-1})	5.73	±	4.77	5.35	±	5.12	6.76	±	7.51	6.83	±	6.20	4.82	±	4.84
Chlorophyll *a* (µg L^{-1})	1.33	±	0.67	1.08	±	0.54	1.22	±	0.99	1.07	±	0.58	1.15	±	0.67
PAR surface (µmol m^{-2} s^{-1})	12.55	±	17.10^{c}	28.80	±	15.60 ^{b}	33.20	±	19.80^{b}	49.51	±	14.50^{a}	79.05	±	42.00^{a}
PAR 20 cm (µmol m^{-2} s^{-1})	2.70	±	4.30^{b}	4.82	±	8.90^{b}	9.73	±	14.50^{a}	14.63	±	14.20^{a}	20.45	±	23.40^{a}
PAR 40 cm (µmol m^{-2} s^{-1})	1.11	±	2.60^{b}	1.93	±	4.80^{b}	3.32	±	6.50^{a}	5.10	±	8.40^{a}	6.20	±	11.00^{a}
Light (lx)	473.00	±	35.01^{cd}	519.67	±	56.33^{bc}	410.67	±	13.69^{d}	1051.00	±	23.28^{ab}	1853.00	±	68.79^{a}
Total amount of water (L)	320.00	±	45,85^{b}	330.00	±	51,96^{b}	340.00	±	17.32^{b}	380.00	±	75,94^{ab}	495.00	±	21.21^{a}

******Average nitrite from nitrite accumulation starting on the 16th day.

***** DO (Dissolved Oxygen); TSS: Total Suspended Solids; PAR: Photosynthetically active radiation; TA-N: total ammonia nitrogen.

Variations in nitrogen compounds concentration over the 70 days of trial are shown in Figure 2. According to Fig. 2A, no significant difference between treatments ($p > 0.05$) in the TAN concentrations was found. The maximum level recorded was 6.25 mg L^{-1} for all treatments.

There was a significant difference between treatments for nitrite concentrations ($p < 0.05$). The highest measured nitrite values were 30 mg L^{-1} for the green treatment and 28 mg L^{-1} for the white, blue, red, and yellow treatments. It is worth mentioning that we worked with a safety margin for shrimp concerning nitrite levels, which was 26 mg L^{-1}. In all treatments, water exchange of 20% of the tank volume was carried out when they exceeded the safety value. The green and blue treatments showed a decrease in nitrite concentrations from the 36th day and undetectable values on the 51st day. On the other hand, treatments such as white, yellow, and red started showing a decreasing pattern from the 46th day. Treatments yellow and red reached no detectable values on day 61 and white only on day 68 (Fig. 2B).

As shown in Fig.2C, there was no significant difference in nitrate concentrations between treatments ($p > 0.05$), with a maximum of 108.33 mg L^{-1} for green and blue treatments, 102.93 mg L^{-1} for red, 90.21 mg L^{-1} for yellow, and 67.83 mg L^{-1} for the white treatment.

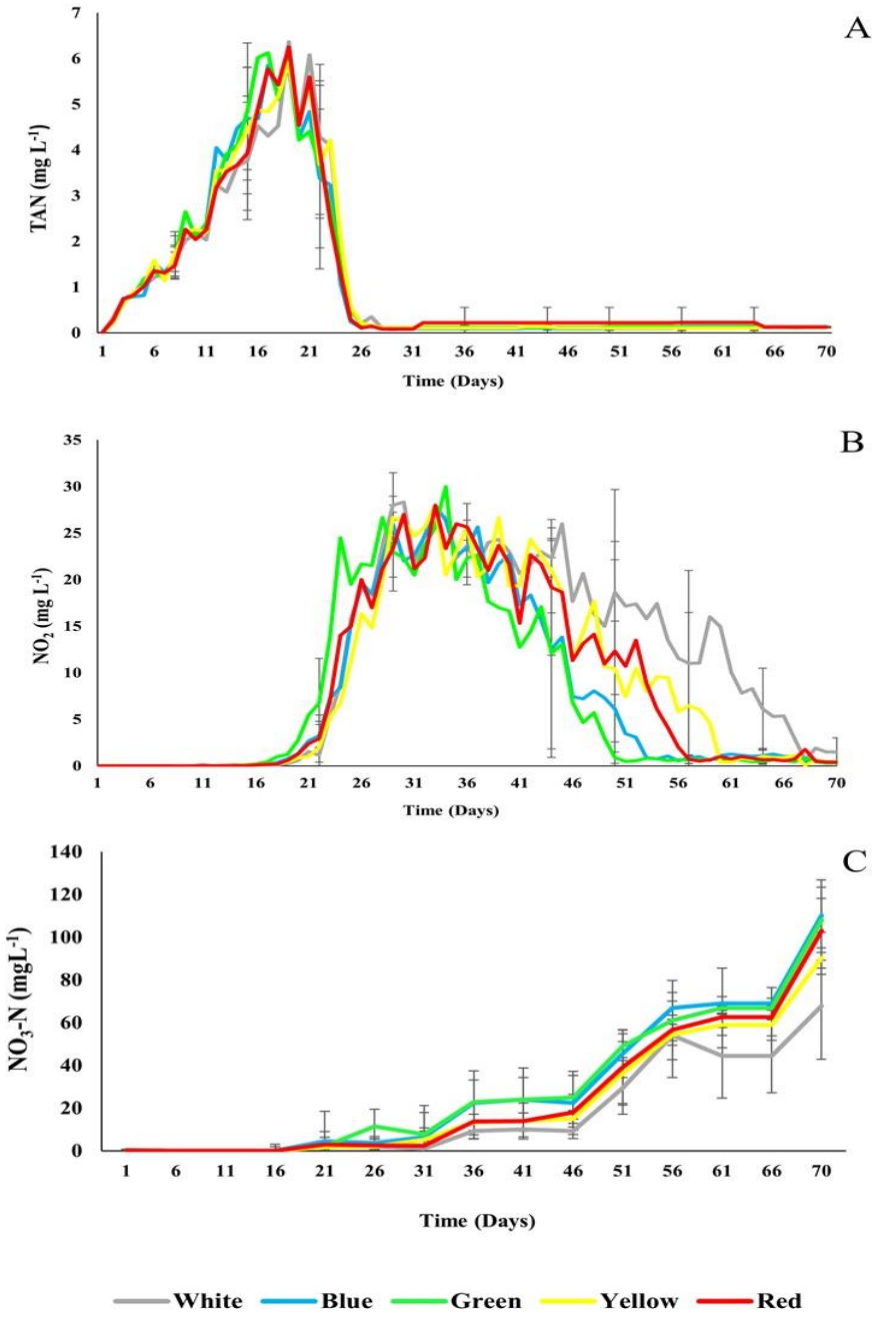

Fig. 2. Variation (mean ± standard deviation) in total ammonia nitrogen – $N\text{-}NH_3^+$ (A), nitrite – $N\text{-}NO_2^-$ (B), and nitrate – $N\text{-}NO_3^-$ (C) concentrations during 70 days of the rearing of *L. vannamei* in BFT systems under different colored LED lights: white, red, green, yellow, and blue.

Fig. 3A shows coccoid bacteria concentrations throughout the experiment. Significant differences were found between treatments at initial and final times ($p < 0.05$), with a minimum concentration of 0.9×10^6 in the red treatment and a maximum of 4.09×10^6, also in the red treatment. For free filamentous bacteria, significant differences were observed among the

treatments on days 7 and 35 ($p < 0.05$). There was a maximum of 4.09×10^6 for red and a minimum of 0.1×10^6 for green (Fig. 3B).

Fig. 3C shows the attached filamentous bacteria concentrations throughout the experiment. There was a significant difference between treatments at 7, 35, and 70 days ($p < 0.05$), with a maximum of 9.84×10^4 for yellow and a minimum of 0.10×10^4 for white. For Vibrio there were also differences at all times, with a maximum of 2.07×10^4 for blue and a minimum of 0.0×10^4 for Blue, Red, and Yellow (Fig. 3D).

Fig. 3E shows bacillus concentrations throughout the experiment. There were significant differences between treatments on days 7 and 35 ($p < 0.05$), with a maximum of 3.96×10^5 for green and a minimum of 0.0×10^5 for white, red, and blue.

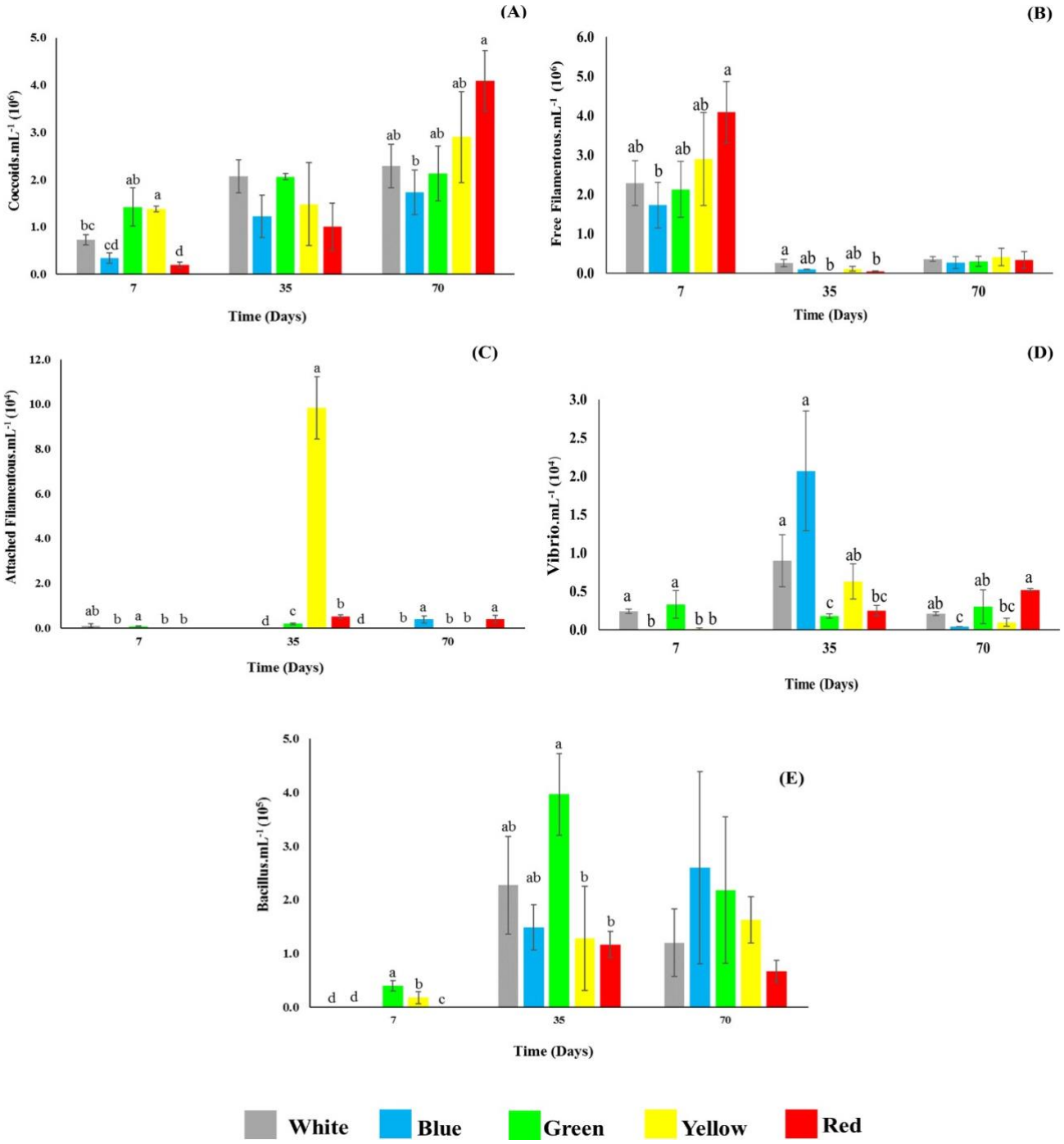

Fig.3. Variation in the abundance of bacterial groups - coccoid (A), free filamentous (B), attached filamentous (C), vibrios (D), and bacillus (E), at different times in the rearing of *L. vannamei* in BFT systems under different colored LED lights: white, red, green, yellow, and blue.

Significant differences were found in flagellate concentrations between treatments at 7 and 35 days ($p < 0.05$), with maximum values of 1.02×10^3 for the green treatment and a minimum of 0.19×10^3 for the blue treatment (Fig.4A). For ciliates, there were significant differences at 7, 35, and 70 days of the experiment ($p < 0.05$), with a minimum of 0.4×10^3 in the white treatment and a maximum of 1.71 in the red treatment (Fig.4B).

Fig.4C shows that there were significant differences in rotifer concentrations on days 7, 35, and 70 in the different treatments ($p < 0.05$), with a minimum of 0.0×10^2 for blue, red, yellow, and white treatments. The maximum value was 1.56×10^2 for the green treatment.

Significant differences were found for nematode concentrations on days 35 and 70 ($p < 0.05$), with a minimum of 0.0×10^1 for the red and white treatments and a maximum of 6.61×10^1 for the blue and white treatments (Fig.4D). There were significant differences in amoeba concentrations at 35 and 70 days of the experiment ($p < 0.05$), with minimum concentrations of 0.0×10^3 for the green, blue, red, and white treatments, and a maximum of 6.96×10^3 for the yellow and red treatments (Fig. 4E).

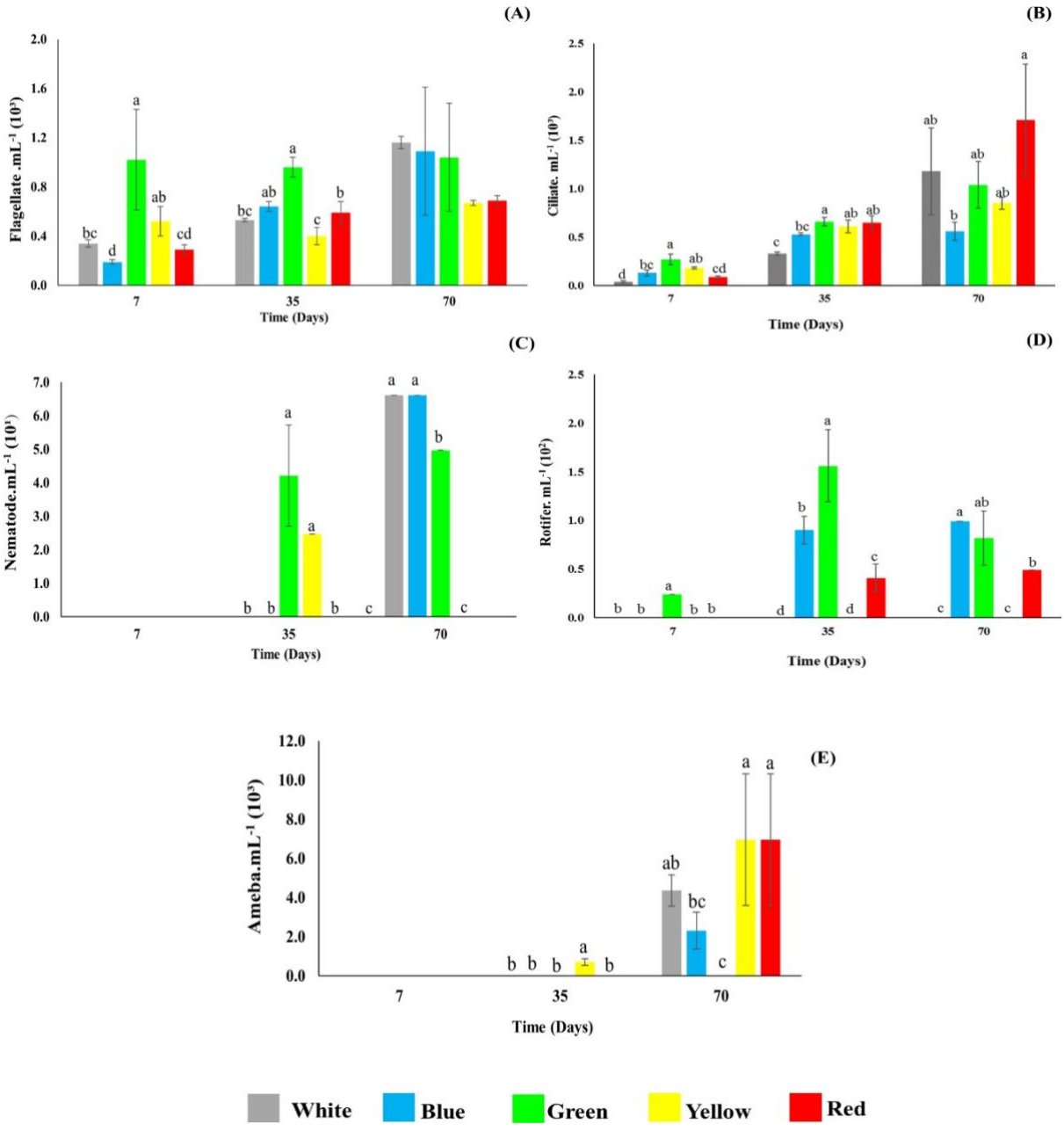

Fig.4. Variation in the abundance of protozoa groups - flagellates (A), ciliates (B) rotifers (C), nematodes (D), and amoeba (E), at different times in the rearing of *L. vannamei* in BFT systems under different colored LED lights: white, red, green, yellow, and blue.

The results for the total microorganisms abundance during 70 days of this study are shown in Table 2. Significant differences were found in flagellates, ciliates, rotifers, nematodes, and amoeba concentrations between the treatments ($p < 0.05$).

Table 2

Total of microorganisms (mean values ± standard deviation) in the treatments: Green, blue, red, yellow, and white after 70 days. Different superscripted letters in a row denote significant differences ($p < 0.05$) between treatments.

Microorganisms	Green	Blue	Red	Yellow	White
Coccoids.mL^{-1}	$1.82x10^{6} \pm 3.37x10^{5}$	$1.15x10^{6} \pm 5.82x10^{5}$	$2.92x10^{6} \pm 8.28x10^{5}$	$2.19x10^{6} \pm 7.11x10^{5}$	$2.22x10^{6} \pm 1.11x10^{5}$
Free Filamentous.mL^{-1}	$9.19x10^{5} \pm 1.06x10^{5}$	$8.22x10^{5} \pm 2.77x10^{5}$	$1.63x10^{6} \pm 1.64x10^{5}$	$1.27x10^{6} \pm 2.46x10^{5}$	$1.14x10^{6} \pm 3.99x10^{4}$
Attached Filamentous.mL^{-1}	$6.98x10^{2} \pm 2.77x10^{2}$	$1.39x10^{3} \pm 3.07x10^{2}$	$1.88x10^{3} \pm 8.54x10^{2}$	$1.48x10^{4} \pm 1.48x10^{4}$	$2.73x10^{2} \pm 2.73x10^{2}$
Vibrio.mL^{-1}	$2.77x10^{3} \pm 1.10x10^{3}$	$4.76x10^{3} \pm 3.56x10^{3}$	$2.68x10^{3} \pm 1.20x10^{2}$	$2.34x10^{3} \pm 7.10x10^{2}$	$2.95x10^{3} \pm 8.97x10^{2}$
Bacillus.mL^{-1}	$1.84x10^{5} \pm 8.04x10^{4}$	$1.26x10^{5} \pm 5.49x10^{4}$	$4.62x10^{4} \pm 3.86x10^{3}$	$9.75x10^{4} \pm 4.14x10^{4}$	$9.16x10^{4} \pm 4.44x10^{3}$
Flagellate.mL^{-1}	$8.79x10^{2} \pm 1.03x10^{2}$ **a**	$4.57x10^{2} \pm 1.70x10^{1}$ **b**	$4.63x10^{2} \pm 2.48x10^{1}$ **b**	$6.57x10^{2} \pm 4.54x10^{1}$ **a**	$3.97x10^{2} \pm 2.48x10^{1}$ **b**
Ciliates.mL^{-1}	$6.61x10^{2} \pm 7.78x10^{1}$ **ab**	$4.10x10^{2} \pm 3.72x10^{1}$ **b**	$5.01x10^{2} \pm 1.65x10^{2}$ **a**	$5.45x10^{2} \pm 2.48x10^{1}$ **ab**	$6.20x10^{2} \pm 7.44x10^{1}$ **ab**
Rotifero.mL^{-1}	$8.81x10^{1} \pm 3.89x10^{0}$ **a**	$6.33x10^{1} \pm 3.89x10^{0}$ **ab**	$3.30x10^{1} \pm 0.00x10^{0}$ **ab**	$0.00x10^{0} \pm 0.00x10^{0}$ **b**	$0.00x10^{0} \pm 0.00x10^{0}$ **b**
Nematode.mL^{-1}	$3.06x10^{1} \pm 4.12x10^{0}$ **a**	$2.20x10^{1} \pm 1.56x10^{1}$ **ab**	$0.00x10^{0} \pm 0.00x10^{0}$ **b**	$8.26x10^{0} \pm 0.00x10^{0}$ **ab**	$1.65x10^{1} \pm 1.65x10^{1}$ **ab**
Amoeba.mL^{-1}	$0.00x10^{0} \pm 0.00x10^{0}$ **a**	$9.34x10^{2} \pm 4.19x10^{2}$ **ab**	$3.72x10^{3} \pm 7.91x10^{2}$ **b**	$7.77x10^{2} \pm 5.21x10^{2}$ **ab**	$1.65x10^{3} \pm 4.04x10^{2}$ **ab**
Total protozoa. mL^{-1}	$1.66x10^{3} \pm 1.52x10^{2}$	$1.89x10^{3} \pm 4.26x10^{2}$	$5.12x10^{3} \pm 9.31x10^{2}$	$1.99x10^{3} \pm 5.00x10^{2}$	$2.68x10^{3} \pm 4.86x10^{2}$
Total bacteria. mL^{-1}	$2.92x10^{6} \pm 3.14x10^{5}$	$2.10x10^{6} \pm 6.88x10^{5}$	$4.60x10^{6} \pm 9.87x10^{5}$	$3.58x10^{6} \pm 9.85x10^{5}$	$3.46x10^{6} \pm 7.41x10^{4}$
Total microorganisms. mL^{-1}	$2.93x10^{6} \pm 3.14x10^{5}$	$2.10x10^{6} \pm 6.89x10^{5}$	$4.61x10^{6} \pm 9.88x10^{5}$	$3.58x10^{6} \pm 9.84x10^{5}$	$3.46x10^{6} \pm 7.46x10^{4}$

Fig.5 shows protozoa and other groups found in the green treatment.

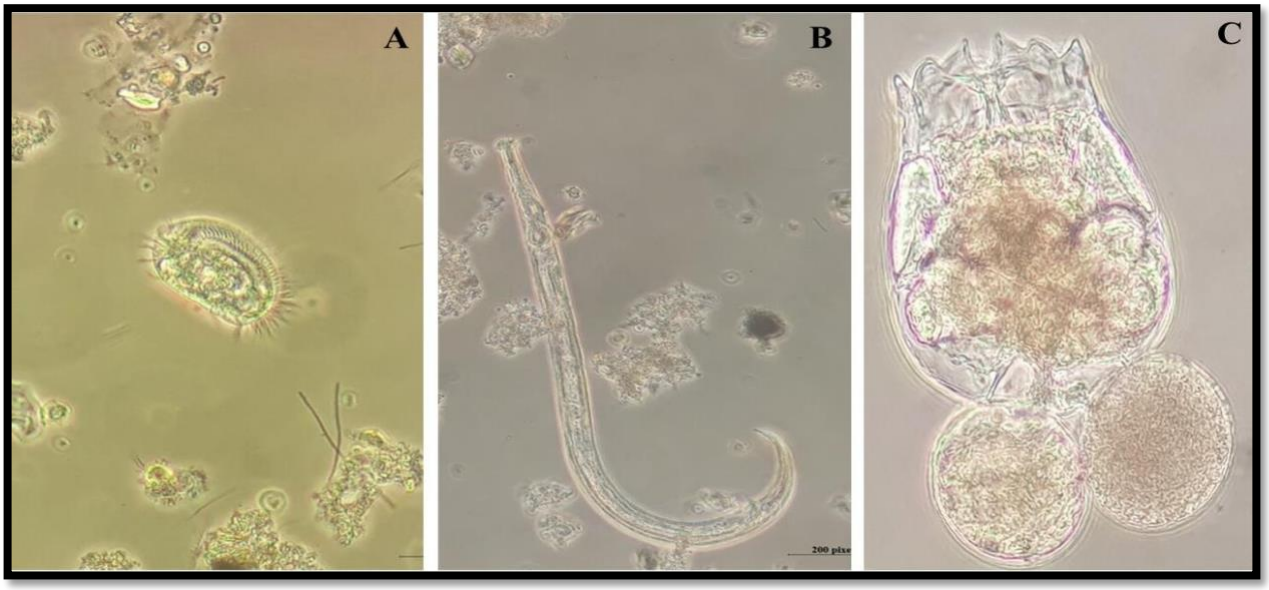

Fig.5. Ciliate (A), nematode (B), and (C) rotifer with attached eggs in the green treatment (C). Magnification of 20x by inverted microscope (image: Wellica G. Reis).

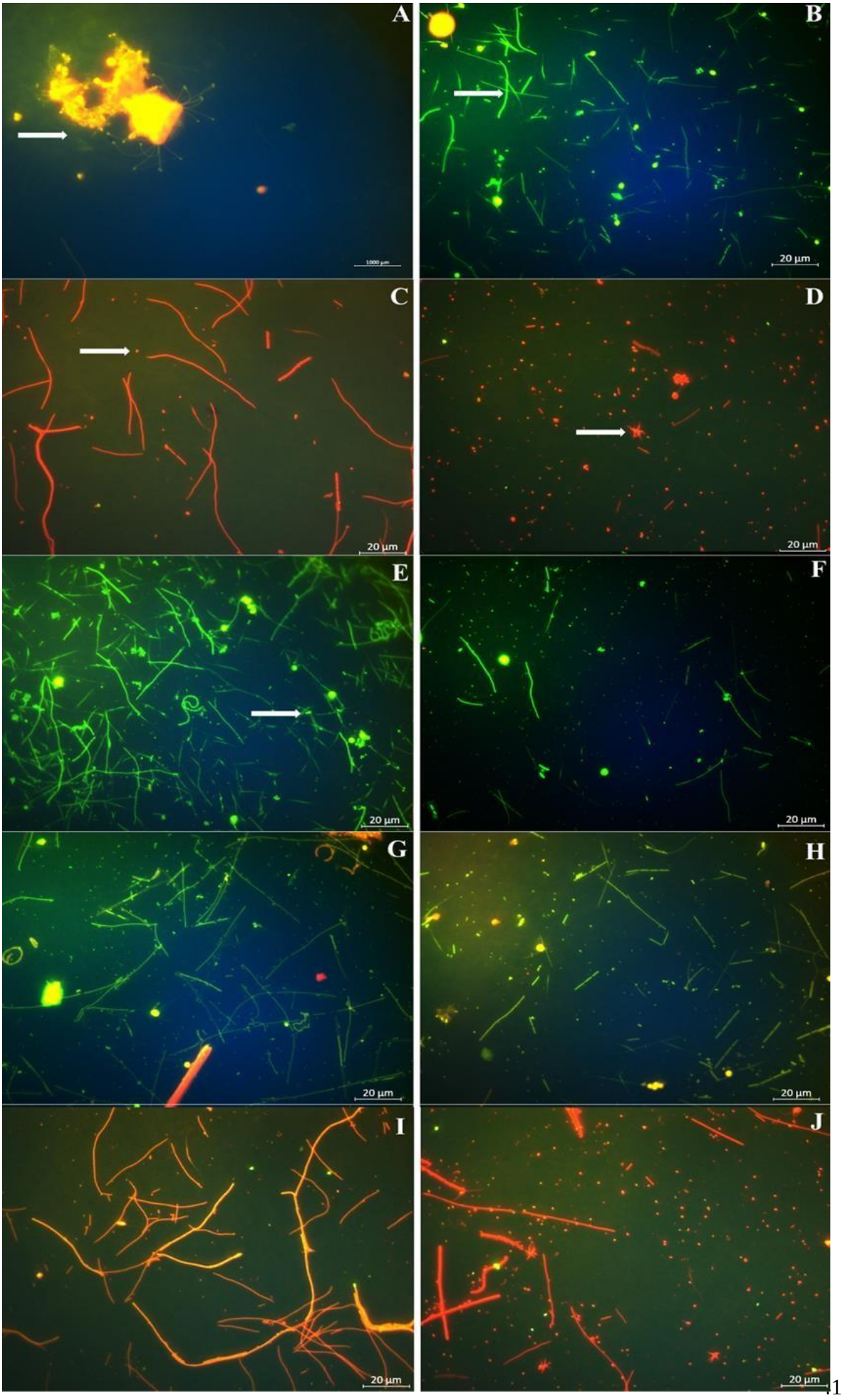
A
1000 µm
B
20 µm
C
20 µm
D
20 µm
E
20 µm
F
20 µm
G
20 µm
H
20 µm
I
20 µm
J
20 µm

Fig. 6. Microscopic images of the microorganisms abundance in the microbial floc: Green treatment: (A) Vorticella (protozoan) in the 7th day of experiment; (B) Free filamentous bacteria in the 70th day; Blue treatment: (C) free coccoids (bacteria) in the 7th day of experiment; (D) Amoeba (protozoan) in the 70th day; Red treatment: (E) Bacillus (bacteria) in the 7th day of experiment (F); Yellow treatment: (G) 7th day of experiment; (H) 70th day of experiment; White treatment: (I) 7th day of experiment; (J) 70th day of experiment. Magnification of 1000 x by epifluorescence microscope (image: Wellica G. Reis).

When comparing protozoa and other groups, it is possible to observe that amoeba was the main organism in blue, red, yellow, and white treatments, while in the green treatment, flagellates and ciliate were the main groups of microorganisms. No differences were found when comparing the total bacterial composition, total protozoa, and total microorganisms between treatments since all treatments showed a similar composition with coccoid bacteria being the main group (Fig. 7).

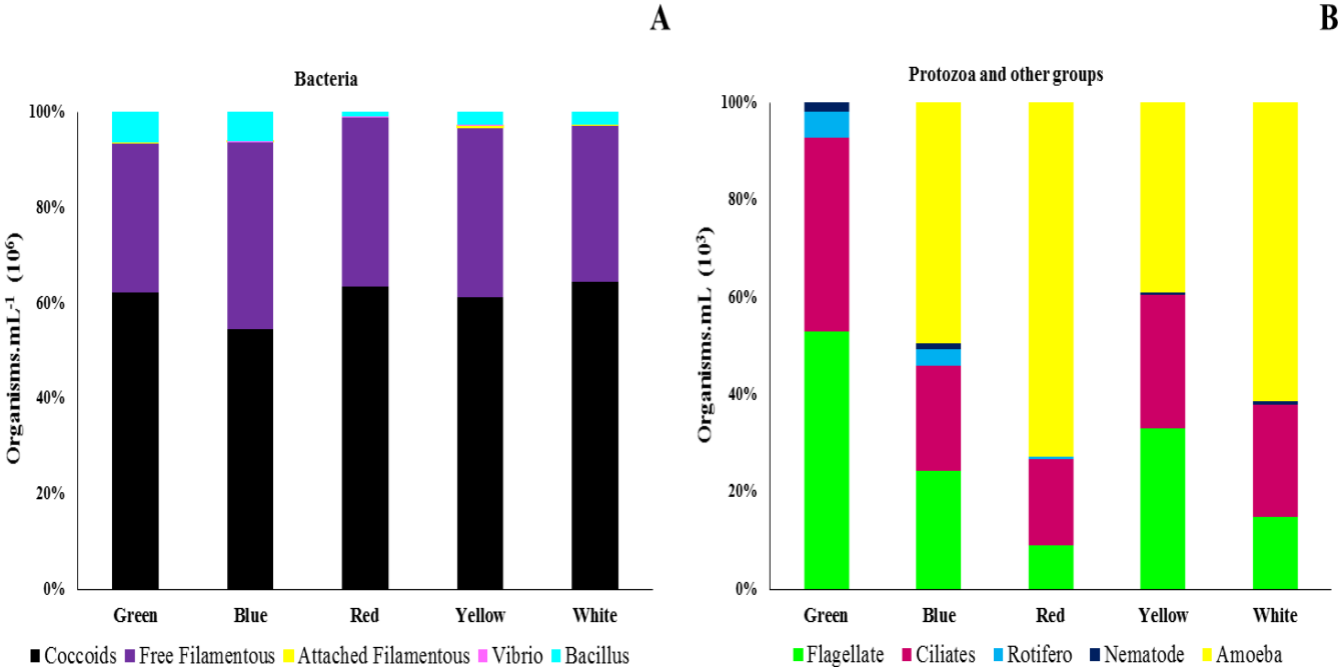

Fig.7. Total Bacterial (A) and protozoa (B) Total composition in the rearing of *L. vannamei* in BFT systems under different colored LED lights: white, red, green, yellow, and blue.

