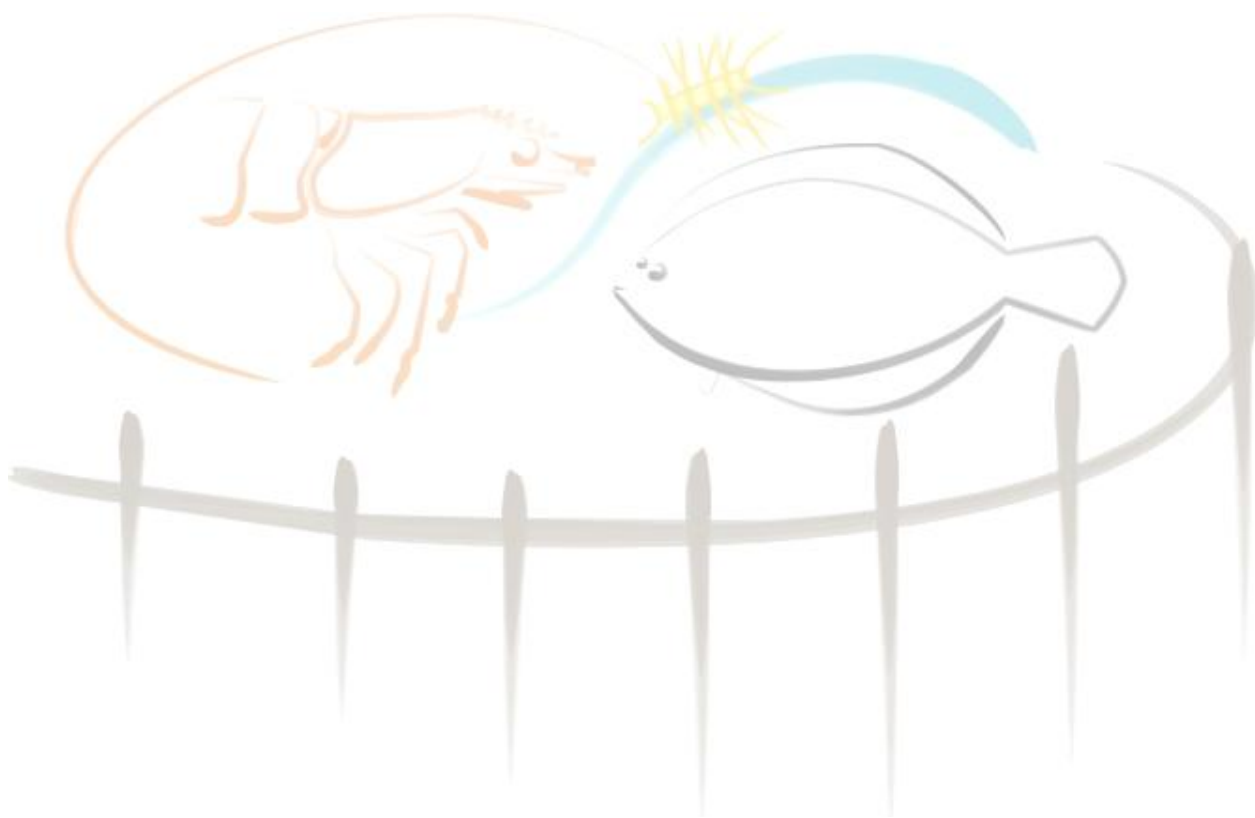


UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA



**TÉCNICAS DE MANEJO APLICADAS À REDUÇÃO DAS
CONCENTRAÇÕES DE NITRITO NA ÁGUA DE CULTIVO DE
Litopenaeus vannamei EM SISTEMA DE BIOFLOCOS**

Gabriele Rodrigues de Lara

Rio Grande, 2012

Universidade Federal do Rio Grande
Instituto de Oceanografia

**Técnicas de manejo aplicadas à redução das concentrações de nitrito
na água de cultivo de *Litopenaeus vannamei* em sistema de bioflocos**

Aluna: Gabriele Rodrigues de Lara

Orientador: Prof. Dr. Wilson Wasielesky Jr.

Co-Orientador: Prof. Dr. Luís Henrique Poersch

Dissertação apresentada
como parte dos requisitos para
obtenção do grau de mestre em
Aqüicultura no Programa de Pós
Graduação em Aqüicultura da
Fundação Universidade Federal do
Rio Grande

Rio Grande, RS
Março de 2012

ÍNDICE:

Agradecimentos	i
Resumo Geral	1
Abstract	2
Introdução Geral	4
Objetivo Geral	8
Objetivos Específicos	8
Referências Bibliográficas	10
CAPÍTULO I: Influência da utilização de diferentes quantidades de substratos artificiais e do reuso da água na metabolização dos compostos nitrogenados no cultivo de <i>Litopenaeus vannamei</i> em sistema de bioflocos	
Resumo	15
Abstract	16
Introdução	17
Materiais e Métodos	18
Resultados	21
Discussão	29
Conclusões	37
Referências Bibliográficas	38
CAPÍTULO II: Efeito da adição de nitrito de sódio e da utilização de biofilme na metabolização dos compostos nitrogenados no cultivo de <i>Litopenaeus vannamei</i> em sistema de bioflocos	
Resumo	45
Abstract	46
Introdução	47
Materiais e Métodos	48
Resultados	52
Discussão	55
Referências Bibliográficas	60
Conclusões Finais	65

AGRADECIMENTOS:

Primeiramente, a pessoa que mais preciso agradecer é meu orientador, amigo, conselheiro e exemplo Prof. Dr. Wilson Wasielesky Jr., sem o teu apoio estes últimos dois anos não teriam sido tão especiais e com a certeza de que “there’s nothing you can do that can’t be done”. Obrigada por tudo, para sempre!

Em segundo lugar, ao Prof. Dr. Luís Poersch, por ter me “adotado” como co-orientada. Pelo apoio, pelas risadas e também pelos puxões de orelha, que tanto me fizeram aprender.

Aos meus colegas e amigos Dariano Krummenauer, Geraldo Fóes e Carlos Gaona, por terem sido meu suporte e meus guias, além dos ótimos momentos compartilhados durante esta trajetória.

Aos colegas de laboratório e amigos, Bárbara, Faby, Camu e Plínio (pela ajuda durante os experimentos e pela companhia de sempre). Aos demais amigos e colegas do Projeto Camarão: Luciano, Plínio, Mércia, Alessandro, Tatiana, André, Vita, Guilherme, Priscila, Ana Luiza, Marcos, Diogo, Sabrina, Kássio, William, Mariana, Joaquin pela convivência diária e pelo grupo que formamos ao longo desse período.

A toda à grande família da EMA, pessoas com as quais dividi muitos momentos, pelo apoio, pela parceria, pelos papos e risadas na sala do café, bolos de aniversário, churrascos e principalmente por ter certeza de que em nenhum outro lugar a rotina diária é tão prazerosa quanto aqui. Em especial, aos amigos de todas as horas: Okamoto, Ricardo, Gabriel, Shei, Janaína, Cíntia, Adriana (Shakirita), Vivi, Angélica, Vika, Léo, Paula Beck, Paquito, Renatão e Camila, Iuri, Juan, Fábio, Mamute, Emeline, Marta, Fernanda, Lise, Michelle, Mateus, entre tantos outros que passam pela EMA o tempo todo e sempre deixam boas lembranças. Aos técnicos e funcionários da EMA: Nero, Lúcio, Fabiano, Anderson, Ana Paula, Getúlio, Pilenghi e Sandro, em especial, por deixar invadir o laboratório de análises químicas, e pelas horas de conversa e ajuda. Aos professores Marcelo Tesser, Luís Romano, Paulo Abreu, Mário Chim, Luciano Garcia e Ricardo Robaldo, pelos ensinamentos somados aos momentos alegres que dividi com todos. À minha amiga-irmã-marida Fabiane Führ, pelos 4 anos de convivência, por estar presente nos momentos mais felizes e mais difíceis da minha vida, pelo apoio e pelo abraço amigo de todos os dias. Às minhas outras biólogas preferidas Tamyris, Cássia, Regina e Luara, por ter o prazer de continuar compartilhando minha vida com vocês, mesmo depois da graduação. Aos amigos do Cassinão: Juliana, Gabriela, Renan, Alexandre e Pirula sempre dispostos a alegrar meus dias. Às queridíssimas Andréa e Lola, por sempre estarem presentes com palavras de carinho e amizade. Aos amigos de David, que sempre provam que amizade é o amor que nunca morre: Simone, Suelen, Rugles, Fernanda, Michele, Heleno, Raul e Bárbara. Ao Titi, que sempre esteve por perto nesses dois últimos anos, independente da distância.

À minha mãe, por sempre ter acreditado nos meus objetivos e me apoiado, incondicionalmente. Meus irmãos Marcelo e Maurício, minha irmã Patrícia, meu primo mais irmão que primo Humberto, e minha sobrinha Letícia, que chegou para encher ainda mais nossas vidas de alegria. Ao meu pai, que, enquanto esteve aqui sempre se orgulhou de mim, o meu agradecimento especial, aonde quer que você esteja agora.

À Prof. Dr. Roberta Soares Borda, por ter aceitado fazer parte da banca examinadora.

Às agências de fomento (CNPq, CAPES e FAURG) pelas bolsas durante o mestrado.

Enfim, agradeço a todos os que contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal ao longo do período do mestrado. Muito obrigada!

RESUMO GERAL:

Nos cultivos intensivos de organismos aquáticos, o acúmulo de compostos nitrogenados pode ocasionar efeitos negativos, afetando o crescimento e a sobrevivência dos animais. Nos sistemas BFT (Biofloc Technology System) os produtos nitrogenados são transformados pelas comunidades bacterianas autotróficas e heterotróficas em proteína microbiana. Vários estudos relatam a efetividade da utilização de substratos artificiais para fixação de biofilme, a reutilização de água de ciclos de cultivo anteriores, e a adição de sais, como o nitrito de sódio (NaNO_2), como técnicas de manejo que contribuem para a dinâmica dos compostos nitrogenados dentro do sistema BFT, seja pela estimulação da formação dos bioflocos, aumento da área de superfície para desenvolvimento da comunidade microbiana ou como fonte de nutrientes para o crescimento da mesma. Assim, na tentativa de verificar qual dessas técnicas é a mais eficiente, o objetivo dos capítulos a serem apresentados é testar simultaneamente diferentes metodologias no cultivo de *Litopenaeus vannamei* em sistema BFT. Desta forma, foram realizados dois experimentos. No primeiro, quatro tratamentos foram confrontados, todos com três réplicas e em sistema de bioflocos: (Controle) sem adição de substratos artificiais e sem reutilização de água de cultivo prévio; (200%) adição de 200% de substratos artificiais; (400%) adição de 400% de substratos artificiais; (Reuso) com reutilização de água de um cultivo prévio e sem adição de substratos artificiais. No segundo, também foram utilizados quatro tratamentos: (T1) adição de NaNO_2 durante 20 dias antes da estocagem e sem substratos artificiais para fixação de biofilme; (T2) adição de nitrito NaNO_2 durante 20 dias antes da estocagem e com adição de 150% de substratos artificiais; (T3) adição de NaNO_2 no dia da estocagem e sem substratos artificiais; e (T4) adição de NaNO_2 no dia da estocagem e com adição de 150% de substratos artificiais. Em ambos os experimentos, foi realizado o acompanhamento da temperatura, oxigênio dissolvido, pH, amônia e nitrito, diariamente. Semanalmente, foram analisados parâmetros como nitrato, alcalinidade, fosfato e também o acompanhamento do desenvolvimento dos bioflocos, através dos sólidos suspensos totais, volume dos bioflocos (cone ImHoff) e turbidez da água. Biometrias foram realizadas ao longo dos estudos para verificar o ganho de peso dos animais, bem como ajustar as quantidades de ração fornecidas aos camarões. Os resultados obtidos comprovam que o biofilme possui um papel importante nos processos de nitrificação, e que a quantidade de substratos artificiais adicionados aos tanques de cultivo pode influenciar na estrutura da comunidade microbiana que faz a remoção de nitrogênio na

forma de amônia no sistema BFT. Além disso, no primeiro estudo a reutilização de água foi a técnica mais efetiva na tentativa de manter a amônia e o nitrito próximos a valores nulos durante todo o período de cultivo. A adição prévia de nitrito de sódio pareceu não influenciar nas taxas de nitrificação dentro do sistema, porém o que se observou foi uma formação mais rápida e volumosa de bioflocos ao adicionar este composto, independente do tempo de maturação da água para cultivo. A biomassa final dos camarões foi afetada pela quantidade de sólidos suspensos totais em ambos os experimentos, nos tratamentos em que essa variável manteve-se sob controle, principalmente aonde houve adição de substratos artificiais para fixação de biofilme, os resultados de biomassa final foram melhores. Portanto, na tentativa de manutenção de melhores níveis de qualidade de água para o cultivo superintensivo de *Litopenaeus vannamei* com mínima troca de água, a reutilização de água juntamente com a adição de superfície extra para a fixação do biofilme e o controle de sólidos suspensos totais são essenciais para que se obtenham melhores resultados.

ABSTRACT:

In superintensive cultures, the nitrogen may bring negative effects, affecting the growth and survival of cultured animals. In Biofloc Technology System (BFT) more toxic nitrogen by-products to animals are transformed by the action of autotrophic and heterotrophic bacterial communities that metabolize these compounds, converting the nitrogen excess in microbial protein. Several studies have reported the effectiveness of the use of artificial substrates for fixing of the biofilm, water reuse of previous cycles of culture, and the addition of salts like sodium nitrite (NaNO_2). These management techniques contribute to the dynamics of the nitrogen compounds within BFT system, either by the stimulation of formation of bioflocs, increased surface area for the development of microbial community as a source of nutrients for their growth. Thus, in an attempt to determine which of these techniques is more efficient to reduce nitrite concentrations, the objectives of the chapters are to test simultaneously different methods in *Litopenaeus vannamei* cultured in BFT system. Therefore, two experiments were conducted: In first, four treatments were compared, all with three replicates and in BFT system (Control) without addition of artificial substrates and without reuse of water from a prior culture, (200%) addition of 200% of artificial substrates, (400%)

addition of 400% of artificial substrates, (Reuse) with reuse of water from a previous culture and without addition of artificial substrates. In the second, it were also used four treatments: (T1) addition of NaNO_2 for 20 days before storage and without artificial substrates for biofilm attachment, (T2) addition of nitrite NaNO_2 for 20 days before storage and 150% of artificial substrates, (T3) addition of NaNO_2 on the day of storage and without artificial substrates, and (T4) addition of NaNO_2 on the day of storage and addition of 150% of artificial substrates. In both experiments it was monitored temperature, dissolved oxygen, pH, ammonia and nitrite daily. Weekly, parameters were analyzed as nitrate, alkalinity, phosphate, and also to observe the development of bioflocs trough suspended solids, bioflocs volume (Imhoff cone) and water turbidity. Sampling was done over the studies to verify the weight gain of animals as well as adjust the quantities of feed to shrimps. The results showed that biofilm plays an important role in processes of nitrification and the amount of artificial substrate added to the culture tanks may influence the removal of nitrogen in the form of ammonia in the BFT system. Furthermore, in the first study reuse of water was the most effective technique in trying to maintain ammonia and nitrite near zero values during the entire period of culture. The previous addition of sodium nitrite not appear to influence the rates of nitrification within the system, but it was noted that a quick formation of bioflocs adding this compound regardless of maturation of water for culture. The final biomass of shrimp was affected by the amount of suspended solids in both experiments. In treatments which this variable was kept under control, especially where there was addition of artificial substrates, the results of final biomass were better. Therefore, in attempt to maintain better water quality for superintensive *Litopenaeus vannamei* culture with minimal water exchange, the reuse of water with the addition of extra surface for the attachment of bacteria and control of suspended solids is essential in order to obtain superior results.

INTRODUÇÃO GERAL:

O ciclo do nitrogênio ocorre em vários ambientes, como solos, oceanos, lagos e sistemas de produção de organismos aquáticos, como viveiros, tanques e aquários e ocorre devido à ação de uma ampla gama de bactérias, que utilizam os compostos nitrogenados de acordo com seu metabolismo. Os efeitos tóxicos desses compostos nitrogenados a curto e longo prazo, principalmente da amônia e do nitrito, são reportados por diversos autores, possuindo influência no consumo de oxigênio, excreção, resposta imune, taxa de crescimento e muda, taxa de conversão alimentar e sobrevivência para diversas espécies de camarões. (Chen & Chen 1992; Cheng & Chen 1998; Alcaraz et al. 1999; Tseng & Chen 2004; Miranda-Filho et al. 2009; Schuler et al. 2010, Vinatea et al. 2010). O nitrato é a forma nitrogenada menos tóxica para a maioria dos organismos aquáticos, assim, mesmo representando grande parte do nitrogênio dissolvido na água, geralmente não atinge concentrações prejudiciais aos animais. Além disso, o acúmulo destes nitrogenados em ambientes de cultivo pode ser uma fonte de nutrientes que causa a eutrofização dos ambientes que recebem os efluentes do cultivo, afetando o equilíbrio desses ambientes (Philips et al. 2002).

Nas últimas décadas, tecnologias avançadas como os sistemas de recirculação de água ou o sistema de bioflocos (Biofloc Technology System - BFT) tem surgido como alternativas para aumentar a produtividade, sem que sejam necessários gastos exacerbados com captação e renovação de água, bem como na eliminação constante de efluentes para os ambientes adjacentes (De Schryver & Verstraete 2009). O sistema BFT oferece a possibilidade de utilizar elevadas densidades de estocagem na produção de diferentes espécies de organismos aquáticos (Avnimelech et al. 2007; Arnold et al. 2009; Krummenauer et al. 2011a; Foes et al. 2011). Isso se deve basicamente pela assimilação dos compostos nitrogenados (amônia, nitrito e nitrato) pela biomassa microbiana formada dentro do ambiente de cultivo (Ebeling et al. 2006) o que também serve como fonte suplementar de alimento, dependendo da habilidade da espécie cultivada em aproveitar a produtividade natural do sistema (Wasielesky et al. 2006; De Schryver et al. 2008).

Porém, o aumento das densidades de estocagem acarreta em um maior acúmulo de nitrogenados ao longo do cultivo proveniente da excreção dos animais, bem como da decomposição da matéria orgânica, proveniente das fezes e dos restos de ração (Azim et al. 2003; Avnimelech 2007). Como o princípio básico do sistema BFT é a mínima ou

nenhuma renovação de água, a tendência é que, dependendo do equilíbrio entre os processos de assimilação de nitrogênio, estes compostos alcancem concentrações tóxicas ou letais para os organismos cultivados, o que pode inviabilizar a produção. Para que isso não ocorra, técnicas de manejo e acompanhamento da dinâmica dos cultivos tem sido estudadas e adotadas nas últimas décadas para o melhor funcionamento do sistema, como por exemplo, a relação C:N ideal para o desenvolvimento das comunidades microbianas (Azim et al. 2008), utilização de diferentes fontes de carbono (Crab et al. 2010), atividade fotossintética e respiração dos microorganismos no sistema (Vinatea et al. 2010), caracterização das comunidades microbianas presentes nos cultivos BFT e controle de sólidos suspensos totais (Ray et al. 2010a, 2010b; Ray et al. 2011; Gaona et al. 2012).

Segundo Ebeling et al. (2006), a remoção de amônia nos sistemas com limitada troca de água ainda possui algumas lacunas no seu entendimento. Na realidade, o que parece ocorrer é uma mistura das vias de remoção baseadas em organismos fotoautotróficos, bactérias autotróficas e bactérias heterotróficas. No entanto, as bactérias heterotróficas e autotóxicas parecem ter um papel mais significativo na manutenção da qualidade da água no sistema BFT. O processo heterotrófico baseia-se na remoção do nitrogênio amoniacal pela incorporação em biomassa bacteriana, podendo ser aprimorado pela adição de carbono na forma de carboidrato. No processo autotrófico, 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, e posteriormente a nitrato. 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 tanques, levando a um distúrbio nas vias de remoção da amônia.

No sistema BFT, o objetivo é fazer a assimilação direta do nitrogênio em biomassa bacteriana, sem que o processo de nitrificação feito pelas bactérias autotróficas ocorra (Hargreaves, 2006). Contudo, nem sempre esse processo ocorre naturalmente apenas com a alteração da relação C:N. De fato, observa-se que a mescla entre as duas vias de remoção da amônia se sobrepõem, em algum momento do cultivo. Isso pode se dar devido à competição por substrato entre os grupos de bactérias, variação nas concentrações de oxigênio dissolvido na água e controle dos sólidos em suspensão (Ebeling et al. 2006). Rios da Silva (2009) observou que em cultivos de

Litopenaeus vannamei em sistema BFT, as bactérias nitrificantes possuem maior eficiência na remoção do nitrogênio, porém levam maior tempo para metabolizar a amônia, devido à sua lenta taxa de crescimento. Assim, se as bactérias heterotróficas não estiverem presentes nas fases iniciais do cultivo, pode ocorrer um aumento nas concentrações de amônia, e já que as bactérias autotróficas possuem um crescimento mais lento a tendência é haver um acúmulo inicial deste composto. Além disso, se a via autotrófica chegar a dominar o sistema, a amônia pode ser oxidada a nitrito, pelas bactérias Amônia-Oxidantes (AOB), que em sua maioria pertencem aos gêneros *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus* e *Nitrosovibrio*.. Porém, as bactérias que fazem a oxidação do nitrito a nitrato (Nitrito-Oxidantes ou NOB), que em sua maioria pertencem aos gêneros *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira* e *Nitrospina*, possuem um crescimento mais demorado do que as AOB, levando a um acúmulo ainda maior de nitrito no sistema.

Assim sendo, dependendo do balanço entre as taxas de formação e transformação do nitrito dentro do sistema, que dependem das características que formam o nitrito no sistema e da remoção feita pelos microorganismos (Philips et al. 2002), pode ocorrer um acúmulo deste composto, causando prejuízos dentro do sistema. Para evitar perdas com a produção relacionadas aos efeitos tóxicos dos compostos nitrogenados no sistema de bioflocos, algumas alternativas tem sido propostas a fim de manipular os ambientes de cultivo para o desenvolvimento de determinados grupos de bactérias que sejam ativas na absorção do nitrogênio, mantendo os preceitos de uma aquicultura ambientalmente amigável.

A reutilização de água é uma técnica que tem se mostrado viável na manutenção dos níveis de amônia e nitrito abaixo das concentrações que afetam os animais cultivados. Segundo Krummenauer et al. (2011b), o reuso de um inoculo mínimo de 2,5% de água de um cultivo anterior acelerou a formação dos agregados microbianos, contribuindo para a manutenção da qualidade da água no sistema. Outros autores como Gaona et al. (2012) evidenciam que o reuso de parcelas de água com bioflocos já formados, somado ao controle dos níveis de sólidos suspensos totais no sistema foram efetivos para a manutenção das concentrações de nitrito abaixo das que afetam negativamente os camarões. Além disso, a reutilização de água é uma técnica que pode reduzir custos com bombeamento de água, insumos e tratamento de efluentes nos sistemas de produção aquícolas. Além disso, nos cultivos, aproximadamente 40% do

nitrogênio que entra no sistema por meio da ração que é ofertada é incorporado em biomassa, enquanto que outros 40% do nitrogênio permanece dissolvido na água, o que acaba gerando um efluente altamente carregado em nitrogenados (Rios da Silva, 2009). Com a reutilização da água, surge a possibilidade de reciclar os nutrientes que permanecem na água, evitando a emissão de grandes cargas de nutrientes para o ambiente.

O biofilme pode ser definido como uma comunidade microbiana associada a uma matriz orgânica, aderida naturalmente em qualquer superfície submersa. A adição de substratos artificiais para fixação de bactérias pode aumentar o crescimento e reduzir as taxas de conversão alimentar em sistemas intensivos (Moss & Moss 2004). O biofilme formado nos substratos é composto de organismos que pertencem à dieta natural de várias espécies de camarões peneídeos, podendo assim servir como complemento alimentar para os animais (Ballester et al. 2007). Além disso, a adição de substratos contribui também para a melhoria na qualidade de água, e também na prevenção de bactérias patogênicas, devido à predação destas por protozoários, reduzindo assim o risco de propagação de doenças nos cultivos (Thompson et al. 2002). Arnold et al. (2009) utilizando diferentes quantidades de substratos em cultivos de *Penaeus monodon* comprovaram que as concentrações de amônia e nitrito foram significativamente menores com a adição de substratos, sendo provável que o biofilme forneça área de superfície para a fixação de bactérias quimioautotróficas, principais responsáveis pelos processos de nitrificação. Durante o desenvolvimento do biofilme, a composição microbiana inicial influencia a dinâmica da população subsequente e a eficiência da nitrificação microbiana na água (Okabe et al. 1996).

Recentemente, protocolos para a adição de cloreto de amônia e de nitrito de sódio têm sido testados a fim de acelerar o processo de formação dos bioflocos e também, fornecer substrato para que as bactérias nitrificantes se desenvolvam na água, similar ao que é realizado na maturação de biofiltros nos sistemas de recirculação. A adição de cloreto de amônia parece ter resultado em uma maior produção de volume de bioflocos, e auxiliado na metabolização deste composto pelas bactérias além de contribuir com a maturação do biofilme (Miranda, 2009; Sesuk et al. 2009). Já a introdução de nitrito de sódio, parece ter contribuído para um rápido crescimento e estabelecimento das bactérias nitrito oxidantes no sistema e reduzido os problemas com as elevadas concentrações de nitrito dissolvido na água durante o ciclo de cultivo

(Otoshi et al., 2011). Porém, pouco ainda se sabe sobre a influência da adição de sais no cultivo BFT e sua real eficácia na redução das concentrações de nitrito, visto que não foi desenvolvido um protocolo claro que determinasse as concentrações e periodicidade de adição.

Contudo, apesar dos vários estudos realizados na tentativa de remover os compostos nitrogenados mais tóxicos, principalmente o nitrito, ainda não foram testadas simultaneamente técnicas para avaliar a mais efetiva na metabolização desses compostos. Além disso, avaliar qual das técnicas é a mais indicada para o cultivo BFT sem que o crescimento dos animais seja comprometido, com redução da necessidade de água, bem como da potencial carga de nutrientes gerada pelo efluente do cultivo.

OBJETIVO GERAL:

O presente trabalho visa desenvolver técnicas aplicadas à redução das concentrações de nitrito no cultivo de *Litopenaeus vannamei* em sistema de bioflocos e analisar comparativamente qual dessas técnicas é mais eficiente na manutenção deste composto abaixo dos níveis que afetem o desempenho e a sobrevivência dos camarões no cultivo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se o incremento na quantidade de substratos artificiais para fixação de biofilme (200% e 400% da área lateral dos tanques) influencia no processo de remoção do nitrogênio amoniacal e posteriores transformações deste composto no cultivo de *Litopenaeus vannamei* em sistema de bioflocos;
- Comparar o reuso de uma parcela de 25 % de água contendo bioflocos de um ciclo de cultivo de camarões anterior aos tratamentos com adição de substratos artificiais e verificar qual deles possui maior eficiência na remoção do nitrogênio amoniacal no cultivo de *L. vannamei* no sistema BFT;
- Avaliar se a adição de nitrito de sódio (NaNO_2) anterior à estocagem dos camarões contribui para a formação de bioflocos e com o desenvolvimento de uma

comunidade microbiana que esteja apta a metabolizar os picos de nitrito no cultivo de *L. vannamei* em sistema de bioflocos;

- Analisar se a adição de substratos artificiais para fixação de biofilme, juntamente com a adição de nitrito de sódio (NaNO_2) contribui para o processo de remoção do nitrogênio amoniacal no cultivo de *Litopenaeus vannamei* no sistema BFT;
- Avaliar o crescimento, a conversão alimentar aparente, a sobrevivência e a biomassa final em cada tratamento, a fim de determinar qual das técnicas apresenta melhores resultados de desempenho zootécnico para a espécie.

Para que os objetivos acima propostos fossem atingidos, foram realizados dois experimentos que estão divididos em dois capítulos apresentados nesta dissertação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Alcaraz, G., Chiappa-Carrara, X., Espinoza, V., Vanegas, C., 1999. Acute toxicity of ammonia and nitrite to white shrimp *Penaeus setiferus* postlarvae. *J. World Aquacult. Soc.* 30, 90–97.
- Arnold, S.J., Coman, F.E., C.J. Jackson, S.A. Groves, 2009. High-intensity, zero-exchange production of juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*: An evaluation of artificial substrates and stocking density. *Aquaculture* 293,42-48.
- Avnimelech, Y., 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. *Aquaculture* 264,140-147.
- Azim, M.E., Verdegem, M.C.J., Mantingh, I., Van Dam, A.A., Beveridge, M.C.M., 2003. Ingestion and utilization of periphyton grown on artificial substrates by Nile tilapia *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture Research* 34, 85–92.
- Azim, M. E., Little, D. C., Bron, J. E., 2008. Microbial protein production in activated suspension tanks manipulating C:N ratio in feed and the implications for fish culture. *Bioresource Technology*, 99(9), 3590-3599.
- Ballester, E.L.C., Wasielesky, W., Cavalli, R.O., Abreu, P.C. 2007, Nursery of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* in cages with artificial substrates: Biofilm composition and shrimp performance. *Aquaculture* 269,355-362.
- Chen, J.C., Chen, S.F., 1992. Effects of nitrite on growth and molting of *Penaeus monodon* juveniles. *Comp. Biochem. Physiol.* 101 C, 453– 458.
- Cheng, S.Y., Chen, J.C., 1998. Effects of nitrite on the oxygen consumption and ammonia excretion of tiger shrimp *Penaeus monodon*. *J. Fish. Soc. Taiwan* 25, 209– 218.
- Crab, R., Chielens, B., Wille, M., Bossier, P., Verstraete, W., 2010. The effect of different carbon sources on the nutritional value of bioflocs, a feed for *Macrobrachium rosenbergii* postlarvae. *Aquac. Res.* 41, 559-567.

- De Schryver, P., Crab, T., Defroidt, N., Boon, W.V., 2008. The basics of bio-flocs technology: The added value for aquaculture. *Aquaculture* 277,125-137.
- De Schryver, P. & Verstraete, W., 2009. Nitrogen removal from aquaculture pond water by heterotrophic nitrogen assimilation in lab-scale sequencing batch reactors. *Bioresource Technol.* 100,1162–1167.
- Ebeling, J.M., Timmons, M.B., Bisogni, J.J., 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic and heterotrophic removal of ammonia – nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture* 257,346-358.
- Foes, G.K., Fores, C.N., Krummenauer, D., Poersch, L.H., Wasielesky, W., 2011. Nursery of pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* in biofloc technology culture system: survival and growth at different stocking densities. *Journal of Shellfish Research* 30(2), 367-373.
- Gaona, C.A.P., Poersch, L.H., Krummenauer, D., Foes, G.K., Wasielesky, W., 2012. The effect of solids removal on water quality, growth and survival of *Litopenaeus vannamei* in a biofloc technology culture system. *International Journal of Recirculating Aquaculture (Artigo Aceito para Publicação)*.
- Hargreaves, J.A., 2006. Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. *Aquacult. Eng.* 34,344–363.
- Krummenauer, D., Peixoto, S. Cavalli, R., Poersch, L.H., Wasielesky, W., 2011a. Superintensive culture of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in a biofloc technology system in southern Brazil at different stocking densities. *J. World Aquac. Soc.* 42(5),726:733.
- Krummenauer, D, C.A. Seifert, L.H. Poersch, G.K. Foes, G.R. Lara & W. Wasielesky. 2011. Cultivo de camarões marinhos em sistema de bioflocos: análise do reuso de água. *Atlântica (aceito para publicação)*
- Miranda-Filho, K. C., Pinho, G. L. L., Wasielesky, W., Bianchini, A., 2009. Long-term ammonia toxicity to the pink-shrimp *Farfantepenaeus paulensis*. *Comparative biochemistry and physiology.* 150(3), 377-82.

- Miranda, M.H., 2009. Influência da adição de amônia na velocidade de desenvolvimento dos flocos microbianos em cultivo heterotrófico do camarão branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei*. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Aquicultura, Universidade Federal do Rio Grande (PPGAq-FURG).
- Moss, K.K., Moss, S.M., 2004. Effects of artificial substrate and stocking density on the nursery production of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. J. World Aquac. Soc. 35, 536-542.
- Okabe, S., Oozawa, Y., Hirata, K., Watanabe, Y., 1996. Relationship between population dynamics of nitrifiers in biofilms and reactor performance at various C:N ratios. Water Res. 30, 1563–1572.
- Otoshi, C., Rodriguez, N., Moss, S., 2011. Establishing nitrifying bacteria in super intensive biofloc shrimp production. Global Aquac. Advocate 14(4), 24-26
- Philips, S., Laanbroek, H.J., Verstraete, W., 2002. Origin, causes and effects of increased nitrite concentrations in aquatic environments. Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 1, 115-141.
- Ray, A.J., Lewis, K.S., Browdy, C.L., Leffler, J.W., 2010a. Suspended solids removal to improve shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and an evaluation of a plant-based feed in minimal-exchange, superintensive culture systems. Aquaculture 299, 89-98.
- Ray, A.J., Seaborn, G., Leffler, J.W., Wilde, S.B., Lawson, A., Browdy, C.L., 2010b. Characterization of microbial communities in minimal-exchange, intensive aquaculture systems and the effects of suspended solids management. Aquaculture 310, 130-138.
- Ray, A.J., Dillon, K.S., Lotz, J.M., 2011. Water quality dynamics and shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production in intensive, mesohaline culture systems with two levels of biofloc management. Aquacult. Eng. 45, 127-136.

- Rios da Silva, K., 2009. Dinâmica do nitrogênio e do fósforo no cultivo superintensivo de *Litopenaeus vannamei* e *Farfantepenaeus paulensis* sem renovação de água. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Aquicultura, Universidade Federal do Rio Grande (PPGAq-FURG).
- Schuler, D. J., Boardman, G. D., Kuhn, D. D., Flick, G. J., 2010. Acute Toxicity of Ammonia and Nitrite to Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at Low Salinities. *Journal Of The World Aquaculture Society*, 41(3), 438-446.
- Sesuk, T., Powtongsook, S., Nootong, K., 2009. Inorganic nitrogen control in a novel zero-water exchanged aquaculture system integrated with airlift-submerged fibrous nitrifying biofilters. *Bioresource Technol.* 100(6), 2088-2094.
- Tseng, I.-T., Chen, J.-C., 2004. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under nitrite stress. *Fish Shellfish Immunol.* 17, 325–333.
- Vinatea, L., Gálvez, A.O., Browdy, C.L., Stokes, A., Venero, J., Haveman, J., Lewis, B.L., Lawson, A., Schuler, A., Leffler, J.W., 2010. Photosynthesis, water respiration and growth performance of *Litopenaeus vannamei* in a super-intensive raceway culture with zero water exchange: Interaction of water quality variables. *Aquacult. Eng.* 42,17-24.
- Wasielesky, W. J., Atwood, H.I, 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

Universidade Federal do Rio Grande
Programa de Pós Graduação em Aquicultura
Instituto de Oceanografia

CAPÍTULO I

Utilização de diferentes quantidades de substratos artificiais e do reuso da água na metabolização dos compostos nitrogenados no cultivo de *Litopenaeus vannamei* em sistema de bioflocos

Gabriele Rodrigues de Lara

O presente capítulo está apresentado de acordo com as normas para submissão da revista
Aquacultural Engineering

RESUMO

Nos ambientes aquáticos, o nitrito é uma substância potencialmente tóxica para os organismos que ali vivem. No cultivo em sistema de bioflocos onde a renovação de água é reduzida ou inexistente o nitrito pode causar impactos negativos na sobrevivência e crescimento de camarões cultivados. O presente estudo visa comparar simultaneamente diferentes técnicas de manejo para reduzir as concentrações de nitrito no cultivo de camarões da espécie *Litopenaeus vannamei* em sistema superintensivo, com mínima troca de água. Assim, quatro tratamentos foram confrontados, todos com três réplicas e em sistema de bioflocos: (Controle) sem adição de substratos artificiais e sem reutilização de água de cultivo prévio; (200%) adição de 200% de substratos artificiais; (400%) adição de 400% de substratos artificiais; (Reuso) com reutilização de água de um cultivo prévio e sem adição de substratos artificiais. O estudo foi realizado em tanques com volume útil de 800L durante 60 dias. Os animais foram estocados a uma densidade de estocagem de 300 camarões m², com peso médio inicial de 1,27g ($\pm 0,48$). Melaço líquido e farelo de arroz foram adicionados para promover o crescimento bacteriano e assim contribuir para a qualidade de água no sistema em todos os tratamentos. Foram medidos parâmetros físicos e químicos da água como temperatura, oxigênio dissolvido, pH e salinidade, bem como o acompanhamento dos compostos nitrogenados (amônia, nitrito e nitrato) além do volume de bioflocos, sólidos suspensos totais e a turbidez da água. A cada dez dias foi realizada uma biometria (n=30) para avaliar o ganho de peso dos camarões. Os dados de temperatura, oxigênio dissolvido, pH e salinidade não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos. As concentrações de amônia foram mais baixas no tratamento com reuso de água ($p < 0,05$) e não diferiram significativamente entre os outros três tratamentos ($p > 0,05$). As concentrações de nitrito ficaram próximas a valores nulos com reuso de água, e não apresentou diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos com adição de substratos artificiais. No tratamento controle o nitrito manteve-se mais elevado durante aproximadamente 40 dias do cultivo (acima de 20 mg.L⁻¹). Os resultados dos parâmetros zootécnicos ao final do experimento foram melhores nos tratamentos com aumento de substrato. Os dados obtidos no presente trabalho demonstram que a reutilização de água e a adição de substratos verticais contribuem para a manutenção das concentrações de nitrito abaixo dos níveis tóxicos para a espécie *L. vannamei* em sistema BFT.