The results for the growth performance of *L. vannamei* reared during 70 days of this study are shown in Table 3. A significant difference was only found in final weight between the

treatments ($p < 0.05$). For survival, feed conversion rate and productivity there was no significant differences ($p > 0.05$).

Table 3

Mean values (± standard deviation) of the growth performance of *L. vannamei* in the treatments: White, blue, green, yellow, and red after 70 days. Different superscripted letters in a row denote significant differences ($p < 0.05$) between treatments.

	Green	Blue	Red	Yellow	White
Initial weight (g)	0.37 ± 0.20	0.37 ± 0.20	0.37 ± 0.20	0.37 ± 0.20	0.37 ± 0.20
Final weight (g)	7.59 ± 0.30^{a}	6.91 ± 0.26^{b}	7.31 ± 0.26^{ab}	6.88 ± 0.28^{b}	6.19 ± 0.09^{c}
Survival (%)	92.88 ± 1.66	85.77 ± 3.82	90.66 ± 2.17	86.22 ± 2.73	90.66 ± 2.88
FCR	1.36 ± 0.01	1.62 ± 0.14	1.42 ± 0.06	1.58 ± 0.02	1.63 ± 0.10
Yield (Kg/m^3)	3.53 ± 0.12	2.96 ± 0.24	3.31 ± 0.19	2.96 ± 0.08	2.80 ± 0.12

5. DISCUSSION

5.1 Influence of different wavelengths of LED light on water quality

There were significant differences between treatments in parameters such as nitrite, light penetration into the water column at different depths, lux, and the total amount of water used for shrimp production. For the other parameters, such as temperature, dissolved oxygen, pH, TAN, nitrate, phosphate, alkalinity, CO_2, settleable solids, total suspended solids, and chlorophyll *a*, there was no significant difference. The values for these variables are within the range considered acceptable for the species under study, therefore, they probably did not cause any difference in performance indices (Van Wyk e Scarpa,1999; Gaona et al., 2011; Furtado et al., 2016; Zhang et al., 2017).

Nitrite toxicity is influenced by salinity and pH, therefore, the lower the values for these parameters, the more toxic nitrite becomes. The safety levels for nitrite concentrations in *L. vannamei* cultures are 15.2 and 25.7 mg NO_2 L^{-1} for salinities of 25 and 35, respectively (Lin and Chen, 2003). In the present study, 26 mg NO_2 L^{-1} was used as a threshold safety level, so that, when this safety value was exceeded, 20% of the total volume of the water in the tanks was exchanged. Green and blue treatments showed a more effective nitrification process, since the decrease phase of nitrite concentration started around seven days earlier compared to red and yellow treatments, and 17 days earlier when compared to the white treatment. Nitrifying

bacteria can be affected by light due to photosensitivity, as described by some authors, such as Vergara et al. (2016) and Reis et al. (2019) who also observed the photosensitivity of nitrifying bacteria which caused a reduction of 20 to 60% in the ammonia removal rates and about 26 to 71% in the nitrite removal rates, exposed both to white LED light with different intensities and greenhouse with natural ambient light, respectively.

In addition, this study highlights the difference in nitrite concentrations at the different wavelengths (colors) used in the experiment, which can be explained by the photosensitivity of nitrifying bacteria not only to light but also to different wavelengths of light. In a work carried out by Guerrero and Jone (1996), the authors observed that nitrifying bacteria have differential photosensitivity activity in the blue spectrum region (400 to 475nm) and that, in general, the inhibition by blue light is lower when compared to other wavelengths. The results found in the present study corroborate those of the authors in noting similar results regarding the wavelength to the blue treatment, but also adds the anticipation of decreasing nitrite levels in the green wavelength (500-565nm).

Therefore, the nitrifying bacteria both at the wavelength in the blue treatment and the green treatment were less photosensitive at these wavelengths in the biofloc system, when compared to the red, yellow, and white treatments. Chlorophyll *a* concentration in the experiment were low in all treatments and there were no significant differences between treatments, seeming to not be a factor that competed for space and food with other microorganisms, and probably did not influence nitrification in this experiment, as verified by Reis et al. (2019).

In parallel to this, it is still possible to add that the penetration of different wavelengths into the water column at different depths of the culture tank was different. Bioflocs consist of aggregates colonized by a bacterial community, microalgae, protozoa, zooplankton, nematodes, rotifers as well as feces and food scraps (Hargreaves, 2013; Lara et al., 2017). The electromagnetic radiation incident on the water surface does not fully penetrate, a significant part is reflected and backscattered, and the absorption is still influenced by the water molecule structure, by particles suspended in the water, and considerably by dissolved organic compounds (Wetzel 2000; Jensen 2009). Thus, all the organic material suspended in the culture water possibly influenced the results of the photosynthetically active radiation in the water column.

In a study carried out by Bukata et al., (1983), the authors observed that with increasing concentration of COD (dissolved organic carbon) there is a decrease in reflectance in the entire visible range, albeit minimal in the red range and accentuated in the blue range. In the present study, results were significantly smaller for the wavelengths in the blue and green treatments, mainly in the depths of 20 and 40 cm, when compared to the red, yellow, and white treatments.

In a natural environment, like the oceans, the shorter wavelengths, such as blue and green, are the ones that penetrate the water most at greater depths with natural lighting. These same wavelengths but using artificial lighting in a biofloc system with all the organic material in suspension, showed the lowest values of photosynthetically active radiation occurring in the water column. Furthermore, another important factor to consider is that these lower photosynthetically active radiation results at different depths of these wavelengths in the blue and green treatments may have benefited the nitrification process.

The different wavelengths also influenced the water exchange rate of the culture tanks and, consequently, the total amount of water used for *L. vannamei* production. In the present study, a water exchange of 20% of the total volume of the tank was carried out to keep nitrite levels in the range set. More water was exchanged in the treatment using white light compared to the others. When less water exchange is performed in the system, the disposal of microorganisms off the system decreases, which includes nitrifying bacteria. Thus, as it is known, chemoautotrophic nitrifying bacteria grow slower when compared to heterotrophic bacteria, so the decrease in water exchange is beneficial in the culture system as it avoids wash-off of these bacteria (Ebeling et al., 2006). It is still possible to add that the decrease in water exchange reduces the manipulation and thus, could also reflect in less stress to the reared animals. In addition, the fact that the same productivity using less water was achieved regardless of the treatment contributes to a more sustainable production.

5.2 The influence of different wavelengths of LED light on microorganisms.

Regarding the abundance of microorganisms, it is possible to verify that the different wavelengths of light positively influenced both bacteria and protozoa, with significant differences between treatments. In the present study, the different wavelengths influenced the abundance of bacteria throughout the experiment. Variations in the abundance of groups of microorganisms in the different light spectra seem to have a strong relationship with predation and food availability, characterizing top-down and bottom-up relationships, because throughout

the study, as the different groups of microorganisms emerged (supply of food), the appearance of groups of predatory organisms also occurred, thus contributing to the microbial loop. This trend was observed across all treatments. However, it was observed in the green spectrum treatment that the abundance of microorganisms in most of the different periods was higher and it was the only treatment that the amoeba microorganism was not found. Therefore, probably the spectrum of green can influence the ambulance of microorganisms in the treatment.

For coccoid bacteria, there were differences, both at seven days and at 70 days. In addition, there was a higher abundance in the green and yellow treatments after seven days and a significant increase in all treatments at the end of the experiment. Research carried out by Ferreira et al. (2008) on the formation of microbial flocs by two species of shrimp (*L. vannamei* and *Farfantepenaeus paulensis*), suggests this abundance of coccoid bacteria may be related to the abundance of biofloc-forming bacteria.

For free and adherent filamentous bacteria there were also significant differences in the different wavelengths. For the free filamentous group, there were differences in abundance both at the beginning (7 days) and at 35 days. As for attached filamentous bacteria, there were differences in all periods. This high concentration of free filamentous, especially at the beginning, may be related to the higher availability of dissolved organic carbon in the culture water when we introduced an external source of organic carbon at the beginning of the experiment. In a study carried out by Anesio et al. (2003), the authors found that free and adherent bacteria arise differently in the environment so that when there is higher availability of dissolved organic carbon in the medium, there is a higher abundance of free bacteria and later appearance of adhered bacteria, and parallel to this, the fostering of detrital binding at higher trophic levels.

It is still possible to add significant differences for vibrio in all periods of the treatments. In addition, the antagonism between vibrio and bacilli was observed in all treatments. It is important to note that in the experiment, probiotics were used in all culture tanks. This result corroborates Krummenauer et al. (2014); and Hostins et al. (2017) who observed the decrease of vibrio and increase of bacilli in BFT systems when probiotics were used in the systems.

The different wavelengths also influenced protozoa and other groups, such as flagellates, ciliates, rotifers, amoebas, and nematodes in different periods throughout the experiment. For flagellates, there was a higher abundance in the green treatment, both at seven days and at thirty-five days. On the other hand, for the ciliates, there were differences in all periods. Throughout the study, an increase in the abundance of ciliates was observed, which

can be explained by the number of flagellates in the different periods of the experiment. These results corroborate Reis et al. (2019), which observed that there was a decrease in the concentration of flagellates and a corresponding increase in the concentration of ciliates. Ciliates can have a great influence on the flagellate community through predation (Auer et al., 2004).

Regarding the abundance of rotifers, there were significant differences between the different wavelengths. The green treatment influenced the development of microorganisms, such as rotifers. In addition, the development of rotifers in the experiment was observed from the first week, and this occurrence remained throughout the experiment, with higher abundance at thirty-five days and a decrease in concentration at seventy days. This decrease in rotifer abundance may be associated with shrimp predation on rotifers, a "top-down" effect, in which shrimp predation on rotifers occurs (Jack & Gilbert, 1997; Agasild et al., 2013). On the other hand, no rotifers were counted in the first time for any of the other treatments, being verified by the abundance of rotifers only at thirty-five days.

Added to this, it was observed in the experiment that with the emergence of flagellates there was also the development of ciliates and the same happened with rotifers, with a relationship between the organisms occurring. Furthermore, the amount of food will determine the biomass of protozoa. Ciliates, on the other hand, can have a great influence on the flagellate community through predation. In addition, rotifers are reported to be efficient predators of ciliates (Curds 1992; Auer et al., 2004; Decamp et al., 2006). This fact shows the importance of "bottom-up" food sources and the influence of "top-down" predators in structuring the protozoan community (Jack & Gilbert, 1997; Agasild et al., 2013).

The different wavelengths influenced the abundance of amoebas between treatments. The green treatment did not have any occurrence of amoeba in any of the periods throughout the study, while all the other treatments had the development of amoeba in the culture tanks. Amoebas are organisms that are typically associated with surfaces, and when in their active feeding state, this microorganism can ingest bacteria, flagellates, ciliates, algae, rotifers, and nematodes (Decamp et al., 2006). Furthermore, amoeba concentrations remain high until nutrient levels for the other species (protozoa) are sufficient for the high growth rates of other organisms to outpace those of amoebas, and thus competition for space and nutrients occurs (Decamp et al., 1999; Silva et al., 2008). In general, it was observed that in the green treatment the concentration of protozoa and other groups was significantly higher compared to the other treatments, which may have influenced the concentration of amoebas in the treatment.

In parallel to this, it is still possible to add that the different wavelengths influenced the abundance of nematodes throughout the study. In this sense, higher concentrations of nematodes were observed on thirty-five days for the green treatment and later for the yellow treatment, but only after seventy days, the emergence in the blue and white treatments and the decrease of nematodes in the yellow treatment were observed. The concentration of nematodes in the culture tank can be altered due to the predation rate of the cultivated organisms (Ray et al., 2010). However, a small increase in the concentration of nematodes was observed in the final period of the study, mainly in the green treatment, and there appeared to be no nematode predation by shrimp. Thus, the wavelength of the green treatment influenced both the abundance and emergence of microorganisms at different periods throughout the study, as well as the trophic levels in the culture system.

5.3 The Influence of different wavelengths of LED light on zootechnical performance.

The different wavelengths of light seem to have affected only the growth of the shrimp but did not affect any other parameter of zootechnical performance. Behavioral changes and the abundance of microorganisms associated with wavelengths may help to elucidate this difference. Studies by different authors have shown that different species of crustaceans have different sensitivity to light spectra (Chen et al., 1996; Xu et al., 2003).

In the present study, only the green spectrum differed from the blue, yellow, and white spectra (control), while the red spectrum obtained a result similar to green, but without differentiating from the other treatments. These results are similar to those found by B. Guo et al. (2011; 2012) for the green wavelength, but different from those same studies that did not find better performance for the red wavelength. The best results found for green and red wavelengths in this study could be related to metabolic adaptation mechanisms of crustaceans, which could give them advantages. Choi et al. (2018) showed that exposure to green and red light was effective in decreasing stress and increasing the ability to control osmotic pressure when *Lysmata amboinensis* were exposed to stressful situations, such as variations in salinity. Another study conducted by Fei et al. (2020a) indicate that *P. vannamei* in the green light group likely was probably to maintain normal physiological metabolism.

The blue, yellow, and white wavelengths had the lowest values in the final weight. These results were similar to those found by Wang et al. (2004); Guo et al. (2011), who observed that constant blue light inhibited the growth of *L. vannamei* and that it increased energy expenditure

while fluctuating light spectra (blue-green), could increase feed efficiency. Another important factor, which may have contributed to the zootechnical performance of shrimp is microorganisms since they are classified not only as an important sources of protein but also for meeting the lipid, mineral, and vitamin needs of shrimp. In addition, they serve as a potential source of exogenous enzymes that aid digestion. (Decamp et al., 2002; Decamp et al., 2003; Loureiro et al., 2012; Becerril-Cortés et al., 2018).

In general, the abundance of protozoa and other microorganisms in the green wavelength was higher, except for amoebae which were not present. This greater abundance of flagellates, ciliates, and nematodes and the presence of rotifers from the first week of the culture of *L. vannamei* may have influenced the zootechnical performance of shrimp. Natural food serves as a supplementary source of nutrients for shrimp, reflecting on performance, both in weight gain and in feed conversion rates (Wasielesky et al., 2006; Becerril-Cortés et al., 2018., Krummenauer et al., 2020). In addition, in this study, it was possible to observe that the shrimp from the green treatment were frequenting the surface of the water column more often, and thus, the handling of the biofloc on the surface of the tanks several times a day was observed. Therefore, the wavelengths that positively influenced the zootechnical performance were those of green and red, but the latter could not also affect positively the nitrification process.

6. CONCLUSION

Green wavelength positively influenced the nitrification process and the formation of the microorganisms community, reflecting on the growth performance of *L. vannamei*. Results suggest that the green wavelength is better suited for the culture of *L. vannamei* in biofloc systems.

7. REFERENCES

Anesio, A.M., Abreu, P.C., Biddanda, B.A., 2003. The role of free and attached microrganisms in the decomposition of estuarine macrophyte detritus. Estuar. Coast. Shelf Sci. 56, 197–201. https://doi.org/10.1016/S0272-7714(02)00152-X.

Auer, B., Elzer, U. and Arndt, H. Comparison of pelagic food webs in lakes along a trophic gradient and with seasonal aspects: influence of resources and predation. Journal of Plankton Research , 2004, 26(6), 697 709. http://dx.doi.org/10.1093/plankt/fbh058.

Agasild, H., Zingel, P., Karus, K., Kangro, K., Salujõe, J. and Nõges, T. Does metazooplankton regulate the ciliate community in a shallow eutrophic lake? Freshwater Biology, 2013, 58(1), 183-191. http://dx.doi.org/10.1111/ fwb.12049.

APHA (American Public Health Association), 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd ed, Washington, DC, 1496 pp.

Avnimelech, Y., 1999. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. Aquaculture 176, 227–235. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00085-X.

Avnimelech, Y., 2015. Biofloc technology – A practical guide book., A practical guide book. The World Aquaculture. https://doi.org/10.13140/2.1.4575.0402.

Bagenal, T.B., Tesch, F.W., 1978. Age and growth. In: Bagenal, T.B. (Ed.), Methods for the Assessment of Fish Production in Fresh Waters. IBP Handbook. vol. 3. Mech. 14, 912–913. https://doi.org/10.1007/bf00860117.

Blaxter, J.H.S., 1968. Visual Thresholds and Spectral Sensitivity of Herring Larvae. J. Exp. Biol. 48, 39–53. https://doi.org/10.1242/jeb.48.1.39.

Bukata, R.P., Bruton, J.E., Jerome, J.H., 1983. Use of chromaticity in remote measurements of water quality. Remote Sens. Environ. 13, 161–177. https://doi.org/10.1016/0034-4257(83)90020-2.

Becerril-cortés, D., Monroy-dosta, M.D.C., Emerenciano, G.C., Castro-mejía, G., Sofia, B., Bermúdez, S., Correa, G.V., 2018. Effect on Nutritional Composition of Produced Bioflocs with Different Carbon Sources (Molasses, Coffee Waste and Rice Bran) in Biofloc System. vol. 6. pp. 541–547.

Burford, M. A., J. P. Thompson, P. R. McIntosh, H. R. Bauman, and C. D. Pearson. 2003. Nutrient and microbial dynamics in high intensity, zero exchange shrimp pond in Belize. Aquaculture 219:393-411. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00575-6.

Boyd, C. E. and J.W. Clay. 2002."Evaluation of Belize Aquaculture, Ltd: A Super intensive Shrimp Aquaculture System". Report prepared under the World Bank, NACA, WWF and FAO Consortium Program on Shrimp Farming and the Environment. Work in Progress for Public Discussion. Published by the Consortium. 17 pages.

Chen et al., 1996 S.Q. Chen, A.J. Li, C. The structure and physiological functions of eyes in shrimp (Penaeus chinensis) Mar. Fish. Res., 17 (1996), pp. 30-34.

Cohen, J.M., Samocha, T.M., Fox, J.M., Gandy, R.L., Lawrence, A.L., 2005. Characterization of water quality factors during intensive raceway production of juvenile Litopenaeus vannamei using limited discharge and biosecure management tools. Aquac. Eng. 32, 425–442. https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2004.09.005.

Curds, C.R. (1992) Protozoa and the Water Industry. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 122 pp.

Caillouet, C.W., 1973. Ovarian maturation induced by eyestalk ablation in pink shrimp *Penaeus duorarum* Burkenroad. In: Wault, J.W., Boudreaux, J., Jaspers, E. (Eds.), Proe, 3rd A. Meeting. Wil. Mariculture Soc. Louisiana State Univ, Baton Rouge, pp. 205–225. https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1972.tb00064.x.

Chevremont, A.C.; Farnet, A. M.; Coulomb, B.; E Boudenne, J. Effect of coupled UV-A and UV-C LEDs on both microbiological and chemical pollution of urban wastewaters. Science of The Total Environment**;** 2012. https://doi.org/doi:10.1016/j.scitotenv.2012.03.043.

Das, P., Lei, W., Aziz, S.S., Obbard, J.P., 2011. Enhanced algae growth in both phototrophic and mixotrophic culture under blue light. Bioresour. Technol. 102, 3883–3887. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.102.

Decamp, O., Warren, A., Sanchez, R., 1999. The role of ciliated protozoa in subsurface flow wetlands and their potential as bioindicators. Water Sci. Technol. 40, 91–98. https://doi.org/10.1016/S0273-1223(99)00444-8.

Decamp, O., L. Conquest, I. Forster & A.G.J Tacon. 2002. The nutrition and feeding of marine shrimp within zero-water exchange aquaculture production systems: role of eukaryotic microorganisms. In: Lee, C.S. & P O`Bryen (eds.). Microbial Approaches to Aquatic Nutrition within Enviromentally Sound Aquaculture Production Systems. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Chap. 5: 79-86.

Decamp, O., Cody, J., Conquest, L., Delanoy, G., Tacon, A.G.J., 2003. Effect of Salinity on Natural Community and Production of *Litopenaeus vannamei* (Boone), within Experimental Zero-water Exchange Culture Systems. https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2003.00842.x.

Decamp, O.E., Otoshi, C.A., Moss, S.M., 2006. Protozoans and meiofauna inhabiting a bead filter: A preliminary investigation of their role as potential bioindicators of shrimp production system health. J. World Aquac. Soc. 37, 481–489.https://doi.org/ 10.1111/j.1749-7345.2006.00061.x.

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. vol. 257. pp. 346–358. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.03.019.

Timmons M.B, Ebeling JM. 2010. Recirculating Aquaculture, 2nd edition. Cayuga Aqua Ventures, Ithaca, NY. http://www.bee.cornell.edu/aquain18/11/2010. p. 998.

Ferreira, L.M.M.H.M (2008) Formação de flocos microbianos em cultivo do camarão rosa *Farfantepenaeus paulensis* e do camarão-branco *Litopenaeus vannamei.* Master Thesis, Federal University of Rio Grande, Rio Grande, Brazil, 96 pp.

Fleckenstein, L.J., Tierney, T.W., Fisk, J.C., Ray, A.J., 2019. Effects of supplemental LED lighting on water quality and Pacific white shrimp (Litopenaeus vannamei) performance in intensive recirculating systems. Aquaculture 504, 219–226. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.01.066.

Furtado, P.S., Poersch, L.H., Wasielesky, W., 2011. Effect of calcium hydroxide, carbonate and sodium bicarbonate on water quality and zootechnical performance of shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in bio-flocs technology (BFT) systems. Aquaculture

321,130–135. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.08.034.

Furtado, P.S., Valenzuela, M.A.J., Badillo, M.A., Gaxiola, G., Wasielesky, W., 2016. Effect of dissolved carbon dioxide on oxygen consumption in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931). Mar. Freshw. Behav. Physiol. 49, 337–346.https://doi.org/10.1080/10236244.2016.1213568.

Gaona, C.A.P., Poersch, L.H., Krummenauer, D., Foes, G.K., Wasielesky, W.J., 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.

Gaona, C.A.P., Serra, F. da P., Furtado, P.S., Poersch, L.H., Wasielesky, W., 2016. Biofloc management with different flow rates for solids removal in the *Litopenaeus vannamei* BFT culture system. Aquac. Int. 24, 1263–1275. https://doi.org/10.1007/s10499-016-9983-2.

Gardner, C., Maguire, G.B., 1998. Effect of photoperiod and light intensity on survival, development and cannibalism of larvae of the Australian giant crab *Pseudocarcinus gigas* (Lamarck). Aquaculture 165, 51–63. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00245-2.

Guerra-Santos, B., López-Olmeda, J.F., de Mattos, B.O., Baião, A.B., Pereira, D.S.P., Sánchez-Vázquez, F.J., Cerqueira, R.B., Albinati, R.C.B., Fortes-Silva, R., 2017. Synchronization to light and mealtime of daily rhythms of locomotor activity, plasma glucose and digestive enzymes in the Nile tilapia (Oreochromis niloticus). Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol. 204, 40–47. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.11.006.

Guerrero, M.A., Jones, R.D., 1996. Photoinhibition of marine nitrifying bacteria. I.Wavelength-dependent response. Mar. Ecol. Prog. Ser. 141, 183–192. https://doi.org/10.3354/meps141183.

Guo, B., Wang, F., Dong, S., Gao, Q., 2011. The effect of rhythmic light color fluctuation on the molting and growth of *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 314, 210–214. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.02.023.

Guo, B., Wang, F., Dong, S., Zhong, D., 2012. Effect of fluctuating light intensity on molting frequency and growth of *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 330–333106–110. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.12.017.

Hargreaves, J.A., 2013. Biofloc Production Systems for Aquaculture. pp. 1–12. Hobbie, J.E., Daley, R.J., Jasper, S., 1977. Use of nuclepore filter counting bacteria by fluoroscence microscopy. Appl. Environ. Microbiol. Microbiol. 33, 1225–1228 (4408959).

Hobbie, J.E., Daley, R.J., Jasper, S., 1977. Use of nuclepore filter counting bacteria by fluoroscence microscopy. Appl. Environ. Microbiol. Microbiol. 33, 1225–1228 (4408959).

Hostins, B., Lara, G., Decamp, O., Cesar, D.E., Wasielesky, W., 2017. Efficacy and variations in bacterial density in the gut of *Litopenaeus vannamei* reared in a BFT system and in clear water supplemented with a commercial probiotic mixture. Aquaculture 480, 58–64. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.07.036.

Irigoien, X., Castel, J., 1997. Light limitation and distribution of chlorophyll pigments in a highly turbid estuary: the Gironde (SW France). Estuar. Coastal Shelf Sci. 44 (4), 507–517. https://doi.org/10.1006/ecss.1996.0132.

Jack, J.D. and Gilbert, J.J. Effects of metazoan predators on ciliates in freshwater plankton communities. The Journal of Eukaryotic Microbiology, 1997, 44(3), 194-199. http://dx.doi. org/10.1111/j.1550-7408.1997.tb05699.x.

Jerlov, N.G., 1968. Optical Oceanography. Elsevier, Amsterdam. Konstantinov, A.S., Zdanovich, V.V., 1986. Some features of fish growth at fluctuating temperature. Vopr. Ikhtiol. 26, 971–977. https://doi.org/10.4319/lo.1968.13.4.0731.

Jensen, JR (2009) Sensoriamento remoto do ambiente: Uma perspectiva em recursos terrestres. Traduzido por: Epiphanio, JCN, Formaggio, AR, Santos, AR, Rudorff, BFT, Almeida, CM, Galvão, LS, Parêntese, São José dos Campos, 598 p.

Jory, D.E., Cabrera, T.R., Dugger, D.M., Fegan, D., Lee, P.G., Lawrence, L., Jackson, C.J., Mcintosh, R.P., Castañeda, J., International, B, Park, H.A., Hwy, N.O.D., Pierce, F., 2001. A global review of shrimp feed management: status and perspectives. Aquaculture 104–152.

Krummenauer, D., Samocha, T., Poersch, L., Lara, G., Wasielesky, 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.

Krummenauer, D., Abreu, P.C., Poersch, L., Reis, P.A.C.P., Suita, S.M., dos Reis, W.G., Wasielesky, W., 2020. The relationship between shrimp (Litopenaeus vannamei) size and biofloc consumption determined by the stable isotope technique. Aquaculture 529, 735635. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735635.

Lara, G., Krummenauer, D., Abreu, P.C., Poersch, L.H., Wasielesky, W., 2017. The use of different aerators on *Litopenaeus vannamei* biofloc culture system: effects on water quality, shrimp growth and biofloc composition. Aquac. Int. 25, 147–162. https://doi.org/10.1007/s10499-016-0019-8.

Le Reste, L., 1970. Contribution a l'étude du rhythme d'activité nocture de *Penaeus indicus* en *Parapenaeopsis acclivirostris* (Crustacea:Decapoda:Natantia). Cah. Off. Rech. Sci. Tech. outre Mer Oceanogr. 8, 3–10.

Lin, Y.C., Chen, J.C., 2003. Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels. Aquaculture 224, 193–201.

Loureiro, C.K., Wasielesky Jr, W., Abreu, P.C., 2012. The Use of Protozoan, Rotifers and Nematodes As Live Food for Shrimp Raised in BFT System. Atlântica 34, 5–12. https://doi.org/10.5088/atl.2012.34.1.5.

Pereira Neto, J.B., Dantas, D.M.D.M., Gálvez, A.O., Brito, L.O., 2006. Avaliação das comunidades plnactonicas e bentônicas de microalgas em viveiros de camarão (Litopenaues vannamei). Bol. do Inst. Pesca 34, 543–551.

Mcfarland, W.N., 1986. Light in the sea - correlations with behaviors of fishes and invertebrates. Integr. Comp. Biol. 26, 389–401. https://doi.org/10.1093/icb/26.2.389.

Ray, A.J., Seaborn, G., Lef, J.W., Wilde, S.B., Lawson, A., Browdy, C.L., 2010. Characterization of Microbial Communities in Minimal-exchange, Intensive Aquaculture Systems and the Effects of Suspended Solids Management. vol. 310. pp. 130–138. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.10.019.

Reis, W.G., Wasielesky, W., Abreu, P.C., Brandão, H., Krummenauer, D., 2019. Rearing of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in BFT system with different photoperiods: Effects on the microbial community, water quality and zootechnical performance. Aquaculture. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture. 2019.04.067.

Samocha, T.M., Prangnell, D.I., Hanson, T.R., Treece, G.D., Morris, T.C., Castro, L.F., Staresinic, N., 2017. Design and Operation of Super Intensive, Biofloc-Dominated Systems for Indoor Production of the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei* – The Texas A&M AgriLife Research Experience. Baton Rouge, Louisiana USA, The World Aquaculture Society.

Sant' Anna Junior, G. L. Tratamento biológico de efluentes: fundamentos e aplicações. Ed. 2, Rio de Janeiro: Interciência, 2013. https://doi.org/10.1590/S1413-41522011000200002.

Strickland, J.D.H., Parsons, T.R., 1972. A practical handbook of seawater analysis. In: A Pract. Handb. Seawater Anal. vol. 167. pp. 185. https://doi.org/10.1002/iroh. 19700550118.

UNESCO, 1983. Chemical Methods for Use in Marine Environmental Monitoring. vol. 53. Utermöhl, H., 1958. Zur Vervollkommung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. Int. Vereinigung für Theor. und Angew. Limnol. Kom. für Limnol. Methoden 9, 1–39. https://doi.org/10.25607/OBP-1419.

Utermohl, H. (1958) Zur Ver vollkommung der quantitativan phytoplankton-methodik. Mitteilung Internationale Vereinigung Fuer Theoretische unde Amgewandte Limnologie, 9, 39 p.

Van Wyk, P., Scarpa, J., 1999. Water quality and management. In: van Wyk, P. (Ed.), Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems. Florida department of agriculture and consumer services, Tallahassee (FL), pp. 141–161.

Vergara, C., Jeison, D., Muñoz, R., Campos, J.L., Seeger, M., 2016. In Fl Uence of Light Intensity on Bacterial Nitrifying Activity in Algal- Bacterial Photobioreactors and Its Implications for Microalgae-based Wastewater Treatment. vol. 114. pp. 116–121.

https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.06.006.

Wang, F., Dong, Shuanglin, Dong, Shaoshuai, Huang, G., Zhu, C., Mu, Y., 2004. The effect of light intensity on the growth of Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. Aquaculture 234, 475–483. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.11.024.

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.

Wasielesky, W., Abreu, P.C., Poersch, L.H., Thompson, F., Ballester, E.L.C., 2012. Influence of light intensity on biofilm formation and the performance of pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* juveniles reared in cages. Aquac. Res. 43, 706–712. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02878.x.

Welschmeyer, N.A., 1994. Fluorometric analysis of chlorophyll a in the presence of chlorophyll b and pheopigments. Limnol. Oceanogr. 39, 1985–1992. https://doi.org/ 10.4319/lo.1994.39.8.1985.

Sin, Y., Wetzel, R.L., Anderson, I.C., 2000. Seasonal variations of size-fractionated phytoplankton along the salinity gradient in the York River estuary, Virginia (USA). J. Plankton Res. 22, 1945–1960. https://doi.org/10.1093/plankt/22.10.1945.

William a. Wurts, 1984. An hypothesis on the light requirements for spawning penaeid shrimp, with emphasis on *Penaeus setiferus*. Aquaculture 41, 93–98. https://doi.org/10.1016/0044-8486(84)90086-3.

Yta, A.G., Rouse, D.B., Davis, Da, 2004. Influence of nursery period on the growth and survival of *Litopenaeus vannamei* under pond production conditions. J. World Aquac. Soc. 35, 357–365. https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2004.tb00099.x.

ZAR, J.H., 2010. Biostatistical Analysis. Prentice Hall, Upper Saddle River.

Zhang, K., Pan, L., Chen, W., Wang, C., 2017. Effect of Using Sodium Bicarbonate to Adjust the pH to Different Levels on Water Quality, the Growth and the Immune Response of Shrimp Litopenaeus vannamei Reared in Zero-Water Exchange Bioflocbased

Culture Tanks. pp. 1194–1208. https://doi.org/10.1111/are.12961.

Xu, Y., Yuan, W.J., Zhao, Y.L., Hu, H., 2003. Influence of light wavelength on the vision of the *Macrobrachium nipponense*. J. Shanghai. Nor. Univ. (Nat. Sci.) 32, 75–78.