ABSTRACT

In aquatic environments, nitrite is a potentially toxic substance for living organisms. In biofloc culture systems where water renewal is minimal or absent, nitrite may cause negative impacts on survival and growth of cultured shrimp. The present study aims to compare both different management techniques to reduce the concentrations of nitrite in *Litopenaeus vannamei* superintensive culture with minimal water exchange. Thus, four treatments were confronted, all with three replicates and in BFT system: (Control) without addition of artificial substrates and without reuse of water, (200%) addition of 200% of artificial substrates, (400%) addition of 400% of artificial substrates, (reuse) with reuse of water from a previous culture and without addition of artificial substrates. The study was carried out in 800L tanks during 60 days. The animals were stocked at a stocking density of 300 shrimp m², with a mean initial weight of 1.27 g (\pm 0.48). Liquid molasses and rice bran were added to promote bacterial growth and thus contribute to the water quality in all treatments. It was measured physical and chemical parameters as water temperature, dissolved oxygen, pH and salinity. Also was monitored the dissolved nitrogen compounds (ammonia, nitrite and nitrate) and bioflocs volume, total suspended solids and turbidity. Every ten days a biometry was performed (n = 30) to assess weight gain of shrimp. The data of temperature, dissolved oxygen, pH and salinity were not significantly different (p>0.05) between treatments. The ammonia concentrations were lower in the treatment with water reuse (p<0.05) and did not differ significantly between another treatments (p>0.05). The nitrite concentrations were close to null values when water was reused, and did not show differences between treatments with the addition of artificial substrates. In the control treatment nitrite remained higher for a long period of growing (above 20 mg.L⁻¹). The results of the performance parameters at the end of the experiment were better in treatments with increased substrate. The data obtained in this study demonstrate that the reuse of water and the addition of artificial substrates contribute to the maintenance of nitrite concentrations below toxic levels for *Litopenaeus vannamei* in BFT culture systems.

1. INTRODUÇÃO

A produção superintensiva de organismos aquáticos em sistema de bioflocos (Biofloc Technology System – BFT) é caracterizada por necessitar de pouca ou nenhuma renovação de água, elevadas densidades de estocagem e utilização da comunidade microbiana como alimento adicional, bem como atuando na manutenção da qualidade da água nos cultivos (Avnimelech 2009; De Schryver et al. 2008). A metabolização dos compostos nitrogenados tóxicos aos animais (principalmente amônia e nitrito) é realizada por uma ampla variedade de microorganismos, porém as bactérias heterotróficas e as bactérias autotróficas nitrificantes parecem ter maior importância nesse sistema (Ebeling et al 2006; Hargreaves 2006). O nitrito é um dos compostos tóxicos mais comuns nos sistemas de cultivo, e seu acúmulo pode ocorrer devido a um desequilíbrio nas taxas de nitrificação ou a um baixo aproveitamento deste composto pelas bactérias heterotróficas. (Ebeling et al. 2006; Mevel & Chamroux, 1981; Philips et al. 2002). Esse desequilíbrio na constituição das comunidades microbianas, aliado às elevadas densidades de estocagem utilizadas e ao grande aporte de nitrogênio, podem causar elevadas concentrações de nitrito no sistema. Essas concentrações acarretam efeitos tóxicos aos camarões cultivados a curto e longo prazo, podendo afetar o crescimento e a sobrevivência dos animais, causando prejuízos na produção (Lin & Chen 2003; Schuler & Boardman 2010; Vinatea et al. 2010). Como alternativas para tentar conter o aumento das concentrações de nitrito no sistema de bioflocos várias alternativas tem sido propostas (Arnold et al. 2009; Krummenauer et al. 2011b; Otoshi et al. 2011), porém, há necessidade de que sejam testadas ao mesmo tempo, a fim de definir qual seria a mais efetiva em relação à qualidade de água, mantendo o crescimento dos camarões cultivados. A reutilização de água tem sido empregada como a principal alternativa, visto que com uma quantidade mínima de água proveniente de um cultivo anterior pode-se manter os níveis de amônia e nitrito baixos durante todo o período de cultivo (Krummenauer et al. 2011b; McAbee et al. 2003; Samocha et al. 2010). Isso se deve basicamente pela presença das bactérias nitrificantes no inoculo de água utilizada, essas por sua vez, possuem uma taxa de crescimento mais lenta do que a das bactérias heterotróficas, portanto demorando mais tempo a aparecer no sistema (Hargreaves 2006). A utilização de substratos artificiais para aumentar a superfície de fixação de bactérias (biofilme) também se mostra como uma técnica na manutenção da qualidade de água no sistema de cultivo, já que um incremento na produção bacteriana contribui para a metabolização dos compostos, que podem ser reciclados dentro das

unidades de cultivo (Arnold et al. 2009; Thompson et al. 2002). Porém, ainda não foi definida a quantidade de necessária de aumento de área de superfície para que se faça um melhor aproveitamento do nitrogênio pelas bactérias ali presentes (Browdy et al. 2001) Além disso, estudos comprovam que tanto o reuso da água como a utilização de biofilme melhoram os índices zootécnicos dos camarões cultivados no sistema BFT, devido a uma maior produtividade natural, reduzindo as taxas de conversão alimentar e aumentando as taxas de crescimento e sobrevivência (Audelo-Naranjo et al. 2010; Ballester et al. 2007; Krummenauer et al. 2011b; Moss & Moss 2004; Zhang 2011). Assim, o estudo da contribuição dessas técnicas de manejo para o cultivo de *Litopenaeus vannamei* em sistema de bioflocos é de suma importância para alcançar melhores resultados, reduzindo a utilização de água, gastos com alimentação e perdas na produção devido aos efeitos tóxicos do nitrito. Dentro desse contexto, o objetivo do presente estudo é testar simultaneamente técnicas (reuso de água e diferentes quantidades de substrato) para manter as concentrações de nitrito abaixo dos níveis que afetem o crescimento e a sobrevivência de *Litopenaeus vannamei* em sistemas de bioflocos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Delineamento Experimental:

O experimento foi realizado no Laboratório de Carcinocultura pertencente ao Instituto de Oceanografia da Universidade Federal do Rio Grande (IO-FURG). Foram estocadas juvenis do camarão branco *Litopenaeus vannamei* com peso médio inicial de $1,27 \pm 0,48$ g a uma densidade de estocagem de 300 camarões m^{-2} equivalente a 525 camarões m^{-3} , em tanques com 800 L de volume útil, com 1,4 m^2 de área de fundo. O experimento teve duração de 60 dias.

Para o desenvolvimento deste estudo, foram utilizados quatro tratamentos, com três repetições cada: (Controle) cultivo em sistema de bioflocos, sem adição de substratos artificiais; (200%) cultivo em sistema de bioflocos e adição de 200% da área lateral dos tanques de substrato artificial; (400%) cultivo em sistema de bioflocos e adição de 400% da área lateral dos tanques de substrato artificial; (Reuso) cultivo em sistema de bioflocos com 25% de reutilização de água de um cultivo prévio.

A formação dos bioflocos seguiu as metodologias propostas por Avnimelech (1999) e Ebeling et al. (2006). Como fontes de carbono foram utilizados melaço líquido e farelo de arroz a fim de manter uma relação C:N de aproximadamente 6:1. Os camarões foram alimentados com ração comercial Guabi[®] com 38 % de proteína bruta fornecida duas vezes ao dia, sendo que as taxas de arraçoamento foram ajustadas de acordo com a metodologia proposta por Jory et al. (2001). Para a fixação do biofilme, foram utilizados substratos artificiais não flutuantes do tipo “Needlona[®]”. A porcentagem de substratos adicionada em cada tanque foi calculada de acordo com a área lateral dos tanques, sendo que os substratos foram fixados na parte superior das caixas e permaneceram submersos durante todo o período experimental.

A água com bioflocos utilizada no tratamento com reuso de água foi obtida de um tanque de cultivo superintensivo de *Litopenaeus vannamei* com 90 dias de duração. Foi utilizado um inoculo de 25% de água com bioflocos (aproximadamente 200 L) e o restante do volume dos tanques foi preenchido com água marinha filtrada, previamente clorada a 10 ppm e declorada com ácido ascórbico (1g para cada 1000 L de água). Nos demais tratamentos foi utilizada apenas água marinha filtrada, clorada e declorada, e sem adição de inoculo de bioflocos, apenas fertilizações orgânicas para posterior formação dos agregados ao longo do estudo.

2.2. Variáveis Físicas e Químicas da Água:

Durante os 60 dias experimentais foram monitoradas, duas vezes ao dia, as concentrações de oxigênio dissolvido e a temperatura da água, utilizando oxímetro digital (marca YSI[®], modelo 55). O pH foi analisado uma vez ao dia, durante a manhã, com o auxílio de um medidor de bancada (marca Mettler Toledo[®], modelo FE20). A salinidade foi analisada semanalmente, utilizando salinômetro refratômetro (Atago).

Diariamente foram feitas coletas de água para o acompanhamento das variações de amônia total (UNESCO, 1983) e nitrito na água (Strickland & Parsons, 1972). As concentrações de nitrato e fosfato da água foram analisadas semanalmente e também seguiram a metodologia proposta por Strickland & Parsons (1972). Também semanalmente, foram realizadas análises de alcalinidade de acordo com American Public Health Association (1989) e quando a alcalinidade alcançava valores abaixo de

200 mg/L e o pH atingia valores abaixo de 7,50 (concentração recomendada por Ebeling et al. 2006) foram feitos ajustes com cal hidratada seguindo a metodologia descrita por Furtado et al. (2011).

O volume dos bioflocos (mL.L^{-1}) dos tanques foi observado duas vezes por semana, com o auxílio de cones Imhoff seguindo a metodologia que foi adaptada por Avnimelech (2007). Para análise dos sólidos suspensos totais, foram coletadas amostras de 20 mL de cada tanque semanalmente para filtragem. O método de análise foi adaptado de Strickland & Parsons (1972), obtido pela diferença de peso seco inicial e final do material retido em filtro de $0,45 \mu\text{m}$ de porosidade. A turbidez (NTU) também foi analisada semanalmente, com o auxílio de turbidímetro digital (Marca Hach, Modelo 2100P).

2.3. Desempenho dos Camarões:

Uma biometria inicial ($n=100$) foi realizada para estimar o peso médio dos camarões a serem estocados em cada unidade experimental. No decorrer do experimento, foram feitas biometrias ($n=30$) a cada 10 dias para se avaliar o ganho de peso (g) e também para ajustar a quantidade de ração fornecida aos camarões. A sobrevivência foi avaliada ao final do experimento por meio da contagem dos animais de cada unidade experimental. A taxa de conversão alimentar aparente foi calculada pela relação entre o total de ração fornecido aos camarões e a diferença entre a biomassa final e a inicial em cada tratamento.

2.4. Análise Estatística:

Os dados coletados foram submetidos a análise de variância de uma via (ANOVA ONE WAY, $p < 0,05$) das variáveis medidas nos tratamentos. Todos os testes foram realizados após a confirmação da homogeneidade das variâncias (Levenes Test) e da normalidade dos dados (Kolmogorov-Smirnov Test). O teste de Tukey foi aplicado para detectar diferenças significativas entre os tratamentos.

3. RESULTADOS

3.1. Variáveis Físicas e Químicas da Água:

As médias dos resultados obtidos para a temperatura (°C), o oxigênio dissolvido (mg.L⁻¹), o pH e a salinidade (%) durante o período experimental nos diferentes tratamentos estão apresentadas na tabela 1. Não foram observadas diferenças significativas (p<0,05) para os parâmetros de temperatura, oxigênio dissolvido, pH e salinidade entre os quatro tratamentos.

Tabela 1 – Parâmetros físicos e químicos da água (médias ± desvio padrão) nos tratamentos Controle, 200% de adição de substrato artificial, 400% de adição de substrato artificial e Reuso de Água, durante o cultivo de *Litopenaeus vannamei* em sistema BFT.

Tratamento	Controle	200%	400%	Reuso
Temperatura (°C)	27,25 ± 1,97	28,15 ± 2,05	27,62 ± 1,80	26,88 ± 2,03
O.D. (mg.L ⁻¹)	6,07 ± 0,58	5,90 ± 0,51	5,98 ± 0,50	6,36 ± 0,51
pH	7,80 ± 0,24	7,86 ± 0,19	7,92 ± 0,13	7,86 ± 0,26
Salinidade	23,88 ± 2,01	24,93 ± 2,09	24,98 ± 1,96	25,97 ± 1,92

As médias dos resultados obtidos para os compostos nitrogenados (amônia, nitrito e nitrato) nos diferentes tratamentos são apresentadas na tabela 2. As concentrações médias de amônia total (mg.L⁻¹ N-AT) foram significativamente menores no tratamento com reuso de água, e não diferiram significativamente (p>0,05) entre os demais tratamentos. As concentrações de nitrito foram significativamente mais elevadas (p<0,05) no tratamento controle e significativamente mais baixas (p<0,05) no tratamento com reuso de água quando comparadas com os outros tratamentos. Porém, entre os tratamentos com adição de substratos artificiais, não foram observadas diferenças significativas (p>0,05) para as concentrações médias de nitrito dissolvido na água. Devido às concentrações de nitrito alcançarem valores muito maiores do que os ideais para a sobrevivência da espécie *Litopenaeus vannamei*, foi realizada uma renovação de 60% do volume da água dos tanques no tratamento “controle” no 30º dia experimental. As concentrações de nitrato apresentaram valores médios significativamente mais elevados no tratamento com reuso de água, seguidas pelos tratamentos controle e 200%, em que os valores médios de nitrato não diferiram entre si.

As concentrações de nitrato foram significativamente mais baixas ($p < 0,05$) no tratamento com adição de 400% de substratos artificiais.

Tabela 2 – Médias \pm Desvio Padrão dos valores de amônia (N-AT), nitrito (N-NO₂) e nitrato (N-NO₃) da água nos tratamentos Controle, 200% de adição de substrato artificial, 400% de adição de substrato artificial e Reuso de Água, durante o cultivo de *Litopenaeus vannamei* em sistema BFT.

Tratamento	Controle	200%	400%	Reuso
N-AT (mg.L ⁻¹)	0,64 \pm 1,46 ^a	0,72 \pm 1,59 ^a	0,55 \pm 1,27 ^a	0,04 \pm 0,06 ^b
N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	23,73 \pm 23,59 ^a	5,47 \pm 7,87 ^b	4,59 \pm 5,57 ^b	0,42 \pm 0,87 ^c
N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	27,22 \pm 32,05 ^a	14,55 \pm 22,68 ^a	2,55 \pm 3,47 ^b	47,11 \pm 25,95 ^c

Letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa

As figuras 1, 2 e 3 apresentam as variações médias para os compostos nitrogenados ao longo dos 60 dias experimentais nos diferentes tratamentos.

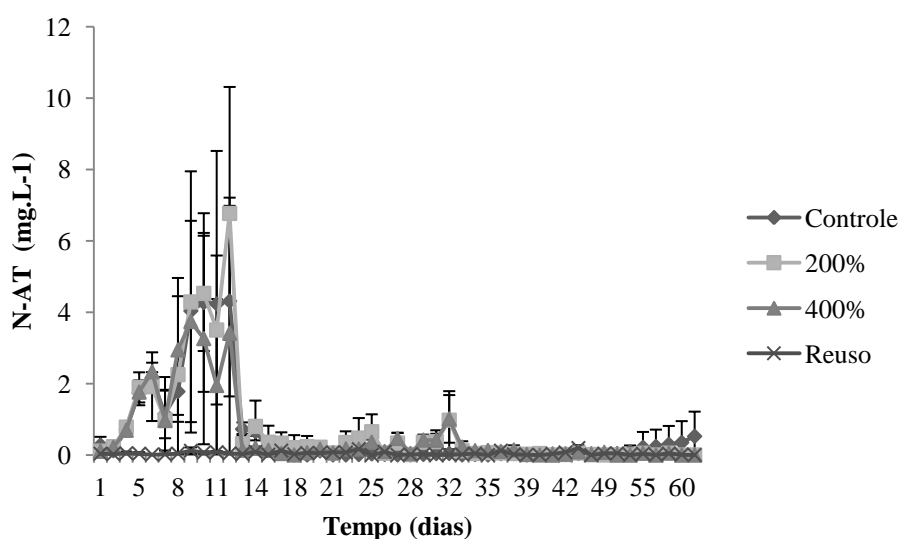


Figura 1 – Variações médias das concentrações de amônia total (mg.L⁻¹) nos tratamentos Controle, 200% de adição de substrato artificial, 400% de adição de substrato artificial e Reuso de Água, durante o cultivo de *Litopenaeus vannamei* em sistema BFT

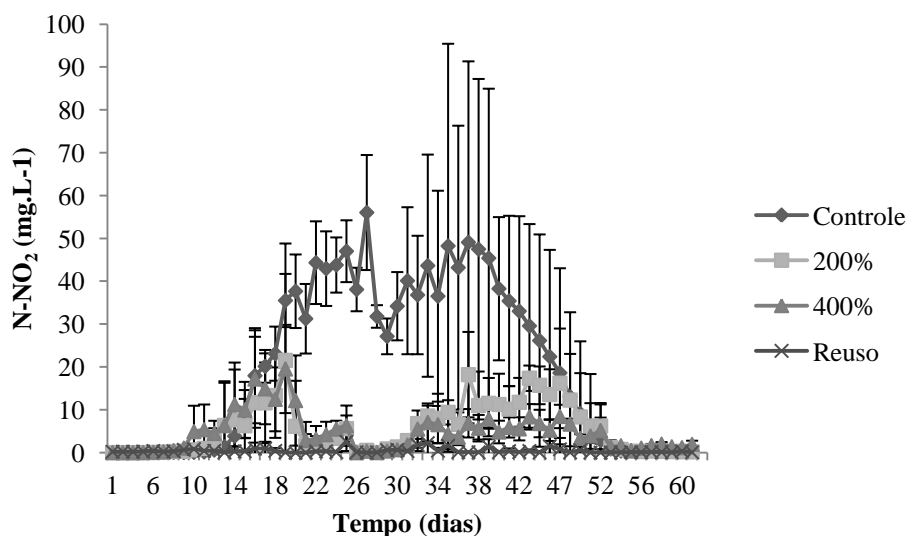


Figura 2 – Variações médias das concentrações de nitrito (mg.L^{-1}) nos tratamentos Controle, 200% de adição de substrato artificial, 400% de adição de substrato artificial e Reuso de Água, durante o cultivo de *Litopenaeus vannamei* em sistema BFT

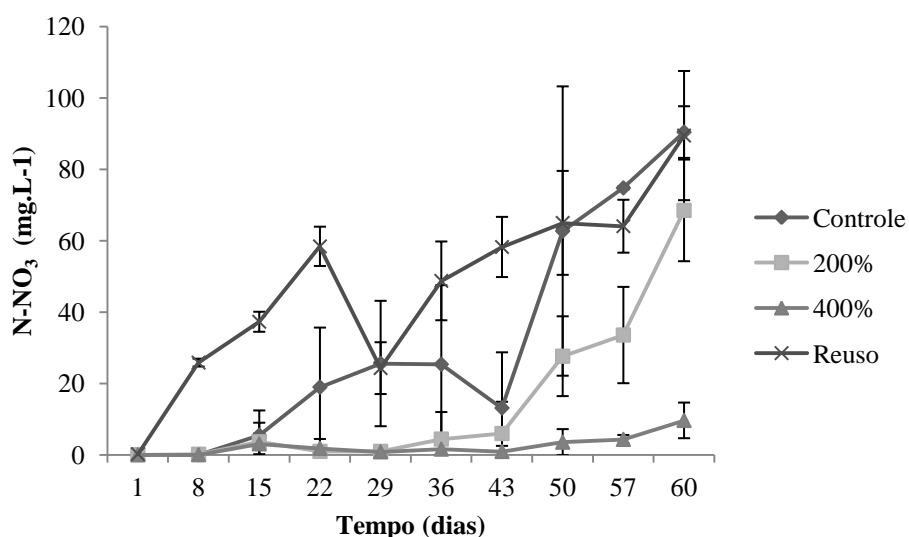


Figura 3 – Variações médias das concentrações de nitrato (mg.L^{-1}) nos tratamentos Controle, 200% de adição de substrato artificial, 400% de adição de substrato artificial e Reuso de Água, durante o cultivo de *Litopenaeus vannamei* em sistema BFT

O fosfato apresentou valores médios significativamente mais elevados ($p < 0,05$) nos tratamentos com adição de substratos artificiais, porém não houve diferença significativa ($p < 0,05$) estatística entre os dois tratamentos com substrato ($5,84 \pm 4,80 \text{ mg.L}^{-1}$ no tratamento “200%” e $6,11 \pm 4,80 \text{ mg.L}^{-1}$ no tratamento “400%”). As concentrações médias de fosfato foram significativamente menores ($p < 0,05$) nos tratamentos “reuso” ($3,26 \pm 1,84 \text{ mg.L}^{-1}$) e “controle” ($3,30 \pm 2,52 \text{ mg.L}^{-1}$) e não diferiram

significativamente entre si ($p < 0,05$). Na figura 4 são apresentadas as variações médias das concentrações de fosfato ao longo do experimento.

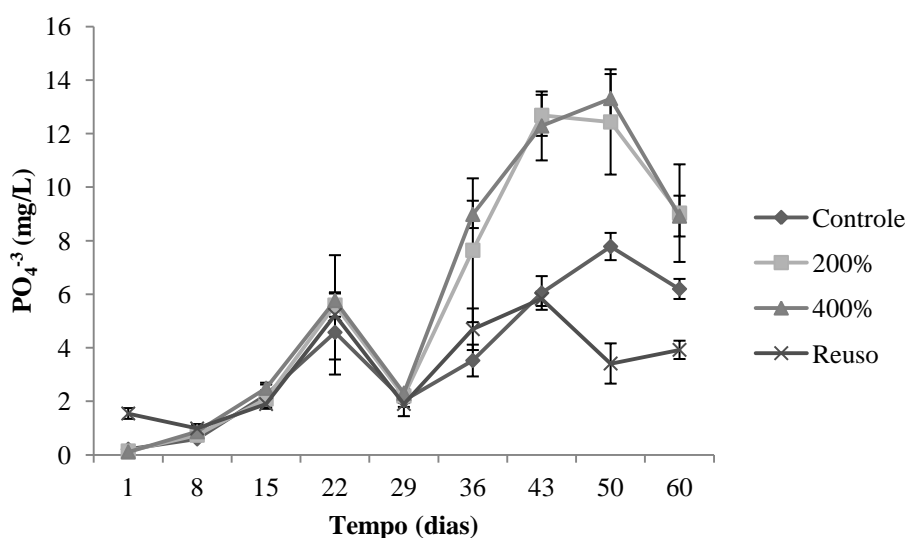


Figura 4 – Variações médias dos valores de fosfato (mg.L^{-1}) nos tratamentos Controle, 200% de adição de substrato artificial, 400% de adição de substrato artificial e Reuso de Água, durante o cultivo de *Litopenaeus vannamei* em sistema BFT

3.2. Sólidos Sedimentáveis, Sólidos Suspensos Totais e Turbidez

As variações médias nos sólidos sedimentáveis ou volume dos flocos (mL.L^{-1}) está apresentada na figura 5. Notou-se que no tratamento “Reuso”, a partir do 6º dia não foi mais possível fazer a observação dos mesmos, pois o material não sedimentava nos cones Imhoff. O mesmo aconteceu no tratamento “Controle” a partir do 45º dia experimental.

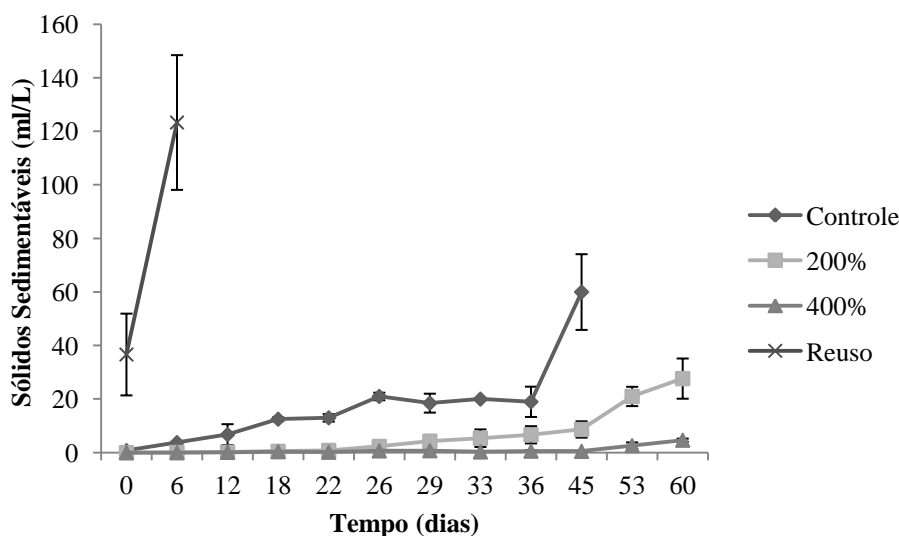


Figura 5 – Variações médias dos valores de sólidos sedimentáveis (ml.L^{-1}) nos tratamentos Controle, 200% de adição de substrato artificial, 400% de adição de substrato artificial e Reuso de Água, durante o cultivo de *Litopenaeus vannamei* em sistema BFT

Os valores médios de sólidos suspensos totais (mg.L^{-1}) e de turbidez (NTU) estão apresentados na tabela 3. Tanto os sólidos suspensos totais assim como a turbidez apresentaram valores médios mais elevados no tratamento “Reuso”, sendo que os tratamentos “Controle” e “200%” não apresentaram diferenças estatísticas entre eles para ambos os parâmetros. O tratamento “400%” foi o que apresentou os menores valores médios para sólidos suspensos totais e turbidez.

Tabela 3 – Valores médios (\pm desvio padrão) para sólidos suspensos totais (mg.L^{-1}) e turbidez (NTU) nos diferentes tratamentos durante os dias de cultivo

Tratamento	Controle	200%	400%	Reuso
SST (mg.L^{-1})	473,48 \pm 252,39 ^a	321,67 \pm 261,71 ^a	134,44 \pm 93,49 ^b	686,67 \pm 222,20 ^c
Turbidez (NTU)	191,85 \pm 128,73 ^a	116,54 \pm 108,81 ^a	24,98 \pm 27,05 ^b	322,72 \pm 137,95 ^c

Letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa

Nas figuras 6 e 7 são apresentadas as variações para os parâmetros acima citados ao longo do período experimental.

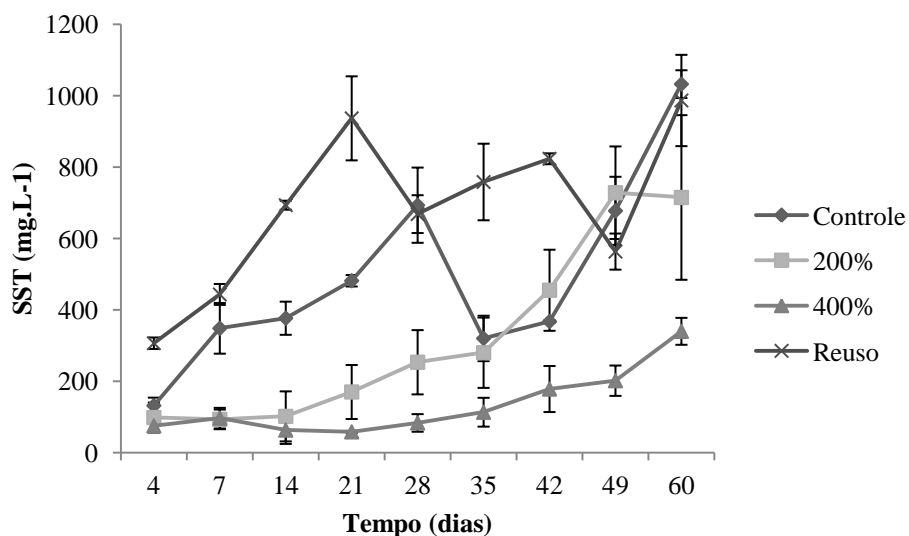


Figura 6 – Variações nas concentrações de sólidos suspensos totais nos tratamentos Controle, 200% de adição de substrato artificial, 400% de adição de substrato artificial e Reuso de Água, durante o cultivo de *Litopenaeus vannamei* em sistema BFT

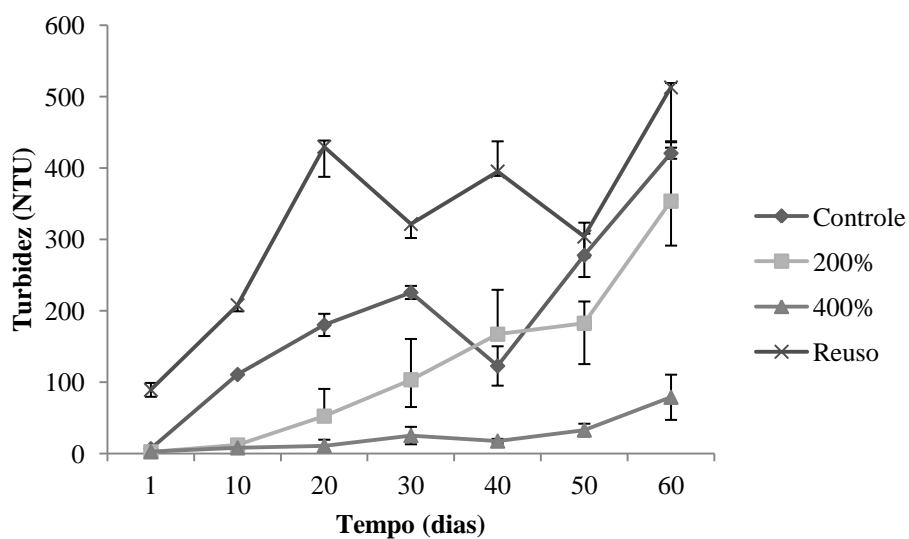


Figura 7 – Turbidez da água nos tratamentos Controle, 200% de adição de substrato artificial, 400% de adição de substrato artificial e Reuso de Água, durante o cultivo de *Litopenaeus vannamei* em sistema BFT

3.3. Desempenho Zootécnico dos Camarões:

A taxa de crescimento semanal nos tratamentos com adição de substratos artificiais foi bastante semelhante ao longo do experimento, o que, aliada aos melhores resultados de sobrevivência, refletiu nas maiores biomassas ao final do estudo (Fig.8).

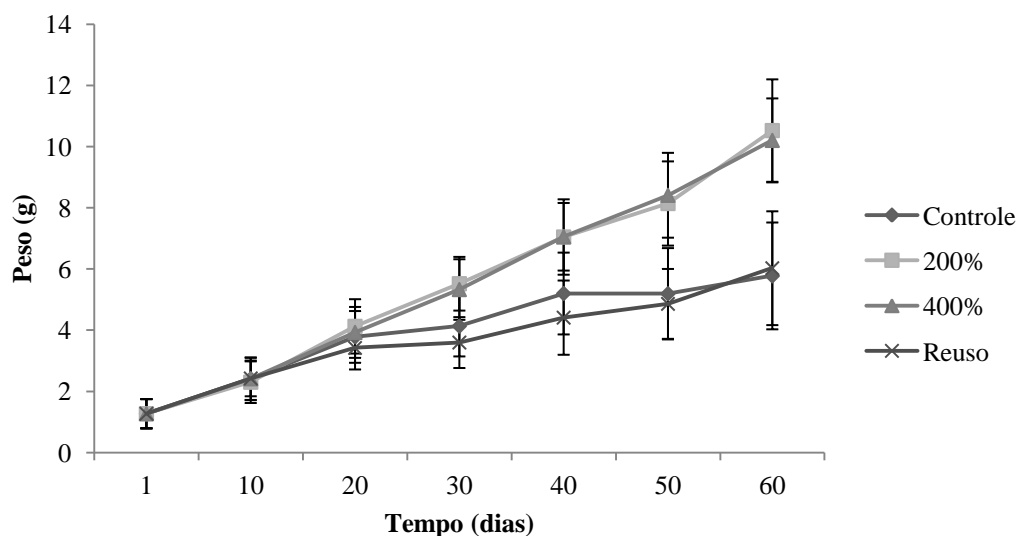


Figura 8 – Crescimento médio dos camarões nos tratamentos Controle, 200% de adição de substrato artificial, 400% de adição de substrato artificial e Reuso de Água, durante o cultivo de *Litopenaeus vannamei* em sistema BFT

Os resultados apresentados na tabela 4 mostram os principais resultados com respeito ao desempenho zootécnico dos camarões ao final do experimento nos diferentes tratamentos. O peso médio final (g) foi superior nos tratamentos com adição de substratos artificiais, independentemente da quantidade de substratos artificiais adicionados em relação aos tratamentos “controle” e “reuso”, sendo que o peso médio final foi estatisticamente semelhante entre esses dois últimos tratamentos. Igualmente, a sobrevivência foi mais elevada nos tratamentos com adição de substratos artificiais, porém os tratamentos “200%” e “reuso” não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre si. O tratamento “controle” apresentou sobrevivência média significativamente menor ($p < 0,05$) quando comparada aos outros tratamentos. O crescimento semanal foi significativamente maior ($p < 0,05$) nos tratamentos “200%” e “400%”, e não apresentou diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos “controle” e “reuso”. A conversão alimentar foi significativamente menor ($p < 0,05$) nos tratamentos com adição de substratos, que não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre si, seguidos do tratamento “reuso” e “controle” que apresentou a pior taxa de conversão alimentar aparente. Igualmente, as produtividades em $\text{kg} \cdot \text{m}^{-2}$ e $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$ foram significativamente maiores ($p < 0,05$) nos tratamentos com adição de substratos, seguidas do tratamento com reuso de água e menores no tratamento controle.

Tabela 4 – Desempenho zootécnico dos camarões (média \pm desvio padrão) nos tratamentos Controle, 200% de adição de substrato artificial, 400% de adição de substrato artificial e Reuso de Água, durante o cultivo de *Litopenaeus vannamei* em sistema BFT

Tratamento	Controle	200%	400%	Reuso
Peso inicial (g)	1,27 \pm 0,48	1,27 \pm 0,48	1,27 \pm 0,48	1,27 \pm 0,48
Peso final (g)	5,78 \pm 1,74 ^a	10,53 \pm 1,67 ^b	10,21 \pm 1,37 ^b	6,03 \pm 1,86 ^a
Sobrevivência (%)	42,00 \pm 6,36 ^a	91,03 \pm 3,61 ^{bc}	97,30 \pm 3,11 ^c	77,22 \pm 8,92 ^b
Cresc. semanal (g.semana ⁻¹)	0,52 \pm 0,37 ^a	1,08 \pm 0,35 ^b	1,04 \pm 0,17 ^b	0,55 \pm 0,28 ^a
CAA	3,22 \pm 0,33 ^a	1,05 \pm 0,07 ^b	1,02 \pm 0,05 ^b	1,68 \pm 0,13 ^c
Produtividade (kg.m ⁻²)	0,71 \pm 0,09 ^a	2,87 \pm 0,14 ^b	2,98 \pm 0,15 ^b	1,39 \pm 0,10 ^c
Produtividade (kg.m ⁻³)	1,24 \pm 0,15 ^a	5,03 \pm 0,25 ^b	5,22 \pm 0,26 ^b	2,44 \pm 0,17 ^c

Letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa

4. DISCUSSÃO

Nos diferentes sistemas de cultivo, o manejo dos parâmetros de qualidade da água é uma das maiores preocupações. Nos sistemas de cultivo utilizando bioflocos, sem renovação de água, esta preocupação é ainda maior, visto que os animais estão submetidos a elevadas densidades e a qualidade da água é altamente influenciada pelos processos respiratórios de toda a comunidade microbiana presente, além das taxas de respiração e excreção dos animais cultivados. A comunidade microbiana, contudo, pode ter efeito benéfico no controle dos parâmetros de qualidade d'água, potencializando a produtividade no sistema de cultivo (Avnimelech et al., 1995).

De acordo com Ponce-Palafox et al. (1997) estudando o desempenho de *Litopenaeus vannamei* sob diferentes temperaturas, verificaram que as melhores taxas de sobrevivência para esta espécie ficam entre os 20 a 30°C, e as melhores taxas de crescimento em temperaturas cerca de 25 até 35°C. No presente estudo, as temperaturas mantiveram-se dentro da faixa ótima de crescimento e sobrevivência para a espécie em todos os tratamentos.

O oxigênio dissolvido é um parâmetro que pode afetar tanto as taxas de excreção dos camarões, bem como seu crescimento e sobrevivência. Para o camarão *L. vannamei*, Van Wyk & Scarpa (1999) recomendam concentrações acima de 5 mg.L⁻¹, valores que foram mantidos no presente estudo. Em sistemas de bioflocos o oxigênio dissolvido na água também pode influenciar a comunidade microbiana, visto que os processos de

assimilação bacteriana e nitrificação consomem oxigênio. Além disso, devido à sua grande afinidade com o oxigênio, as bactérias filamentosas podem dominar o sistema, competindo com outras bactérias que possam estar presentes na água do cultivo (De Schryver et al. 2008; Ray et al. 2010b).

O pH manteve-se acima de 7,80 em todos os tratamentos, estando dentro da faixa recomendada por Van Wyk & Scarpa (1999) que recomendam taxas de pH entre 7,0 e 8,3. Estes mesmos autores citam que taxas de pH mantidas entre 7,0 e 8,0 favorecem o crescimento de bactérias nitrificantes e também agindo na diminuição da fração não ionizada da amônia (menor que 5%). Nos cultivos em sistemas de bioflocos o aumento da biomassa microbiana causa um consumo de alcalinidade, o que leva a uma queda no pH (Furtado et al. 2011; Krummenauer et al. 2011a).

Maicá et al. (2012) testando o efeito de baixas salinidades em sistemas superintensivos sem renovação de água, obtiveram melhores resultados de crescimento e sobrevivência para *L. vannamei* na salinidade 25, com um aumento da sobrevivência concomitante ao incremento da salinidade, principalmente devido à atenuação dos efeitos tóxicos da amônia e do nitrito em salinidades mais elevadas (Lin & Chen 2001, 2003). No presente estudo, a salinidade média se manteve dentro dos níveis recomendados por esses autores.