CAPÍTULO II

A influência de diferentes fotoperíodos com iluminação verde artificial (LED) em sistema de bioflocos sobre o crescimento e estresse oxidativo de *Litopenaeus vannamei*

Wellica G. Reis[a]; Paulo C. Abreu[a;] Wilson Wasielesky Jr[b;] José Maria Monserrat[c;] Luiz Poersch[b;] Hellyjúnyor Brandão; Dariano Krummenauer[a] *

[a] Laboratório de Ecologia de Microrganismos Aplicados à Aquicultura, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande - FURG, CP 474, Rio Grande, RS CEP 96201-900, Brasil

*Endereço de e-mail: darianok@gmail.com (D. Krummenauer).

[b] Laboratório de Carcinicultura Marinha, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande - FURG, CP 474, Rio Grande, RS CEP 96201-900, Brasil

[c] Laboratório de Bioquímica Funcional de Organismos Aquáticos (BIFOA), Centro Biotecnológico e de Doenças de Organismos Aquáticos (CBD), IO, FURG, Rio Grande, Brasil

Artigo subbmetido para a revista Aquaculture internacional.

Observação: As Tabelas e as figuras foram inseridas no corpo do texto para facilitar a leitura da tese.

RESUMO

A produção de camarões em sistemas superintensivos ao ar livre pode se beneficiar da abundância de luz natural, promovendo um melhor desempenho zootécnico dos organismos cultivados. Já nos cultivos em ambientes fechados, onde não há luz natural ou em locais que a luz natural pode ser limitada em determinadas épocas do ano, é possível obter os mesmos benefícios usando iluminação artificial na produção, além disso, pode se aproveitar a vantagem de controlar e escolher características específicas de cada tipo de luz fornecida. O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto de diferentes fotoperíodos de luz verde de lâmpadas LED na qualidade da água, na comunidade de microrganismos, na capacidade antioxidante (ACAP), na peroxidação lipídica (TBARS) e no desempenho de crescimento do camarão branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei* no sistema BFT. O estudo foi realizado em uma sala de alvenaria fechada em tanques de 150L de volume útil, utilizando-se camarões com peso inicial de 0,48 g com uma densidade de 500 m^{-3} de camarão. O experimento foi delineado com quatro tratamentos e quatro repetições cada, com diferentes fotoperíodos em luz verde: **1)** 16h LI/8h DA, **2)** 12h LI/12h DA (controle), **3)** 8h LI/16h DA e **4)** 4h LI /20h DA. Não foram encontradas diferenças nos parâmetros de qualidade da água ($p > 0,05$). Houve diferenças significativas na abundância de bactérias, como cocoides livres, filamentosas livres, vibrios e bacilos ($p < 0,05$) e em protozoários, como flagelados, ciliados, rotíferos, nematoides e amebas ($p < 0,05$). Também houve diferenças na peroxidação lipídica (TBARS) com menor peroxidação lipídica nos tratamentos 12h LI/12h DA, 8h LI/16h DA, e 4h LI/20h DA e maior capacidade antioxidante (ACAP) nos hepatopâncreas e tecidos musculares no tratamento 8h LI /16h DA ($p<0,05$). Além disso, o camarão do tratamento 8h LI/16h DA apresentou maior peso final, quando comparado ao tratamento controle 12h LI/12h DA ($p < 0,05$). Assim, o fotoperíodo de 8 horas de luz e 16 horas de escuro com luz LED verde pode ser sugerido para a criação de *L. vannamei* em sistemas de bioflocos.

palavras chaves: Luminosidade; Iluminação artificial; Bioquímica; Sistemas super intensivos; Ambientes fechados.

1. INTRODUÇÃO

O cultivo de camarões em sistemas de produção aquícola que recebem bastante luz natural podem ter melhor desempenho devido à diversidade de organismos de diferentes grupos, incluindo fotossintetizantes (Gardner et al., 1998; Guerra-Santos et al., 2017; Reis et al., 2019). Já a iluminação artificial tem sido aplicada em ambientes fechados, proporcionandoresultados interessantes para organismos aquáticos, como bom desempenho zootécnico, maiorteor de proteína e alteração na composição dos bioflocos (Fleckenstein et al., 2019; Lopez- Betancur et al., 2020; Waycott, 2021). Desse modo, a produção de camarão em ambientes fechados ou em determinadas épocas do ano em que não há luz natural pode se beneficiar da iluminação artificial, gerando ainda economia de energia com a escolha de lâmpadas LED (diodos emissores de luz). Essas luzes são muito eficientes em comparação com a iluminação tradicional, como lâmpadas incandescentes e fluorescentes, e apresentam baixa dissipação de calor, baixo consumo de energia e longa vida útil (Das et al., 2011; Chevremont et al., 2012).

A luz é um fator abiótico de grande importância para os organismos aquáticos, diversos parâmetros, como intensidade, fonte, espectro luminoso e fotoperíodo, podem influenciar os sistemas de produção. O espectro de luz e o fotoperíodo parecem ter grande influência nos organismos aquáticos, como sobrevivência, peso, produtividade, desova, processo de muda de crustáceos, dinâmica de microrganismos e qualidade da água (Guo et al., 2011, 2012; Gao et al., 2016; Reis et al., 2019; Lopez- Betancur et al., 2020). Os camarões peneídeos podem apresentar alterações na ingestão alimentar, no crescimento e no comportamento quando expostos a diferentes fotoperíodos (Gardner et al., 1998; Guerra-Santos et al., 2017). Além de afetar o organismo cultivado, a luz também pode influenciar a produtividade primária dos sistemas de produção, por meio da seleção de grupos específicos de microrganismos com facilidade de adaptação a condições específicas (Kirk, 2010), afetando a comunidade microbiana e processos relacionados, como nitrificação. Isso se torna ainda mais importante em sistemas de aquicultura superintensivos que dependem de uma comunidade microbiana estável para fornecer água de boa qualidade, como os sistemas de bioflocos.

A luz no espectro verde vem sendo citada por diversos autores por proporcionar benefícios no sistema de cultivo, como melhor nitrificação, abundância de microrganismos, benefícios em termos de saúde animal como defesas antioxidantes e melhor desempenho zootécnico na aquicultura. Em estudo realizado por Reis et al. (2022) com diferentes espectros de cores e fotoperíodo 12LI/12DA, os autores relataram que a nitrificação, a abundância de microrganismos e o desempenho zootécnico de *L. vannamei* no espectro verde foram melhores,

quando comparados ao espectro branco (controle). Além disso, em outro estudo de Waycott (2021), os autores mostraram que uma espécie de linguado criada no espectro de luz verde com fotoperíodo 12/12 promoveu crescimento rápido e aumento do consumo de ração. Outro estudo realizado por Fei et al. (2020) os autores mostraram que o uso de condições espectrais verdes com fotoperíodo 12LI/12DA pode melhorar a produção aquícola de *L. vannamei* e a composição espectral pode afetar o crescimento dos camarões e as respostas ao estresse oxidativo. A luz é um fator ambiental importante na carcinicultura, mas entender os efeitos de diferentes composições espectrais no estresse oxidativo em camarões é fundamental (Fei et al., 2020), pois pode afetar a resiliência contra diversos fatores estressantes que direta ou indiretamente promovem o estresse oxidativo (Colombo et al., 2020).

Mudanças em algumas condições ambientais podem causar distúrbios no equilíbrio do animal, levando ao predomínio de compostos oxidantes. O camarão, como qualquer organismo aeróbico, é suscetível ao estresse oxidativo, resultante da ação de espécies reativas de oxigênio (ERO), que podem ser oriundas do ambiente (exógenas) ou geradas no próprio organismo (endógenas). A produção de ROS (espécies reativas de oxigênio) não necessariamente causa danos celulares (Amado et al., 2009), mas quando seu acúmulo ultrapassa a capacidade de defesa dos sistemas antioxidantes, ocorre o estresse oxidativo (Lushchak, 2005; Liang et al., 2016). Para os crustáceos, o equilíbrio interno pode ser facilmente danificado por fatores ambientais (Limon-Pacheco e Gonsebatt, 2009), portanto, entender os efeitos de diferentes fotoperíodos usando luz LED verde sobre o estresse oxidativo em *L. vannamei* pode ajudar a melhorar os resultados da aquicultura.

Embora já existam estudos sobre o uso de diferentes espectros de luz em camarões e outros crustáceos em ambientes aquáticos, ainda faltam informações sobre sistemas de produção, com uso do espectro de luz verde com diferentes fotoperíodos. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a influência do espectro de cor verde sob diferentes fotoperíodos na qualidade da água, comunidade de microrganismos, respostas antioxidantes e ao estresse oxidativo e desempenho zootécnico de camarões *L. vannamei* criados em sistema BFT.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no período de 18 de abril a 17 de junho de 2020, nas dependências do Laboratório de Carcinicultura (EMA-IO-FURG) do Instituto de Oceanografia da Universidade Federal do Rio Grande - FURG, localizado na cidade de Rio Grande, Cassino - RS, Brasil (32°19'S, 52°15'W). A espécie utilizada no experimento foi o camarão branco do

Pacífico *L. vannamei* no estágio náuplio adquirido da Aquatec® LTDA (Rio Grande do Norte). Os camarões passaram primeiramente pelas fases de incubação e berçário no Laboratório de Carcinicultura Marinha, por aproximadamente 20 dias até atingirem peso médio de 0,48 ± 0,03 g, sendo então estocados nas unidades experimentais.

2.1 Design experimental.

A água utilizada em cada unidade experimental era proveniente de um reservatório, previamente bombeado da Praia do Cassino. A água para o experimento foi clorada com 10 ppm de hipoclorito de sódio. Após quatro horas de ação, a água foi declorada com ácido ascórbico (vitamina C) na proporção de um grama para mil litros de água. As unidades experimentais foram constituídas por dezesseis tanques circulares com capacidade de 180 litros e volume útil de 150 litros e equipados com sistema de aeração com mangueiras microperfuradas (Aerotube®). Os camarões foram estocados em densidade de 500 camarões m^{-3}.

O estudo foi delineado com quatro tratamentos e quatro repetições usando luz verde sob diferentes fotoperíodos: **1)** 16h LI/8h DA: 16 horas de luz acesa e 8 horas de escuro; **2)** 12h LI/12h DA: 12h acesa e 12h escuro (controle); **3)** 8h LI/16h DA: 8 horas de luz acesa e 16 horas de escuridão; **4)** 4h LI/20h DA: 4 horas de luz acesa e 20 horas de escuridão. Um timer foi utilizado para controlar os fotoperíodos. As Luzes de LED verdes utilizadas foram (Foxlux ®, 7W, intensidade de 488 lx) foram colocadas sobre os tanques a aproximadamente 60 cm da superfície da água, fixadas em um cone de geomembrana preta revestida internamente com alumínio, a fim de manter as luzes com fotoperíodos individuais para cada tanque. O estudo durou 61 dias.

Figura 1. A e B: Visão geral das unidades experimentais usando luz verde sob diferentes fotoperíodos (imagem: Wellica G. Reis).

A penetração de luz (Radiação Fotossinteticamente Ativa - PAR) na coluna d'água foi medida nos tanques em diferentes profundidades: abaixo da superfície da água, no meio do tanque (20 cm de profundidade) e no fundo (40 cm de profundidade) uma vez por semana com auxílio do aparelho LI-COR® – (modelo LI-1400 dataLOGGER). O sensor do aparelho foi fixado em uma régua para medir as diferentes profundidades dentro do tanque de cultivo. Além disso, a quantidade de lux (lx) que atingiu a superfície da água também foi aferida com um luxímetro (Chauvin Arnoux ® modelo CA 810), no início do experimento.

2.2 formação de bioflocos.

Para estimular a formação dos bioflocos, a relação C/N do sistema foi mantida em 15/1, conforme metodologia proposta por Avnimelech (1999) e Ebeling et al. (2006). A fertilização orgânica foi realizada sempre que o nitrogênio amoniacal total (TAN) superou 1,0 mg L^{-1} na água, adicionando melaço de cana (37,27% de carbono), considerando 6,0 g de carbono orgânico para cada g de nitrogênio amoniacal total (TAN) na água (Brandão et al., 2021). Além disso, aplicações de probióticos comerciais (INVE® Sanolife PRO-W) foram realizados uma vez por semana na água utilizando 0,5 grama para cada mil litros de água, para auxiliar na qualidade da água em todos os tratamentos.

2.3 Dióxido de carbono.

Foram realizadas análises para quantificar a concentração de dióxido de carbono (CO_2) dissolvido na água de cultivo. Amostras de água foram coletadas duas vezes por semana, durante os 70 dias de experimento, para determinação dos níveis de alcalinidade e pH. Em seguida, os resultados de alcalinidade e pH foram utilizados de acordo com a metodologia proposta por Ebeling et al. (2010) para obter a concentração de CO_2 na água de cultivo, seguindo os cálculos:

$[CO_2]$: alcalinidade x $10^{(6,3-pH)}$

$[CO_2]$: Concentração de dióxido de carbono dissolvido (mg L^{-1}).

Alcalinidade: $CaCO_3$ (mg L^{-1}).

2.4 análises de clorofila a.

A concentração de clorofila *a* foi determinada uma vez por semana a partir de amostras de 10 mL de água de cultivo filtrada por meio de microfiltros de fibra de vidro GF 50-A. O pigmento fotossintético foi extraído por imersão dos filtros em 10 mL de acetona 90% (Merck® PA), colocados em frascos e mantidos em freezer (-12°C). Após um período de 24 horas, a concentração de clorofila *a* foi medida usando um fluorímetro (Turner Designs Trilogy) (Welschmeyer, 1994) , no qual o extrato de clorofila é absorbância (excitado) a 460nm e a emissão de luz (fluorescência) foi medida a 670nm.

2.5 Quantificação dos microrganismos.

Para quantificar os microrganismos, presentes na água de cultivo, foram coletadas amostras de água (18 mL de cada unidade experimental) uma vez por semana. As amostras foram fixadas em formol a 4% e mantidas em frascos âmbar para posterior contagem e identificação dos grupos de microrganismos.

Para determinar a abundância de grupos bacterianos com base nos morfotipos, as amostras fixadas foram filtradas por meio de filtros de membrana de policarbonato (Nuclepore, poro de 0,2 µm e diâmetro de 2,5 mm) previamente escurecidos com Irlan Black e corados com Acridine Orange 1%, na concentração de 1 µg /mL (Hobbie et al., 1977) . As bactérias foram fotografadas com câmera digital acoplada a microscópio de epifluorescência (Axioplan -Zeiss, com aumento de 1000X), para posterior contagem de 30 campos escolhidos aleatoriamente.

Para determinar a abundância de protozoários e outros grupos de microrganismos, alíquotas de 0,5 mL de amostra de água fixa foram colocadas em uma câmara de sedimentação

e 30 campos aleatórios foram contados em um microscópio invertido (Nikon TS 100, aumento final de 200x) (Utermöhl, 1958). Os microrganismos foram classificados em grupos separados. Para as bactérias esses grupos foram: cocoides, filamentosos livres, filamentosos aderentes, vibriões e bacilos. Para os protozoários e outros grupos, as categorias de classificação foram flagelados, ciliados, nematoides, rotíferos e amebas. Todas as contagens foram realizadas no Laboratório de Ecologia de Microrganismos Aplicados à Aquicultura – FURG de acordo com as técnicas estabelecidas.

2.5 Manejo de alimentação.

Os camarões foram alimentados duas vezes ao dia, utilizando ração comercial (Potimar GUABI®) com 40% de proteína bruta na fase de creche e 38% até uma grama. Para controlar o consumo de ração, 10% da quantidade de ração foi colocada em bandejas de alimentação e o restante foi distribuída a lanço no tanque. A taxa de alimentação até uma grama seguiu a metodologia descrita por Jory et al. (2001) os ajustes nas taxas de alimentação foram realizados após uma grama seguindo a metodologia de Garza de Yta et al. (2004).

2.6 Qualidade da água.

A temperatura e o oxigênio dissolvido (YSI® PRO 20) foram monitorados duas vezes ao dia, enquanto o pH (pH meter® FE 20/FG2) foi verificado uma vez ao dia. A salinidade foi verificada a cada três dias (Hach® HQ40d). A turbidez da água foi determinada uma vez por semana com um turbidímetro (Hach® 2100P, Hach Company). Amostras de água foram coletadas diariamente para quantificar a concentração de nitrogênio amoniacal total (N-(NH_3 +NH_4^+)) e nitrito (N-NO_2^-), determinados de acordo com a UNESCO (1983) e Strickland e Parsons (1972), respectivamente. Quando as concentrações de nitrito ultrapassaram o limite de segurança de 26mg L^{-1} permitido para a espécie (Lin e Chen, 2003), foram realizadas trocas de água de 20% do volume do tanque. A alcalinidade foi analisada a cada três dias de acordo com a metodologia proposta pela APHA (2012). Quando a alcalinidade atingiu valores abaixo de 150 mg $CaCO_3$ L^{-1} e/ou valores de pH caíram abaixo de 7,6, conforme recomendado por Ebeling et al. (2006), foram feitos ajustes utilizando cal hidratada, seguindo a metodologia descrita por Furtado et al. (2011) e Zhang et al. (2017).

As concentrações de nitrato (N-NO_3^-), fosfato (P-PO_4^{3}) e sólidos totais em suspensão (mg L^{-1}) foram analisadas semanalmente utilizando a metodologia proposta por Strickland e Parsons (1972). Para sólidos suspensos totais, as amostras de água foram filtradas com filtros

de fibra de vidro GF50-A, utilizando bomba de vácuo (Prismatec®). Os teores de sólidos suspensos totais foram mantidos até 500 mg L^{-1}, conforme recomendado por Gaona et al. (2011) e quando os valores ultrapassaram o valor recomendado, foram utilizados clarificadores. Além disso, foi estimada a quantidade total de água necessária para produzir um quilo de camarão em cada tratamento.

2.7 Análises bioquímicas.

2.7.1 Homogeneização da amostra.

Os camarões foram eutanasiados em nitrogênio líquido para coleta dos órgãos. Após a dissecção, o hepatopâncreas e o músculo foram pesados e homogeneizados (1:5 P/V) em tampão de crustáceo contendo Tris-base (20 mM), EDTA (1 mM), MgCl 2 (0,05 mM), sacarose (5 mM), e KCl (1 mM), todos dissolvidos em água destilada, com o pH ajustado para 7,2. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 3000 xg por 30 minutos a uma temperatura de 4 ºC, e os sobrenadantes foram reservados para análise. A determinação do teor de proteína total foi realizada pelo método do Biureto (550 nm) em um leitor de microplacas (BioTek LX 800) utilizando o Doles Total Protein Kit (Amado et al., 2009).

2.7.2 Capacidade antioxidante total contra os radicais peroxil (ACAP).

A determinação da capacidade antioxidante total frente aos radicais peroxil foi realizada pelo método descrito por Amado et al. (2009) , baseado na detecção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em amostras de tecido na presença ou ausência de 2,2-azobis-2-metilpropionamidinadicloridrato (ABAP), que a 37 ºC gera radicais peroxil. Para a determinação de ROS, foi utilizado diacetato de 2',7' diclorofluoresceína (H 2 DCFDA). As leituras foram realizadas em um leitor de microplacas de fluorescência (Biotek Synergy HT) usando comprimentos de onda de excitação e emissão de 485 e 530 nm, respectivamente. A capacidade antioxidante total contra radicais peroxil foi quantificada pela área relativa com e sem ABAP, sendo que quanto maior a área relativa, menor a capacidade antioxidante (Amado et al., 2009).

2.7.3 Peroxidação lipídica (TBARS).

As análises de peroxidação lipídica foram realizadas através da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Oakes e Van Der, 2003). Em tubos de ensaio, foram adicionados às amostras (músculo: 100 µl; hepatopâncreas: 20 µl), 20 µl de solução de hidroxitolueno butilado (67 µM BHT), 150 µl de solução de ácido acético a 20%,

150 µl de TBA (0,8%), 50 µL de água destilada e 20 µL de dodecil sulfato de sódio (8,1% SDS). As amostras foram aquecidas a 95°C durante 30 minutos. Posteriormente, 100 µL de água destilada e 500 µL de n-butanol foram adicionados à solução final e, em seguida, centrifugados a 3.000 xg por 10 min a 15 °C. O sobrenadante (100 µL) foi colocado em um leitor de microplacas para determinar a fluorescência (excitação: 520 nm; 580 nm: emissão). Os resultados foram expressos em nmol de tetrametoxipropano (TMP) (usado como padrão) por mg de tecido úmido.

2.8 Desempenho zootécnico.

O desempenho zootécnico dos camarões foi monitorado por meio da biometria semanal de 20 animais por tratamento, utilizando balança digital com precisão de 0,01g (Marte ® científico AS5000C). O ganho de peso semanal (WWG) e a conversão alimentar aparente (Bagenal e Tesch, 1978; Van Wyk e Scarpa, 1999) foram avaliados pelos seguintes cálculos:

WWG= (FW- IW) / semanas; onde WWG = Ganho de peso semanal, IW= Peso inicial, FW= Peso final.

Conversão alimentar aparente (AFC) = entrada de ração / ganho de biomassa.

Taxa de sobrevivência: (biomassa final/peso final) /animais estocados) x 100.

Produtividade: (biomassa final – biomassa inicial) / volume do tanque.

3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A homoscedasticidade da análise de variâncias e a normalidade da distribuição dos dados foram verificadas. Posteriormente, foi aplicada a Análise de Variância – ANOVA (α =0,05) uma via e duas vias (tratamentos, tempos e tratamentos x tempos). Quando as suposições não foram confirmadas, os dados foram submetidos a transformações estatísticas. Quando diferenças significativas foram encontradas, um teste Post-hoc Tukey foi aplicado (Zar 2010).

4. RESULTADOS

4.1 Qualidade da água.

Foram realizados os parâmetros químicos e físicos da água de cultura durante o período de estudo de 61 dias são mostrados na Tabela 1. Não foram encontradas diferenças significativas ($p>0,05$) em temperatura, oxigênio dissolvido, salinidade, pH, TAN, nitrito, nitrato, fosfato, alcalinidade, CO_2, sólidos em sedimentação, sólidos totais em suspensão, turbidez, superfície PAR (20 cm), PAR (40 cm), Lux, quantidade total de água e Clorofila *a*.

tabela 1

Média (± desvio padrão) dos parâmetros químicos e físicos da água nos tratamentos: 16hLI/8hDA, 12h LI/12h DA, 8h LI/16h DA, 4h LI/20h DA durante 61 dias de experimento. Não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos (p >0,05).

Parâmetros	**16hLI/8hDA**	**12h LI/12h DA**	**8h LI/16h DA**	**4h LI/20h DA**
Temperatura (o C)	29.29 ± 1.13	29.24 ± 1.19	29h30 ± 0,90	29.43 ± 1.03
* OD (mg L^{-1})	6.22 ± 0,28	6.23 ± 0,29	6.14 ± 0,37	6.12 ± 0,3
Salinidade (mg de $CaCO_3$ L^{-1})	30.23 ± 0,82	30.32 ± 0,72	30.25 ± 0,8	30.38 ± 0,67
pH	8.10 ± 0,17	8.11 ± 0,14	8.06 ± 0,15	8.08 ± 0,15
*TAN (mg L^{-1})	0,92 ± 1,66	1.03 ± 1.8	1.13 ± 1,84	1.09 ± 1,88
N-NO_2 (mg L^{-1})	4.64 ± 7.31	4,70 ± 7.64	4,90 ± 8.08	4.01 ± 7.18
N-NO_3 (mg L^{-1})	49,45 ± 45,67	49,81 ± 44,96	44,75 ± 36,76	46,92 ± 40,00
PO_4^{-3} P (mg L^{-1})	2.9 ± 3.48	2.82 ± 3.17	3.19 ± 3,75	2.82 ± 2,96
Alcalinidade (mg L^{-1})	138,75 ± 33.53	137.06 ± 34,93	135,63 ± 35.14	135,4 ± 33,91
CO_2 Livre (mg L^{-1})	2.15 ± 0,82	2.07 ± 0,66	2.37 ± 1.17	2.22 ± 0,86
*SST (mg L^{-1})	312,5 ± 177,8	366,4 ± 200,7	312.03 ± 172.02	346,4 ± 206,88
Turbidez (NTU)	123.08 ± 87,98	135,96 ± 88.14	129.09 ± 92.12	140,7 ± 99,19
Sólidos Sedimentáveis (mL L^{-1})	6.5 ± 6.47	9.1 ± 8.59	9.17 ± 7.8	10.1 ± 8.76
Clorofila *a* (µg L^{-1})	1.35 ± 0,51	1,85 ± 0,65	1,45 ± 0,36	1.32 ± 0,65
*PAR Superfície (µmol m^{-2} s^{-1})	7.77 ± 2.5	8.9 ± 4.44	10.8 ± 5.72	6.9 ± 2.56
PAR 20 cm (µmol m^{-2} s^{-1})	1.16 ± 1.13	1,59 ± 2.35	1.47 ± 1.47	1.16 ± 1,59
PAR 40 cm (µmol m^{-2} s^{-1})	0,2 ± 0,32	0,26 ± 0,5	0,3 ± 0,53	0,2 ± 0,38
Luz (lx)	488 ± 10.5	488 ± 10.8	488 ± 10.5	488 ± 10.6
Quantidade total de água (L)	330 ± 30	300 ± 30	330 ± 30	300 ± 30

* DO (Oxigênio Dissolvido); TSS: Sólidos Suspensos totais; PAR: Radiação fotossinteticamente ativa; TAN: nitrogênio amoniacal total.

As variações nas concentrações de compostos nitrogenados ao longo dos 61 dias de estudo são mostradas na Figura 2. De acordo com a Figura 2A, não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos (p >0,05). O nível máximo registrado foi de 6,92 mg L^{-1} para todos os tratamentos, como 16h LI/8h DA, 12h LI/12h DA, 8h LI/16h DA e 4h

LI/20h DA. As variações nas concentrações de nitrito ao longo dos 61 dias do estudo são mostradas na Figura 2.B. Os maiores valores de nitrito medidos foram 29,12 mg L^{-1} para todos os tratamentos como 16h LI/8h DA, 12h LI/12h DA, 8h LI/16h DA e 4h LI/20h DA.

Conforme observado anteriormente, no estudo nós trabalhamos com uma margem de segurança limite para o camarão em relação aos níveis de nitrito, que foi de 26 mg L^{-1}. Em todos os tratamentos, a troca de água de 20% do volume total do tanque e esta foi realizada quando o valor limite de segurança foi ultrapassado. Os tratamentos 16h LI/8h DA e 12h LI/12h DA apresentaram diminuição das concentrações de nitrito por volta do 34º dia e valores indetectáveis no 50º dia. Por outro lado, os tratamentos, como 8h LI/16h DA e 4h LI/20h DA começaram a apresentar um padrão decrescente em aproximadamente 37 dias. Os tratamentos 8h LI/16h DA e 4h LI/20h DA atingiram valores indetectáveis no dia 50.

Conforme mostra a Figura 2C, não houve diferença significativa nas concentrações de nitrato entre os tratamentos ($p > 0,05$), com máximo de 155,00 mg L^{-1} para os tratamentos 16h LI/8h DA e tratamentos 12h LI/12h DA, 123,75 mg L^{-1} para 4h LI/20h DA e 112,50 mg L^{-1} para 8h LI/16h DA.

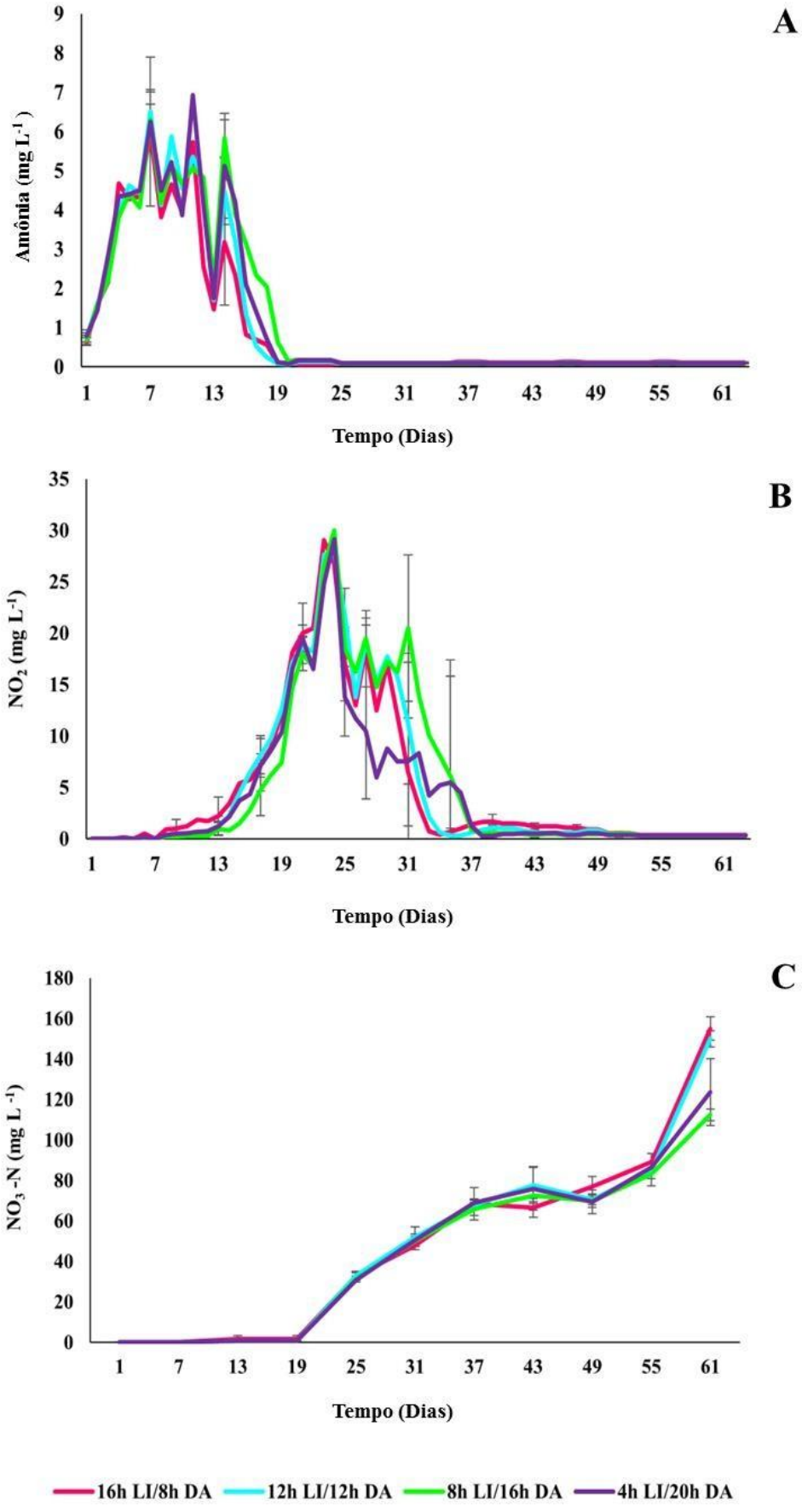
A
Amônia (mg L-1)
Tempo (Dias)
B
NO2 (mg L-1)
Tempo (Dias)
C
NO3 -N (mg L-1)
Tempo (Dias)
16h LI/8h DA
12h LI/12h DA
8h LI/16h DA
4h LI/20h DA

Figura 2. Variação (média ± desvio padrão) nas concentrações de nitrogênio amoniacaltotal – TAN (A), nitrito – $N\text{-}NO_2^-$ (B) e nitrato – $N\text{-}NO_3^-$ (C) durante 61 dias de criação de *L.vannamei* em sistemas BFT sob diferentes fotoperíodos LEDs verdes: 16h LI/8h DA,12h LI/12h DA, 8h LI/16h DA e 4h LI/20h DA.

4.2 Quantificação microrganismos.

A Figura 3A estão as concentrações de bactérias cocoides ao longo do experimento. Diferenças significativas foram encontradas entre os tratamentos no período de 35 dias ($p < 0,05$), com concentração mínima de 1,35 $x10^6$ mL^{-1} no tratamento 12h LI/12h DA e máxima de 2,42 x 10^6 mL^{-1}, por 16h Tratamentos LI/8h DA e 4h LI/20h DA.

Para bactérias filamentosas livres, diferenças significativas foram observadas entre os tratamentos aos 30 e 61 dias ($p < 0,05$). Houve máximo de 9,87 $x10^5$ mL^{-1} para 16h LI/8h DA e mínimo de 2,28 $x10^5$ mL^{-1} para 12h LI/12h DA (Figura 3B).

A Figura 3C estão as concentrações de bactérias filamentosas aderidas ao longo do experimento. Houve diferenças significativas nos períodos 15, 30 e 61 dias ($p < 0,05$), com concentração máxima de 1,62 $x10^5$ mL^{-1} para 4h LI/20h DA e mínima de 0,10 $x10^5$ mL^{-1} para 12h LI/ 12h DA.