O camarão *L. vannamei* assim como a maioria dos crustáceos marinhos é um animal primariamente amoniotélico, portanto, a amônia é a principal forma nitrogenada resultante da sua excreção (Jiang et al. 2000). Além disso, a amônia também pode acumular nos sistemas de produção de organismos aquáticos devido à mineralização de detritos orgânicos, como ração não consumida e fezes (Lin & Chen, 2001). Barbieri (2010) em um estudo sobre a toxicidade aguda da amônia para o camarão branco *Litopenaeus schmitti* relatou que a excreção de amônia aumentou quando os animais foram expostos a elevadas concentrações de amônia. Para o camarão *L. vannamei*, Lin & Chen (2001) observaram que a toxicidade da amônia aumenta com o tempo de exposição, sendo que a tolerância pode diminuir até 64,7% após 96 horas de exposição à amônia. Estes mesmos autores determinaram que o nível de segurança para juvenis de *L. vannamei* na faixa de salinidade de 25-35 é de 3,55-3,95 mg.L⁻¹ de nitrogênio na forma de amônia total (N-AT). No presente estudo, a concentração média de amônia total esteve dentro dessa faixa em todos os tratamentos. Porém, no tratamento com

reutilização de água as concentrações de amônia mantiveram-se praticamente nulas durante todo o período experimental, indicando uma possível maior eficiência das bactérias presentes na metabolização deste composto. Este fato já tem sido relatado por outros autores (Gaona et al. 2012; Samocha et al. 2010) que por meio de um inoculo de água com bioflocos de cultivos prévios conseguiram manter as concentrações de amônia baixas durante o cultivo. Nos outros tratamentos, foi observada a metabolização da amônia pela formação dos agregados microbianos e/ou adesão de bactérias aos substratos artificiais, sendo que duas semanas após o início do cultivo as concentrações de amônia decresceram em todos os tratamentos, com poucas variações até o final do cultivo.

Segundo Lin & Chen (2003) as concentrações de nitrito seguras para *L. vannamei* em salinidades entre 25 – 35 estão entre 15,2 – 25,7 mg.L⁻¹N-NO₂, sendo que a tolerância pode diminuir em até 38,3% após 96 horas de exposição. Além disso, esses autores observaram uma maior sensibilidade ao nitrito em condições hip-osmóticas para a espécie, fato evidenciado por Maicá et al. (2012), em sistemas de bioflocos. Condições de estresse causadas pelas elevadas concentrações de nitrito também podem aumentar a susceptibilidade da espécie à infecção por patógenos, por uma redução na contagem de hemócitos e aumento da produção do ânion superóxido, possivelmente a níveis que também sejam tóxicos às células dos hospedeiros (Tseng & Chen, 2004). No sistema BFT, Vinatea et al. (2010) reportaram que o parâmetro que apresentou maior influência em alguns parâmetros zootécnicos no cultivo de *L. vannamei* foi o nitrito, indicando que concentrações de 0,72 – 9,49 mg.L⁻¹ N-NO₂ do composto foram suficientemente significantes para reduzir a taxa de crescimento e aumentar a conversão alimentar dos animais. As concentrações médias de nitrito observadas em nosso estudo foram significativamente maiores no tratamento sem adição de substratos artificiais e sem reuso de água, o que refletiu nas menores sobrevivências, produtividades e também nas maiores taxas de conversão alimentar aparente. Nos tratamentos com adição de substratos as concentrações de nitrito alcançaram os 20 mg.L⁻¹ de N-NO₂ em alguns períodos do cultivo, porém as sobrevivências mantiveram-se acima dos 90% em ambos. O tratamento com reutilização de água, assim como para as concentrações de amônia, foi o que apresentou os menores valores médios de nitrito, e as concentrações mantiveram-se próximas a zero durante quase todo o período experimental, o que provavelmente não foi um fator que influenciou o desempenho zootécnico dos animais.

O nitrato (NO_3^-) é o produto final da oxidação da amônia, sendo que sua toxicidade parece não ser um sério problema aos organismos aquáticos. Devido a sua baixa toxicidade, há poucos estudos relacionando os efeitos agudos e crônicos do nitrato para *L. vannamei*. Porém, assim como nos sistemas de recirculação de água, no sistema BFT a nitrificação pode causar um grande acúmulo de nitrato, principalmente se a água for reutilizada por vários ciclos e dependendo da comunidade microbiana que é formada (Kuhn et al. 2010a; Samocha et al. 2010). De acordo com Kuhn et al. (2010b), a toxicidade do nitrato é potencializada em salinidades menores. Esses mesmos autores afirmam que o nitrato possui impacto na sobrevivência, crescimento e biomassa de *L. vannamei* em concentrações maiores de 220 mg.L^{-1} em salinidade 11, relacionando efeitos crônicos como supressão do tamanho das antenas, lesões no hepatopâncreas e alterações branquiais, como incrustações por bactérias. De acordo com os dados obtidos no presente estudo, o nitrato não atingiu concentrações tóxicas para os animais em nenhum dos tratamentos, porém no tratamento com reuso de água, observou-se um acúmulo de nitrato ao longo do cultivo, típico de sistemas em que a água é reutilizada por vários ciclos.

A nitrificação é um processo que envolve duas etapas, sendo que as bactérias nitrificantes, que em sua maioria são autotróficas, são as responsáveis pelos processos de conversão que partem da amônia até chegar a nitrato. A primeira etapa é a oxidação da amônia em nitrito que é realizada pelas bactérias amônia oxidantes (AOB), representadas pelos gêneros *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Notrosolobus* e *Nitrosovibrio*. O nitrito (NO_2^-) é um composto intermediário, e sua metabolização é feita pelas bactérias nitrito oxidantes (NOB), representadas pelos gêneros *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira* e *Nitrospina*, que o fazem em meio ligeiramente alcalino, dependendo assim do pH e também da concentração de amônia dissolvida na água (Fenchel & Blackburn, 1979). No sistema BFT, para que não ocorram acúmulos de nitrito e nitrato, a assimilação do nitrogênio amoniacal deve ser feita apenas pelas bactérias heterotróficas, sem que aconteça o processo típico de nitrificação (De Schryver & Verstraete 2009; Hargreaves 2006). Porém, em um ambiente de cultivo as interações dos parâmetros de qualidade de água somados ao estabelecimento da relação C:N ideal, além da atividade de pastagem dos animais cultivados sobre os bioflocos e o biofilme e também a entrada de alimento no sistema formam um complexo que muitas vezes é difícil de ser controlado.

No presente estudo, o processo de remoção ou assimilação do nitrogênio nos diferentes tratamentos pode ter ocorrido de acordo com as três vias descritas por Ebeling et al. (2006). No tratamento com adição de 400% de substratos artificiais, podem ter ocorrido as vias de remoção heterotrófica e fotoautotrófica. Nesse tratamento, ao final do cultivo pode-se verificar uma baixa concentração de nitrato quando comparada aos outros tratamentos. Assim, a remoção do nitrogênio amoniacal pela incorporação em biomassa microbiana heterotrófica através da adição de carbono orgânico parece ter sido a principal via de remoção da amônia do sistema. De acordo com Michaud et al. (2006) a população de bactérias heterotróficas pode se sobrepor à de nitrificantes por se encontrarem nas camadas mais externas do biofilme, reduzindo a disponibilidade de oxigênio para as camadas mais profundas, aonde as bactérias nitrificantes provavelmente são encontradas. Além disso, as taxas de crescimento das bactérias heterotróficas são mais elevadas do que as das nitrificantes, desde que a relação C:N seja ideal para isso. Arnold et al. (2009), aumentando em 100% a área de superfície para adesão de biofilme no cultivo em sistema BFT de *Penaeus monodon* observou um comportamento semelhante sugerindo que as baixas concentrações de nitrato poderiam ser causadas pela presença de bactérias heterotróficas no sistema. A remoção de nitrogênio pela via fotoautotrófica nos biofilmes foi relatada por Thompson et al. (2002), ao observar que as maiores taxas de remoção de nitrogênio amoniacal estavam relacionadas aos picos de clorofila α no cultivo de *Farfantepenaeus paulensis*. Segundo esses autores, a amônia pode ser absorvida pelas microalgas, que utilizam esse elemento para produzir novas células. Assim, no tratamento com adição de 400% de substratos artificiais, pode ter ocorrido também o processo de assimilação de nitrogênio pelas microalgas presentes no biofilme.

A terceira via de remoção de nitrogênio, realizada pelas bactérias nitrificantes, foi observada no tratamento com reuso de água, aonde as concentrações de amônia e nitrito mantiveram-se praticamente nulas durante todo o período experimental e as concentrações de nitrato aumentaram ao longo do tempo. Esse processo pode ter ocorrido, principalmente pelo fato de que a água proveniente de um ciclo de cultivo anterior ao experimento já conter a comunidade de bactérias nitrificantes estabelecida. Sabe-se que no processo de nitrificação autotrófica, pequenas quantidades de biomassa bacteriana são produzidas (Ebeling et al. 2006). Assim no sistema BFT baseado em crescimento de bactérias nitrificantes autotróficas mais tempo é necessário para que os

bioflocos estejam na sua forma “madura”, similar ao que acontece em um sistema de recirculação de água. No tratamento com 200% de adição de substratos artificiais, observa-se que possivelmente houve uma predominância heterotrófica e fotoautotrófica durante os primeiros 40 dias de cultivo e após esse período as bactérias nitrificantes autotróficas se estabeleceram como dominadoras no processo de remoção do nitrogênio, fato que pode ser observado devido ao súbito aumento das concentrações de nitrato nos últimos 20 dias experimentais. Já para o tratamento controle, o que se pode observar é que a quantidade de bactérias nitrificantes não foi o suficiente para metabolizar todo o nitrito formado na água, causando acúmulo desse composto durante aproximadamente 30 dias. Isso pode ter acontecido, provavelmente devido à falta de substrato adicional para que as bactérias se desenvolvessem a tempo de não ocorrer acúmulo de amônia e nitrito nos tanques. Arnold et al. (2009) também observaram maior acúmulo desses compostos quando não foram utilizados substratos artificiais no cultivo.

O progressivo aumento das concentrações de fosfato ao longo do experimento provavelmente deve-se a constante entrada de nutrientes, que ocorre normalmente nos sistemas de cultivo, devido principalmente à ração não consumida e às fezes dos animais dentro dos tanques (Barak et al., 2003). Ferreira et al. (2011) observaram que há uma correlação positiva entre o fosfato e o número total de bactérias no sistema, além de ser um componente utilizado pelas microalgas para a construção de componentes estruturais celulares como proteínas e açúcares. Portanto, as flutuações nas concentrações desse composto podem ter acontecido em função da sucessão microbiana que ocorre no sistema BFT e da utilização desse composto pelos microorganismos.

Segundo Avnimelech (2009) o volume de sólidos sedimentáveis no sistema BFT para camarões deve ficar em torno de 20 a 40 mL.L⁻¹. No presente estudo, o volume dos bioflocos manteve-se dentro dessa faixa nos tratamentos com adição de substrato durante todo o período experimental, fato que pode ser justificado pela adesão das partículas e microorganismos que ficariam em suspensão, mas que podem ter se aderido aos substratos artificiais. Nos tratamentos controle e reuso, a resuspensão das partículas não permitiu a leitura nos cones Imhoff quando o volume de bioflocos atingiu valores maiores de 40 mL.L⁻¹. Avnimelech (2009) cita que a resuspensão das partículas ocorre devido à formação de gases após um período prolongado de sedimentação dos bioflocos, porém através de observações visuais pode-se perceber que no presente estudo, os bioflocos não sedimentavam em nenhum momento durante a amostragem.

O controle dos sólidos suspensos totais no cultivo em sistema de bioflocos tem se mostrado uma técnica de manejo que pode melhorar a qualidade de água, bem como a produtividade do sistema (Gaona et al., 2012; Ray et al. 2010a). Elevadas concentrações de sólidos suspensos podem afetar o crescimento e a sobrevivência dos camarões, bem como a abundância de certos microorganismos no sistema, principalmente as cianobactérias, que podem ser privilegiadas, devido às baixas concentrações de oxigênio que são características quando não há controle de sólidos (Ray et al., 2010b). Além disso, alguns autores relatam que o controle de sólidos contribuiu para a manutenção de menores concentrações de nitrito no sistema, indicando uma possível relação entre esses dois parâmetros (Almeida 2012; Ray et al. 2011). Almeida (2012), trabalhando com diferentes quantidades de sólidos no sistema, observou melhores resultados quando os sólidos eram mantidos entre 300-400 mg.L⁻¹. Já Ray et al. (2011), obtiveram melhores resultados com sólidos entre 100-300 mg.L⁻¹. Em nosso estudo, não foi possível fazer o controle de sólidos suspensos totais nos tratamentos com reuso da água e controle, que apresentaram níveis acima dos recomendados para o cultivo, porque as partículas não chegavam a sedimentar nos cones Imhoff, não sendo possível utilizar os sedimentadores existentes no local do experimento para controle de sólidos. Devido às elevadas concentrações de sólidos em ambos os tratamentos, pode ser considerado que tanto a qualidade da água, como a sobrevivência dos animais tenham sido afetadas. Nos tratamentos com adição de substrato as concentrações de sólidos mantiveram-se mais baixas durante todo o período experimental o que provavelmente não influenciou no crescimento dos camarões, e ainda contribuiu com a manutenção da qualidade da água.

A turbidez é um parâmetro que possui estreita relação com os sólidos suspensos totais e com a quantidade de matéria orgânica no sistema. Um aumento da degradação microbiana heterotrófica pode levar a um aumento da NTU devido ao incremento de material orgânico no sistema, aumentando a demanda de oxigênio e a formação anaeróbica de metabólitos como amônia e nitrito (Burford & Lorenzen, 2004; Hargreaves, 2006). No entanto, não existe uma faixa de turbidez recomendada para o melhor desempenho zootécnico da espécie, de acordo com Vinatea et al. (2010) não há uma relação entre a turbidez e taxa de crescimento ou taxa de conversão alimentar de *L. vannamei*. Os valores obtidos no presente trabalho encontram-se acima dos valores encontrados por Vinatea et al. (2010) e Ray et al. (2011), porém, observa-se que há

uma relação entre o aumento da concentração de sólidos e o aumento da turbidez em todos os tratamentos.

Diversos autores tem demonstrado que a adição de substratos artificiais causa efeitos positivos nos parâmetros de produção e condição nutricional dos animais cultivados (Audelo-Naranjo et al, 2011; Ballester et al., 2007; Moss & Moss, 2004; Wasielesky et al. 2011; Zhang et al., 2010). Os fatores pelos quais o biofilme aumenta a produtividade no sistema podem estar relacionados com a composição nutricional dos microorganismos aderidos a esses substratos, que podem ser ricos em nitrogênio e fósforo, além de apresentarem na sua composição, nutrientes essenciais como ácidos graxos polinsaturados, esteróis, aminoácidos, vitaminas e carotenóides (Silva et al., 2008; Thompson et al., 1999). Além da qualidade nutricional dos biofilmes, outro fator que é essencial para que as taxas de sobrevivência sejam elevadas no cultivo é o controle dos parâmetros de qualidade de água. O biofilme também pode contribuir com a manutenção das concentrações dos compostos nitrogenados abaixo da faixa prejudicial aos animais cultivados (Arnold et al., 2009; Holl et al., 2011; Thompson et al., 2002; Viau et al., 2012). Mais um fator atribuído à utilização dos biofilmes é a redução da ocorrência de bactérias patogênicas nos sistemas, seja pela absorção de nitrogênio (Austin & Austin, 1999), pela produção de antibióticos por microalgas presentes nos substratos (Alabi et al., 1999) ou pela pastagem de protozoários sobre possíveis bactérias patógenas (Thompson et al., 1999).

A soma de todos os fatores expostos acima é evidenciada no presente estudo, aonde as melhores taxas de conversão alimentar, crescimento, sobrevivência e biomassa final foram obtidas nos tratamentos com utilização de substrato. Porém, observa-se que o incremento na quantidade de substratos artificiais de 200% para 400% não causou efeitos sobre o desempenho dos animais. No tratamento com reutilização de água, apesar de a qualidade de água ter se mantido dentro dos níveis adequados para a espécie, o crescimento dos animais foi prejudicado devido, provavelmente, à quantidade de sólidos suspensos totais na água, que pode causar uma redução nas taxas de conversão alimentar e crescimento dos camarões (Gaona et al., 2012). Já no tratamento controle, os piores dados de desempenho zootécnico foram observados, visto que o efeito das elevadas concentrações de nitrito durante um longo período aliadas às elevadas concentrações de sólidos suspensos totais na água afetaram o crescimento e a sobrevivência dos animais cultivados.

5. CONCLUSÕES:

Analisando comparativamente os tratamentos, observa-se que a reutilização de água manteve os nitrogenados tóxicos aos camarões mais baixos do que os tratamentos com utilização de substrato artificial, independentemente da quantidade adicionada. Porém, devido à impossibilidade de remoção de sólidos suspensos totais no tratamento com reuso de água, esse tratamento apresentou resultados de desempenho zootécnico abaixo dos esperados. Além disso, os melhores parâmetros zootécnicos nos tratamentos com biofilme confirmam que os microorganismos aderidos aos substratos são uma importante fonte de alimento para os camarões, reduzindo as taxas de conversão alimentar e aumentando o crescimento e a sobrevivência dos mesmos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alabi, A.O., Cob, Z.C., Jones, D.A., Latchford, J.W., 1999. Influence of algal exudates and bacteria on growth and survival of white shrimp larvae fed entirely on microencapsulated diets. *Aquacult. Int.*7(3),137–158.
- Almeida, M. 2012. Efeito de diferentes níveis de sólidos suspensos totais na qualidade da água e no desempenho zootécnico da produção superintensiva do camarão *Litopenaeus vannamei* em sistema BFT. Dissertação de mestrado Programa de Pós Graduação em Aquicultura, Universidade Federal do Rio Grande (PPGAQ-FURG). Em preparação.
- American Public Health Association (APHA). 1989. Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington. pp.1193.
- Arnold, S.J., Coman, F.E., C.J. Jackson, S.A. Groves, 2009. High-intensity, zero-exchange production of juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*: An evaluation of artificial substrates and stocking density. *Aquaculture* 293,42-48.
- Audelo-Naranjo, J.M., Martínez-Córdova, L.R., Voltolina, D., Gómez-Jiménez S., 2011. Water quality, production parameters and nutritional condition of *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) grown intensively in zero water exchange mesocosms with artificial substrates. *Aquacult. Res.* 42, 1371-1377.
- Austin, B., Austin, D., 1999. Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish. 3rd edn. Springer, Chichester, pp.457.
- Avnimelech, Y., Mozes, N., Diab S., Kochba, M. 1995. Rates of organic carbon and nitrogen degradation in intensive fish ponds. *Aquaculture* 134, 211-216.
- Avnimelech, Y., 1999. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture* 176, 227–235.
- Avnimelech, Y., 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. *Aquaculture* 264,140-147.
- Avnimelech, Y., 2009. Biofloc Technology – A Practical Guide Book. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA.