A Figura 3D mostra as concentrações de vibrio ao longo do experimento. Diferenças significativas foram encontradas entre os tratamentos aos 61 dias ($p < 0,05$), com concentração mínima de 0,20 x 10^4 mL^{-1} no tratamento 8h LI/16h DA e concentração máxima de 1,20 x 10^4 mL^{-1} nas 16h Tratamento LI/8h DA.

Para bacilos, houve diferenças em todos os períodos, com máximo de 3,67 x 10^5 mL^{-1} para 8h LI/16h DA e mínimo de 0,10 $x10^5$ mL^{-1} para 16h LI/8h DA, 12h LI/12h DA, 8h LI/16h DA e 4h LI/20h DA (Fig. 3E).

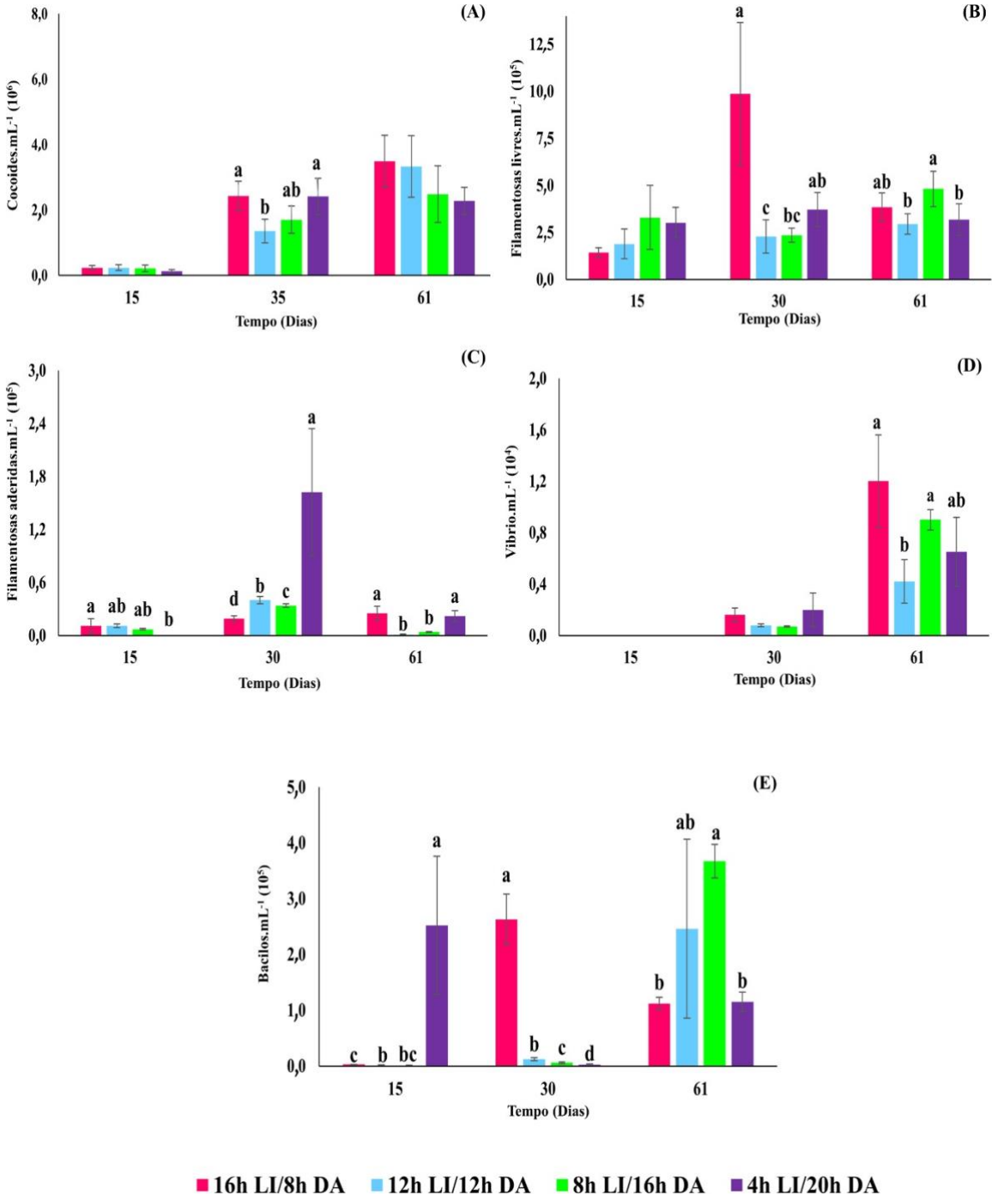

Figura 3. Variação na abundância dos grupos de morfotipos de bactérias - cocóide (A), filamentosa livre (B), filamentosa aderida (C), vibriões (D) e bacilo (E), em diferentes momentos na criação de *L. vannamei* em sistemas BFT sob diferentes fotoperíodos LED verdes: 16h LI/8h DA, 12h LI/12h DA, 8h LI/16h DA e 4h LI/20h DA.

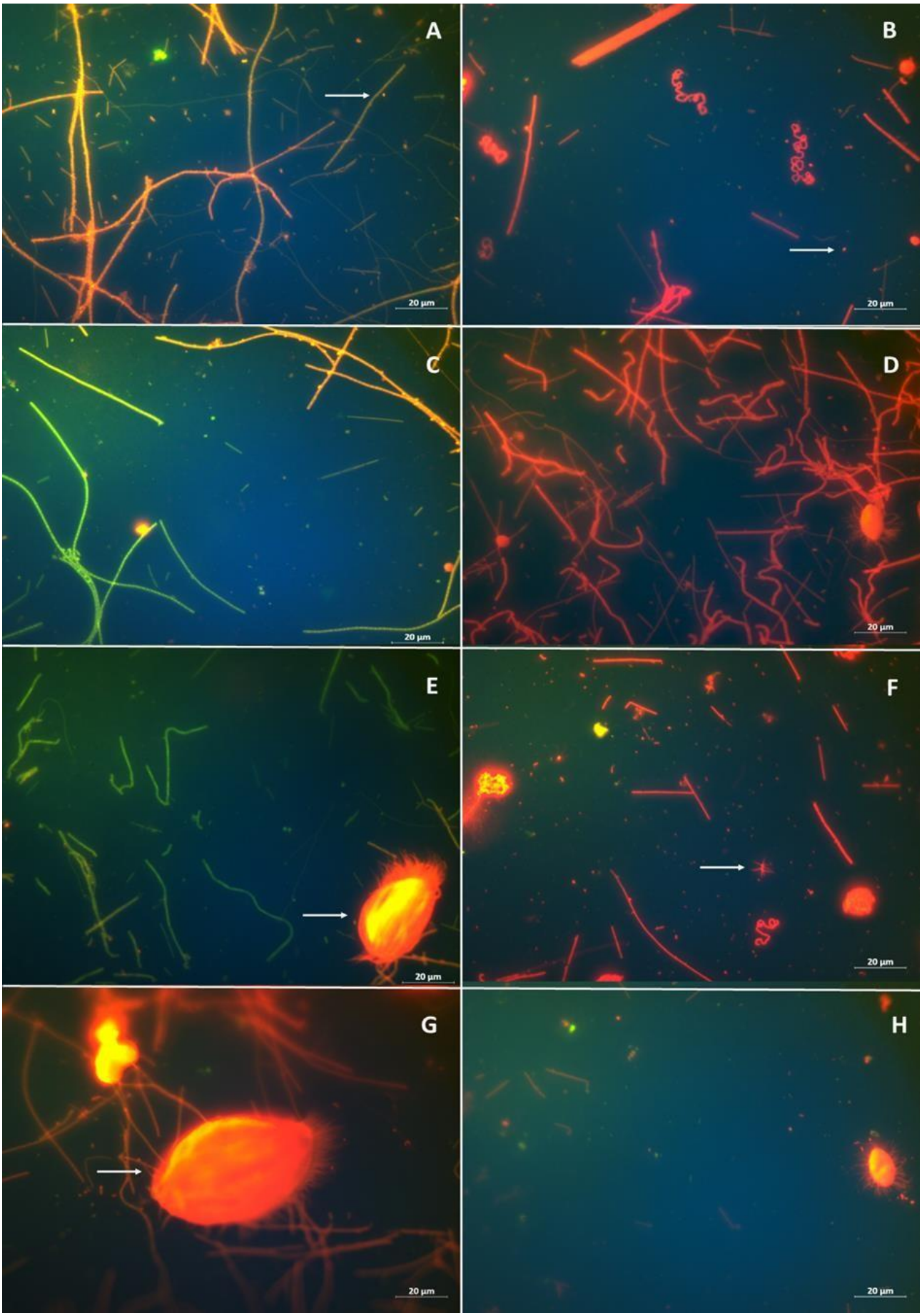
A
B
C
D
E
F
G
H
20 µm

Figura 4. Abundância de morfotipos de bactérias no floco microbiano no tratamento green16h LI/8h DA: (A) Filamentosos livres (bactérias) no 15º dia de experimento; (B) Cocoides (bactérias) no 61º dia ; Abundância de bactérias no floco microbiano no tratamento verde 12h LI/12h DA: (C) no 15º dia de experimento; (D) no 61º dia ; Abundância de bactérias no floco microbiano no tratamento verde 8h LI/16h DA: (E) Ciliados (protozoários) no 15º dia de experimento; (F) Ameba (protozoário) no 61º dia; Abundância de bactérias no floco microbiano no tratamento verde 4h LI/20h DA (G) Ciliado 15º dia de experimento; (H) 61º dia de experimento. Aumento de 1000x por microscopia de epifluorescência (imagem: Wellica G. Reis).

Diferenças significativas foram encontradas nas concentrações de flagelados entre os períodos 15, 30 e 61 ($p < 0,05$), com valor máximo de 2,86 $x10^3$ mL^{-1} para o tratamento 12h LI/12h DA e mínimo de 0,21 $x10^3$ mL^{-1} para o tratamento 4h LI/20h DA (Figura 5A).

Para os ciliados houve diferenças significativas nos períodos de 15, 30 e 61 dias de experimento ($p <0,05$), com mínimo de 0,69 $x10^3$ mL^{-1} nos tratamentos 8h LI/16h DA e 4h LI/20h DA e máximo de 2,76 x 10^3 mL^{-1} no tratamento 8h LI/16h DA (Figura 5B).

A Figura 5C mostra que houve diferenças significativas nas concentrações de rotíferos no período de 30 dias nos diferentes tratamentos ($p <0,05$), com um mínimo de 0,0 x 10^2 mL^{-1} para os tratamentos 8h LI/16h DA, e um valor máximo de 3,47 x 10^2 mL^{-1} para o tratamento 12h LI/12h DA.

Diferenças significativas foram encontradas para as concentrações do nematoide nos períodos de 30 e 61 dias ($p<0,05$), com mínimo de 0,0 x 10^2 mL^{-1} para os tratamentos 4h LI/20h DA e máximo de 1,12 x 10^2 mL^{-1} para os tratamentos 16h LI/8h DA (Figura 5D).

Houve diferenças significativas nas concentrações de amebas nos períodos 15, 30 e 61 dias ($p<0,05$), com concentração mínima de 0,10 x 10^4 mL^{-1} para os tratamentos 16h LI/8h DA e 8h LI/16h DA, e máximo de 2,13 x 10^4 mL^{-1} para o tratamento 8h LI/16h DA (Figura 5E).

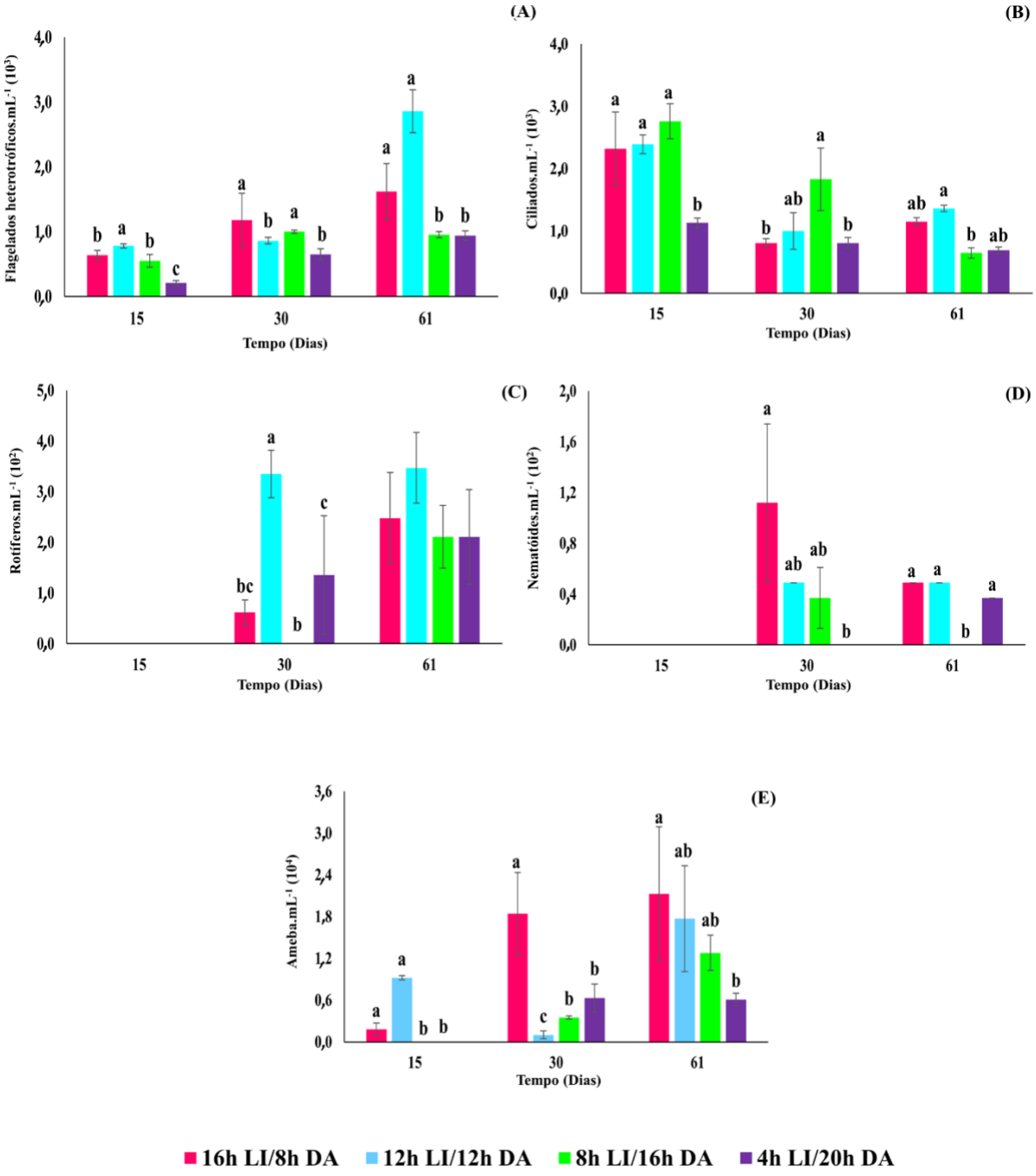

Figura 5. Variação na abundância de grupos de protozoários - flagelados (A), ciliados (B) rotíferos (C), nematoides (D) e amebas (E), em diferentes momentos na criação de *L. vannamei* em sistemas BFT sob fotoperíodos LED verde luzes: 16h LI/8h DA, 12h LI/12h DA, 8h LI/16h DA e 4h LI/20h DA.

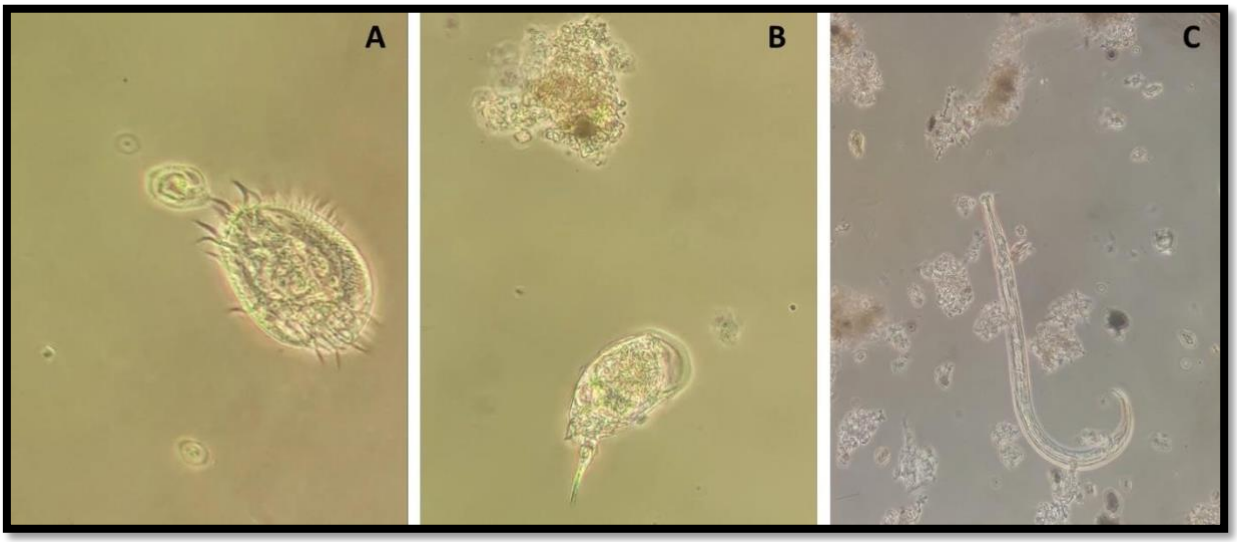

Figura 6. Ciliado (A), rotífero (B) e nematoide (C), Aumento de 20x em microscópio invertido (imagem: Wellica G. Reis).

4.3 Peroxidação Lipídica (TBARS) e Capacidade Antioxidante Total (ACAP).

No hepatopâncreas houve diferença estatística aos 29 e 61 dias, com maior peroxidação lipídica para o tratamento 16h LI/8h DA (com 0,674± 0,008 mg e menor peroxidação para os tratamentos 4h LI/20h DA com 0,203 mg 12h LI/12h DA (com 0,235 ± 0,002 mg) e o tratamento 8h LI/16h DA (com 0,241 ± 0,007 mg) ($p < 0,05$). Porém, aos 47 dias não houve diferença estatística entre os tratamentos ($p > 0,05$). Houve diferenças significativas quando avaliada a interação fotoperíodo e tempo, no início aos 29 dias e no final aos 61 dias para o fotoperíodo 16h LI/8h DA ($p < 0,05$), mas não foram encontradas diferenças para os outros tratamentos (Figura 7A).

Para a capacidade antioxidante total houve diferenças significativas entre os tratamentos aos 29, 47 e 61 dias de experimento para o hepatopâncreas ($p < 0,05$). Todos os tratamentos iniciaram com baixa capacidade antioxidante (maior área relativa), mas ao longo do experimento a capacidade antioxidante aumentou. Assim, a capacidade antioxidante total foi maior (menor área relativa) principalmente após 61 dias para o tratamento 8h LI/16h DA (com valor de 0,301 ± 0,038 mg de área relativa), seguido pelos tratamentos 12h LI/12h DA (com 0,590 ± 0,121 mg de área relativa) e para o tratamento 4h LI/20h DA (com 0,696 ± 0,071 mg de área relativa). Houve uma interação significativa entre fotoperíodo e tempo para todos os tratamentos para hepatopâncreas ao longo do estudo (Figura 7B).

Os níveis de TBARS no músculo foram menores em comparação com o hepatopâncreas (menos de 0,062 nmol TMP/mg de tecido). Houve diferenças estatísticas aos 29 dias de cultivo com menor peroxidação lipídica para o tratamento 16h LI/8h DA (com 0,053 ± 0,00 mg) e maior peroxidação lipídica para o tratamento 8h LI/16h DA (com 0,062 ±0,002 mg), seguido de 12h LI/12h DA (com 0,054 ± 0,004 mg) e tratamento 4h LI/20h DA (com 0,053 ± 0,00 mg) ($p < 0,05$). No entanto, no meio e no final do experimento não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos ($p > 0,05$). Além disso, todos os tratamentos no período intermediário e no final do experimento apresentaram menor peroxidação lipídica. As análises das interações entre o fotoperíodo e o tempo não foram significativas para o músculo ($p > 0,05$) (Figura 7C).

A capacidade antioxidante total contra os radicais peroxil no músculo apresentou um aumento (áreas relativas menores) ao longo do período experimental ($p < 0,05$). A capacidade antioxidante total foi significativamente maior (menor área relativa) em todos os tratamentos, principalmente no período final para o tratamento 8h LI/16h DA (0,213 ± 0,101 mg de área relativa), seguido do tratamento 12h LI/12h DA (0,426 ± 0,059 mg de área relativa), 4h LI/20h DA (0,664 ± 0,039 mg de área relativa) e o tratamento 16h LI/8h DA (0,755 ± 0,081 mg de área relativa). Houve uma interação significativa entre o fotoperíodo e o tempo no tecido muscular ao longo do experimento para todos os tratamentos (Figura 7D).

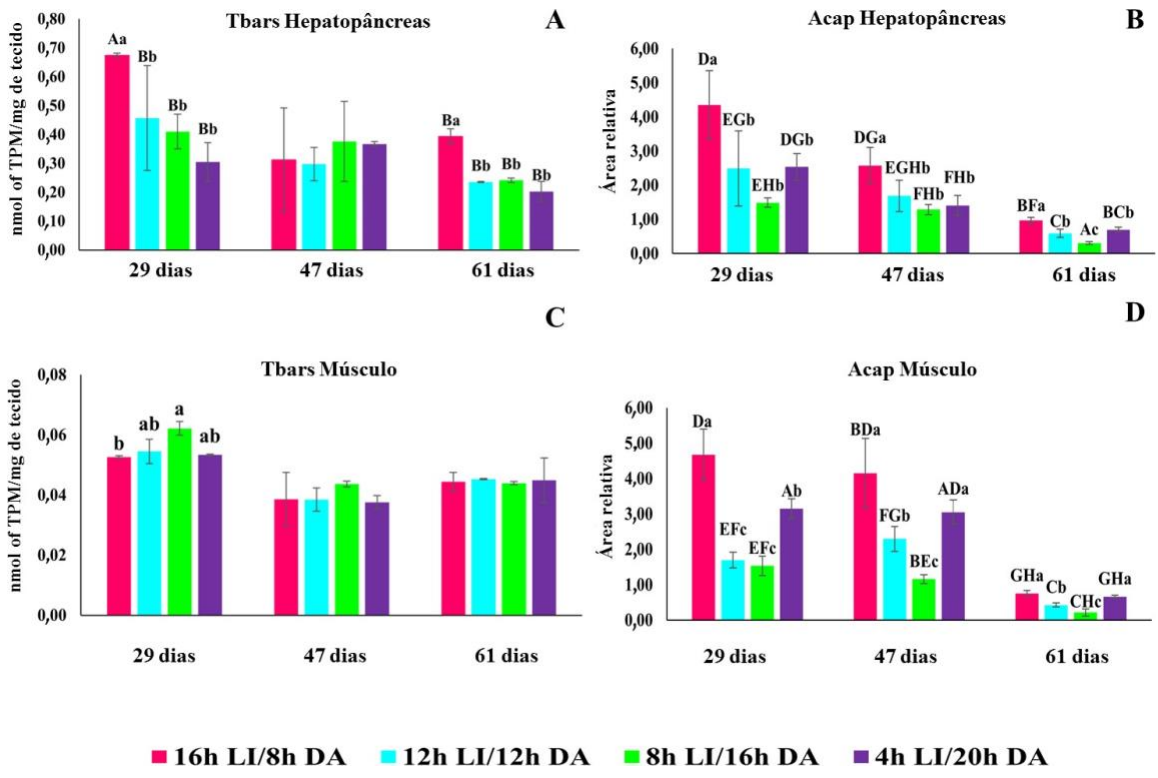

Figura 7. Média (± desvio padrão) dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (nmol de TMP/mg por tecido) em (A) hepatopâncreas e (C) músculo durante 61 dias de criação de *L. vannamei* em sistemas BFT sob diferentes fotoperíodos com verde Luz LED: 16h LI/ 8h DA, 12h LI/12h DA, 8h LI/16h DA e 4h LI/20h DA. Média (± desvio padrão) da capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (expressa em área relativa) em (B) hepatopâncreas e (D) músculo. Em todos os casos, letras minúsculas representam diferenças entre tratamentos no mesmo período e letras maiúsculas representam a interação do fotoperíodo com o período ou tempo. Foram encontradas diferenças significativas no tratamento, no tempo e tratamento x tempo.

4.4 Desempenho zootécnico.

Os resultados do desempenho zootécnico de *L. vannamei* criados durante 61 dias deste estudo são apresentados na Tabela 2. Houve diferença significativa no peso final entre os tratamentos ($p < 0,05$). Para os parâmetros, com crescimento semanal, taxa de sobrevivência, taxa de conversão alimentar e produtividade não houve diferença significativa.

Tabela 2

Valores médios (± desvio padrão) do desempenho vegetativo de *L. vannamei* nos tratamentos: 16h LI/8hDA, 12h LI/12h DA, 8h LI/16h DA, 4h LI/20h DA após 61 dias. Diferentes letras sobrescritas em uma linha denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

	16h LI/8h DA	**12h LI/12hDA**	**8h LI/16h DA**	**4h LI/20h DA**
Peso inicial (g)	0,48 ± 0,03	0,48 ± 0,03	0,48 ± 0,03	0,48 ± 0,03
Peso final (g)	6,68 ± 0,14^{ab}	6,30 ± 0,67^{b}	7,12 ± 0,30^{a}	6,50 ± 0,19^{b}
Crescimento semanal (g)	0,69 ± 0,33	0,68 ± 0,32	0,74 ± 0,32	0,67 ± 0,25
FCA	1,19 ± 0,08	1,29 ± 0,04	1,20 ± 0,06	1,33 ± 0,05
Taxa de sobrevivência (%)	94,00 ± 4,76	92,00 ± 2,17	88,00 ± 7,01	86,67 ± 3,92
Produtividade (Kg/m^3)	3,14 ± 0,22	2,89 ± 0,09	3,13 ± 0,18	2,81 ± 0,12

5. DISCUSSÃO

5.1 Influência de diferentes fotoperíodos de luz LED verde na qualidade da água.

Os parâmetros de qualidade da água analisados não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 1). Os valores dessas variáveis estão dentro da faixa considerada aceitável para a espécie nas condições de estudo, portanto, provavelmente não causaram diferença nos índices de desempenho (Van Wyk e Scarpa, 1999; Gaona et al., 2011; Furtado et al., 2016; Zhang et al., 2017). Em estudo realizado por Reis et al, (2022), os autores observaram que a nitrificação em diferentes espectros foi melhor no espectro verde com fotoperíodo 12h LI/12h DA, quando comparado ao controle (espectro branco). Neste estudo, o mesmo espectro verde em diferentes fotoperíodos não influenciou na nitrificação, portanto, na qualidade da água com espectro verde, poderia ser utilizado o fotoperíodo que contribui para um menor gasto energético.

5.2 A influência de diferentes fotoperíodos de luz LED verde em microrganismos.

Embora tenha ocorrido diferenças estatísticas para os microrganismos em cada período, foi possível observar uma forte relação de disponibilidade de alimento e predação no sistema de cultivo e a influência do fotoperíodo pode ter ocorrido sobre os microrganismos de forma indireta. A abundância de bactérias parece estar relacionada, principalmente ao fornecimento de fontes de carbono no sistema de cultivo, nutrientes e a contribuição que as bactérias têm na formação dos bioflocos. Para as bactérias cocoides, houve diferença no período intermediário (47 dias). Além disso, houve maior abundância nos tratamentos 4/20, 8/16 e 16/8, com aumento em todos os tratamentos ao final do experimento, Esse aumento significativo de bactérias cocoides ao longo do experimento pode estar relacionado à contribuição dessas bactérias na formação de bioflocos no sistema de cultivo, conforme observado por Ferreira et al, (2008),

Paralelamente, as bactérias filamentosas livres e aderidas apresentaram diferença significativa nos diferentes fotoperíodos com luz verde. Para bactérias filamentosas livres, observou-se diferença no meio e no final ao longo do estudo, com 30 e 61 dias. Por outro lado, as concentrações de bactérias filamentosas aderidas diferiram em todos os períodos durante o experimento. Essa abundância de filamentosas livres podem estar relacionadas à maior disponibilidade de carbono orgânico dissolvido nos tanques de cultivo, quando uma fonte externa de carbono orgânico foi adicionada no início do experimento. Em estudo realizado por

Anesio et al. (2003), os autores observaram que tanto as bactérias livres quanto as aderidas atuam de formas diferentes no ambiente, quando há maior oferta de carbono orgânico dissolvido no meio, sendo assim, ocorre a maior abundância de bactérias livres e posteriormente as bactérias filamentosas aderidas com a formação de bioflocos.

Nesse contexto, a alta concentração de carbono orgânico dissolvido (DOC), conhecido como circuito microbiano, cria um fluxo alternativo de energia em altos níveis tróficos (Pomeroy, 1974; Azam et al., 1983). Dentre esses fatores, a predação é capaz de influenciar a abundância, composição, comportamento e morfologia das bactérias (Roselli, 2008) e constitui o chamado controle top-down proposto por Wright (1988), que juntamente com a disponibilidade de nutrientes (bottom-up) merecem destaque, como sendo o principal fator responsável pelo controle de bactérias nos sistemas,

Ainda é possível acrescentar, que em todos os tratamentos foi verificada similaridade nas abundâncias de vibrio e bacilos. É importante ressaltar que o probiótico foi utilizado em todos os tratamentos, assim, o antagonismo entre vibrio e bacilos foi observado em todos os tratamentos com aumento na abundância de bacilos e diminuição na abundância de vibrios. Esse resultado corrobora com Krummenauer et al. (2014), Hostins et al. (2017), e Reis et al. (2019), que observaram menores concentrações de vibrios e o aumento de bacilos quando probióticos foram usados em um sistema BFT.

Como observação geral, quanto à abundância de protozoários e metazoários houve diferenças significativas nas concentrações de microrganismos, como flagelados, ciliados, rotíferos, nematoides e amebas em diferentes fotoperíodos com luz verde. O tratamento 4/20 apresentou menor abundância de protozoários e metazoários na água de cultivo, portanto este fotoperíodo influenciou na comunidade destes microrganismos, e desta forma, o ambiente funcionou como um filtro de seleção menos favorável para a abundância de microrganismos na o fotoperíodo com menos luz,

No presente estudo, foi verificada a presença de flagelados heterotróficos em todos os tratamentos ao longo do experimento, mas em nenhum momento foi verificada a presença de flagelados autotróficos na água de cultivo, o que pode ser explicado pela capacidade mixotrófica dos flagelados (Zhang et al., 1996; Ma et al., 2018). Além disso, ainda é possível acrescentar que a abundância de flagelados heterotróficos nos diferentes períodos ao longo do experimento pode estar relacionada ao desenvolvimento de ciliados, pois estes são predadores de flagelados e outros microrganismos, Os ciliados são importantes na cadeia alimentar, pois

se alimentam de algas filamentosas, amebas, bactérias, detritos, outros ciliados, flagelados e hifas fúngicas (Verni e Gualtieri, 1997; Dias, 2008),

O filo Ciliophora é um dos maiores grupos entre os protozoários e é de suma importância na transferência de nutrientes dentro da cadeia alimentar em ambientes costeiros, sendo um dos principais elos da alça microbiana marinha (Monagnes, et al., 2010). As concentrações de ciliados apresentaram diferenças em todos os períodos do estudo, com maior abundância no início e menor no final em todos os tratamentos, porém os tratamentos com fotoperíodos com mais luz foram positivos na abundância de ciliados. O tratamento 4/20 apresentou a menor abundância de ciliados ao longo dos diferentes períodos. Por outro lado, um estudo realizado por Anunciação (2016) que avaliou fatores abióticos no crescimento dos ciliados, mostrou que houve melhor desenvolvimento dos ciliados nos fotoperíodos 0 luz/24 horas escuro e 16 horas claro e 8 horas escuro, quando comparados aos outros fotoperíodos, Este estudo corrobora com o autor apenas no fotoperíodo 16/8 e acrescentamos que maior abundância de ciliados também foi encontrada em fotoperíodos com períodos de luz mais altos, 12/12 e 16/8, e menor em 4/20 com luz verde artificial.