- Ballester, E.L.C., Wasielesky, W., Cavalli, R.O., Abreu, P.C. 2007, Nursery of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* in cages with artificial substrates: Biofilm composition and shrimp performance. *Aquaculture* 269,355-362.
- Barak, Y., Cytryn, E., Gelfand, I., Krom, M., Van Rijn, J., 2003. Phosphorus removal in a prototype, recirculating aquaculture system. *Aquaculture* 220, 313–326.
- Barbieri, E., 2010. Acute toxicity of ammonia in white shrimp (*Litopenaeus schmitti*) (Burkenroad, 1936, Crustacea) at different salinity levels. *Aquaculture* 306,329-333.
- Browdy, C.L., Bratvold, D., Stokes, A.D., McIntosh, R.P., 2001. Perspectives on the application of closed shrimp culture systems. In: Browdy, C.L., Jory, D.E. (Eds.). *The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture 2001*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA, pp 20-34.
- Burford, M.A., Lorenzen, K., 2004. Modeling nitrogen dynamics in intensive shrimp ponds: the role of sediments remineralization. *Aquaculture* 229,129–145.
- De Schryver, P., Crab, T., Defroidt, N., Boon, W.V., 2008. The basics of bio-flocs technology: The added value for aquaculture. *Aquaculture* 277,125-137.
- De Schryver, P. & Verstraete, W., 2009. Nitrogen removal from aquaculture pond water by heterotrophic nitrogen assimilation in lab-scale sequencing batch reactors. *Bioresource Technol.* 100,1162–1167.
- Ebeling, J.M., Timmons, M.B., Bisogni, J.J., 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic and heterotrophic removal of ammonia – nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture* 257,346-358.
- Fenchel, T., Blackburn, T.H., 1979. *Bacteria and mineral cycling*. Academic Press, London.
- Ferreira, N.C., Bonetti, C., Seiffert, W.Q., 2011. Hydrological and Water Quality Indices as management tools in marine shrimp culture. *Aquaculture* 318,425-433.

- Furtado, P., 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.
- Gaona, C.A.P., Poersch, L.H., Krummenauer, D., Foes, G.K., Wasielesky, W., 2012. The effect of solids removal on water quality, growth and survival of *Litopenaeus vannamei* in a biofloc technology culture system. *International Journal of Recirculating Aquaculture* (Artigo Aceito para Publicação).
- Hargreaves, J.A., 2006. Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. *Aquacult. Eng.* 34,344–363.
- Holl, C.M., Ootshi, C., Unabia, C.R., 2011. Nitrifying biofilms critical for water quality in intensive shrimp RAS. *Global Aquac. Advocate* 14(1),38-39.
- Jiang, D., Lawrence, A.L., Neill, W.H., Gong, H., 2000. Effects of temperature and salinity on nitrogenous excretion by *Litopenaeus vannamei* juveniles. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 253(2),193-209.
- Jory, E.J., Cabrera, T.R., Dugger, D.M., Fegan, D., Lee, P.G., Lawrence, A.L. Jackson, C.J., McIntosh, R.P., Castañeda, J., 2001. A global review of shrimp feed management: status and perspectives. In: *The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture 2001*. Baton Rouge, USA, 118-143.
- Krummenauer, D., Peixoto, S. Cavalli, R., Poersch, L.H., Wasielesky, W., 2011a. Superintensive culture of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in a biofloc technology system in southern Brazil at different stocking densities. *J. World Aquac. Soc.* 42(5),726:733.
- Krummenauer, D, C.A. Seifert, L.H. Poersch, G.K. Foes, G.R. Lara & W. Wasielesky. 2011. Cultivo de camarões marinhos em sistema de bioflocos: análise do reuso de água. *Atlântica* (aceito para publicação)

- Kuhn, D.D., Drahos, D.D., Marsh, L., Flick Jr., G.J., 2010a. Evaluation of nitrifying bacteria product to improve nitrification efficacy in recirculating aquaculture systems. *Aquac. Eng.* 43,78-82.
- Kuhn, D.D., Smith, S.A., Boardman, G.D., Angier, M.W., Marsh, L., Flick Jr., G.J., 2010b. Chronic toxicity of nitrate to Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: Impacts on survival, growth, antennae length, and pathology. *Aquaculture* 306,329-333.
- Lin, Y-C, Chen, J-C., 2001. Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 259,109-119.
- Lin, Y-C, Chen, J-C., 2003. Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels. *Aquaculture* 224,193-201.
- Maicá, P.F., Borba, M.R., Wasielesky, W., 2012. Effect of low salinity on microbial floc composition and performance of *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles reared in a zero-water-exchange super-intensive system. *Aquacult. Res.*43,361-370.
- McCabe B.J., Browdy, C.L., Rhodes, R.J., Stokes, A.D., 2003. The use of greenhouse-enclosed raceway systems for the super-intensive production of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in the United States. *Global Aquac. Advocate* 6,40-43.
- Mevel, G., Chamroux, S., 1981. A study on nitrification in the presence of prawns (*Penaeus japonicus*) in marine closed systems. *Aquaculture* 23, 29-43.
- Michaud, L., Blancheton, J.P., Bruni, V., Piedrahita, R., 2006. Effect of particulate organic carbon on heterotrophic bacterial populations and nitrification efficiency in biological filters. *Aquacult. Eng.* 34(3), 224-233.
- Moss, K.K., Moss, S.M., 2004. Effects of artificial substrate and stocking density on the nursery production of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J. World Aquac. Soc.* 35, 536-542.

- Otoshi, C., Rodriguez, N., Moss, S., 2011. Establishing nitrifying bacteria in super intensive biofloc shrimp production. *Global Aquac. Advocate* 14(4), 24-26
- Philips, S., Laanbroek, H.J., Verstraete, W., 2002. Origin, causes and effects of increased nitrite concentrations in aquatic environments. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 1,115-141.
- Ponce-Palafox, J., Martinez-Palacios, C.A., Ross, L.G., 1997. The effect of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. *Aquaculture* 157,107-115.
- Ray, A.J., Lewis, K.S., Browdy, C.L., Leffler, J.W., 2010a. Suspended solids removal to improve shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and an evaluation of a plant-based feed in minimal-exchange, superintensive culture systems. *Aquaculture* 299,89-98.
- Ray, A.J., Seaborn, G., Leffler, J.W., Wilde, S.B., Lawson, A., Browdy, C.L., 2010b. Characterization of microbial communities in minimal-exchange, intensive aquaculture systems and the effects of suspended solids management. *Aquaculture* 310,130-138.
- Ray, A.J., Dillon, K.S., Lotz, J.M., 2011. Water quality dynamics and shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production in intensive, mesohaline culture systems with two levels of biofloc management. *Aquacult. Eng.* 45,127-136.
- Samocha, T.M., Wilkenfeld, J.S., Morris, T., Correia, E., Hanson, T., 2010. Intensive raceways without water exchange analyzed for white shrimp culture. *Global Aquac. Advocate* 14(4), 22-24.
- Schuler, D.J., Boardman, G. D., 2010. Acute toxicity of ammonia and nitrite to Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at low salinities. *Journal of the World Aquaculture Society* 41(3),438-446.
- Silva, C.F., E.L.C. Ballester, J. Monserrat, L. Geracitano, W. Wasielesky & P.C. Abreu. 2008. Contribution of microorganisms to the biofilm nutritional quality: protein and lipids contents. *Aquacult. Nutr.* 14,507-514.

- Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1969. Biometry. Principle and practices of statistics in biological research. W. H. Freeman & Co, p.p.776.
- Strickland, J.D.H., Parsons, T.R., 1972. A practical handbook of seawater analysis. Ottawa: Fishery Research Board Canada, p.p.310.
- Thompson, F.L., Abreu, P.C., Cavalli, R.O., 1999. The use of microorganisms for water quality and nourishment in intensive shrimp culture. *Aquaculture* 203, 263-278.
- Tseng, I.-T., Chen, J.-C., 2004. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under nitrite stress. *Fish Shellfish Immunology* 17,325–333.
- Thompson, F.L., Abreu, P.C., Wasielesky, W., 2002. Importance of biofilm for water quality and nourishment in intensive shrimp culture. *Aquaculture* 203,263–278.
- UNESCO, 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring. Manual and Guides 12, Intergovernmental Oceanographic Commission. Paris, France.
- Van Wyk, P. , Scarpa, J., 1999. Water Quality and Management. In: Van Wyk, P., et al. (Eds.), *Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems*. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Tallahassee, p.p. 128–138.
- Viau, V., Souza, D.M., Rodríguez, E.M., Wasielesky, W., Abreu, P.C., Ballester, E.L.C., 2012. Biofilm feeding by postlarvae of the pink shrimp *Farfantepenaeus braziliensis* (Decapoda, Penaeidae). *Aquacult. Res.* (February 2012) doi: 10.1111/j.1365-2109.2011.03087.x
- Vinatea, L., Gálvez, A.O., Browdy, C.L., Stokes, A., Venero, J., Haveman, J., Lewis, B.L., Lawson, A., Schuler, A., Leffler, J.W., 2010. Photosynthesis, water respiration and growth performance of *Litopenaeus vannamei* in a super-intensive raceway culture with zero water exchange: Interaction of water quality variables. *Aquacult. Eng.* 42,17-24.
- Wasielesky, W., Abreu, P.C., Poersch, L.H., Thompson, F., Ballester, E.L.C., 2011. Influence of light intensity on biofilm formation and the performance of pink

shrimp *Litopenaeus paulensis* juveniles reared in cages. Aquacult. Res. (May 2011) doi:10.1111/j.1365-2109.2011.02878.x

Zhang, B. 2011. Influence of the artificial substrates on the attachment behavior of *Litopenaeus vannamei* in the intensive culture condition. Int. J. Anim. Veter. Adv., 3(1),37-43.

Universidade Federal do Rio Grande
Programa de Pós Graduação em Aquicultura
Instituto de Oceanografia

CAPÍTULO II

Adição de nitrito de sódio e de biofilme na metabolização dos compostos nitrogenados no cultivo de *Litopenaeus vannamei* em sistema de bioflocos

Gabriele Rodrigues de Lara

O presente capítulo está apresentado de acordo com as normas para submissão da revista
Bioresource Technology

Rio Grande, 2012

1 RESUMO

2 O acúmulo de compostos nitrogenados tóxicos, principalmente amônia e nitrito, é um
3 dos principais problemas nos cultivos superintensivos, com mínima ou sem renovação
4 de água. O objetivo do presente estudo é avaliar se a adição prévia de nitrito de sódio
5 (NaNO_2) durante um período anterior à estocagem de camarões da espécie *Litopenaeus*
6 *vannamei* em sistema de cultivo em bioflocos (BFT), juntamente com a adição de
7 substratos artificiais para a fixação de biofilme são técnicas eficientes no processo de
8 metabolização do nitrogênio na forma de amônia e nitrito dentro do sistema. Assim,
9 quatro tratamentos foram delineados: (T1) adição de NaNO_2 durante 20 dias antes da
10 estocagem e sem substratos artificiais para fixação de biofilme; (T2) adição de nitrito
11 NaNO_2 durante 20 dias antes da estocagem e com adição de 150% da superfície lateral
12 dos tanques de substratos artificiais; (T3) adição de NaNO_2 no dia da estocagem e sem
13 substratos artificiais; e (T4) adição de NaNO_2 no dia da estocagem e com adição de
14 150% da superfície lateral dos tanques de substratos artificiais. Camarões da espécie
15 *Litopenaeus vannamei* foram estocados em uma densidade de 400 camarões m^{-2} , valor
16 equivalente à 1.100 camarões m^{-3} , em tanques de 180 L de volume útil, durante 30 dias,
17 até que os camarões atingissem o peso médio de aproximadamente 1g. Após este
18 período, denominado berçário, os animais foram reestocados a uma densidade menor
19 (120 camarões m^{-2} equivalente a 400 camarões m^{-3}) por mais 18 dias de cultivo. A
20 adição de NaNO_2 foi realizada adicionando esse sal para manter as concentrações de
21 nitrito (N-NO_2) próximas a 2 mg/L. Melaço líquido e farelo de arroz foram utilizados
22 para estimular o crescimento da biomassa microbiana ao longo do cultivo. Diariamente,
23 foram monitorados parâmetros físicos químicos da água (temperatura, oxigênio
24 dissolvido, pH, amônia e nitrito) e semanalmente, o nitrato, alcalinidade e salinidade,
25 bem como foi realizado o acompanhamento do desenvolvimento dos bioflocos através
26 dos sólidos suspensos totais, cone Imhoff e turbidez da água. Os resultados obtidos no
27 presente estudo indicam que a adição de NaNO_2 parece não causar efeito sobre a
28 metabolização do nitrito dentro do sistema, porém a adição deste composto 20 dias
29 antes da estocagem causou aceleração na formação de bioflocos quando comparamos os
30 tratamentos T1 e T2 aos tratamentos T3 e T4. Ao final da fase de berçário, o peso médio
31 final e a sobrevivência foram maiores nos tratamentos com biofilme, independente da
32 adição de NaNO_2 . Os resultados de desempenho zootécnico dos camarões mostraram
33 que nos tratamentos sem adição prévia de NaNO_2 os camarões apresentaram maior
34 crescimento e uma tendência a ter maiores índices de sobrevivência. Esses dados podem
35 estar relacionados ao grande aumento de sólidos suspensos totais nos tratamentos com
36 adição prévia de NaNO_2 , fator que pode ter comprometido os resultados de biomassa
37 final nos tratamentos T1 e T2. Assim, a adição de uma pequena quantidade de NaNO_2
38 na estocagem dos camarões pode aumentar a produtividade no sistema, porém pode
39 promover um aumento excessivo na quantidade de sólidos suspensos totais.

40

41

42

43

44

45

46 **ABSTRACT**

47 The accumulation of toxic nitrogenous compounds, especially ammonia and nitrite, is a
48 major problem in superintensive cultures with minimal or no water renewal. The aim of
49 this study is to evaluate if the previous addition of sodium nitrite (NaNO₂) during a
50 period prior to stocking of *Litopenaeus vannamei* in BFT system and with the addition
51 of artificial substrates for the attachment of biofilm are efficient techniques in the
52 metabolism of nitrogen in the form of ammonia and nitrite within the system. Thus, four
53 treatments were designed: (T1) addition of NaNO₂ for 20 days before stocking and
54 without artificial substrates for biofilm attachment, (T2) addition of NaNO₂ for 20 days
55 before stocking, and with 150% additional artificial substrates, (T3) adding NaNO₂ on
56 the day of storage and no artificial substrates, and (T4) addition of NaNO₂ on storage
57 and with 150% additional artificial substrates. Shrimps *Litopenaeus vannamei* were
58 stored initially, a density of 400 shrimp m⁻² corresponding to 1,100 shrimp m⁻³ in 180 L
59 tanks, for 30 days until the shrimp reached an average weight of approximately 1g.
60 After this period, denominated nursery, the animals were restocked at a lower density
61 (120 shrimp m⁻² equal to 400 shrimp m⁻³) for another 18 days of culture. The addition of
62 NaNO₂ was performed by adding the salt to maintain concentrations of nitrite (N-NO₂)
63 close to 2 mg.L⁻¹. Liquid molasses and rice bran were added to stimulate the biomass
64 growth throughout the microbial production. Daily, physical and chemical water
65 parameters were monitored (temperature, dissolved oxygen, pH, ammonia and nitrite)
66 and weekly, nitrate, alkalinity, salinity, total suspended solids, Imhoff cone and water
67 turbidity. The results of this study indicate that the addition of NaNO₂ seems to cause
68 no effect on the metabolism of nitrite in the system, but the addition of this compound
69 20 days prior stocking caused acceleration on biofloc formation when comparing T1
70 and T2 to T3 and T4. At the end of nursery phase, the mean final weight and survival
71 were higher in treatments with biofilm, regardless of the addition of NaNO₂. The results
72 of growth performance of shrimp showed that the treatments without previous addition
73 of NaNO₂ the shrimps had higher growth and a tendency to have higher survival
74 rates. These data may be related to the large increase in total suspended solids prior
75 treatments with addition of NaNO₂, a factor that may have affected the results of final
76 biomass in T1 and T2. Thus, the addition of a small amount of NaNO₂ in storage of
77 shrimps can increase productivity in the system, but may promote an excessive increase
78 in the amount of suspended solids.

79

1. INTRODUÇÃO

Nos sistemas convencionais de cultivo de organismos aquáticos, a qualidade de água é mantida dentro dos níveis adequados para as espécies através de renovações de grandes volumes da água. (Hopkins et al., 1993; Moss et al., 1999). Devido ao grande impacto ambiental negativo que a emissão desses efluentes causa, surgiu a necessidade de buscar alternativas que evitem ou reduzam essa liberação de compostos para os corpos d'água receptores. Assim, o cultivo em sistema de bioflocos tem se mostrado uma alternativa eficaz na redução da emissão de efluentes provenientes da aquicultura devido à possibilidade de se reaproveitar a água por diversos ciclos, e utilizar a comunidade microbiana formada nos tanques para a manutenção da qualidade de água e também como alimento adicional para os animais cultivados (Browdy et al., 2001; Hopkins et al., 1995; Wasielesky et al., 2006). Mesmo assim, se não houver controle nas relações C:N, densidades de estocagem, quantidade de proteína nas rações, sistemas de aeração, sólidos suspensos totais entre outros fatores que afetam o cultivo, podem ocorrer alterações na estrutura das comunidades microbianas ali formadas, afetando as taxas de remoção de nitrogênio amoniacal, proveniente da excreção dos animais e principalmente dos processos de decomposição da matéria orgânica (De Schryver et al. 2008).

A remoção do nitrogênio dissolvido na água realizada pela comunidade microbiana ocorre em dois tipos de sistema: suspenso ou aderido. Quando em suspensão, os microorganismos se movem livremente na água, fornecendo contato direto entre as células bacterianas e a massa d'água. Quando aderidos, os microorganismos crescem em uma camada aderida à superfície de um meio de suporte sólido, podendo ser artificial ou natural, dependendo do sistema de cultivo que é utilizado (Fitch et al. 1998; Nogueira et al. 1998).

A taxa de nitrificação no biofilme é determinada pelo equilíbrio entre a demanda de substrato criada pelo crescimento da biomassa bacteriana e a taxa de suprimento de substrato determinada pela difusão dos nutrientes essenciais para as camadas mais profundas do biofilme. Segundo Michaud et al. (2006), nas camadas mais externas do biofilme, são encontradas principalmente bactérias heterotróficas, reduzindo a disponibilidade de oxigênio e a difusão da amônia para as camadas mais profundas, em que as bactérias nitrificantes autotróficas crescem lentamente. Contudo, segundo esses mesmos autores, as bactérias heterotróficas podem ter um efeito positivo sob as

nitrificantes, protegendo-as do desprendimento e da pastagem por outros microorganismos, bem como dos animais que estão sendo cultivados.

Assim, no sistema de bioflocos além da comunidade microbiana que é formada em suspensão na água, dentro dos agregados, a adição de substratos para fixação de biofilme também contribui para a metabolização dos compostos nitrogenados gerados dentro do sistema (Arnold et al. 2009). Porém, se não houver um balanço entre as taxas de formação e remoção de amônia e nitrito dentro do sistema, um acúmulo desses compostos pode ocorrer, causando prejuízos na produção. Sabe-se que a comunidade microbiana sofre diversas modificações durante o cultivo no sistema BFT (Biofloc Technology System – sistema de bioflocos). Primeiramente, há um aumento na quantidade das bactérias que utilizam a matéria orgânica dissolvida presente no ambiente para o seu crescimento, representadas principalmente pelos bacilos (Biddanda, 1985). Assim, devido à produção de muco aderente por essas bactérias há um aumento no tamanho dos bioflocos causado pela agregação das partículas. Após isso, há um incremento na densidade de outros microorganismos, tais como flagelados, ciliados e formas amebóides, que exercem predação sobre as bactérias (Biddanda & Pomeroy, 1988). A dinâmica de crescimento da população microbiana acontece devido à adaptabilidade da mesma às concentrações de matéria orgânica presentes na água e seu potencial em modificar e controlar a qualidade d'água nos cultivos. A atividade das comunidades microbianas é definida pelas taxas destes processos (Avnimelech 2009).

Portanto, o desenvolvimento prévio da comunidade bacteriana através da adição de compostos que podem servir como estimuladores do crescimento microbiano antes do início do cultivo pode ser uma alternativa para que a população de microorganismos já esteja maturada ou estável quando os animais forem estocados, podendo evitar os picos de compostos nitrogenados tóxicos aos camarões (Sesuk et al. 2009). Otoshi et al. (2011) mostraram uma maior eficiência no processo de nitrificação a partir da adição de nitrito de sódio em um cultivo de *Litopenaeus vannamei* em sistema de bioflocos, porém esses autores não descrevem nenhum padrão para a aplicação deste composto no cultivo. Considerando os fatores expostos, o objetivo do presente estudo é avaliar se a formação de bioflocos com a adição de nitrito de sódio (NaNO_2) por um período anterior à estocagem dos camarões (20 dias) é eficiente na diminuição dos picos de nitrito no cultivo de *Litopenaeus vannamei* em sistema BFT e se a adição de substratos artificiais para a fixação de biofilme pode contribuir para este processo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Delineamento Experimental:

O experimento foi realizado no Laboratório de Carcinocultura pertencente ao Instituto de Oceanografia da Universidade Federal do Rio Grande (IO-FURG). Inicialmente, foram estocadas pós-larvas de *Litopenaeus vannamei* com peso médio de $0,21 \pm 0,08\text{g}$, a uma densidade de estocagem de 400 camarões m^{-2} valor equivalente à $1.100 \text{ camarões } \text{m}^{-3}$ em tanques de 180 L de volume útil. Foi utilizada água marinha filtrada, clorada a 10 ppm. e declorada com ácido ascórbico (relação de 1 g para cada 1.000L de água)Esse período do cultivo durou 30 dias, fase que foi caracterizada como berçário até que os camarões atingissem o peso médio de aproximadamente 1g. Após este período, os animais foram reestocados nos seus respectivos tanques em uma menor densidade ($120 \text{ camarões } \text{m}^{-2}$ equivalente a $400 \text{ camarões } \text{m}^{-3}$),por mais 18 dias de cultivo, sendo que a água proveniente da fase de berçário foi totalmente reaproveitada ao início da segunda fase experimental

O experimento conteve quatro tratamentos: (T1) adição de nitrito de sódio (NaNO_2) durante 20 dias antes da estocagem e sem substratos artificiais; (T2) adição de nitrito de sódio (NaNO_2) durante 20 dias antes da estocagem e com adição de 150% da superfície lateral dos tanques de substrato artificial; (T3) adição de nitrito de sódio (NaNO_2) no dia da estocagem e sem substratos artificiais; e (T4) adição de nitrito de sódio (NaNO_2) no dia da estocagem e com adição de 150% da superfície lateral dos tanques de substrato artificial. As adições de nitrito de sódio (NaNO_2) foram realizadas para estimular o crescimento das bactérias nitrificantes a uma dosagem de 2 mg.L^{-1} . O valor proposto foi baseado no trabalho de Otoshi et al. (2011), que obteve redução do pico de nitrito por meio da adição desse composto em alguns períodos do cultivo. Assim, foi estabelecida a aplicação 20 dias antes da estocagem nos tratamentos T1 e T2, e após a análise das concentrações de nitrito a cada dois dias fazia-se a adição do composto, quando necessária, baseando-se na diferença da concentração proposta (2 mg.L^{-1}) pela concentração observada. Para os tratamentos T3 e T4, a adição do NaNO_2 foi realizada apenas no dia da estocagem, a uma concentração de 2 mg.L^{-1} .

A formação dos bioflocos seguiu as metodologias propostas por Avnimelech (1999) e Ebeling et al. (2006). Como fontes de carbono foram utilizados melaço líquido e farelo de arroz a fim de manter uma relação C:N de aproximadamente 6:1. Os

camarões foram alimentados com ração comercial Guabi[®] com 38 % de proteína bruta fornecida duas vezes ao dia, sendo que as taxas de arraçoamento foram ajustadas de acordo com a metodologia proposta por Jory et al. (2001). Para a fixação do biofilme, foram utilizados substratos artificiais não flutuantes do tipo “Needlona[®]”. A porcentagem de substratos adicionada em cada tanque foi calculada de acordo com a área lateral dos tanques, sendo que os substratos foram fixados na parte superior das caixas e permaneceram submersos durante todo o período experimental.

2.2. Variáveis Físicas e Químicas da Água:

Durante os 48 dias de cultivo foram monitoradas, duas vezes ao dia, as concentrações de oxigênio dissolvido e a temperatura da água, utilizando oxímetro digital (marca YSI[®], modelo 55). O pH foi analisado uma vez ao dia, durante a manhã, com o auxílio de um medidor de bancada (marca Mettler Toledo[®], modelo FE20). A salinidade foi analisada semanalmente, utilizando salinômetro refratômetro (Atago). Diariamente foram feitas coletas de água para o acompanhamento das variações de amônia total (UNESCO, 1983) e nitrito na água (Strickland & Parsons, 1972). As concentrações de nitrato e fosfato da água foram analisadas semanalmente e também seguiram a metodologia proposta por Strickland & Parsons (1972). Semanalmente, também foram realizadas análises de alcalinidade de acordo com American Public Health Association (1989) e feitos ajustes com cal hidratada seguindo a metodologia descrita por Furtado et al. (2011).

O volume dos bioflocos (mL.L^{-1}) dos tanques foi medido duas vezes por semana, com o auxílio de cones Imhoff seguindo a metodologia adaptada por Avnimelech (2007). Para análise dos sólidos suspensos totais, foram coletadas amostras de 20 mL de cada tanque semanalmente para filtração. O método de análise foi adaptado de Strickland & Parsons (1972), consistindo na filtração das amostras em filtros de membrana de 0,45 μm de porosidade e posterior secagem em estufa. A turbidez (NTU) também foi analisada semanalmente, com o auxílio de turbidímetro digital (Marca Hach, Modelo 2100P).

2.3. Desempenho dos Camarões:

Uma biometria inicial (n=100) foi realizada para estimar o peso médio dos camarões a serem estocados em cada unidade experimental. No decorrer do experimento, foram feitas biometrias (n=20) semanais para se avaliar o ganho de peso (g) e também para ajustar a quantidade de ração fornecida aos camarões. A sobrevivência foi avaliada ao final das duas fases de cultivo por meio da contagem dos animais de cada unidade experimental. A taxa de conversão alimentar aparente foi calculada pela relação entre o total de ração fornecido aos camarões e a diferença entre a biomassa final e a inicial em cada tratamento.

2.4. Análise Estatística:

Os dados de temperatura, oxigênio dissolvido, pH, salinidade e alcalinidade foram submetidos a análise de variância de uma via ($p < 0,05$). Os resultados de amônia, nitrito, nitrato, turbidez, volume dos bioflocos (cone Imhoff) e sólidos suspensos totais foram submetidos a análise de variância de duas vias, em cada tempo ($p < 0,05$) Todos os testes foram realizados após a confirmação da homogeneidade das variâncias (Teste Levenes) e da normalidade dos dados (Teste Kolmogorov-Smirnov). O teste de Tukey foi aplicado quando foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos (Sokal e Rohlf, 1969).

3. RESULTADOS

Os principais resultados dos parâmetros físicos e químicos da água durante os 48 de cultivo estão apresentados na tabela 1:

Tabela 1 – Parâmetros físicos e químicos da água nos tratamentos T1 e T2, com adição prévia de 20 dias de NaNO₂, sem e com adição de biofilme, respectivamente e T3 e T4, com adição de NaNO₂ no dia da estocagem, sem e com adição de biofilme, respectivamente no cultivo de *Litopenaeus vannamei* em sistema de bioflocos, durante um período de 48 dias

Tratamento	T1 - NaNO ₂ (-20 dias)	T2 – NaNO ₂ +Biofilme (-20 dias)	T3 - NaNO ₂ (Estocagem)	T4 - NaNO ₂ +Biofilme (Estocagem)
Temperatura (°C)	26,8 ± 1,96 ^a	25,91 ± 1,72 ^a	26,34 ± 1,94 ^a	26,05 ± 1,65 ^a
O.D. (mg.L ⁻¹)	6,43 ± 0,45 ^a	6,39 ± 0,45 ^a	6,54 ± 0,43 ^a	6,41 ± 0,41 ^a
pH	8,05 ± 0,12 ^a	8,01 ± 0,12 ^a	8,05 ± 0,10 ^a	8,01 ± 0,09 ^a
Salinidade	30,64 ± 3,28 ^a	31,07 ± 3,19 ^a	28,68 ± 2,96 ^a	29,40 ± 2,48 ^a
Alcalinidade (mg.L ⁻¹)	158,67 ± 31,70 ^a	156,33 ± 31,08 ^{ab}	142 ± 26,91 ^b	141,67 ± 23,80 ^b
Turbidez (NTU)	270,84 ± 113,62 ^a	112,11 ± 63,72 ^b	228 ± 121,02 ^a	83,22 ± 57,70 ^b
Sólidos Sedimentáveis (ml.L ⁻¹)	46,12 ± 16,34 ^a	12,78 ± 6,62 ^b	35,78 ± 15,16 ^a	8,61 ± 5,07 ^b
SST (mg.L ⁻¹)	1166,06 ± 420,16 ^a	805,11 ± 482,49 ^b	818,83 ± 541,05 ^b	646,44 ± 507,30 ^b

Valores apresentados com Média ± Desvio Padrão; Letras diferentes na mesma linha correspondem a diferenças significativas entre os tratamentos.

Os resultados obtidos para o oxigênio dissolvido, a temperatura, o pH e a salinidade não diferiram significativamente entre os tratamentos ($p < 0,05$). Os resultados de turbidez, sólidos sedimentáveis e sólidos suspensos totais, que podem ser considerados parâmetros de acompanhamento do desenvolvimento dos bioflocos no cultivo, indicam que nos tratamentos em que não foram adicionados substratos para aderência de biofilme, houve um maior acúmulo de partículas suspensas na água, aumentando assim a quantidade de sólidos suspensos totais, volume dos bioflocos e da turbidez da água. Nos tratamentos com adição prévia de NaNO₂ com pode-se notar que independentemente da adição de biofilme, houve maior formação de bioflocos

demonstrando maior crescimento de biomassa bacteriana nos tratamentos T1 e T2 ($p > 0,05$).

As figuras 1a, 1b, 1c e 1d, representam as variações ao longo do tempo para os compostos nitrogenados (amônia, nitrito e nitrato). As médias das concentrações de amônia (N-NAT), nitrito (N-NO₂) e nitrato (N-NO₃) não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos em nenhum momento do cultivo ($p < 0,05$). Porém, algumas diferenças podem ser observadas entre os tratamentos em que foram utilizados substratos para fixação de biofilme. Esses tratamentos apresentaram uma espécie de compartimentalização no que diz respeito ao ciclo de transformações do nitrogênio dentro do cultivo. Nos tratamentos com biofilme, o pico de nitrito ocorreu a partir do 42º dia experimental, sendo que a partir desse momento o nitrito começa a diminuir, e o nitrato a aumentar. Já nos tratamentos em que apenas foi adicionado o nitrito de sódio, as concentrações de nitrito e nitrato sobem praticamente ao mesmo tempo.

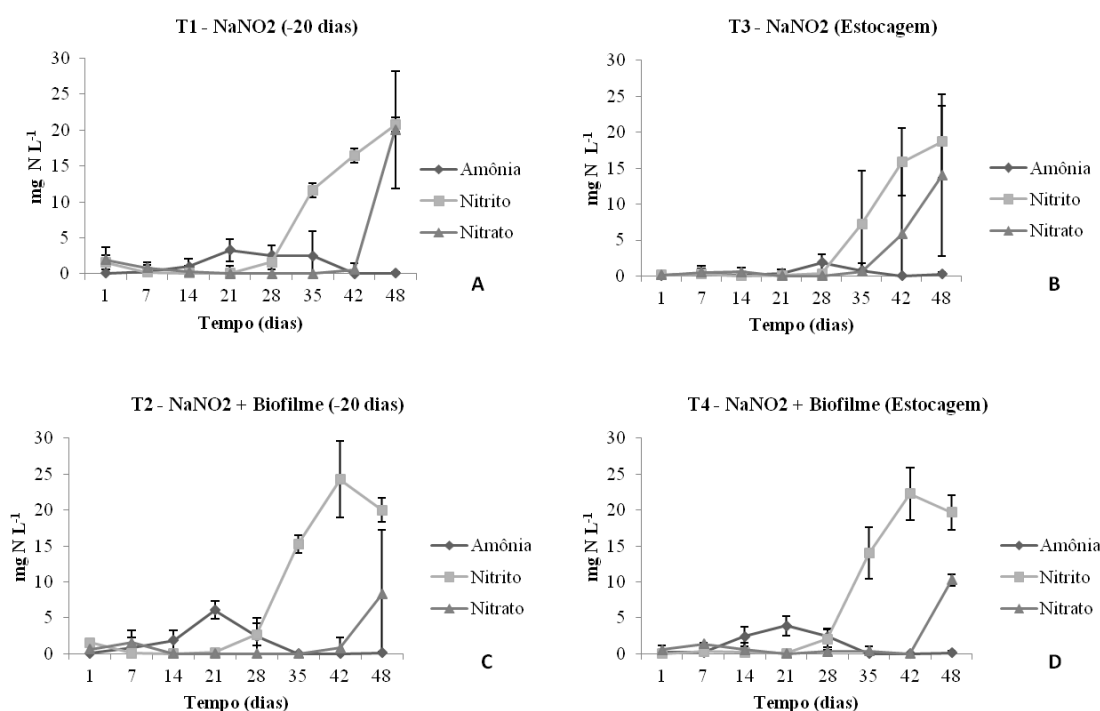


Figura 1 – Variação nos níveis de amônia (N-TAN), nitrito (N-NO₂) e nitrato (N-NO₃), ao longo de 48 dias de cultivo de *Litopenaeus vannamei* com e sem adição prévia (20 dias) de nitrito de sódio (NaNO₂) e com e sem adição de substratos artificiais para fixação de biofilme, em sistema de bioflocos

Os dados de desempenho zootécnico dos camarões estão apresentados na tabela 2. Ao final da fase de berçário, o peso médio e a sobrevivência dos camarões foi significativamente menor no tratamento em que foi adicionado NaNO₂ 20 dias antes da

estocagem e sem utilização de biofilme com relação aos demais tratamentos. Ao final da engorda, o peso médio final foi significativamente maior ($p>0,05$) nos tratamentos com adição de nitrito de sódio apenas na estocagem, independente da adição de substratos artificiais para fixação de biofilme. Já a sobrevivência não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos ($p<0,05$). Os resultados de conversão alimentar apresentaram médias menores nos tratamentos com adição de nitrito de sódio na estocagem, embora sem diferença significativa de T2.

Tabela 2 – Peso médio inicial e final (g), sobrevivência (%) e conversão alimentar aparente ao longo de 48 dias de cultivo de *Litopenaeus vannamei* com e sem adição prévia (20 dias) de nitrito de sódio (NaNO_2) e com e sem adição de substratos artificiais para fixação de biofilme, em sistema de bioflocos

Tratamento	T1 –	T2 –	T3 -	T4 -
	NaNO_2 (-20 dias)	NaNO_2 +Biofilme (-20 dias)	NaNO_2 (Estocagem)	NaNO_2 +Biofilme (Estocagem)
Peso Médio Inicial (g)	0,21 \pm 0,08	0,21 \pm 0,08	0,21 \pm 0,08	0,21 \pm 0,08
Peso Médio Final Berçário (g)	0,82 ^a \pm 0,40	0,95 ^{ab} \pm 0,40	1,13 ^b \pm 0,45	1,11 ^b \pm 0,49
Sobrevivência Berçário (%)	79,67 ^a \pm 19,34	94,83 ^b \pm 5,84	87,83 ^b \pm 1,62	92,83 ^b \pm 2,47
Peso Médio Final Engorda (g)	1,95 ^a \pm 0,96	1,67 ^b \pm 0,73	2,55 ^c \pm 0,85	2,77 ^c \pm 0,90
Sobrevivência Engorda (%)	97,22 ^a \pm 3,43	93,33 ^a \pm 10,13	100 ^a	97,78 ^a \pm 3,85
CAA	1,24 ^a \pm 0,49	1,07 ^b \pm 0,21	0,91 ^b \pm 0,13	0,84 ^b \pm 0,12

4. DISCUSSÃO

Segundo Ponce-Palafox et al (1997), a faixa de temperatura ótima para a sobrevivência de *Litopenaeus vannamei* fica em torno de 20-30°C. No presente estudo, as temperaturas mantiveram-se dentro da faixa recomendada pelos autores acima citados.

Em todos os tratamentos as concentrações de oxigênio dissolvido (mg/L) estiveram acima dos valores recomendados por Van Wyk & Scarpa (1999), que sugerem concentrações acima de 5 mg/L para melhores taxas de crescimento e sobrevivência de *L. vannamei*. No processo de nitrificação, o oxigênio dissolvido é um fator de extrema importância, sendo essencial para os processos de transformação da amônia e do nitrito, realizados pelas bactérias amônia oxidantes (AOB) e nitrito oxidantes (NOB), respectivamente. Diversos autores tem reportado os efeitos das concentrações de oxigênio dissolvido nas taxas de nitrificação tanto em sistemas de biofiltros suspensos ou aderidos (Beccari et al., 1992; Painter, 1986; Sharma & Ahlert, 1977; Stenstrom & Poduska, 1980) sendo que as máximas taxas de nitrificação ocorrem em concentrações de oxigênio próximas a 4 mg/L (Chen et al. 2006). As concentrações de oxigênio observadas no presente estudo estão acima dos valores recomendados considerando-se a elevada biomassa de camarões juntamente com a biomassa microbiana presente, as concentrações de oxigênio dissolvido foram adequadas para a manutenção de ambas para o funcionamento pleno do cultivo.