O efeito do fotoperíodo no crescimento ciliado não é bem compreendido, mas este parâmetro pode influenciar a fisiologia dos ciliados por meio do fototropismo (Cadotte et al., 2007). Em um estudo realizado por Yoo e Hur (2002), os autores verificaram que a alta intensidade de luz de 3000 lux também inibiu o crescimento da população ciliada. Quanto à variação na abundância de ciliados ao longo do estudo, principalmente a diminuição no período final, ela também pode estar relacionada ao desenvolvimento de rotíferos no ambiente de cultivo, pois os rotíferos são relatados como eficientes predadores de ciliados (Curds 1992; Auer et al., 2004; Decamp et al., 2006).

A abundância dos rotíferos nos diferentes fotoperíodos com luz verde apresentou diferenças significativas no período do meio, com maior abundância no tratamento 12/12 e menor nos tratamentos 4/20, 16/8 e 8/16, mas não houve diferença no período do final. Um estudo realizado por Rojas et al. (1999), com a espécie de rotífero *Brachionus cayciflorus* sob a influência de fatores abióticos, os autores relataram que um fotoperíodo superior a 8 horas diárias proporciona melhor eclosão dos ovos. Os rotíferos, como organismos oportunistas, adaptam-se facilmente a mudanças nas condições ambientais e, portanto, é difícil encontrar um padrão constante de composição e ocorrência de espécies no espaço e no tempo (Rodriguez et al., 2000). Além disso, essa variação no período do meio pode estar associada à predação de

camarão em rotíferos, um efeito “top-down”, no qual ocorre a predação de camarão sobre os rotíferos (Jack & Gilbert, 1997; Agasild et al., 2013).

Para a abundância de nematoides houve diferença para os períodos intermediário e tardio, com maior abundância nos tratamentos 16/8, 12/12 e 8/16 e ao final do ensaio os tratamentos permaneceram semelhantes, exceto para o tratamento de 16/08. De forma geral, houve uma redução na concentração de nematoides ao longo do estudo, o que pode estar relacionado à taxa de predação dos organismos cultivados (Ray et al., 2010). Por outro lado, no tratamento 12/12 não houve variação na concentração ao longo do estudo, e parece não haver predação de nematoides pelos os camarões.

5.3 A influência de diferentes fotoperíodos de luz LED verde em parâmetros bioquímicos.

Os diferentes fotoperíodos com luz LED verde influenciaram nos resultados das análises bioquímicas. A peroxidação lipídica foi, consideravelmente menor quando comparada ao hepatopâncreas, o que possivelmente pode estar relacionado ao próprio tecido, no caso o músculo, por ter maior teor de proteína. O comprimento de onda utilizado e as alterações comportamentais dos animais associadas ao fotoperíodo podem ajudar a explicar essas diferenças.

Em um estudo realizado por Fei et al. (2020), com diferentes comprimentos de onda no fotoperíodo 12/12 com luzes LED em água limpa, os autores relataram aumento de algumas enzimas antioxidantes, como SOD, GSH-PX e CAT, principalmente nos espectros de luz azul e verde e que esta ocorrência pode ter ajudado a eliminar as ERO induzidas pelo ambiente espectral, protegendo assim as células do dano oxidativo e, portanto, conseguindo manter o metabolismo fisiológico normal. Assim, a luz verde utilizada no experimento com diferentes fotoperíodos em sistema de bioflocos pode ter contribuído para o equilíbrio do metabolismo fisiológico,

Outro ponto a ser considerado é o efeito do fotoperíodo na geração do estresse oxidativo, o *L. vannamei* é ativo durante o dia e à noite, porém essa atividade varia dependendo de comportamentos específicos. Por exemplo, a agilidade locomotora (natação) ocorre mais à noite, enquanto a exploração do substrato (busca de alimento) ocorre em ambas as fases, porém, os animais tendem a iniciar o consumo de alimentos durante a fase clara (Pontes e Arruda, 2005; Pontes, 2006). Portanto, o tratamento com período de luz mais prolongado 16h LI/8h DA pode ter influenciado os camarões a explorarem por alimento por mais tempo, quando comparado a

outros tratamentos com menor quantidade de luz, o que pode ter gerado um aumento no metabolismo dos animais e, assim, influenciado na geração do estresse oxidativo,

A capacidade antioxidante apresentou diferenças significativas entre todos os tratamentos e houve interação significativa no fotoperíodo e tempo ao longo do experimento. A determinação da capacidade antioxidante é extremamente importante para promover o entendimento da resistência dos organismos à toxicidade causada pela geração de ERO (Amado et al., 2009). No entanto, ao analisar as respostas de um organismo ao estresse oxidativo, é essencial considerar que a capacidade antioxidante e a intensidade do dano oxidativo se comportam de maneira diferente em diferentes órgãos (Monserrat et al., 2008; Amado et al., 2009).

De modo geral, os resultados para a capacidade antioxidante no hepatopâncreas foram maiores (menor área relativa) no início, no meio e no final nos tratamentos com fotoperíodo 12/12, 8/16 e 4/20, quando em comparação com o tratamento 16/8 que apresentou menor capacidade antioxidante (maior área relativa). Porém, há um tratamento que sempre obteve maior capacidade antioxidante em todos os diferentes fotoperíodos ao longo do estudo, o tratamento 8/16. Por outro lado, no tecido muscular houve maior capacidade antioxidante nos tratamentos com fotoperíodo 12/12 e 8/16 e menor capacidade antioxidante nos tratamentos 16/8 e 4/20. Esses resultados persistiram em todos os períodos analisados. No entanto, todos os tratamentos aumentaram a capacidade antioxidante ao longo do experimento, esses resultados podem estar relacionados ao peso do animal e aos microrganismos presentes nos bioflocos, que são consumidos pelos camarões e que podem ter potencial bioativo para os animais de criação (Buford., et al 2003; Ju et al., 2008; Martins et al., 2015; Krummenaeur et al., 2020).

Os resultados para a abundância de microrganismos foram semelhantes em todos os tratamentos, inclusive em todos os diferentes períodos ao longo do estudo, portanto, essa abundância também pode ter influenciado de forma semelhante no fornecimento de compostos bioativos antioxidantes aos camarões ao longo do estudo. O efeito pelo menos nas respostas antioxidantes e danos oxidativos em camarões seria indireto e consequência de uma comunidade de bioflocos com maior ou menor teor de compostos bioativos que modulariam a resposta nos camarões.

Os Microrganismos representam uma fonte de proteínas, lipídios, carboidratos e energia. Os nutrientes desempenham um papel essencial no desenvolvimento de várias espécies cultivadas, como os ácidos graxos poliinsaturados (Glencross, 2009; López et al., 2015; Rajeev et al., 2021). Desta forma, alguns aminoácidos essenciais (Ju et al., 2008) e quantidades

consideráveis de vitaminas (Avnimelech 2009) podem ser encontrados em microrganismos. Os bioflocos são considerados probióticos naturais devido ao seu papel como imunoestimulante que pode aumentar a resistência de peixes e camarões contra doenças infecciosas (Crab, 2010). Estudos indicam que o consumo de bioflocos melhora os aspectos nutricionais, pois são uma fonte natural rica em compostos bioativos que ajudam a manter o equilíbrio das funções fisiológicas, aumentando o status antioxidante do camarão (Wasielesky et al., 2006; Silva Martins et al., 2015),

Além disso, algumas pesquisas relataram que os bioflocos podem conter vários compostos bioativos, incluindo carotenóides, flavonóides, clorofilas, fitoesteróis, bromofenóis e açúcares amino (Ju et al., 2008; Kim et al., 2014; León et al., 2018). Assim, tratamentos com menor exposição à luz causaram menor peroxidação lipídica, principalmente no hepatopâncreas, e maior capacidade antioxidante, tanto no hepatopâncreas quanto no músculo. Além disso, os bioflocos podem ter contribuído para todos os tratamentos no aumento da capacidade antioxidante durante o ensaio.

5.4 A influência de diferentes fotoperíodos de luz LED verde no desempenho zootécnico.

Para o desempenho zootécnico houve diferenças significativas na criação *de L. vannamei,* influenciando positivamente o peso final dos camarões nos diferentes tratamentos. Os tratamentos 8/16 e 16/8 obtiveram maior peso final, mas apenas o tratamento 8/16 diferiu do controle 12/12. Para os demais parâmetros examinados, não foram encontradas diferenças significativas. Em estudo realizado por Reis et al. (2022) os autores avaliaram diferentes espectros de luz no desempenho zootécnico de *L. vannamei*, sendo que o espectro de luz verde teve o maior peso, quando comparado ao controle e também não houve diferença significativa entre os outros parâmetros. Portanto, o presente estudo corrobora com os autores, pois apesar de ter apresentado diferença no peso final, não foi verificada diferença significativa na sobrevivência, FCA e produtividade.

De maneira geral, a abundância de microrganismos nos tratamentos foi semelhante, exceto no tratamento 4/20, que teve menor abundância de protozoários e outros grupos, portanto, esses microrganismos podem ter contribuído de forma semelhante nos tratamentos e, assim, refletindo também na uma maneira semelhante no desempenho do crescimento. Porém, com os resultados das análises bioquímicas é possível observar que o tratamento 8/16 na maioria dos períodos apresentou menor peroxidação lipídica e maior capacidade antioxidante, o que pode ter refletido no desempenho do animal, pois foi o único tratamento que se

diferenciou do o controle. Os resultados encontrados foram diferentes dos encontrados por Wang et al. (2021) que observaram melhor desempenho para camarões expostos a menos luz com fotoperíodo 12/12 e como os resultados encontrados pelos autores na presença de luz em diferentes fotoperíodos (Baloi et al., 2013; Esparza-Leal et al., 2017; Fleckenstein et al., 2019 Reis et al., 2019, 2022). Portanto, para o desempenho zootécnico, o tratamento que teve melhor resultado quando comparado ao controle foi 8/16.

6. CONCLUSÃO

O uso da luz LED verde em diferentes fotoperíodos não influenciou a qualidade da água, mas influenciou positivamente a capacidade antioxidante e o dano oxidativo (peroxidação lipídica) do *L, vannamei* e o desempenho zootécnico. Portanto, o fotoperíodo de 8 horas de verde luz e 16 horas de escuro pode ser recomendado para a criação de *L. vannamei* em sistemas de bioflocos em ambientes fechados, pois proporciona menor consumo de energia e a mesma produtividade, quando comparado aos outros tratamentos.

7. REFERÊNCIAS

Amado, L.L., Garcia, M.L., Ramos, P.B., Freitas, R.F., Zafalon, B., Ferreira, J.L.R., Monserrat, J.M., 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxyl radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. Science of theTotal Environment, 407, https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.11.038

Anésio, A.M., Abreu, P.C., Biddanda, B.A., 2003. The role of free and attached microrganisms in the decomposition of estuarine macrophyte detritus. Estuar. Coast. Shelf Sci. 56, 197–201. https://doi.org/10.1016/S0272-7714(02)00152-X

Annunciação, W.F., 2016. Influence of abiotic factors on the production of the copepod Bestiolina similis and the ciliated protozoan *Euplotes* sp. Tese 2016.

Auer, B., Elzer, U., Arndt, H. Comparison of pelagic food webs in lakes along a trophic gradient and with seasonal aspects: influence of resources and predation. Journal of Plankton Research, 2004, 26(6), 697 709. http://dx.doi.org/10.1093/plankt/fbh058.

Agasild, H., Zingel, P., Karus, K., Kangro, K., Salujõe, J. and Nõges, T. Does metazooplankton regulate the ciliate community in a shallow eutrophic lake? Freshwater Biology, 2013, 58(1), 183-191. http://dx.doi.org/10.1111/ fwb.12049.

APHA (American Public Health Association), 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd ed, Washington, DC, 1496 pp.

Avnimelech, Y., 1999. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. Aquaculture 176, 227–235. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00085-X.

Avnimelech Y (2009) Biofloc technology—a practical guidebook, 1st edn. The World Aquaculture Society, Baton Rouge

Avnimelech, Y., 2015. Biofloc technology – A practical guidebook., A practical guidebook. The World Aquaculture. https://doi.org/10.13140/2.1.4575.0402.

Azam, F.; Fenchel, T.; Field, J. G.; Gray, J. S.; Meyer-Reil, L. A.; Thingstad, F., 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. Mar. Ecol. Prog. Ser., 10, 257-263.

Bagenal, T.B., Tesch, F.W., 1978. Age and growth. In: Bagenal, T.B. (Ed.), Methods for the Assessment of Fish Production in Fresh Waters. IBP Handbook. vol. 3. Mech. 14, 912–913. https://doi.org/10.1007/bf00860117.

Baloi, M., Arantes, R., Schveitzer, R., Magnotti, C., Vinatea, L., 2013. Performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* raised in biofloc systems with varying levels of light exposure. Aquac. Eng. 52, 39–44. https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2012.07.003

Boyd, C. E. and J.W. Clay. 2002.“ Evaluation of Belize Aquaculture, Ltd: A Super intensive Shrimp Aquaculture System ”. Report prepared under the World Bank, NACA, WWF and FAO Consortium Program on Shrimp Farming and the Environment. Work in Progress for Public Discussion. Published by the Consortium. 17 pages.

Brandão, H., Xavier, Í.V., Santana, G.K.K., Santana, H.J.K., Krummenauer, D., Wasielesky, W., 2021. Heterotrophic versus mixed BFT system: Impacts on water use, suspended solids production and growth performance of *Litopenaeus vannamei*. Aquac. Eng. 95, 102194. https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2021.102194

Burford, M. A., J. P. Thompson, P. R. McIntosh, H. R. Bauman, and C. D. Pearson. 2003. Nutrient and microbial dynamics in high intensity, zero exchange shrimp pond in Belize. Aquaculture 219:393-411. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00575-6.

Cadotte, M. W., Jantz, S., Mai, D. V., 2007. Photo-dependent population dynamics of *Stentor coeruleus* and its consumption of *Colpidium striatum*. Canadian journal of Zoology 85(5), 674-677.

Chevremont, A.C.; Farnet, A. M.; Coulomb, B.; E Boudenne, J. Effect of coupled UV-A and UV-C LEDs on both microbiological and chemical pollution of urban wastewaters. Science of The Total Environment; 2012. https://doi.org/doi:10.1016/j.scitotenv.2012.03.043.

Colombo, G.M., dos Santos Simião, C., Schmitz, M.J., Pedrosa, V.F., Romano, L.A., Tesser, M.B., Ramos, P.B., Wasielesky, W., Monserrat, J.M., 2020. The role of açaí (*Euterpe oleracea* Mart. 1824) as a chemoprotective agent in the evaluation of antioxidant defence, oxidative damage and histology of juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei*

(BOONE, 1931) exposed to ammonia. Aquaculture Research 51, 1551–1566. https://doi.org/10.1111/are.14503

Cohen, J.M., Samocha, T.M., Fox, J.M., Gandy, R.L., Lawrence, A.L., 2005. Characterization of water quality factors during intensive raceway production of juvenile Litopenaeus vannamei using limited discharge and biosecure management tools. Aquac. Eng. 32, 425–442. https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2004.09.005.

Crab, R., Lambert, A., Defoirdt, T., Bossier, P., Verstraete, W., 2010. The application of bioflocs technology to protect brine shrimp (*Artemia franciscana*) from pathogenic *Vibrio harveyi* 1643–1649. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04791.x

Curds, C.R. (1992) Protozoa and the Water Industry. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 122 pp.

Das, P., Lei, W., Aziz, S.S., Obbard, J.P., 2011. Enhanced algae growth in both phototrophic and mixotrophic culture under blue light. Bioresour. Technol. 102, 3883–3887. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.102.

Decamp, O.E., Otoshi, C.A., Moss, S.M., 2006. Protozoans and meiofauna inhabiting a bead filter: A preliminary investigation of their role as potential bioindicators of shrimp production system health. J. World Aquac. Soc. 37, 481–489.https://doi.org/ 10.1111/j.1749-7345.2006.00061. x.

Dias, R. J. P.; D'Avila, S.; Wieloch, H. e D'Agosto, M. Protozoan ciliate epibionts on the freshwater Apple snail *Pomacea figulina* (Spix, 1827) (Gastropoda, Ampullariidae) in an urban stream of southeast Brazil. Journal of Natural Histoty, v. 42, n.19, p. 1409-1420. 2008.

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. vol. 257. pp. 346–358. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.03.019.

Esparza-Leal, H.M., Amaral Xavier, J.A., Wasielesky, W., 2016. Performance of *Litopenaeus vannamei* postlarvae reared in indoor nursery tanks under biofloc conditions at different salinities and zero-water exchange. Aquac. Int. 24, 1435–1447.

https://doi.org/10.1007/s10499-016-0001-5

Ferreira, L.M.M.H.M (2008) Formação de flocos microbianos em cultivo do camarão rosa *Farfantepenaeus paulensis* e do camarão-branco *Litopenaeus vannamei*. Master Thesis, Federal University of Rio Grande, Rio Grande, Brazil, 96 pp.

Fei, F., Gao, X., Wang, X., Liu, Y., Bin, H., Liu, B., 2020. Effect of spectral composition on growth, oxidative stress responses, and apoptosis-related gene expression of the shrimp, Penaeus vannamei. Aquac. Reports 16, 100267. https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2019.100267

Fleckenstein, L.J., Tierney, T.W., Fisk, J.C., Ray, A.J., 2019. Effects of supplemental LED lighting on water quality and Pacific white shrimp (Litopenaeus vannamei) performance in intensive recirculating systems. Aquaculture 504, 219–226. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.01.066.

Furtado, P.S., Poersch, L.H., Wasielesky, W., 2011. Effect of calcium hydroxide, carbonate and sodium bicarbonate on water quality and zootechnical performance of shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in bio-flocs technology (BFT) systems. Aquaculture 321,130–135. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.08.034.

Furtado, P.S., Valenzuela, M.A.J., Badillo, M.A., Gaxiola, G., Wasielesky, W., 2016. Effect of dissolved carbon dioxide on oxygen consumption in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931). Mar. Freshw. Behav. Physiol. 49, 337–346.https://doi.org/10.1080/10236244.2016.1213568.

Gaona, C.A.P., Poersch, L.H., Krummenauer, D., Foes, G.K., Wasielesky, W.J., 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.

Gardner, C., Maguire, G.B., 1998. Effect of photoperiod and light intensity on survival, development and cannibalism of larvae of the Australian giant crab *Pseudocarcinus gigas* (Lamarck). Aquaculture 165, 51–63. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00245-2.

Gao, X., Li, X., Zhang, M., Chi, L., Song, C., Liu, Y., 2016. Effects of LED light quality on

the growth, survival and metamorphosis of *Haliotis discus hannai* Ino larvae. Aquac. Res. 47, 3705–3717. https://doi.org/10.1111/are.12980

Glencross B.D., 2009. Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. Reviews in Aquaculture 1, 71-12410.

Guerra-Santos, B., López-Olmeda, J.F., de Mattos, B.O., Baião, A.B., Pereira, D.S.P., Sánchez-Vázquez, F.J., Cerqueira, R.B., Albinati, R.C.B., Fortes-Silva, R., 2017. Synchronization to light and mealtime of daily rhythms of locomotor activity, plasma glucose and digestive enzymes in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol. 204, 40–47. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.11.006.

Guo, B., Wang, F., Dong, S., Gao, Q., 2011. The effect of rhythmic light color fluctuation on the molting and growth of *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 314, 210–214. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.02.023.

Guo, B., Wang, F., Dong, S., Zhong, D., 2012. Effect of fluctuating light intensity on molting frequency and growth of *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 330–333106–110. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.12.017.

Hargreaves, J.A., 2013. Biofloc Production Systems for Aquaculture. pp. 1–12. Hobbie, J.E., Daley, R.J., Jasper, S., 1977. Use of nuclepore filter counting bacteria by fluoroscence microscopy. Appl. Environ. Microbiol. Microbiol. 33, 1225–1228 (4408959).

Hobbie, J.E., Daley, R.J., Jasper, S., 1977. Use of nuclepore filter counting bacteria by fluoroscence microscopy. Appl. Environ. Microbiol. Microbiol. 33, 1225–1228 (4408959).

Hostins, B., Lara, G., Decamp, O., Cesar, D.E., Wasielesky, W., 2017. Efficacy and variations in bacterial density in the gut of *Litopenaeus vannamei* reared in a BFT system and in clear water supplemented with a commercial probiotic mixture. Aquaculture 480, 58–64. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.07.036.

Huang, M., Dong, Y., Zhang, Y., Chen, Q., Xie, J., Xu, C., Zhao, Q., Li, E., 2019. Growth and lipidomic responses of juvenile Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* to low salinity. Front. Physiol. 10, 1–13. https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01087

Irigoien, X., Castel, J., 1997. Light limitation and distribution of chlorophyll pigments in a highly turbid estuary: the Gironde (SW France). Estuar. Coastal Shelf Sci. 44 (4), 507–517. https://doi.org/10.1006/ecss.1996.0132.

Jack, J.D. and Gilbert, J.J. Effects of metazoan predators on ciliates in freshwater plankton communities. The Journal of Eukaryotic Microbiology, 1997, 44(3), 194-199. http://dx.doi. org/10.1111/j.1550-7408. 1997.tb05699. x.

Jory, D.E., Cabrera, T.R., Dugger, D.M., Fegan, D., Lee, P.G., Lawrence, L., Jackson, C.J., Mcintosh, R.P., Castañeda, J., International, B, Park, H.A., Hwy, N.O.D., Pierce, F., 2001. A global review of shrimp feed management: status and perspectives. Aquaculture 104–152.

Ju, Z.Y., Forster, I., Conquest, L., Dominy, W., Kuo, W.C., David Horgen, F., 2008. Determination of microbial community structures of shrimp floc cultures by biomarkers and analysis of floc amino acid profiles. Aquac. Res. 39, 118–133.https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01856.x

Kim, S.K., Pang, Z., Seo, H.C., Cho, Y.R., Samocha, T., Jang, I.K., 2014. Effect of bioflocs on growth and immune activity of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* postlarvae. Aquac. Res. 45, 362–371. https://doi.org/10.1111/are.12319

Khanjani, M.H.A.M. b, Emerenciano, M.G.C., 2022. Microorganisms in biofloc aquaculture system. Aquac. Reports 26, 101300. https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101300

Krummenauer, D., Samocha, T., Poersch, L., Lara, G., Wasielesky, 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.

Krummenauer, D., Abreu, P.C., Poersch, L., Reis, P.A.C.P., Suita, S.M., dos Reis, W.G., Wasielesky, W., 2020. The relationship between shrimp (*Litopenaeus vannamei*) size and biofloc consumption determined by the stable isotope technique. Aquaculture 529, 735635. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735635.

Lin, Y.C., Chen, J.C., 2003. Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels. Aquaculture 224, 193–201.

Limon-Pacheco and Gonsebatt, J. Limon-Pacheco, M. Gonsebatt 2009. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress Mutat. Res., 674 (1) (2009), pp. 137-147

Lopez-Betancur, D., Moreno, I., Guerrero-Mendez, C., Gómez-Meléndez, D., de Macias, M.J.P., Olvera-Olvera, C., 2020. Effects of colored light on growth and nutritional composition of tilapia, and biofloc as a food source. Appl. Sci. 10. https://doi.org/10.3390/app10010362

Liang, Z., Liu, R., Zhao, D., Wang, L., Sun, M., Wang, M., & Song, L. (2016). Ammonia exposure induces oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and apoptosis in hepatopancreas of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Fish & Shellfish Immunology, 54, 523–528. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.05.009

López-Elías, J.A., Moreno-Arias, A., Miranda-Baeza, A., Martínez-Córdova, L.R., Rivas-Vega, M.E., Márquez-Ríos, E., 2015. Proximate composition of bioflocs in culture systems containing hybrid red tilapia fed diets with varying levels of vegetable meal inclusion. N. Am. J. Aquac. 77, 102–109. https://doi.org/10.1080/15222055.2014.963767

León. M. C, D., Wasiliesky. j, W., Monserrat, J.M., 2018. Quercetin influence in water quality and biochemical responses of shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in Biofloc Technology System. Aquac. Res. 49, 3569–3576. https://doi.org/10.1111/are.13823

Lushchak, V. I., Bagnyukova, T. V., Husak, V. V., Luzhna, L. I., Lushchak,V., & Storey, K. B. (2005). Hyperoxia results in transient oxidative estress and an adaptive response by antioxidant enzymes in goldfish tissues. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 37,1670–1680. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.02.024

Neto, P.J.B., Dantas, D.M.D.M., Gálvez, A.O., Brito, L.O., 2006. Avaliação das comunidades planctonicas e bentônicas de microalgas em viveiros de camarão (*Litopenaues vannamei*). Bol. do Inst. Pesca 34, 543–551.

Ma, M., Gong, Y., Hu, Q., 2018. Identification and feeding characteristics of the mixotrophic flagellate *Poterioochromonas malhamensis*, a microalgal predator isolated from outdoor massive *Chlorella* culture. Algal Res. 29, 142–153.

https://doi.org/10.1016/j.algal.2017 .11.024

Martins, A.C.S., Artigas Flores, J., Porto, C., Wasielesky Junior, W., Monserrat, J.M., 2015. Antioxidant and oxidative damage responses in different organs of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) reared in a biofloc technology system. Mar. Freshw. Behav. Physiol. 48, 279–288. https://doi.org/10.1080/10236244.2015.1041240

Montagnes, D.J., Dower, J.F., Figueiredo, G.M., 2010. The protozooplankton–ichthyoplankton trophic Link: An overlooked aspect of aquatic food webs. J Euk Microbiol 57(3), 223-228.

Monserrat, J. M., Lima, J. V., Ferreira, J. L. R., Acosta, D., Garcia, M.L., Ramos, P. B., Amado, L. L. (2008). Modulation of antioxidant and detoxification responses mediated by lipoic acid in the fish *Corydoras paleatus* (Callychthyidae). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 148, 287–292. https:// doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.06.011

Oakes, K. D., & Van Der Kraak, G. J. (2003). Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. Aquatic Toxicology, 63, 447–463. https://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00204-7

Pomeroy L.R, Wiebe WJ (1988) Energetics of microbial food webs. Hydrobiologia 159: 7–18.

Ray, A.J., Seaborn, G., Lef, J.W., Wilde, S.B., Lawson, A., Browdy, C.L., 2010. Characterization of microbial communities in minimal-exchange, intensive aquaculture systems and the effects of suspended solids management. vol. 310. pp. 130–138. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.10.019.

Rajeev, R., Adithya, K.K., Kiran, G.S., Selvin, J., 2021. Healthy microbiome: a key to successful and sustainable shrimp aquaculture. Rev. Aquac. 13, 238–258. https://doi.org/10.1111/raq.12471

Reis, W.G., Wasielesky, W., Abreu, P.C., Brandão, H., Krummenauer, D., 2019. Rearing of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in BFT system with

different photoperiods: Effects on the microbial community, water quality and zootechnical performance. Aquaculture. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture. 2019.04.067.

Reis, W.G., Abreu, P.C., Brandão, H., Wasielesky, W., Krummenauer, D., 2022. Colored LED lights can influence shrimp growth, water quality in biofloc culture. Glob. Seaf. Alliance's (GSA). https://www.globalseafood.org/advocate/colored-led-lights caninfluence-shrimp-growth-water-quality-in-biofloc-culture/.

Reis, W.G., Wasielesky, W., Abreu, P.C., Brandão, H., Krummenauer, D., 2022. The influence of different light wavelengths in the culture of the Pacific white shrimp Litopenaeus vannamei reared in BFT using LED lights. Aquaculture. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738924

Roselli, I. M. The influence of predator detection on life history strategies in *Ceriodaphnia reticulata* (Cladocera: Daphnidae). Mestrado, Eastern New Mexico University, New Mexico, 49 p.,2008.

Rojas, N.E.T., Verani, J.R., Basile-Martins, M.A., 1999. Influência de fatores abióticos na eclosão de ovos dormentes do rotífero *Brachionus calyciflorus* Pallas (Monogononta, Ploima). Rev. Bras. Zool. 16, 27–35. https://doi.org/10.1590/s0101-81751999000600004

Rodríguez, M.P., Matsumura-Tundisi, T., 2000. Variation of density, species composition and dominance of rotifers at a shallow tropical reservoir (Broa reservoir, SP, Brazil) in a short scale time. Rev. Bras. Biol. 60, 1–9. https://doi.org/10.1590/s0034-71082000000100002

Samocha, T.M., Prangnell, D.I., Hanson, T.R., Treece, G.D., Morris, T.C., Castro, L.F., Staresinic, N., 2017. Design and operation of super intensive, biofloc-dominated systems for indoor production of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* – The Texas A&M AgriLife Research Experience. Baton Rouge, Louisiana USA, The World Aquaculture Society.

Strickland, J.D.H., Parsons, T.R., 1972. A practical handbook of seawater analysis. In: A Pract. Handb. Seawater Anal. vol. 167. pp. 185. https://doi.org/10.1002/iroh. 19700550118.

UNESCO, 1983. Chemical Methods for Use in Marine Environmental Monitoring. vol. 53.

Utermöhl, H., 1958. Zur Vervollkommung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. Int. Vereinigung für Theor. und Angew. Limnol. Kom. für Limnol. Methoden 9, 1–39. https://doi.org/10.25607/OBP-1419.

Van Wyk, P., Scarpa, J., 1999. Water quality and management. In: van Wyk, P. (Ed.), Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems. Florida department of agriculture and consumer services, Tallahassee (FL), pp. 141–161.

Verni, F., Gualtieri, P., 1997. Feeding behaviour in ciliated protists. Micron 28, 487–504. https://doi.org/10.1016/S0968-4328(97)00028-0

Viet, L.Q., Ngan, T.V., Phu, T.M., Hai, T.N., 2017. Effects of photoperiods on growth and quality of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in biofloc system. Can Tho University Journal of Science. Vol 6: 83-92

Wang, F., Dong, Shuanglin, Dong, Shaoshuai, Huang, G., Zhu, C., Mu, Y., 2004. The effect of light intensity on the growth of Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. Aquaculture 234, 475–483. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.11.024.

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.

Wasielesky, W., Abreu, P.C., Poersch, L.H., Thompson, F., Ballester, E.L.C., 2012. Influence of light intensity on biofilm formation and the performance of pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* juveniles reared in cages. Aquac. Res. 43, 706–712. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02878.x.

Waycott, B.B., 2021. Green-lighting growth : Green LED light shows promise in ounder farming 1–5. https://www.globalseafood.org/advocate/green-lighting-growth-green-led-lights-show-promise-in-flounder-farming/

Welschmeyer, N.A., 1994. Fluorometric analysis of chlorophyll a in the presence of chlorophyll b and pheopigments. Limnol. Oceanogr. 39, 1985–1992. https://doi.org/

10.4319/lo.1994.39.8.1985.

Wright, R. T. A model for short-term control of the bacterioplankton by substrate and grazing. Hydrobiologia, v. 159, p. 111-117, 1988.

Timmons M.B, Ebeling JM. 2010. Recirculating Aquaculture, 2nd edition. Cayuga Aqua Ventures, Ithaca, NY. http://www.bee.cornell.edu/aquain18/11/2010. p. 998.

Garza de Yta, A.G., Rouse, D.B., Davis, Da, 2004. Influence of nursery period on the growth and survival of *Litopenaeus vannamei* under pond production conditions. J. World Aquac. Soc. 35, 357–365. https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2004.tb00099.x.

Yoo, J. H., & Hur, S. B. (2002). Evaluation of Six Species Ciliates as a Live Food and Culture Environment for Euplotes sp. Korean J Fish Aquat Sci 35(4), 342-347.

Zar, J.H., 2010. Biostatistical Analysis. Prentice Hall, Upper Saddle River.

Zhang, K., Pan, L., Chen, W., Wang, C., 2017. Effect of using sodium bicarbonate to adjust the pH to different levels on water quality, the growth and the immune response of shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in zero-water exchange biofloc based culture tanks. pp. 1194–1208. https://doi.org/10.1111/are.12961.

Zhang, X. Watanabe, M.M.., National, 1996. Light and electron microscopy of grazing by 46, 37–46.

CAPÍTULO III

A influência da restrição parcial de luz natural no cultivo do camarão branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei* em sistema BFT

Wellica G. Reis [a;] Wilson Wasielesky Jr [b;] Paulo C. Abreu [a;] Hellyjúnyor Brandão [b;] Missileny J. Xavier [a;] Dariano Krummenauer [a *]

[a] Laboratório de Ecologia de microrganismos Aplicados à Aquicultura, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande - FURG, CP 474, Rio Grande, RS CEP 96201-900, Brasil

*Endereço de e-mail: darianok@gmail.com (D. Krummenauer).

[b] Laboratório de Carcinicultura Marinha, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande - FURG, CP 474, Rio Grande, RS CEP 96201-900, Brasil

Artigo submetido para a revista Aquaculture Internacional.

Observação: As Tabelas e as figuras foram inseridas no corpo do texto para facilitar a leitura da tese.

RESUMO

Em um sistema de tecnologia de bioflocos (BFT), existem mudanças nas comunidades microbianas durante um ciclo de cultivo de camarões. Inicialmente, há uma predominância de bactérias heterotróficas, as quais são substituídas por uma comunidade fotoautotróficas ou quimioautotróficas ao longo do ciclo produtivo devido às condições ambientais e de manejo. No sistema BFT, a comunidade quimioautotróficas pode ser representada pelas bactérias nitrificantes, essas bactérias podem apresentar fotossensiblidade a exposição à luz solar e assim, podem afetar o processo de nitrificação. O objetivo desse estudo foi avaliar a comunidade de microrganismos com restrição parcial de luz natural no sistema BFT. O estudo foi realizado em uma estufa retangular com 18 tanques com volume útil de 150 Litros, com uma densidade de estocagem de 770 camarões m^{-3}, 116 camarões em cada tanque com peso inicial de 0,014g. O estudo foi realizado com seis tratamentos e três repetições cada. Os tratamentos foram manejados de acordo com as concentrações de nitrito e nitrato. Todos os tanques foram cobertos com uma lona preta, exceto o controle que permaneceu descoberto. Os tratamentos foram descobertos de acordo com cada tratamento: Os tratamentos foram delineados em **1)** RP-10: o tanque foi descoberto, quando a concentração de nitrato chegou a 10mg L^{-1} , **2)** RP-20: o tanque foi descoberto, quando a concentração de nitrato chegou a 20mg L^{-1} **3)** RP-30: o tanque foi descoberto, quando a concentração de nitrato chegou a 30mg L^{-1} , **4)** RP-40: o tanque foi descoberto, quando a concentração de nitrato chegou a 40mg L^{-1} , **5)** RPN: o tanque foi descoberto quando, após atingir a concentração máxima, houve o decréscimo do nitrito para 1mg L^{-1} e **6)** CL: controle, não foi coberto. Houve diferença significativa entre os parâmetros de qualidade da água para nitrito, clorofila *a* e lux ($p < 0,05$). Houve diferença significativa na abundância de bactérias em diferentes períodos como cocoides livres, filamentosas livres, filamentosas aderidas, vibrio e bacilo ($p < 0,05$). Em protozoários e outros grupos, como flagelados heterotróficos, flagelados autotróficos ciliados, rotíferos, nematoides e amebas ($p < 0,05$). Porém, não houve diferença estatística para o desempenho zootécnico. Desse modo, o tratamento com restrição parcial de luz RPN pode ser indicado para o cultivo de *L. vannamei* em sistema bioflocos.

Palavras-chave: luminosidade; Nitrificação; Aquicultura superintensiva; Fotossensiblidade.

1. INTRODUÇÃO

O Sistema de bioflocos (BFT) é uma tecnologia desenvolvida para proporcionar aumento de produtividade, minimizando o uso de terra e água, além de proporcionar maior controle ambiental sobre o processo produtivo e, com isso, reduzir a incidência de doenças e aumentar a biossegurança e a sustentabilidade (Krummenauer et al., 2014; Avnimelech., 2015; Samocha et al., 2017). Os bioflocos são compostos por uma diversidade de microrganismos que formam agregados (Hargreaves, 2013; Khanjani 2022). Esses agregados também podem atuar como fonte alimentar suplementar para os organismos cultivados, contribuindo para maior crescimento, ganho de peso, sobrevivência e menor conversão alimentar (Wasielesky et al., 2006; Krummenauer et al., 2020; Khanjani 2022).

Vários parâmetros podem afetar a produtividade no sistema BFT. Um desses parâmetros é a luz, que é considerada um fator abiótico de suma importância para os organismos aquáticos (Irigoien e Castel, 1997; Pereira Neto et al., 2008; Reis et al., 2022). A presença ou restrição de luz pode influenciar as comunidades microbianas durante um ciclo de produção (Reis et al., 2019). A exposição à luz muitas vezes pode mudar abruptamente um sistema heterotrófico (dominado principalmente por bactérias e protozoários) (Kirk, 2010; Hargreaves, 2013) para um sistema, predominantemente fotoautotróficos (dominado por microalgas).

A importância relativa de cada processo fotoautotróficos, quimioautotróficas e heterotróficos depende de muitos fatores, tais como: taxa diária de alimentação, concentração de sólidos suspensos, concentração de amônia, intensidade luminosa e relação carbono-nitrogênio (C/N). (Avnimelech, 1999; 2015). O processo heterotrófico baseia-se na remoção do nitrogênio amoniacal pela incorporação desse elemento na biomassa bacteriana na forma de proteína. Essa incorporação se dá pela manipulação das relações C/N no sistema, ou seja, pela adição de uma fonte de carbono na forma de carboidrato (Avnimelech e Kochba, 2009). A utilização dessa estratégia permite acelerar os processos de remoção de nitrogênio inorgânico de forma rápida e eficiente, reduzindo as concentrações de amônia total dissolvida na água (Ebeling et al., 2006). Porém, logo após a incorporação, pode ocorrer novo aumento nos níveis de amônia devido à predação de bactérias por protozoários que, após a digestão, excretam amônia no meio e além disso, as excretas dos camarões. (Silva et al., 2013).

No processo quimioautotrófico, as bactérias realizam a oxidação da amônia aos gêneros nitritos *Nitrosomonas, Nitrosococcus, Nitrosospira, Nitrosolobus e Nitrosovibrio (bactérias* oxidantes de amônio - AOB), e posteriormente aos gêneros nitratos *Nitrobacter, Nitrosococcus,*

Nitrospira (bactérias -NOB), mas devido à lenta taxa de crescimento das bactérias nitrificantes, pequenas quantidades de biomassa bacteriana são produzidas (Ebeling et al., 2006; Crab et al., 2007). Mesmo assim, é difícil ter controle total sobre as comunidades bacterianas que serão estabelecidas durante o cultivo, devido à complexidade das interações que ocorrem dentro dos sistemas de cultivo, principalmente relacionadas à luz (Hargreaves, 2013).

A nitrificação é um processo crucial para o cultivo de espécies de aquicultura em um sistema de bioflocos. É o processo de transformação de amônia em nitrato realizado por bactérias nitrificantes autotróficas (Ebeling et al., 2006). As condições ambientais e o manejo utilizado nos sistemas de produção podem interferir na atividade das bactérias nitrificantes, e assim causar acúmulo de nitrito na água de cultivo (Marazzi et al., 2019). Assim, estudos mostraram o efeito da radiação luminosa nas bactérias nitrificantes, descobrindo que a luz pode enfraquecer as atividades das bactérias nitrificantes devido às suas diferentes respostas à sensibilidade à luz (Gonzalez-Camejo et al., 2019).

Em outro estudo Akizuki et al. (2020) os autores relataram que o efeito inibidor da radiação luminosa sobre as bactérias NOB foi significativamente maior do que AOB sob intensidade de luz acima de 225 μmol (m^{-2} $s^{-1)}$. Além disso, a radiação solar excessiva inibe a atividade das bactérias nitrificantes (Akizuki et al., 2019b). Desse modo, as bactérias NOB são mais afetadas pela luz que as AOB, o que pode causar o acúmulo de nitrito sob intensidades de luz.

Ainda é possível adicionar o fator de fotossensiblidade que as bactérias nitrificantes podem possuir, tanto para as bactérias oxidantes de amônia (AOB) quanto para as bactérias oxidantes de nitrito (NOB) (Guerrero 1996). Em estudo realizado por Reis et al. (2019), os autores relataram que a nitrificação em sistemas BFT com restrição total de luz ocorre de forma mais eficiente, quando comparada a ambientes que possuem exposição parcial ou total à luz e que isso, possivelmente ocorre devido à fotossensiblidade das bactérias nitrificantes à luz, conforme já comprovado por (Guerreiro 1996). Apesar da nitrificação ser favorecida na restrição de luz, o desempenho zootécnico de *L. vannamei* foi afetado na ausência de luz.

Assim, é importante investigar estratégias de exposição à luz para estabelecer o momento adequado no período de cultivo em que as bactérias nitrificantes podem ser expostas à luz, sem comprometer o processo de nitrificação nos tanques de cultivo e sem comprometer o desempenho dos organismos cultivados. Além disso, a caracterização e quantificação da comunidade microbiana no cultivo desses organismos em um sistema BFT pode ajudar a elucidar essa lacuna. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar o processo de

nitrificação, a comunidade de microrganismos e o desempenho do camarão branco do Pacífico, *L. vannamei*, sob diferentes estratégias de restrição de luz em um sistema BFT.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no período de 24 de novembro de 2020 a 12 de janeiro de 2021, na Estação Marinha de Aquicultura (EMA) do Instituto de Oceanografia da Universidade Federal do Rio Grande - FURG, localizada na cidade de Rio Grande, Cassino - RS, Brasil (32° 19' S, 52° 15' W). A espécie de camarão utilizada no experimento foi a *L. vannamei*, adquiridos no estágio náuplius da Aquatec™ LTDA (Rio Grande do Norte). Os camarões passaram pela fase de criação larval no Laboratório de Carcinicultura (EMA), por aproximadamente 20 dias até atingirem peso médio de 0,014g ±0,04g, para o início do experimento.

2.1 Design experimental.

A água utilizada em cada unidade experimental provém de um reservatório, previamente bombeado da "Praia do Cassino". A água foi clorada com 10 ppm de solução de hipoclorito de sódio, após quatro horas de ação, a água foi desclorada com ácido ascórbico (vitamina C) na proporção de um grama para cada mil litros de água. Foram utilizados 18 tanques quadrados de polietileno com capacidade de 180 litros e volume útil de 150 litros. Em cada unidade experimental foi instalado um sistema de aeração com mangueiras microperfuradas (Aerotube™). A densidade de estocagem utilizada foi de 770 camarões m^{-3}.
O experimento foi delineado com seis tratamentos e com três repetições cada, consistindo em:

1) **RP-10:** restrição total de luz até atingir concentração de 10 mg L^{-1} de nitrato na água.

2) **RP-20:** restrição total de luz até atingir concentração de 20 mg L^{-1} de nitrato na água.

3) **RP-30:** restrição total de luz até atingir concentração de 30 mg L^{-1} de nitrato na água.

4) **RP-40:** restrição total de luz até atingir concentração de 40 mg L^{-1} de nitrato na água.

5) **RPN:** restrição total de luz até a diminuição do nitrito para concentração de 1,0 mg L^{-1}

6) **CL:** controle, exposição natural à luz.

Após atingirem as concentrações de nitrato determinadas para cada tratamento, os tanques foram gradualmente expostos à luz natural com fotoperíodo natural. Isso foi feito

retirando a cobertura utilizada (lona plástica preta) na proporção de 20% da área total a cada dia até expor 100% da área do tanque. A quantidade de lux (lx) que atingiu a superfície da camada de água também foi medida com um luxímetro (aparelho Chauvin Arnoux™ - modelo CA 810), no início do experimento.

Para realizar este estudo, o nitrato foi medido diariamente na água de cultivo para monitorar a evolução das concentrações de nitrato no sistema. Vale ressaltar que nenhuma fonte externa de nitrato foi adicionada à água de cultivo, sendo o nitrato medido produzido no tanque de cultivo ocorrido pelo processo natural de nitrificação.

2.2 formação de bioflocos.

Para estimular a formação de bioflocos, a relação C/N no sistema foi mantida em 15/1 conforme metodologia proposta por Avnimelech (1999) e Ebeling et al. (2006). Para as adubações orgânicas foi utilizado melaço de cana com 37,27% de carbono, a adição de melaço foi realizada para manter uma relação C/N de 6,0 g de carbono orgânico para cada grama de nitrogênio amoniacal total (TAN) na água. A adubação foi realizada sempre que a concentração de amônia superou 1,0 mg L^{-1}, calculada considerando o volume dos tanques, concentração de carbono orgânico na fonte e relação C/N (Brandão et al., 2021). Além disso, foram realizadas aplicações de probióticos comerciais (INVE™ Sanolife PRO-W) uma vez por semana na água na proporção de 0,5 gramas para cada mil litros de água, com o objetivo de ajudar auxiliar a qualidade da água em todos os tratamentos.

2.3 Amostragem e contagem de microrganismos.

Para quantificar os microrganismos, presentes na água de cultivo, amostras de água (18 mL de cada unidade experimental) foram coletadas uma vez por semana. As amostras foram fixadas em formol a 4% e mantidas em frascos âmbar para posterior contagem e identificação de grupos de microrganismos.

Para determinar a abundância de grupos bacterianos com base no morfotipos, as amostras fixadas foram filtradas através de filtros de membrana de policarbonato (Nuclepore, poro de 0,2 µm e 2,5 mm de diâmetro) previamente escurecidos com Irlan Black e corados com Acridine Orange 1%, na concentração de 1 µg/ml (Hobbie e outros, 1977). As bactérias foram fotografadas com câmera fotográfica acoplada a microscópio de epifluorescência (Axioplan-Zeiss, aumento de 100X), para posterior contagem de 30 campos escolhidos aleatoriamente.

Para determinar a abundância de protozoários e outros grupos de microrganismos, alíquotas de 0,5 mL das amostras foram colocadas em câmara de sedimentação e 30 campos aleatórios foram contados em microscópio invertido (Nikon TS 100, aumento final de 200x) (Utermöhl, 1958). Os microrganismos foram classificados em diferentes grupos, para bactérias: cocoides, filamentosos livres, filamentosas aderidas, vibrios e bacilos; para protozoários e outros grupos: flagelados heterotróficos, flagelados autotróficos, ciliados, nematoides, rotíferos e amebas. Todas as contagens foram realizadas no Laboratório de Ecologia de Microrganismos Aplicados à Aquicultura - FURG.

2.4 Manejo de alimentação.

Os camarões foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial (Potimar GUABI™) com 40% de proteína até atingirem 1,0g e 38% após esse peso. A taxa de alimentação até 1,0g foi de acordo com a metodologia descrita por Jory et al., (2001) e após 1,0 g foram feitos ajustes nas taxas de alimentação seguindo a metodologia de Garza Yta et al. (2004).

2.5 Monitoramento dos parâmetros de qualidade da água.

Os parâmetros físicos e químicos monitorados duas vezes ao dia foram: temperatura e oxigênio dissolvido (YSI™ pro-20) e pH (pH meter™ FE 20/FG2). A salinidade foi verificada a cada três dias (Hach® HQ40d). A turbidez da água foi determinada uma vez por semana com um turbidímetro (Hach™ 2100P, Hack Company). Amostras de água foram coletadas diariamente para quantificar a concentração de nitrogênio amoniacal total ($N\text{-}(NH_3^- + NH_4^+)$), nitrito ($N\text{-}NO_2^-$) e nitrato ($N\text{-}NO_3^-$) determinado de acordo com (UNESCO, 1983) e Strickland e Parsons (1972), respectivamente. Quando as concentrações de nitrito ultrapassaram o nível de segurança de 26 mg L^{-1} (Lin e Chen, 2003), permitido para a espécie, 20% do volume de água foi trocado. A alcalinidade foi analisada a cada três dias conforme metodologia proposta pela APHA (2012). Quando a alcalinidade atingiu valores abaixo de 150 mg $CaCO_3$ L^{-1} e/ou valores de pH abaixo de 7,6, conforme recomendado por Ebeling et al. (2006), foram feitos ajustes com cal hidratada, seguindo a metodologia descrita por Furtado et al. (2011) e Zhang et al. (2017).

As concentrações semanais de fosfato ($P\text{-}PO_4^3$) e sólidos suspensos totais (mg L^{-1}) foram avaliadas utilizando a metodologia proposta por Strickland e Parsons (1972). As

amostras de água para quantificação dos sólidos suspensos totais foram filtradas com filtros de fibra de vidro GF50-A, utilizando uma bomba de vácuo (Prismatec™). Os teores de sólidos totais em suspensão foram mantidos até 500 mg $L^{-1,}$ conforme recomendado por Gaona et al., (2011), e quando os valores ultrapassaram o valor recomendado, os sólidos foram retirados do sistema com auxílio de clarificadores.

2.6 Dióxido de carbono.

Foram realizadas análises para quantificar a concentração de dióxido de carbono (CO_2) dissolvido na água de cultivo. Amostras de água foram coletadas duas vezes por semana, durante o experimento de 81 dias, para determinar os níveis de alcalinidade e pH. Em seguida, os resultados de alcalinidade e pH foram utilizados de acordo com a metodologia proposta por Timmons e Ebeling (2010) para obter a concentração de CO_2 na água de cultivo. De acordo com o seguinte cálculo:

$[CO_2]$: alcalinidade x $10^{(6,3\text{-}pH)}$

$[CO_2]$: Concentração de dióxido de carbono dissolvido na água (mg L^{-1})

Alcalinidade: concentração de alcalinidade ($CaCO_3$ mg L^{-1}).

2.7 análise de clorofila a.

A concentração de clorofila a foi determinada uma vez por semana a partir de amostras de 10 mL de água de cultura filtrada através de microfiltros de fibra de vidro GF 50-A. A extração do pigmento fotossintético foi realizada por imersão dos filtros em 10 mL de acetona 90% (Merck™ PA), colocados em frascos escuros e mantidos em freezer (-12 °C). Após um período de 24 horas, a concentração de clorofila a foi lida usando um fluorímetro (Turner Designs Trilogy) (Welschmeyer, 1994).

2.8 Desempenho de zootécnico.

O desempenho zootécnico dos camarões foi monitorado por meio da biometria semanal de 20 animais por tanque, utilizando balança digital com precisão de 0,01 g (Marte™ Scientific AS5000C). O ganho de peso semanal (WWG) e a taxa de conversão alimentar aparente (FCR) (Bagenal e Tesch, 1978; Van Wyk e Scarpa, 1999) foram avaliados usando os seguintes cálculos:

GPT= (peso médio final – peso médio inicial) / número de semanas de cultura;

FCR = ração total oferecida/ganho de biomassa.

Taxa de Sobrevivência: (biomassa final/peso individual médio) / número de indivíduos armazenados) x 100.

Produtividade: (biomassa final – biomassa inicial) / volume do tanque.

3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à análise de homocedasticidade de variâncias e análise de normalidade da distribuição dos dados. Quando os pressupostos não foram atendidos, foram utilizadas transformações estatísticas. Posteriormente, uma análise de variância uma via - ANOVA (α =0,05) e um teste Post-hoc Tukey foram aplicados quando diferenças significativas foram encontradas (Zar 2010).

4. RESULTADOS

4.1 Qualidade da água.

Os valores médios dos parâmetros químicos e físicos da água durante o período de estudo de 81 dias são apresentados na (Tabela 1). Houve diferença significativa entre os tratamentos para nitrito, clorofila *a* e lux ($p<0,05$). Não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos para temperatura, oxigênio dissolvido, pH, salinidade, TAN, nitrato, fosfato, alcalinidade, CO_2, sólidos sedimentáveis, sólidos suspensos totais e turbidez ($p >0,05$).

tabela 1

Parâmetros físicos e químicos da água (valores médios ± desvio padrão) nos tratamentos: RP-10, RP-20, RP-30, RP-40, RPN e CL após 81 dias. Diferentes letras sobrescritas em uma linha denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

Parâmetros	**RP-10**			**RP-20**			**RP-30**			**RP-40**			**RPN**			**CL**		
Temperatura	29.46	±	1.44	29.62	±	1.53	29.45	±	1.25	29,55	±	1.23	29,77	±	1.41	29.57	±	1.28
*OD (mg L^{-1})	6.05	±	0,38	6.07	±	0,38	6.06	±	0,34	6.01	±	0,37	5,99	±	0,34	6.04	±	0,34
Salinidade (mg de CaCO3 L^{-1})	29.49	±	1.63	29.47	±	1.43	29.37	±	1,48	29,80	±	1,76	29.38	±	1.52	30.29	±	1,97
pH	8.16	±	0,25	8.17	±	0,19	8.18	±	0,22	8.16	±	0,24	8.16	±	0,22	8.18	±	0,23
*TAN (mg L^{-1})	0,31	±	0,40	0,29	±	0,35	0,29	±	0,32	0,32	±	0,36	0,30	±	0,34	0,28	±	0,30
NO_2 - N (mg L^{-1})	4,48	±	6.59b –	5,78	±	7.77b –	4.01	±	6h00 –	3.15	±	5,35 [a]	2,75	±	4.24 [a]	5.14	±	7.65b –
NO_3 – N (mg L^{-1})	14.62	±	26.69	14.77	±	25.01	15.78	±	28.25	15.19	±	27.88	15.68	±	27.57	13.88	±	25.08
PO_4^{3-} P (mg L^{-1})	1,69	±	1,48	1.34	±	1.27	1,65	±	1.52	1,72	±	1.44	1.44	±	1.09	1,40	±	1.18
Alcalinidade (mg L^{-1})	163,63	±	28.03	159,31	±	27.47	163,60	±	31.12	164,71	±	27,99	162,45	±	29h30	163,63	±	29.34
CO_2 Livre (mg L^{-1})	2.37	±	1.08	2.24	±	0,80	2.24	±	1.05	2.45	±	1.11	2.35	±	1.01	2.33	±	1.12
*SST (mg L^{-1})	287,50	±	194.02	299,31	±	214,62	313.05	±	243,26	301.31	±	206,40	292.09	±	211.02	294,15	±	200,46
Turbidez (NTU)	170,71	±	167.06	170.07	±	155,63	191,00	±	202.44	191,31	±	171,95	185,63	±	169,96	195,34	±	189,87
Sólidos Sedimentáveis (mL L^{-1})	11.03	±	21.41	6.24	±	5.38	6.04	±	6.23	6.39	±	6.24	5.77	±	6.16	5.23	±	5.36
Clorofila *a* (μg L^{-1})	67,70	±	68,84 [a]	53,56	±	60,32 [a]	49,77	±	59,29 [a]	45,56	±	61.03a –	48,49	±	57,34 [a]	159,39	±	107.32b
Luz (lx)	443,74	±	364,62ab –	363,20	±	427,59b –	254,58	±	306,74b –	234.12	±	305,55b –	280,57	±	329.14b –	875,48	±	425,53 [a]

*(Oxigênio dissolvido); SST: Sólidos Suspensos Totais; TAN: nitrogênio amoniacal total

As variações nas concentrações de compostos nitrogenados ao longo dos 81 dias de estudo são mostradas na Figura 1. De acordo com a Figura 1A, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os tratamentos ($p > 0,05$). O nível máximo registrado foi 2.15 mg L^{-1} para o tratamento RP-10.

As variações nas concentrações de nitrito ao longo dos 81 dias do estudo são mostradas na Figura 1B. O maior valor de nitrito medido foi de 26 mg L^{-1} para o tratamento RP-20. Vale ressaltar que trabalhamos com uma margem de segurança limite para o camarão em relação aos níveis de nitrito, que foi de 26 mg L^{-1}. Em todos os tratamentos, a troca de água foi de 20% do volume do tanque e realizada quando ultrapassava o valor limite de segurança. O tratamento RPN diminuiu a concentração de nitrito antecipado aos 40 dias, quando comparado aos demais tratamentos e valores não detectáveis aos 46 dias, este tratamento foi o único que não apresentou aumento do nitrito novamente após a retirada da lona. Os tratamentos RP-10, RP-20, RP-40 e CL apresentaram diminuição nas concentrações de nitrito em dias semelhantes, com 50, 53, 48, 52 dias, respectivamente, e não detectou valores aos 54 dias.

Conforme mostrado na Figura 1C, não houve diferença significativa nas concentrações de nitrato entre os tratamentos ($p > 0,05$), com valor máximo de 117,22 mg L^{-1} para tratamento de RPN e valor mínimo de 88,33 mg L^{-1} para o tratamento RP-20.

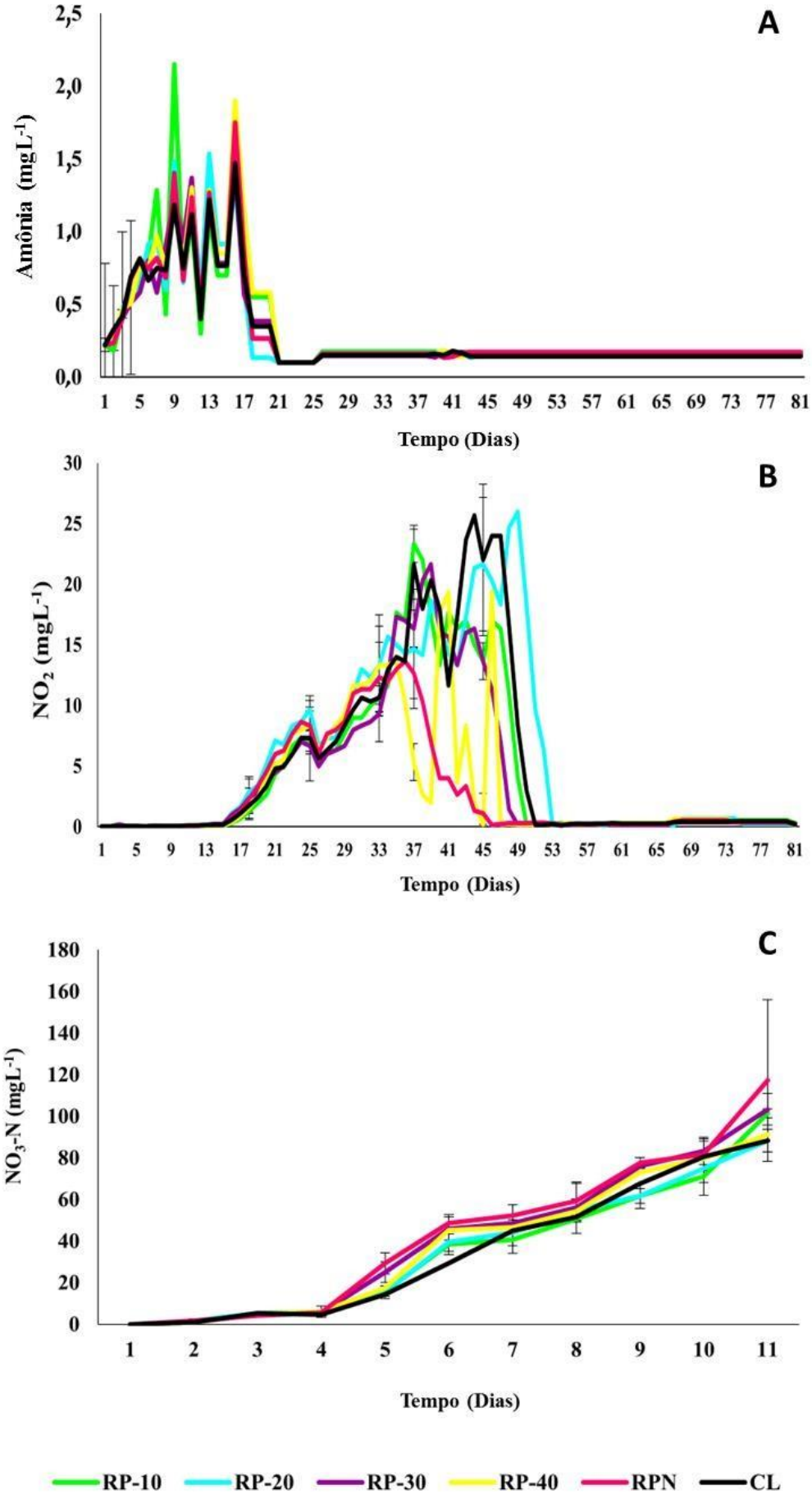
A
Amônia (mgL-1)
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
1 5 9 13 17 21 25 29 33 37 41 45 49 53 57 61 65 69 73 77 81
Tempo (Dias)
B
NO2 (mgL-1)
30
25
20
15
10
5
0
1 5 9 13 17 21 25 29 33 37 41 45 49 53 57 61 65 69 73 77 81
Tempo (Dias)
C
NO3-N (mgL-1)
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
Tempo (Dias)
RP-10
RP-20
RP-30
RP-40
RPN
CL

Figura 1. Variação (média ± desvio padrão) nas concentrações de nitrogênio amoniacal total – TAN (A), nitrito – N-NO_2^- (B) e nitrato – N-NO_3^- (C) durante 81 dias de criação de *L. vannamei* em sistemas BFT com restrição de luz natural: RP-10, RP-20, RP-30, RP-40, RPN e CL.

Os tanques foram descobertos de acordo com cada tratamento, conforme a tabela 2.

Tabela 2

O experimento foi delineado com seis tratamentos: RP-10, RP-20, RP-30, RP-40, RPN e CL após 81 dias.

Tratamento	Os tanques foram descobertos.
RP-10	Quando atingiu 10mg L^{-1} NO_3 / com 31 dias
RP-20	Quando atingiu 20mg L^{-1} NO_3 /com 34 dias
RP-30	Quando atingiu 30mg L^{-1} NO_3 /com 35 dias
RP-40	Quando atingiu 40mg L^{-1} NO_3 /com 42 dias
RPN	Quando o nitrito (NO_2) diminuiu para 1mg L^{-1} /com 42 dias
CL	Não coberto

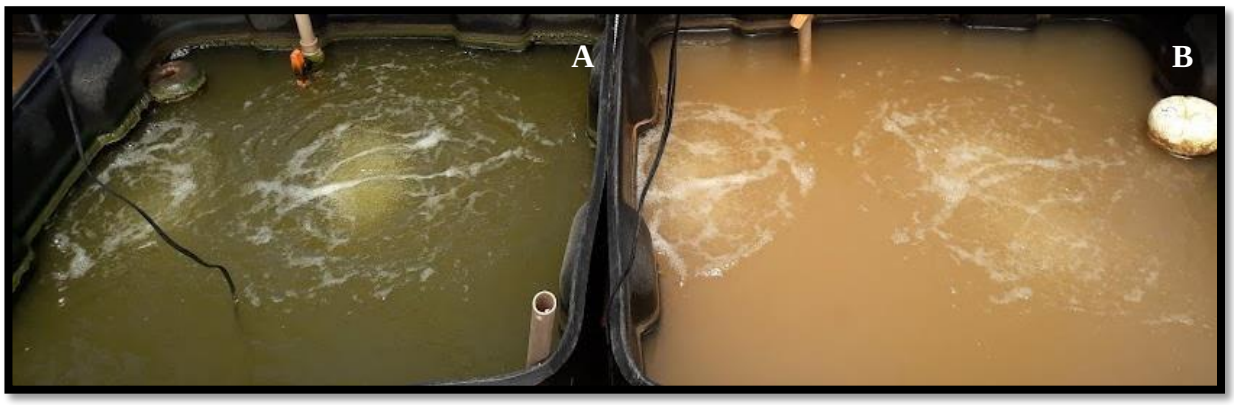

Figura 2. A: controle após 42 dias de cultivo; B: tratamento RPN após 42 dias de cultivo (Foto: Wellica G. Reis).

De acordo com a Figura 3, houve diferença significativa na concentração de clorofila *a* ao longo do estudo de 81 dias. O valor máximo medido foi de 307,45 μgL^{-1} para o tratamento CL e o valor mínimo de 135 μgL^{-1} para o tratamento RPN.

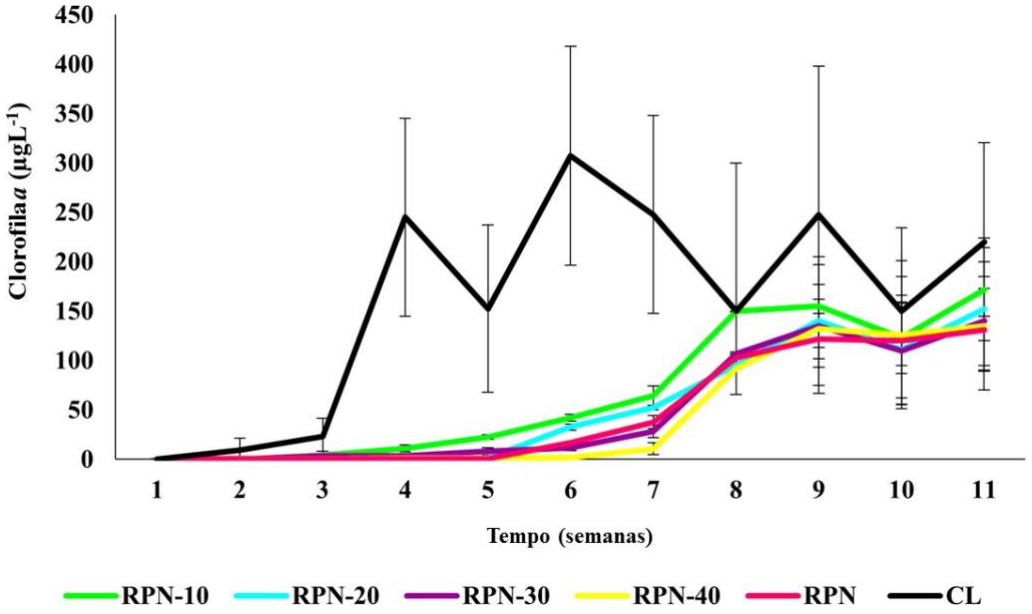

Figura 3. Variação (média ± desvio padrão) na clorofila *a* concentração durante 81 dias de criação de *L. vannamei* em sistemas BFT sob restrição de luz natural: RP-10, RP-20, RP-30, RP-40, RPN e CL.

4.1 Quantificação dos Microrganismos.

A Figura 4A mostra as concentrações de bactérias cocoides ao longo do experimento. Diferenças significativas foram encontradas entre os tratamentos no período de 80 dias ($p<0,05$), com concentração mínima de 1,50 x 10^{6} mL^{-1} no tratamento de CL e 3,66 x 10^{6} mL^{-1} tratamento máximo RP-10.

Para bactérias filamentosas livres, diferenças significativas foram observadas entre os tratamentos nos períodos de 40 e 80 dias ($p<0,05$). Houve um máximo de 1,33 x 10^{6} mL^{-1} para CL e mínimo de 0,26 x 10^{6} mL^{-1} para RP-30 (Figura 4B).

A Figura 4C mostra as concentrações de bactérias filamentosas aderidas ao longo do experimento. Houve diferença significativa entre os períodos 40 e 80 dias ($p<0,05$), com concentração máxima de 3,07 x 10^{5} mL^{-1} para RP-10 e um mínimo de 0,08 x 10^{5} mL^{-1} para RP-30.

Conforme a Figura 4D ocorreu variações nas concentrações de bactérias vibrio ao longo do estudo. Diferenças significativas foram encontradas entre os tratamentos no período de 40 e 80 dias ($p<0,05$), com concentração mínima de 0,00 x 10^{4} mL^{-1} no tratamento RP-10 e concentração máxima de 6,97 x 10^{4} mL^{-1} para o tratamento de CL.

Para as bactérias bacillus também houve diferenças nos períodos com 40 e 80 dias, com máximo de 1,05 x 10^5 mL^{-1} para RP-10 e mínimo de 0,48 x 10^5 mL^{-1} para RP-40 (Figura 4E).

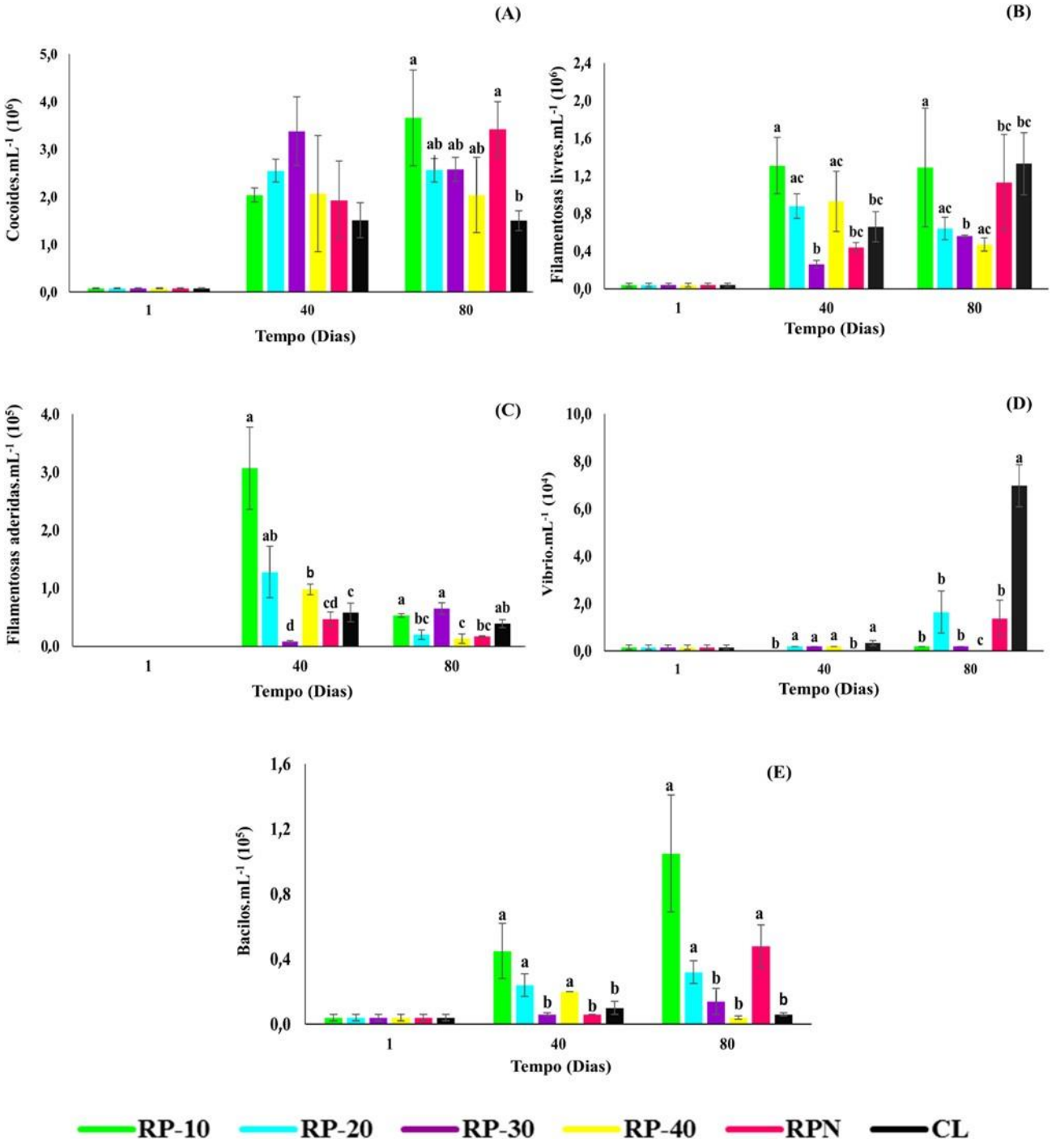

Figura 4. Variação na abundância dos grupos bacterianos - cocoides (A), filamentosa livre (B), filamentosa aderida (C), vibriões (D) e bacilo (E), em diferentes momentos na criação de *L. vannamei* em sistemas BFT com restrição de luz natural: RP-10, RP-20, RP-30, RP-40, RPN e CL.

Diferenças significativas foram encontradas nas concentrações de flagelados heterotróficos entre 40 e 80 dias ($p < 0,05$), com valores máximos de 1,87 x 10^4 mL^{-1} para tratamento de CL e mínimo de 0,80 x 10^4 mL^{-1} para tratamento RPN (Figura 5A).

Diferenças significativas foram encontradas nas concentrações de flagelados autotróficos entre 40 e 80 dias ($p<0,05$), com valores máximos de 8,86 x 10^4 mL^{-1} para tratamento de CL e mínimo de 0,25 x 10^4 mL^{-1} para tratamento de CL (Figura 5B).

Para os ciliados, houve diferenças significativas no período de estudo de 40 dias ($p < 0,05$), com um mínimo de 0,01 x 10^2 mL^{-1} para o tratamento RP-10 e um máximo de 2.31 x 10^2 mL^{-1} no tratamento CL (Figura 5C).

A Figura 5D mostra que houve uma diferença significativa nas concentrações de rotíferos no período de 40 dias nos diferentes tratamentos ($p <0,05$), com um mínimo de 0,0 x 10^2 mL^{-1} para tratamentos RPN. O valor máximo foi 2.31 x 10^2 mL^{-1} para o tratamento de CL.

Para as concentrações de nematóides, não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$), com um mínimo de 0,01 x 10^2 mL^{-1} para os tratamentos RP-10, RP-20, RPN e CL e máximo de 5,78 x 10^2 mL^{-1} para os tratamentos RP-30 e CL (Figura 5E).

Houve diferenças significativas nas concentrações de ameba nos períodos de 40 e 80 dias de estudo ($p<0,05$), com concentrações mínimas de 0,41 x 10^4 mL^{-1} para tratamentos RPN, e máximo de 1,98 x 10^4 mL^{-1} para os tratamentos CL (Figura 5F).

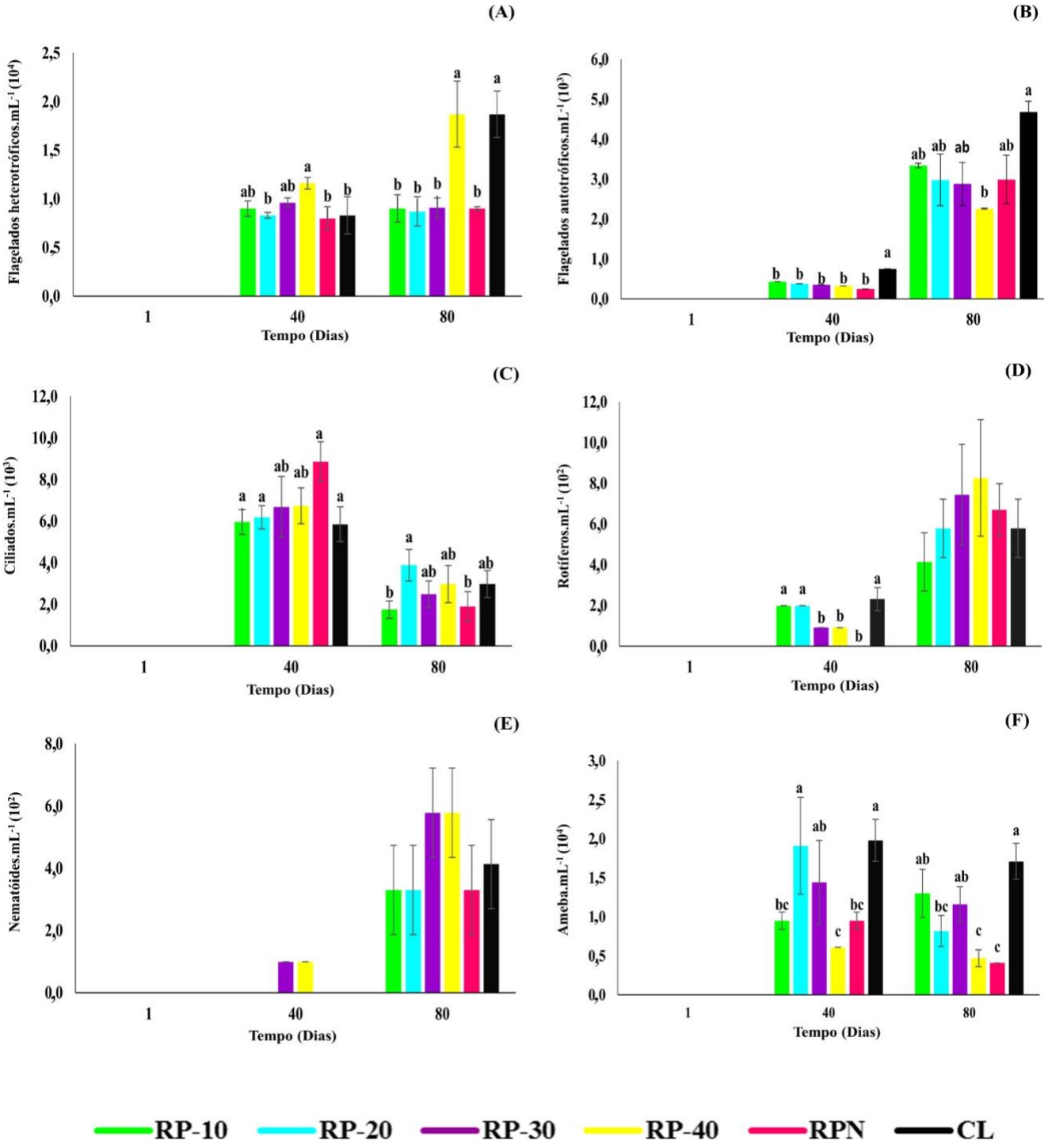

Figura 5. Variação na abundância de grupos de protozoários – flagelados heterotróficos (A), flagelados fotoautotróficos (B) ciliados (C) rotíferos (D), nematoides (E) e amebas (F), em diferentes momentos na criação de L. *vannamei* em Sistemas BFT com restrição de luz natural: RP-10, RP-20, RP-30, RP-40, RPN e CL.

Os resultados para a abundância total de microrganismos durante 81 dias deste estudo são mostrados na Tabela 3. Diferenças significativas foram encontradas nas concentrações de filamentos aderidos, vibrio, bacilos, nematoides, amebas e abundância total de microrganismos entre os tratamentos ($p < 0,05$).

Tabela 3

Abundância de microrganismos totais (valores médios ± desvio padrão) nos tratamentos: RP-10, RP-20, RP-30, RP-40, RPN, CL e controle após 81 dias. Diferentes letras sobrescritas em uma linha denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

Microorganisms	**RP-10**	**RP-20**	**RP-30**	**RP-40**	**RPN**	**CL**
Cocoids.mL^{-1}	$1,93x10^{6} \pm 3,28\ x10^{5}$	$1,73x10^{6} \pm 1,52x10^{5}$	$2,01x10^{6} \pm 2,65x10^{5}$	$1,40x10^{6} \pm 4,45x10^{5}$	$1,81x10^{6} \pm 9,51x10^{4}$	$1,03x10^{6} \pm 8,66x10^{4}$
Filamentosa livre, mL^{-1}	$8,81x10^{5} \pm 3,17x10^{5}$	$5,26x10^{5} \pm 1,51x10^{4}$	$2,89x10^{6} \pm 2,65x10^{5}$	$4,82x10^{5} \pm 9,00x10^{4}$	$5,36x10^{5} \pm 1,86x10^{5}$	$6,80x10^{5} \pm 1,34x10^{5}$
Filamentosa aderida, mL^{-1}	$1,20x10^{5} \pm 2,45x10^{4a}$	$4,97x10^{4} \pm 1,40x10^{4ab}$	$2,46x10^{4} \pm 4,16x10^{3cd}$	$3,71x10^{4} \pm 2,09x10^{3abc}$	$2,19x10^{4} \pm 4,10x10^{3d}$	$3,26x10^{4} \pm 6,98x10^{3bcd}$
Vibrio.mL^{-1}	$1,23x10^{3} \pm 3,40x10^{2d}$	$6,70x10^{3} \pm 3,19x10^{3ab}$	$1,92x10^{3} \pm 3,40x10^{2cd}$	$1,23x10^{3} \pm 3,40x10^{2d}$	$5,11x10^{3} \pm 2,34x10^{3bc}$	$4,70x10^{4} \pm 6,16x10^{3a}$
Bacilos.mL^{-1}	$5,19x10^{4} \pm 1,32x10^{4a}$	$2,07x10^{4} \pm 2,13x10^{3a}$	$8,64x10^{3} \pm 2,35x10^{3c}$	$1,00x10^{4} \pm 8,31x10^{2bc}$	$1,98x10^{4} \pm 4,04x10^{3ab}$	$7,50x10^{3} \pm 8,89x10^{2c}$
*Flagelados, Hete.mL^{-1}	$1,94x10^{4} \pm 1,84x10^{3}$	$1,91x10^{4} \pm 2,30x10^{3}$	$1,96x10^{4} \pm 1,81x10^{3}$	$2,34x10^{4} \pm 2,72x10^{3}$	$1,91x10^{4} \pm 2,27x10^{3}$	$2,23x10^{4} \pm 3,30x10^{3}$
*Flagelados, Foto.mL^{-1}	$1,26x10^{3} \pm 1,19x10^{1}$	$1,12x10^{3} \pm 2,18x10^{2}$	$1,08x10^{3} \pm 1,81x10^{2}$	$8,61x10^{2} \pm 5,09x10^{0}$	$1,08x10^{3} \pm 2,0^{6}x10^{2}$	$1,81x10^{3} \pm 9,29x10^{1}$
Ciliados.mL^{-1}	$2,84x10^{3} \pm 3,47x10^{1}$	$3,63x10^{2} \pm 4,14x10^{2}$	$3,33x10^{3} \pm 7,18x10^{2}$	$3,52x10^{3} \pm 6,06x10^{2}$	$3,86x10^{3} \pm 5,60x10^{2}$	$3,22x10^{3} \pm 4,03x10^{2}$
Rotíferos.mL^{-1}	$2,04x10^{2} \pm 4,77x10^{1}$	$2,59x10^{2} \pm 4,77x10^{1}$	$2,81x10^{2} \pm 8,26x10^{1}$	$3,08x10^{2} \pm 9,54x10^{1}$	$3,55x10^{2} \pm 7,32x10^{1}$	$2,70x10^{2} \pm 4,16x10^{1}$
Nematoide.mL^{-1}	$1,10x10^{2} \pm 4,77x10^{1d}$	$1,10x10^{2} \pm 4,77x10^{1d}$	$2,26x10^{2} \pm 4,77x10^{1c}$	$8,61x10^{2} \pm 5,02x10^{0\ bc}$	$1,08x10^{3} \pm 2,06x10^{2ab}$	$1,81x10^{1} \pm 9,29x10^{1\ a}$
Ameba.mL^{-1}	$7,52x10^{3} \pm 1,37x10^{3b}$	$9,11x10^{3} \pm 1,97x10^{3ab}$	$8,66x10^{3} \pm 1,42x10^{3ab}$	$3,64x10^{3} \pm 3,95x10^{2\ d}$	$4,56x10^{3} \pm 3,95x10^{2\ cd}$	$1,23x10^{4} \pm 1,81x10^{3a}$
Total protozoários, mL^{-1}	$3,13x10^{4} \pm 1,07x10^{3}$	$3,33x10^{4} \pm 4,17x10^{3}$	$2,98x10^{4} \pm 3,70x10^{3}$	$3,26x10^{4} \pm 2,45x10^{3}$	$3,00x10^{4} \pm 2,61x10^{3}$	$4,17x10^{4} \pm 4,56x10^{3}$
Total bactéria, mL^{-1}	$2,98x10^{6} \pm 5,45x10^{5}$	$2,34x10^{6} \pm 1,54x10^{5}$	$2,34x10^{6} \pm 2,82x10^{5}$	$1,93x10^{6} \pm 4,77x10^{5}$	$2,40x10^{6} \pm 9,79x10^{4}$	$1,80x10^{6} \pm 1,71x10^{5}$
Total microrganismos, mL^{-1}	$9,05x10^{6} \pm 5,44x10^{5a}$	$7,11x10^{6} \pm 1,52x10^{5ab}$	$7,10x10^{6} \pm 2,81x10^{5ab}$	$5,89x10^{6} \pm 4,75x10^{5b}$	$7,28x10^{6} \pm 9,90x10^{4ab}$	$7,28x10^{6} \pm 9,90x10^{4b}$

* Flagelados Hete: Flagelados heterotróficos; Flagelado Foto: Flagelado fotoautotróficos.

Houve diferença significativa para abundância total de microrganismos nos diferentes tratamentos com maior concentração de microrganismos para o tratamento RP-10 de 9,05 x 10^{6} e foi o único tratamento diferente do controle de 7,28 x 10^{6}, porém os tratamentos RP-20, RP-30 e RPN foram iguais a RP-10 e controle (CL) (Figura 6).

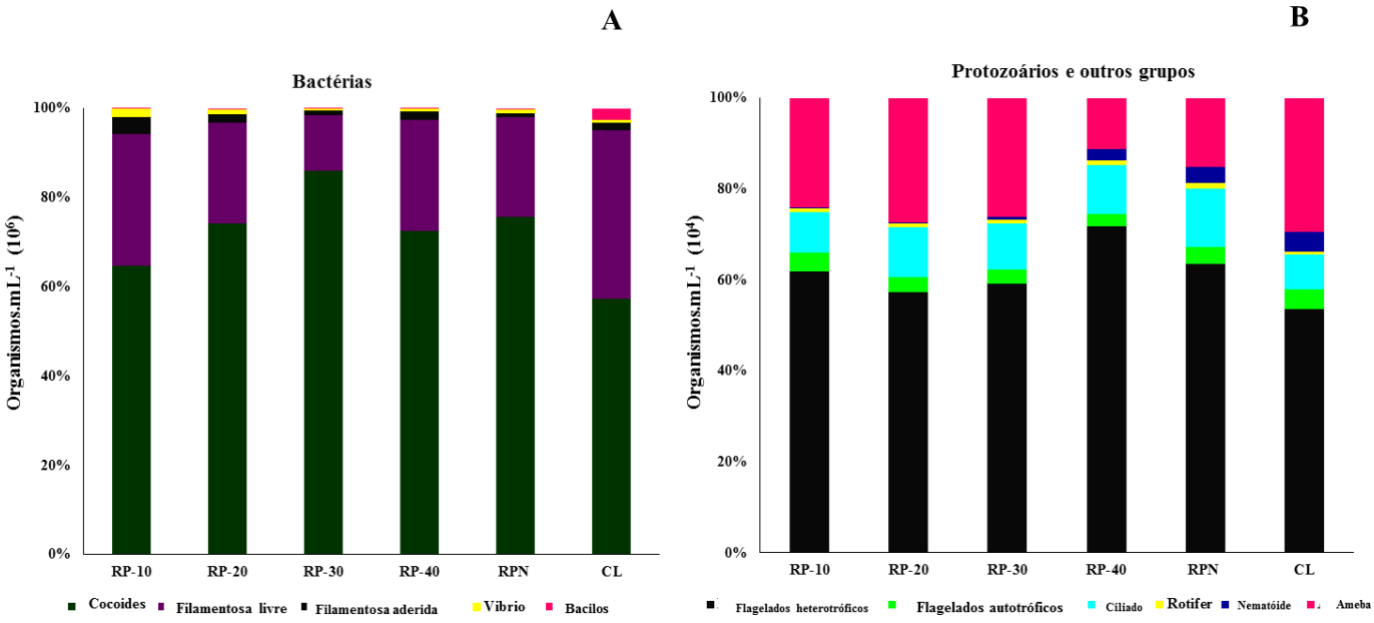

Figura 6. Composição total de bactérias (A) e protozoários (B) na cultura de *L, vannamei* em sistemas BFT sob restrição de luz natural: RP-10, RP-20, RP-30, RP-40, RPN e CL,

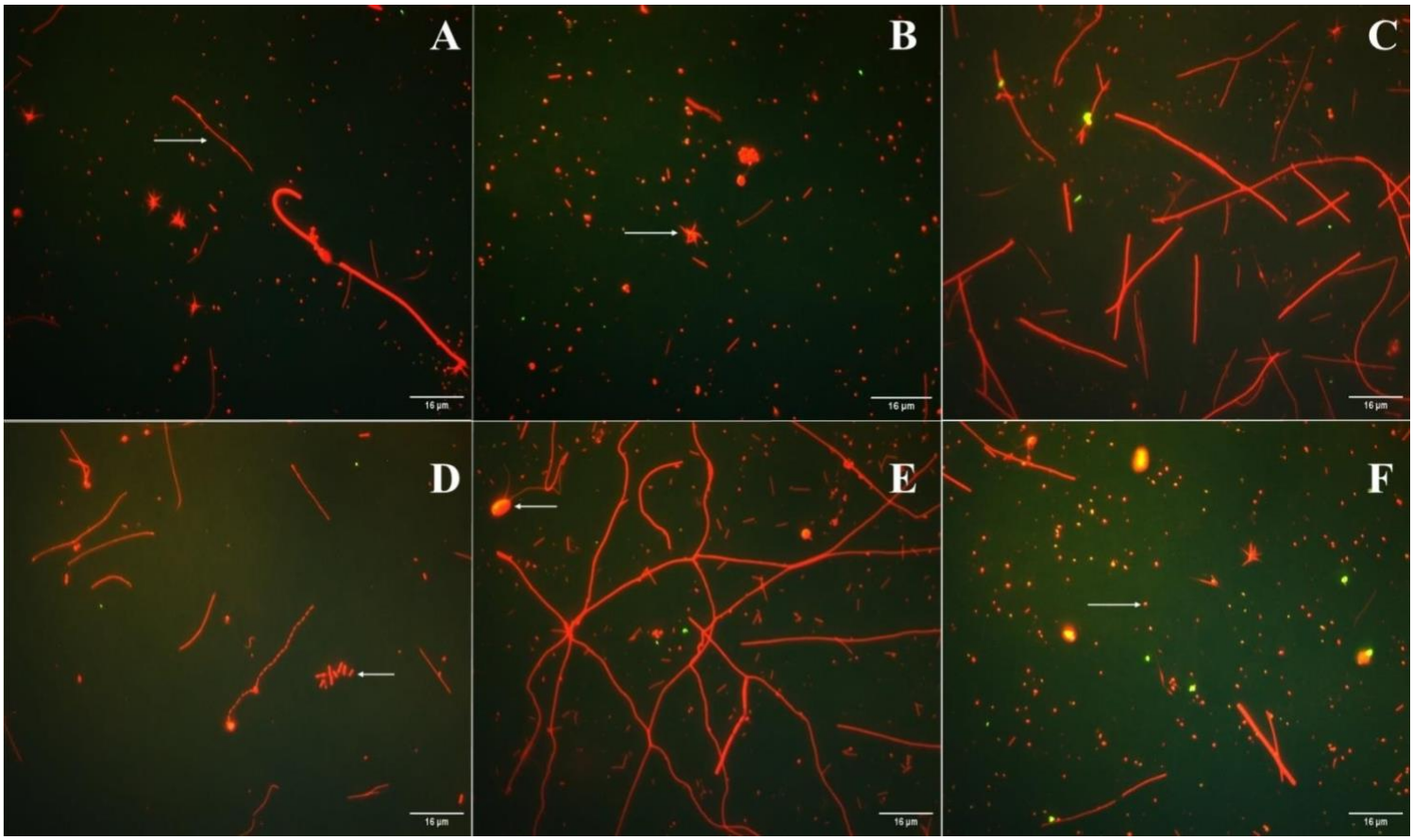

Figura 7. Abundância de morfotipos bactérias no floco microbiano no tratamento RP-10: (A) Filamentosas livres (bactérias) no 80º dia de experimento. Abundância de bactérias no floco microbiano no tratamento RP-20: (B) Ameba (protozoário) no 80º dia de experimento. Abundância de bactérias no floco microbiano no tratamento RP-30: (C) no floco microbiano no 80º dia de experimento. Abundância de bactérias no floco microbiano no tratamento RP-30: (D) Bacilos (bactéria) no 80º dia de experimento. Abundância de bactérias no floco microbiano no tratamento RP-40: (E) Flagelados (protozoários) no 80º dia de experimento. Abundância de bactérias no floco microbiano no tratamento RP-40: (F) Cocoide (bactérias) no 80º dia de experimento. Ampliação de 1000× por microscópio de epifluorescência (imagem: Wellica G, Reis).

4.1 Desempenho zootécnico.

Os resultados para o desempenho zootécnico de *L, vannamei* criados durante 81 dias são apresentados na Tabela 2. Para peso final, crescimento semanal, sobrevivência, conversão alimentar e produtividade não houve diferenças significativas ($p > 0,05$).

Tabela 4

Valores médios (± desvio padrão) do desempenho vegetativo de *L. vannamei* nos tratamentos após 81 dias.

	RP-10	RP-20	RP-30	RP-40	RPN	CL
Peso inicial (g)	0,014 ±0,04	0,014 ±0,04	0,014 ±0,04	0,014 ±0,04	0,014±0,04	0,014±0,04
Peso final (g)	4,29 ±0,84	5,34 ±0,44	4,25 ±1,27	5,29 ±2,43	5,21 ±1,93	5,22 ±0,21
Crescimento semanal (g)	0,35 ±0,04	0,41 ±0,04	0,33 ±0,10	0,51 ±0,22	0,40±0,15	0,40 ±0,02
FCA	1,15 ±0,12	1,11 ±0,08	1,22 ±0,17	1,37 ±0,31	1,28±0,27	1,02±0,04
Sobrevivência (%)	77,23 ± 6,84	64,60 ±8,62	77,43 ±18,24	62,42 ±15,37	69,15±28,79	60,81±2,81
Produtividade (Kg/m ^{3})	3,50 ±0,37	3,67 ±0,27	3,39 ±0,72	3,34 ± 0,76	3,47 ±0,62	3,96±0,06

5. DISCUSSÃO

5.1 A influência da restrição parcial de luz natural na qualidade da água.

Para os parâmetros de qualidade da água, como nitrito para os tratamentos RP-40 e RPN foram diferentes RP-10, RP-20, RP-30, o tratamento clorofila *a* CL foi diferente de todos os outros tratamentos, e o tratamento lux CL foi igual ao RP-10 e diferente dos demais tratamentos. Por outro lado, parâmetros como temperatura, oxigênio dissolvido, pH, amônia, nitrato, fosfato, alcalinidade, CO_2, sólidos sedimentáveis, sólidos suspensos totais, não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos. Os valores dessas variáveis estão dentro da faixa considerada aceitável para a espécie em estudo, portanto, provavelmente não causaram nenhuma diferença nos índices de desempenho (Van Wyk e Scarpa, 1999; Gaona et al,, 2011; Furtado et al,, 2016 ; Zhang et al,, 2017),

A toxicidade do nitrito é influenciada pela salinidade e pelo pH, portanto, quanto menores os valores desses parâmetros, mais tóxico o nitrito se torna. Os níveis de segurança para concentrações de nitrito em culturas *de L, vannamei* são 15,2 e 25,7 NO_2^- mg L^{-1} para salinidades de 25 e 35 $^-$ mg L^{-1} respectivamente (Lin e Chen, 2003). No presente estudo, foi utilizado um nível de segurança de 26 mg NO_2 -L^{-1} de forma que, quando esse valor de segurança fosse ultrapassado, 20% do volume total do tanque fosse renovado. A restrição parcial de influenciou a nitrificação nos diferentes tratamentos. O tratamento RPN descoberto quando a concentração de nitrito diminuiu para 1mg L^{-1} apresentou nitrificação mais efetiva quando comparado aos demais tratamentos, com diminuição da concentração de nitrito cerca de nove dias antes, quando comparado aos tratamentos RP-, 10, RP-30, RP-40 e controle. Em relação ao tratamento RP-20, a diferença foi de 13 dias quando comparado ao tratamento RPN,

Além disso, em todos os tratamentos, exceto no controle (CL) e RPN, houve aumento nas concentrações de nitrito quando os tanques foram descobertos. Essa nitrificação mais efetiva do tratamento RPN, que foi coberto com lona até que a concentração de nitrito diminuísse para 1mg L^{-1}, quando comparada aos demais tratamentos, que foram descobertos com diferentes concentrações de nitrato, pode estar relacionada à fotossensiblidade dos nitrificantes à luz bactérias, Peng e outros, (2001), estudando a nitrificação no Oceano Pacífico, observaram que na zona eufótica a nitrificação era fotoinibida, o que comprova a sensibilidade dessas bactérias à luz solar.

Além da luz solar, as bactérias nitrificantes também respondem à luz artificial de diferentes maneiras, apresentando diferentes comportamentos quando expostas a diferentes comprimentos de onda (Vergara et al., 2016; Reis et al., 2019; Reis et al., 2022). Em um trabalho realizado por Guerrero (1996), os autores observaram a fotossensiblidade de bactérias nitrificantes quando expostas a diferentes comprimentos de onda de luz e em diferentes cores. Além disso, observaram inibição da atividade das bactérias nitrificantes quando expostas à luz solar, mas o efeito da luz nas bactérias não depende apenas do tipo de bactéria, mas também das condições ambientais. Em outro estudo realizado por Vergaraet al. (2016) os autores também observaram a sensibilidade relacionada à luz por bactérias nitrificantes, nas quais irradiações com 500 e 1250 $m^2 s^{-1}$ causaram uma redução de 20 a 60% nas taxas de remoção deamônia e cerca de 26 a 71% nas taxas de remoção de nitrito.

Essa fotossensiblidade pode explicar porque no tratamento RPN que foi coberto até que ocorresse a diminuição do nitrito, a nitrificação ocorreu mais cedo em relação aos tratamentos que foram expostos à luz enquanto o processo de nitrificação de conversão de nitrito em nitrato realizado por bactérias oxidadoras de nitrito (NOB) ainda não estava totalmente estabelecido. O tratamento com restrição de luz RPN pode ter proporcionado um ambiente de cultivo favorável ao crescimento de bactérias, evitando uma possível inibição da atividade de bactérias nitrificantes, resultados esses que corroboram com Reis et al. (2019).

Além da fotossensiblidade, outros fatores podem ter influenciado no comportamento diferente do estabelecimento da nitrificação nos tratamentos, como a competição entre diferentes grupos microbianos após alguma mudança nas condições ambientais de cultivo, neste caso, exposição à luz, microrganismos, como bactérias e microalgas, consomem carbonatos para cada grama de amônia consumida, Segundo Ebeling et al., (2006), organismos fotoautotróficos consomem 3,13g de alcalinidade, os quimioautotróficos consomem 7,05g e os heterotróficos 3,57g de alcalinidade para cada grama de amônia. Assim, quando esses grupos de microrganismos estão presentes no tanque de cultivo, pode ocorrer competição por nutrientes, no caso, carbonatos e compostos nitrogenados.

Portanto, o fato de descobrir os tanques quando ainda está ocorrendo o crescimento de bactérias nitrificantes no tanque de cultivo, que é mais lento que bactérias heterotróficas e microrganismos fotoautotróficos, pode ter proporcionado um ambiente mais favorável para o crescimento de organismos fotoautotróficos, gerando competição por nutrientes e espaço e dificultando o estabelecimento de bactérias nitrificantes. No entanto, as presenças de todos esses grupos de microrganismos não atuam como um fator excludente para a nitrificação, mas sim um ambiente em que ocorrerá maior competição e uma nitrificação mais tardia no sistema de cultivo.

A restrição parcial de luz também influenciou os resultados de clorofila *a* nos diferentes tratamentos. A clorofila *a* é o pigmento mais importante para a fotossíntese, ela é encontrada nos cloroplastos de todas as espécies fotossintéticas que absorvem luz visível, entre o comprimento de onda 380-750 nm (Lourenço et al., 2009). Portanto, os grupos de organismos fotossintéticos contidos nos bioflocos contribuíram para os altos teores de clorofila *a* nos tratamentos expostos à luz. As altas concentrações de clorofila *a* foram influenciadas pela presença de luz no cultivo de acordo com os tratamentos. Em todos os tratamentos como RP-10, RP-20, RP-30, RP-40, RPN a concentração de clorofila *a* foi menor pois esses tratamentos foram cobertos com lona preta por um determinado período, assim isso influenciou nas concentrações de clorofila *a,* quando comparado ao tratamento controle (CL).

Nesse sentido, o tratamento CL (testemunha) foi o que apresentou maior concentração de clorofila *a,* e isso está relacionado à exposição do tratamento à luz por um período maior. Como o controle não foi coberto, este tratamento permaneceu exposto a maior quantidade de luz natural durante todos os 81 dias do estudo, portanto este maior período de exposição à luz contribuiu para a maior concentração de clorofila a no tratamento, quando comparado aos tratamentos que foram cobertos por um determinado período. Paralelamente, é importante destacar que em todos os tratamentos houve variações na clorofila *a* devido as clarificações que foram realizadas, quando os valores limitem de segurança de sólidos totais em suspensão foram ultrapassados. Portanto, quando se faz a clarificação, parte da clorofila *a* também é retirada dos tanques de cultivo, portanto esse manejo pode ocasionar uma variação na concentração de clorofila *a* nos tratamentos.

A quantidade de luz medida nos tanques também foi influenciada pelos diferentes tratamentos. Os tratamentos CL e RP-10 apresentaram maiores valores de lux quando comparados aos tratamentos RP-20, RP-30, RP-40, RPN. Essa variação de lux nos diferentes tratamentos pode ser explicada pelas características de cada tratamento, pois o tratamento CL não foi coberto, portantoa quantidade de lux medida no tratamento foi maior quando comparada aos tratamentos que foram

cobertos devido à restrição parcial de luz natural de cada tratamento. O comportamento observado tanto da clorofila quanto do lux era esperado nos tratamentos.

5.2 A influência da restrição parcial da luz do dia sobre os microrganismos.

A restrição parcial de luz natural influenciou positivamente tanto a abundância de bactérias quanto de protozoários e outros grupos de microrganismos ao longo do experimento. Variações no ambiente de cultivo, como nutrientes, competição natural de diferentes espécies e luz, podem influenciar tanto a produtividade primária quanto a predominância de grupos específicos de microrganismos mais adaptados às condições ambientais (Irigoien e Castel, 1997; Pereira Neto et al., 2008). No sistema intensivo de produção de camarão, a comunidade natural produzida na cultura possui uma grande variedade com a presença de bactérias, fitoplâncton, rotíferos, nematoides e protistas, e estes desempenham um papel importante no fluxo de energia dos ecossistemas aquáticos (Decamp et al., 2003; Lara et al., 2017; Reis et al., 2019). A biomassa microbiana produzida no sistema BFT serve como uma importante fonte de nutrientes para camarões cultivados (Wasielesky et al., 2006; Ballester et al., 2010; Becerril-Cortés et al., 2018).

Para as bactérias cocoides, houve diferença na concentração no período final de 80 dias, maior abundância foi encontrada nos tratamentos com restrição de luz quando comparados ao controle (CL). No entanto, foi observado um aumento de bactérias cocoides em diferentes períodos em todos os tratamentos. Esses aumentos significativos de bactérias cocoides ao longo do experimento podem estar relacionados à contribuição dessas bactérias para a formação de bioflocos no sistema de cultivo; este resultado corrobora com estudos anteriores (Ferreira et al., 2008; Reis et al., 2019).

Diferenças significativas também foram observadas na concentração de bactérias filamentosas livres e aderidas entre os diferentes tratamentos com restrição parcial de luz natural, por períodos de 40 e 80 dias. Em geral, a abundância de bactérias livres e aderidas no tratamento RP-10 foi maior quando comparada aos outros tratamentos. No entanto, essa abundância de filamentos livres e filamentos aderidos pode estar relacionada a uma maior disponibilidade de carbono orgânico dissolvido nos tanques de cultivo quando introduzimos uma fonte externa de carbono orgânico no início do experimento. A alta concentração de carbono orgânico dissolvido (COD), conhecido como alça microbiana, cria um fluxo alternativo de energia em altos níveis tróficos (Azam et al,, 1983). Em estudo realizado por Anésio et al, (2003), os autores observaram que tanto as bactérias livres quanto as aderidas atuam de maneiras diferentes no ambiente. Quando temos maior oferta de carbono orgânico dissolvido no meio, há maior abundância de bactérias livres e posteriormente bactérias filamentosas aderidas com formação de bioflocos.

Houve diferença estatística nos períodos de 40 e 80 dias, tanto para as concentrações de vibrios quanto para bacilos nos diferentes tratamentos com restrição parcial de luz natural. Embora haja maior abundância de vibrio no tratamento controle, é possível observar que foi menor quando comparamos a abundância de bacilos em todos os tratamentos. Além disso, é importante ressaltar que probióticos foram utilizados em todos os tratamentos, portanto, observou-se antagonismo entre vibrio e bacilos em todos os tratamentos com aumento da abundância de bacilos e diminuição da abundância de vibrio. Esse resultado corrobora Krummenauer et al. (2014), Hostins et al. (2017), que observaram menores concentrações de vibrio e aumento de bacilos ao usar probióticos no sistema BFT e, portanto, os antagonismos entre microrganismos.

Dentre esses fatores mencionados acima, a predação realizada por microrganismos pode influenciar a abundância, composição, comportamento e morfologia das bactérias (Roselli, 2008) e constitui o chamado controle top-down proposto por Wright (1988), concomitantemente com a disponibilidade de nutrientes (bottom-up) merece destaque, por ser o principal responsável pelo controle de bactérias nos sistemas.

Uma observação geral, quanto à abundância de protozoários e outros grupos, houve diferença significativa de microrganismos, como flagelados heterotróficos, flagelados autotróficos, ciliados, rotíferos, nematoides e amebas em diferentes tratamentos com restrição parcial de luz natural. Para os flagelados heterotróficos e autotróficos, houve diferença nos períodos com 40 e 80 dias em todos os tratamentos. Para os tratamentos cobertos com lona, a abundância de microrganismos aos 40 dias foi semelhante em todos os tratamentos, e ao final de 80 dias, os tratamentos RP-40 e CL para flagelados heterotróficos apresentaram maior abundância. Além disso, houve aumento na concentração de flagelados autotróficos no período final, porém, esse comportamento já era esperado visto que todos os tanques estavam recebendo luz igual ao tratamento controle. Essa variação de flagelados tanto heterotróficos quanto autotróficos pode estar relacionada à mixotrófia dos organismos.

Em um estudo realizado por Zhang et al. (1996) e Ma et al. (2018), os autores observaram que algumas espécies de flagelados podem ser mixotróficas e utilizar múltiplos modos de nutrição, o que lhes permite adaptar-se a diferentes condições nutricionais, sobrevivendo por fotossíntese em um ambiente oligotrófico ou vivendo alimentando-se de várias partículas orgânicas, por exemplo, exemplo, bactérias, grãos e microalgas. Além disso, vale ressaltar que a abundância de flagelados heterotróficos e autotróficos em diferentes períodos ao longo do estudo pode ser influenciada pelo desenvolvimento dos ciliados, que são predadores de flagelados e outros microrganismos. Os ciliados são importantes na cadeia alimentar, pois se alimentam de algas filamentosas, amebas, bactérias, detritos, outros ciliados, flagelados e hifas fúngicas (Verni e Gualtieri, 1997; Dias, 2008).

Diferenças na concentração de ciliados foram encontradas nos períodos de 40 e 80 dias de estudo, com maior abundância no início e menor no final em todos os tratamentos. O filo Ciliophora é um dos maiores grupos entre os protozoários e é de suma importância na transferência de nutrientes dentro da cadeia alimentar em ambientes costeiros, sendo um dos principais elos da alça microbiana marinha (Monagnes, et al., 2010). Em relação à variação na abundância de ciliados ao longo do estudo, principalmente a diminuição no período final pode estar relacionada tanto ao desenvolvimento de rotíferos no ambiente de cultivo devido à predação de rotíferos sobre ciliados, uma vez que os rotíferos são relatados como eficientes predadores de ciliados, como a predação de camarões (Curds 1992; Auer et al,, 2004; Decamp et al,, 2006), bem como a predação de camarões sobre ciliados, um efeito "top-down", no qual ocorre a predação de camarões sobre ciliados (Jack & Gilbert , 1997; Agasild et al,, 2013).

Ainda é possível acrescentar, abundância de rotíferos nos diferentes tratamentos com restrição de luz natural. Houve diferença significativa no período de 40 dias, com maior abundância para os tratamentos CL, RP-10 e RP-20, Porém, no período de 80 dias, a abundância de rotíferos foi semelhante. Essa variação na abundância pode ser explicada pela facilidade de adaptação dos rotíferos. Como os rotíferos são organismos oportunistas, eles se adaptam facilmente às mudanças nas condições ambientais e, portanto, é difícil encontrar um padrão constante de composição e ocorrência de espécies no espaço e no tempo (Rodriguez et al., 2000).

Paralelamente a isso, a restrição parcial de luz influenciou na concentração de amebas no estudo, no período de 40 e 80 dias, houve menor abundância nos tratamentos RP-40 e RPN, quando comparado aos demais tratamentos, diferindo de o que foi constatado por Godoy (2008), que observou esses organismos apenas na última semana do experimento. Isso pode estar relacionado aopróprio ambiente de cultivo, pois as concentrações de amebas permanecem altas até que os níveis denutrientes para outras espécies (protozoários) sejam suficientes para que a alta taxa de crescimento de outros organismos supere as amebas e, assim, há competição por espaço e nutrientes (Decamp e outros, 1999).

Em relação à abundância total de microrganismos nos diferentes tratamentos, houve diferença significativa com maior concentração de microrganismos para o tratamento RP-10, único tratamento que se diferenciou da testemunha. No entanto, os tratamentos RP-20, RP-30 e RPN foram semelhantes ao RP-10 e ao controle (CL). Portanto, a restrição parcial de luz natural influenciou positivamente tanto a abundância quanto os níveis tróficos no sistema de cultivo.

5.3 A influência da restrição parcial da luz do dia no desempenho zootécnico.

A restrição parcial de luz natural não influenciou o desempenho zootécnico de *L, vannamei*,como peso final, crescimento semanal, conversão alimentar, taxa de sobrevivência e produtividade nos diferentes tratamentos. Embora a abundância de microrganismos nos tratamentos tenha sido diferente, isso não pareceu refletir no desempenho zootécnico dos camarões deste estudo.

As taxas de conversão alimentar do presente estudo nos tratamentos expostos à luz foram consideradas baixas, quando comparadas a trabalhos anteriores em sistemas de bioflocos com restrição de luz (Wasielesky et al., 2012; Baloi et al., 2013; Esparza-Leal et al., 2017). Os resultados de desempenho são diferentes dos relatados por Esparza-Leal et al. (2017) e semelhante aos resultados de Guo et al. (2012), Wasielesky et al, (2012), Baloi et al. (2013) e Reis et al. (2022). Portanto, o tratamento que tem contribuído positivamente para a qualidade da água e a comunidade de microrganismos pode ser utilizado de forma mais eficiente.

6. CONCLUSÃO

O uso de restrição parcial de luz natural influenciou positivamente na qualidade da água e na abundância de microrganismos, além de não ter efeitos negativos no desempenho zootécnico em relação ao controle. Assim, a restrição parcial de luz do tratamento RPN pode ser recomendada para produção em um sistema BFT, pois fornece nitrificação mais eficiente em comparação com o controle.

7. REFERÊNCIAS

Anesio, A,M,, Abreu, P,C,, Biddanda, B,A,, 2003, The role of free and attached microorganisms in the decomposition of estuarine macrophyte detritus, Estuar, Coast, Shelf Sci, 56, 197–201, https://doi,org/10,1016/S0272-7714(02)00152-X,

Auer, B,, Elzer, U, and Arndt, H, Comparison of pelagic food webs in lakes along a trophic gradient and with seasonal aspects: influence of resources and predation, Journal of Plankton Research , 2004, 26(6), 697 709, http://dx,doi,org/10,1093/plankt/fbh058,

Agasild, H,, Zingel, P,, Karus, K,, Kangro, K,, Salujõe, J, and Nõges, T, Does metazooplankton regulate the ciliate community in a shallow eutrophic lake? Freshwater Biology, 2013, 58(1), 183-191, http://dx,doi,org/10,1111/ fwb,12049,

APHA (American Public Health Association), 2012, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd ed, Washington, DC, 1496 pp,

Avnimelech, Y,, Kochba, M,, 2009, Evaluation of nitrogen uptake and excretion by tilápia in bio fl oc tanks, using 15 N tracing, Aquaculture 287, 163−168, https://doi,org/10, 1016/j,aquaculture,2008,10,009,

Avnimelech, Y, 2015, Biofloc technology – A practical guide book, A practical guide book, The World Aquaculture, https://doi,org/10,13140/2,1,4575,0402,

Akizuki, S, Kishi, M,, Cuevas-Rodríguez, G,, Toda, T,, 2019b, Effects of different light conditions on ammonium removal in a consortium of microalgae and partial nitrifying granules, Water Res, (in press) https://doi,org/10,1016/j,watres,2019,115445

Akizuki; Kishi M; Rodrígues, G, C, (2020) Effects of different light conditions on ammonium removal in a consortium of microalgae and partial nitrifying granules, 171:, https://doi,org/10,1016/j,watres,2019,115445

Azam, F,; Fenchel, T,; Field, J, G,; Gray, J, S,; Meyer-Reil, L, A,; Thingstad, F,, 1983, The ecological role of water-column microbes in the sea, Mar, Ecol, Prog, Ser,, 10, 257- 263,

Ballester, E,L,C,, Abreu, P,C,, Cavalli, R,O,, Emerenciano, M,, de Abreu, L,, Wasielesky, W,, 2010, Effect of practical diets with different protein levels on the performance of Farfantepenaeus paulensis juveniles nursed in a zero Exchange suspended microbial flocs intensive system, Aquac, Nutr, 16, 163–172, 47 https://doi,org/10,1111/j,1365-2095,2009,00648,x

Bagenal, T,B,, Tesch, F,W,, 1978, Age and growth, In: Bagenal, T,B, (Ed,), Methods for the Assessment of Fish Production in Fresh Waters, IBP Handbook, vol, 3, Mech, 14, 912–913, https://doi,org/10,1007/bf00860117,

Baloi, M,, Arantes, R,, Schveitzer, R,, Magnotti, C,, Vinatea, L,, 2013, Performance of Pacific white

shrimp Litopenaeus vannamei raised in biofloc systems with varying levels of light exposure, Aquac, Eng, 52, 39–44, https://doi,org/10,1016/j,aquaeng,2012,07,003

Becerril-cortés, D,, Monroy-dosta, M,D,C,, Emerenciano, G,C,, Castro-mejía, G,, Sofia, B,, Bermúdez, S,, Correa, G,V,, 2018, Effect on Nutritional Composition of Produced Bioflocs with Different Carbon Sources (Molasses, Coffee Waste and Rice Bran) in Biofloc System, vol, 6, pp, 541–547,

Brandão, H,, Xavier, Í,V,, Santana, G,K,K,, Santana, H,J,K,, Krummenauer, D,, Wasielesky, W,, 2021, Heterotrophic versus mixed BFT system: Impacts on water use, suspended solids production and growth performance of Litopenaeus vannamei, Aquac, Eng, 95, https://doi,org/10,1016/j,aquaeng,2021,102194

Curds, C,R, (1992) Protozoa and the Water Industry, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 122 pp,

Crab, R,, Avnimelech, Y,, Defoirdt, T,, 2007, Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production, 270, 1−14, https://doi,org/10,1016/j,aquaculture, 2007,05,006,

Decamp, O,, Warren, A,, Sanchez, R,, 1999, The role of ciliated protozoa in subsurface flow wetlands and their potential as bioindicators, Water Sci, Technol, 40, 91–98,https://doi,org/10,1016/S0273-1223(99)00444-8,

Decamp, O, Cody, J, Conquest, L,, Delanoy, G,, Tacon, A,G,J,, 2003, Effect of Salinity on Natural Community and Production of Litopenaeus vannamei (Boone), within Experimental Zero-water Exchange Culture Systems, https://doi,org/10,1046/j,1365-2109,2003,00842,x,

Decamp, O, E, Otoshi, C, A, Moss, S,M,, 2006, Protozoans and meiofauna inhabiting a bead filter: A preliminary investigation of their role as potential bioindicators of shrimp production system health, J, World Aquac, Soc, 37, 481–489,https://doi,org/ 10,1111/j,1749-7345,2006,00061,x,

Dias, R, J, P,; D'Avila, S,; Wieloch, H, e D'Agosto, M, Protozoan ciliate epibionts on the freshwater Apple snail Pomacea figulina (Spix, 1827) (Gastropoda, Ampullariidae) in an urban stream of southeast Brazil, Journal of Natural Histoty, v, 42, n,19, p, 1409-1420, 2008,

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, vol, 257, pp, 346–358, https://doi,org/10,1016/j,aquaculture,2006,03,019,

Esparza-Leal, H,M,, López-Álvarez, E,S,, Ponce-Palafox, J,T,, Melendrez-Soto, J,A,, Medina-Astorga, M,A,, Luna-González, A,, Valenzuela-Quiñónez, W,, Álvarez- Ruiz, P,, Rodríguez-Quiroz, G,, 2017, Effect of light limitation on the water quality, bacterial counts and performance of Litopenaeus vannamei postlarvae reared with biofloc at low salinity, Aquac, Res, 48, 4371–

4379, https://doi,org/10,1111/are,13260

Timmons M,B, Ebeling JM, 2010, Recirculating Aquaculture, 2nd edition, Cayuga Aqua Ventures, Ithaca, NY, http://www,bee,cornell,edu/aquain18/11/2010, p, 998,

Ferreira, L,M,M,H,M (2008) Formação de flocos microbianos em cultivo do camarão rosa Farfantepenaeus paulensis e do camarão-branco Litopenaeus vannamei, Master Thesis, Federal University of Rio Grande, Rio Grande, Brazil, 96 pp,

Furtado, P,S,, Poersch, L,H,, Wasielesky, W,, 2011, Effect of calcium hydroxide, carbonate and sodium bicarbonate on water quality and zootechnical performance of shrimp Litopenaeus vannamei reared in bio-flocs technology (BFT) systems, Aquaculture 321,130–135, https://doi,org/10,1016/j,aquaculture,2011,08,034,

Furtado, P,S,, Valenzuela, M,A,J,, Badillo, M,A,, Gaxiola, G,, Wasielesky, W,, 2016, Effect of dissolved carbon dioxide on oxygen consumption in the Pacific white shrimp, Litopenaeus vannamei (Boone 1931), Mar, Freshw, Behav, Physiol, 49, 337–346,https://doi,org/10,1080/10236244,2016,1213568,

Gaona, C,A,P,, Poersch, L,H,, Krummenauer, D,, Foes, G,K,, Wasielesky, W,J,, 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,

Guerrero, M,A,, Jones, R,D,, 1996, Photoinhibition of marine nitrifying bacteria, I,Wavelength-dependent response, Mar, Ecol, Prog, Ser, 141, 183–192, https://doi, org/10,3354/meps141183,

Guo, B,, Wang, F,, Dong, S,, Zhong, D,, 2012, Effect of fluctuating light intensity on molting frequency and growth of Litopenaeus vannamei, Aquaculture 330–333106–110, https://doi,org/10,1016/j,aquaculture,2011,12,017,

Godoy, L,C, de, 2008, Dissertação - Desempenho do camarão-branco Litopenaeus vannamei cultivado em meio de diatomáceas ou flocos microbianos com mínima troca de água 1–66,

González-Camejo, J,, Barat, R,, Aguado, D,, Ferrer, J,, Continuous 3-year outdoor operation of a flat-panel membrane photobioreactor to treat effluent from an anaerobic membrane bioreactor, Water Research (2019), doi: https://doi,org/10,1016/j,watres,2019,115238,

Hargreaves, J,A,, 2013, Biofloc Production Systems for Aquaculture, pp, 1–12, Hobbie, J,E,, Daley, R,J,, Jasper, S,, 1977, Use of nuclepore filter counting bacteria by fluoroscence microscopy, Appl, Environ, Microbiol, Microbiol, 33, 1225–1228 (4408959),

Hobbie, J,E,, Daley, R,J,, Jasper, S,, 1977, Use of nuclepore filter counting bacteria by fluoroscence microscopy, Appl, Environ, Microbiol, Microbiol, 33, 1225–1228 (4408959),

Hostins, B,, Lara, G,, Decamp, O,, Cesar, D,E,, Wasielesky, W,, 2017, Efficacy and variations inbacterial density in the gut of Litopenaeus vannamei reared in a BFT system and in clear water supplemented with a commercial probiotic mixture, Aquaculture 480, 58–64, https://doi,org/10,1016/j,aquaculture,2017,07,036,

Irigoien, X,, Castel, J,, 1997, Light limitation and distribution of chlorophyll pigments in a highly turbid estuary: the Gironde (SW France), Estuar, Coastal Shelf Sci, 44 (4), 507–517, https://doi,org/10,1006/ecss,1996,0132,

Jack, J,D, and Gilbert, J,J, Effects of metazoan predators on ciliates in freshwater plankton communities, The Journal of Eukaryotic Microbiology, 1997, 44(3), 194-199, http://dx,doi, org/10,1111/j,1550-7408,1997,tb05699,x,

Jory, D,E,, Cabrera, T,R,, Dugger, D,M,, Fegan, D,, Lee, P,G,, Lawrence, L,, Jackson, C,J,, Mcintosh, R,P,, Castañeda, J,, International, B, Park, H,A,, Hwy, N,O,D,, Pierce, F,, 2001, A global review of shrimp feed management: status and perspectives, Aquaculture 104–152,

Kirk, K,R,, 2010, Modeling Microbial and Nutrient Dynamics in Zero-discharge Aquaculture Systems,

Khanjani, M,H,, Mohammadi, A,, Emerenciano, M,G,C,, 2022, Microorganisms in biofloc aquaculture system, Aquac, Reports 26, 101300, https://doi,org/10,1016/j,aqrep,2022,101300

Krummenauer, D,, Samocha, T,, Poersch, L,, Lara, G,, Wasielesky, 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,

Krummenauer, D,, Abreu, P,C,, Poersch, L,, Reis, P,A,C,P,, Suita, S,M,, dos Reis, W,G,, Wasielesky, W,, 2020, The relationship between shrimp (Litopenaeus vannamei) size and biofloc consumption determined by the stable isotope technique, Aquaculture 529, 735635, https://doi,org/10,1016/j,aquaculture,2020,735635,

Lara, G,, Krummenauer, D,, Abreu, P,C,, Poersch, L,H,, Wasielesky, W,, 2017, The use of different aerators on Litopenaeus vannamei biofloc culture system: effects on water quality, shrimp growth and biofloc composition, Aquac, Int, 25, 147–162, https://doi,org/10,1007/s10499-016-0019-8,

Lin, Y,C,, Chen, J,C,, 2003, Acute toxicity of nitrite on Litopenaeus vannamei (Boone) juveniles at different salinity levels, Aquaculture 224, 193–201,

Lourenço, S,O,; Marques Júnior, A,N, Produção primária marinha, In Pereira, C,P,; Soares-Gomes, A, (Org,) Biologia Marinha, – 2º Ed, Rio de Janeiro: Interciência, 2009,

Ma, M,, Gong, Y,, Hu, Q,, 2018, Identification and feeding characteristics of the mixotrophic flagellate Poterioochromonas malhamensis, a microalgal predator isolated from outdoor massive

Chlorella culture, Algal Res, 29, 142–153, https://doi,org/10,1016/j,algal,2017 ,11,024

Montagnes, D, J,, Dower, J, F,, Figueiredo, G, M, The Protozooplankton–Ichthyoplankton Trophic Link: An Overlooked Aspect of Aquatic Food Webs, J Euk Microbiol 57(3), 223-228, 2010,

Pereira Neto, J,B,, Dantas, D,M,M,, Gálvez, A,O,, Brito, L,O,, 2008, Avaliação das comunidades planctônicas e bentônicas de microalgas em viveiros de camarão (Litopenaeus vannamei), Bol, Inst, Pesca 34 (4), 543−551,

Reis, W,G,, Wasielesky, W,, Abreu, P,C,, Brandão, H,, Krummenauer, D,, 2019, Rearing of the Pacific white shrimp Litopenaeus vannamei (Boone, 1931) in BFT system with different photoperiods: Effects on the microbial community, water quality and zootechnical performance, Aquaculture, https://doi,org/10,1016/j,aquaculture, 2019,04,067,

W,G, Reis, W, Wasielesky, P,C, Abreu, et al, The influence of different light wavelengths in the culture of the Pacific white shrimp Litopenaeus vannamei reared in BFT using LED lights, aquaculture (2022), https://doi,org/10,1016/j,aquaculture,2022,738924

Roselli, I, M, The influence of predator detection on life history strategies in Ceriodaphnia reticulata (Cladocera: Daphnidae), Mestrado, Eastern New Mexico University, New Mexico, 49 p,,2008,

Rodríguez, M,P,, Matsumura-Tundisi, T,, 2000, Variation of density, species composition and dominance of rotifers at a shallow tropical reservoir (Broa reservoir, SP, Brazil) in a short scale time, Rev, Bras, Biol, 60, 1–9, https://doi,org/10,1590/s0034-71082000000100002

Samocha, T,M,, Prangnell, D,I,, Hanson, T,R,, Treece, G,D,, Morris, T,C,, Castro, L,F,, Staresinic, N,, 2017, Design and Operation of Super Intensive, Biofloc-Dominated Systems for Indoor Production of the Pacific White Shrimp, Litopenaeus vannamei –The Texas A&M AgriLife Research Experience, Baton Rouge, Louisiana USA, The World Aquaculture Society,

Strickland, J,D,H,, Parsons, T,R,, 1972, A practical handbook of seawater analysis, In: A Pract, Handb, Seawater Anal, vol, 167, pp, 185, https://doi,org/10,1002/iroh, 19700550118,

Silva, A,F,, Lara, G,R,, Ballester, E,C,, Krumennauer, D,, Abreu, P,C,, Wasielesky, W,, 2013, Efeito das altas densidades de estocagem no crescimento e sobrevivência de Litopenaeus vannamei na fase final de engorda, cultivados em sistemas de bioflocos (bft), Cienc, Anim, Bras, 14, 279−287, https://doi,org/10,5216/cab,v14i3,10,419,

UNESCO, 1983, Chemical Methods for Use in Marine Environmental Monitoring, vol, 53, Utermöhl, H,, 1958, Zur Vervollkommung der quantitativen Phytoplankton-Methodik, Int, Vereinigung für Theor, und Angew, Limnol, Kom, für Limnol, Methoden 9, 1–39, https://doi,org/10,25607/OBP-1419,

Utermohl, H, (1958) Zur Ver vollkommung der quantitativan phytoplankton-methodik, Mitteilung Internationale Vereinigung Fuer Theoretische unde Amgewandte Limnologie, 9, 39 p,

Van Wyk, P,, Scarpa, J,, 1999, Water quality and management, In: van Wyk, P, (Ed,), Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems, Florida department of agriculture and consumer services, Tallahassee (FL), pp, 141–161,

Vergara, C,, Jeison, D,, Muñoz, R,, Campos, J,L,, Seeger, M,, 2016, In Fl Uence of Light Intensity on Bacterial Nitrifying Activity in Algal- Bacterial Photobioreactors and Its Implications for Microalgae-based Wastewater Treatment, vol, 114, pp, 116–121, https://doi,org/10,1016/j,ibiod,2016,06,006,

Verni, F,, Gualtieri, P,, 1997, Feeding behaviour in ciliated protists, Micron 28, 487–504, https://doi,org/10,1016/S0968-4328(97)00028-0

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,

Wasielesky, W,, Abreu, P,C,, Poersch, L,H,, Thompson, F,, Ballester, E,L,C,, 2012, Influence of light intensity on biofilm formation and the performance of pink shrimp Farfantepenaeus paulensis juveniles reared in cages, Aquac, Res, 43, 706–712, https://doi,org/10,1111/j,1365-2109,2011,02878,x,

Welschmeyer, N,A,, 1994, Fluorometric analysis of chlorophyll a in the presence of chlorophyll b and pheopigments, Limnol, Oceanogr, 39, 1985–1992, https://doi,org/ 10,4319/lo,1994,39,8,1985,

Wright, R, T, A model for short-term control of the bacterioplankton by substrate and grazing, Hydrobiologia, v, 159, p, 111-117, 1988,

Yta, A,G,, Rouse, D,B,, Davis, Da, 2004, Influence of nursery period on the growth and survival of Litopenaeus vannamei under pond production conditions, J, World Aquac, Soc, 35, 357–365, https://doi,org/10,1111/j,1749-7345,2004,tb00099,x,

ZAR, J,H,, 2010, Biostatistical Analysis, Prentice Hall, Upper Saddle River,

Zhang, K,, Pan, L,, Chen, W,, Wang, C,, 2017, Effect of Using Sodium Bicarbonate to Adjust the pH to Different Levels on Water Quality, the Growth and the Immune Response of Shrimp Litopenaeus vannamei Reared in Zero-Water Exchange Bioflocbased Culture Tanks, pp, 1194–1208, https://doi,org/10,1111/are,12961,

Zhang, X, Watanabe, M,M,,, National, 1996, Light and Electron Microscopy of Grazing By 46, 37–46,

8. CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos nos diferentes experimentos da presente tese colaboram para o desenvolvimento de um pacote tecnológico para a produção de camarões em ambientes sem abundância de luz natural e os empreendimentos em estufas. Desse modo, com os experimentos realizados podemos concluir que:

1) A luz artificial suplementar com comprimento de onda verde influência positivamente o processo de nitrificação, a comunidade de microrganismos, refletindo sobre o desempenho zootécnico do camarão *L. vannamei.* Portanto, o mais indicado para o cultivo de camarões em sistemas de BFT internos, como galpões é o comprimento de onda verde.

2) O uso de luz LED verde em diferentes fotoperíodos não influência na qualidade de água.

3) À luz LED com fotoperíodo de 8 horas de luz verde e 16 horas de escuro influência positivamente a comunidade de microrganismos, a capacidade antioxidante, o dano oxidativo (peroxidação lipídica) e o desempenho zootécnico de *L. vannamei.* Logo, o fotoperíodo mais indicado para o cultivo do *L. vannamei* em sistemas internos com luz verde LED é 8/16.

4) A restrição parcial de luz natural não influência no desempenho zootécnico do *L, vannamei.*

5) O uso de restrição parcial para o sistema de cultivo em BFT influência, positivamente qualidade de água, na abundância dos microrganismos, quando comparado ao controle. Dessa forma, a restrição parcial de luz pode ser indicada para o cultivo do *L. vannamei* em sistema BFT.