Van Wyk & Scarpa (1999) recomendam valores de pH dentro da faixa de 7 e 8,3 para o melhores resultados de crescimento e sobrevivência dos camarões. Em todos os tratamentos, o pH manteve-se dentro de valores próximos aos recomendados pelos autores acima citados. De acordo com Chen et al. (2006), a faixa de pH ótimo para o crescimento de bactérias nitrificantes é ampla, ficando entre 7 e 9. Esta faixa é determinada de acordo com os efeitos que o pH pode causar sobre a população de bactérias nitrificantes, levando em conta a ativação e desativação de suas atividades, o efeito nutricional ligado à alcalinidade e a inibição que pode ocorrer por meio da amônia e do ácido nitroso livres no sistema (Villaverde et al. 1997). A conversão da amônia em nitrito e posteriormente a nitrato é um processo que consome alcalinidade, devido ao fato de que os íons carbonato e bicarbonato são nutrientes essenciais para o desenvolvimento das bactérias nitrificantes (Ebeling et al. 2006). Além disso, os camarões cultivados também consomem alcalinidade, pois esses mesmos íons são

responsáveis pela formação da carapaça, sendo essencial para o crescimento dos crustáceos. Ebeling et al. (2006), recomendam valores de alcalinidade entre 100 e 150 mg/L (como CaCO_3), já Chen et al. (2006), indicam alcalinidade acima de 200 mg/L em biofilmes, considerando que há uma possível estratificação de pH e alcalinidade nesses sistemas, principalmente quando há baixa troca d'água. No presente estudo, a alcalinidade foi corrigida de acordo com metodologia proposta por Furtado et al. (2011), e manteve-se acima de 100 mg/L em todos os tratamentos. Porém, esses valores podem estar abaixo do requerido pelas bactérias nitrificantes, afetando o seu desenvolvimento.

No presente estudo, a salinidade manteve-se próxima aos níveis recomendados para a espécie (Ponce-Palafox et al. 1997). Há pouca informação sobre a influência da salinidade nas taxas de nitrificação dentro de biofilmes, porém sabe-se que em sistemas utilizando água com salinidades mais elevadas, há um período maior para que haja acúmulo de nitrito, quando comparados a salinidades mais baixas (Chen et al. 2006), o que pode ter influenciado a taxa de metabolização dos compostos nitrogenados no presente estudo.

O acúmulo de compostos nitrogenados, principalmente nas formas de amônia e nitrito é um problema comum em sistemas de produção de organismos aquáticos, sobretudo nos que utilizam pouca ou nenhuma renovação de água. Assim, se houver um desequilíbrio entre as taxas de produção e metabolização desses compostos, causado por diversos fatores, eles podem ser prejudiciais aos animais cultivados. As médias obtidas para amônia, nitrito e nitrato estiveram dentro da faixa considerada segura para o desempenho e sobrevivência dos camarões (Kuhn et al. 2010; Lin & Chen 2001, 2003). Mesmo nos períodos em que foram registrados os picos de amônia e nitrito durante o experimento, as concentrações somente ultrapassaram o nível de segurança para o nitrito durante um único dia, no tratamento com adição prévia de NaNO_2 e sem biofilme.

As bactérias autotróficas nitrificantes são um pequeno grupo de bactérias, com crescimento lento e altamente sensíveis às variáveis físicas e químicas da água (Chen et al. 2006) Já as bactérias heterotróficas, utilizam material orgânico pré-formado (carboidratos e proteínas) como fonte de carbono e energia, crescendo cerca de 10 vezes mais rápido do que as bactérias nitrificantes (Hargreaves, 2006). Assim, dependendo das condições do meio, as bactérias heterotróficas podem competir com as nitrificantes por área de superfície para adesão e pelo acesso ao oxigênio molecular (Cohen et al. 2005). Porém, o crescimento bacteriano heterotrófico, estimulado pela adição de fontes

de carbono no início do cultivo, pode levar a um acúmulo de sólidos suspensos totais (bioflocos), sendo necessária a remoção do excesso de sólidos para que não cause danos aos animais cultivados (Ebeling et al. 2006).

A partir dos resultados de amônia, nitrito e nitrato obtidos no presente estudo, pode-se observar que, provavelmente, a adição prévia de nitrito de sódio não influenciou na metabolização dos compostos nitrogenados no cultivo em sistema de bioflocos. As concentrações médias desses compostos não apresentaram diferenças significativas em nenhum dos dias experimentais, indicando que não houve um aumento da comunidade bacteriana nitrificante nos tratamentos com adição de NaNO_2 nos vinte dias anteriores ao período de cultivo. Esses resultados são contrários aos obtidos por Otsoshi et al. (2011), que observou menores flutuações nos níveis de nitrito ao longo do cultivo de *L. vannamei* em sistemas de bioflocos com a adição de NaNO_2 , nas mesmas concentrações que foram adicionadas no presente estudo.

O fator que provavelmente afetou as taxas de nitrificação no presente estudo foi a adição de substratos artificiais para fixação de biofilme. Embora não tenham sido detectadas diferenças significativas para as médias dos compostos nitrogenados entre os tratamentos, parece ter acontecido nos tratamentos com adição de substrato um espaçamento temporal entre a oxidação da amônia até nitrato. Assim, parece que o biofilme proporciona um crescimento mais lento das bactérias nitrificantes, porém seu número é suficiente para a metabolização tanto da amônia como do nitrito, evitando seu acúmulo ao longo do cultivo.

As taxas de crescimento das bactérias autotróficas nitrificantes também podem ter sido influenciadas pelo acúmulo de sólidos suspensos totais, observadas em todos os tratamentos. A formação dos bioflocos ocorreu de forma mais acelerada nos tratamentos com adição prévia, mostrando que possivelmente esse composto seja um estimulador da comunidade microbiana e assim, do desenvolvimento dos bioflocos. Esses dados são confirmados quando analisamos a relação dos sólidos suspensos totais, com os resultados de sólidos sedimentáveis, bem como dos maiores valores de turbidez obtidos nesses tratamentos. Estudos conduzidos por Ray et al. (2010, 2011) e Gaona et al. (2012), comprovam que a manutenção de baixas concentrações de sólidos suspensos totais podem contribuir com o desenvolvimento de bactérias nitrificantes, provavelmente devido à competição por substrato com as bactérias heterotróficas. Além disso, esses mesmos autores evidenciam que o manejo dos sólidos também é fundamental para o crescimento dos camarões. Os resultados de sólidos suspensos totais

obtidos no presente trabalho estão acima dos recomendados por esses autores para que se obtenham os melhores resultados de desempenho zootécnico no sistema de bioflocos.

A utilização de substratos artificiais para fixação do biofilme tem sido reportada como uma técnica que contribui para o crescimento e sobrevivência dos camarões em diversos trabalhos (Arnold et al. 2009; Audelo-Naranjo et al. 2011, Ballester et al. 2007; Moss & Moss 2004), principalmente na fase de berçário, devido ao valor nutricional que os microorganismos presentes no biofilme possuem (Abreu et al. 2007; Ballester et al. 2003; Viau et al. 2012). Porém, não existem muitos trabalhos que relatem o efeito da adição de compostos que estimulem o crescimento microbiano anterior ao cultivo. Um estudo feito por Sesuk et al. (2009), com aclimação prévia (78 dias) de um tipo de superfície para adesão de bactérias e adição de cloreto de amônia (NH_4Cl) mostrou ser eficiente na melhoria dos resultados zootécnicos para tilápias em sistema BFT. Na fase de berçário, o biofilme pode ter contribuído com a elevada sobrevivência em T2, mesmo com valores de sólidos suspensos totais elevados. Já, os resultados obtidos para o desempenho zootécnico dos camarões na fase de engorda evidenciam que a adição prévia de NaNO_2 provavelmente não contribui para a melhoria do crescimento, sobrevivência e conversão alimentar dos camarões em sistemas BFT. O que de fato acontece é uma maior formação de bioflocos, que se não tiver seu crescimento controlado pode levar a danos na produção (Almeida 2012). Nos tratamentos em que o NaNO_2 foi adicionado apenas no dia da estocagem, os resultados de biomassa final foram melhores provavelmente devido ao crescimento mais lento da biomassa bacteriana.

Além disso, as baixas taxas de conversão alimentar aparente podem ter sido consequência da produtividade microbiana suspensa e também da aderida aos substratos artificiais, mostrando uma tendência a ser melhor nos tratamentos nos tratamentos que continham biofilme, reduzindo assim, os custos com alimentação dos camarões. Esses resultados estão de acordo com os estudos realizados por Emerenciano et al. (2012), Ballester et al. (2007), Mishra et al. (2008), Viau et al. (2012) e Wasielesky et al. (2011), que observaram aproveitamento da comunidade microbiana presentes nos bioflocos e no biofilme como fonte adicional de alimento para camarões peneídeos.

Assim, tendo em vista a interferência de todos os fatores expostos tanto no processo de nitrificação como no crescimento e sobrevivência dos camarões, pode-se concluir que a adição prévia de NaNO_2 pode ser uma alternativa para estimular a produção mais rápida de bioflocos dentro do sistema. Porém, um crescimento rápido e

descontrolado da biomassa bacteriana (principalmente heterotrófica) no cultivo, pode causar prejuízos ao produtor, se não forem realizadas intervenções para a retirada de sólidos suspensos totais. Além disso, o presente estudo sugere que o processo de nitrificação ocorre de uma forma mais lenta e organizada quando se adicionam substratos artificiais para fixação de biofilme no cultivo em sistema de bioflocos, evitando assim que haja um acúmulo de compostos nitrogenados tóxicos aos animais cultivados ao mesmo tempo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, P.C., Ballester, E.L.C., Odebrecht, C., Wasielesky, W., Cavalli, R.O., Granéli, W., Anesio, A.M., 2007. Importance of biofilm as food source for shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*) evaluated by stable isotopes ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 347, 88-96
- American Public Health Association (APHA), 1989. Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington. pp.1193.
- Arnold, S.J., Coman, F.E., C.J. Jackson, S.A. Groves, 2009. High-intensity, zero-exchange production of juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*: An evaluation of artificial substrates and stocking density. Aquaculture 293,42-48.
- Audelo-Naranjo, J.M., Martínez-Córdova, L.R., Voltolina, D., Gómez-Jiménez S., 2011. Water quality, production parameters and nutritional condition of *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) grown intensively in zero water exchange mesocosms with artificial substrates. Aquacult. Res. 42, 1371-1377.
- Avnimelech, Y., 1999. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. Aquaculture 176, 227–235.
- Avnimelech, Y., 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. Aquaculture 264,140-147.
- Avnimelech, Y., 2009. Biofloc Technology – A Practical Guide Book. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA.
- Ballester, E.L.C, Wasielesky, W., Cavalli, R. O., Santos,M.H. S., Abreu, P. C., 2003. Influência do biofilme no crescimento do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* em sistemas de berçário. Atlântica 25(2),117-122.
- Ballester, E.L.C., Wasielesky, W., Cavalli, R.O., Abreu, P.C., 2007. Nursery of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* in cages with artificial substrates: Biofilm composition and shrimp performance. Aquaculture 269,355-362.

- Beccari, M., Di Pinto, A.C., Ramadori, R., Tomei, M.C., 1992. Effects of dissolved oxygen and diffusion resistances on nitrification kinetics. *Water Res.* 26, 1099–1104.
- Biddanda, B.A., 1985. Microbial synthesis of macroparticulate matter. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 20, 241–251.
- Biddanda, B.A. & Pomeroy, L.R., 1988. Microbial aggregation and degradation of phytoplankton-derived detritus in seawater. I. Microbial succession. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 42, 79–88.
- Browdy, C.L., D. Bratvold, A.D. Stokes & R.P. McIntosh. 2001. Perspectives on the application of closed shrimp culture systems. In: Browdy, C.L., Jory, D.E. (Eds.). *The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture 2001*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA, pp 20-34.
- Chen, S., Ling, J., & Blancheton, J.-P., 2006. Nitrification kinetics of biofilm as affected by water quality factors. *Aquacult. Eng.* 34, 179-197.
- Cohen, J., Samocha, T., Fox, J., Gandy, R., Lawrence, A., 2005. Characterization of water quality factors during intensive raceway production of juvenile *Litopenaeus vannamei* using limited discharge and biosecure management tools. *Aquacult. Eng.* 32, 425–442.
- De Schryver, P., Crab, T., Defroidt, N., Boon, W.V., 2008. The basics of bio-flocs technology: The added value for aquaculture. *Aquaculture* 277,125-137.
- Ebeling, J.M., Timmons, M.B., Bisogni, J.J., 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic and heterotrophic removal of ammonia – nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture* 257,346-358.
- Emerenciano, M., Ballester, E. L. C., Cavalli, R. O., Wasielesky, W. 2012. Biofloc technology application as a food source in a limited water exchange nursery system for pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817). *Aquacult. Res.*, 43(3), 447-457.

- Fitch, M.W., Pearson, N., Richards, G., Burken, J.G., 1998. Biological fixed-film systems. *Water Environ. Res.* 70, 495–518.
- Furtado, P., 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.
- Gaona, C.A.P., Poersch, L.H., Krummenauer, D., Foes, G.K., Wasielesky, W., 2012. The effect of solids removal on water quality, growth and survival of *Litopenaeus vannamei* in a biofloc technology culture system. *International Journal of Recirculating Aquaculture* (Artigo Aceito para Publicação).
- Hargreaves, J.A., 2006. Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. *Aquacult. Eng.* 34,344–363.
- Hopkins, J.S., Hamilton, R.D., Sandifer, P.A., Browdy, C.L., Stokes, A.D., 1993. Effects of water exchange rate on production, water quality, effluent characteristics and nitrogen budgets of intensive shrimp ponds. *J. World Aquac. Soc.* 24,304–320.
- Hopkins, J.S., Sandifer, P.A., Browdy, C.L., 1995. Effect of two feed protein levels and feed rate combinations on water quality and production of intensive shrimp ponds operated without water exchange. *J. World Aquac. Soc.* 26,93-97.
- Jory, E.J., Cabrera, T.R., Dugger, D.M., Fegan, D., Lee, P.G., Lawrence, A.L., Jackson, C.J., McIntosh, R.P., Castañeda, J., 2001. A global review of shrimp feed management: status and perspectives. In: *The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture 2001*. Baton Rouge, USA, 118-143.
- Kuhn, D.D., Smith, S.A., Boardman, G.D., Angier, M.W., Marsh, L., Flick Jr., G.J., 2010. Chronic toxicity of nitrate to Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: Impacts on survival, growth, antennae length, and pathology. *Aquaculture* 306,329-333.

- Lin, Y-C, Chen, J-C., 2001. Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 259,109-119.
- Lin, Y-C, Chen, J-C., 2003. Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels. *Aquaculture* 224,193-201.
- Maicá, P.F., Borba, M.R., Wasielesky, W., 2012. Effect of low salinity on microbial floc composition and performance of *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles reared in a zero-water-exchange super-intensive system. *Aquacult. Res.*43,361-370.
- Michaud, L., Blancheton, J. P., Bruni, V., Piedrahita, R., 2006. Effect of particulate organic carbon on heterotrophic bacterial populations and nitrification efficiency in biological filters. *Aquacult. Eng.* 34, 224-233.
- Mishra, J. K., Samocha, T. M., Patnaik, S., Speed, M., Gandy, R. L., Ali, A.-M. (2008). Performance of an intensive nursery system for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, under limited discharge condition. *Aquacult. Eng.* 38(1), 2-15.
- Moss, S.A., G.D. Pruder & T.M. Samocha. 1999. Environmental management and control: controlled ecosystem and biosecure shrimp growout systems. In: Bullis, R.A., Pruder, G.D. (Eds.), *Controlled and Biosecure Production Systems, Preliminary Proceedings of a Special Integration of Shrimp and Chicken Models*, 27–30 April. Sydney, Australia. World Aquaculture Society, pp. 87–91.
- Moss, K.K., Moss, S.M., 2004. Effects of artificial substrate and stocking density on the nursery production of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J. World Aquac. Soc.* 35, 536-542.
- Nogueira, R., Lazarova, V., Manem, J., Melo, L.F., 1998. Influence of dissolved oxygen on the nitrification kinetics in a circulating bed biofilm reactor. *Bioprocess Eng.* 19, 441-449.

- Otoshi, C.A., Rodriguez, N., Moss, S.M., 2011. Establishing nitrifying bacteria in super-intensive biofloc shrimp production. *Glob. Aquac. Advoc.* 14(4): 24-26
- Painter, H.A., 1986. Nitrification in the treatment of sewage and wastewaters. In: Prosser, J.I. (Ed.), *Nitrification*. IRL Press, Oxford.
- Ponce-Palafox, J., Martinez-Palacios, C.A., Ross, L.G., 1997. The effect of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. *Aquaculture* 157,107-115.
- Ray, A.J., Lewis, K.S., Browdy, C.L., Leffler, J.W., 2010. Suspended solids removal to improve shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and an evaluation of a plant-based feed in minimal-exchange, superintensive culture systems. *Aquaculture* 299,89-98.
- Ray, A.J., Dillon, K.S., Lotz, J.M., 2011. Water quality dynamics and shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production in intensive, mesohaline culture systems with two levels of biofloc management. *Aquacult. Eng.* 45,127-136.
- Sesuk, T., Powtongsook, S., Nootong, K., 2009. Inorganic nitrogen control in a novel zero-water exchanged aquaculture system integrated with airlift-submerged fibrous nitrifying biofilters. *Bioresource Technol.* 100(6), 2088-2094.
- Sharma, B., Ahlert, R.C., 1977. Nitrification and nitrogen removal. *Water Res.* 11897–11925.
- Sokal, R.R. & F.J. Rohlf. 1969. *Biometry. Principle and practices of statistics in biological research*. W. H. Freeman & Co, 776p.
- Stenstrom, M., Poduska, R., 1980. The effect of dissolved oxygen concentration on nitrification. *Water Res.* 14, 643–649.
- Strickland, J.D.H., Parsons, T.R., 1972. *A practical handbook of seawater analysis*. Ottawa: Fishery Research Board Canada, p.p.310.

- UNESCO, 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring. Manual and Guides 12, Intergovernmental Oceanographic Commission. Paris, France.
- Van Wyk, P. , Scarpa, J., 1999. Water Quality and Management. In: Van Wyk, P., et al. (Eds.), Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Tallahassee, p.p. 128–138.
- Viau, V. E., Souza, D. M., Rodríguez, E. M., Wasielesky, W., Abreu, P. C., Ballester, E. L. C., 2012. Biofilm feeding by postlarvae of the pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Decapoda, Penaeidae). *Aquacult. Res.* doi:10.1111/j.1365-2109.2011.03087.x
- Villaverde, S., Garcia-encina, P.A., Fdz-Polanco, F., 1997. Influence of pH over nitrifying biofilm activity in submerged biofilters. *Water Res.* 31, 1180–1186.
- Wasielesky, W. J., Atwood, H.I, 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.
- Wasielesky Jr, W., Abreu, P. C., Poersch, L. H., Thompson, F., Ballester, E. L. C., 2011. Influence of light intensity on biofilm formation and the performance of pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* juveniles reared in cages. *Aquacult. Res.* doi:10.1111/j.1365-2109.2011.02878.x

CONCLUSÕES:

- O incremento nas quantidades de substrato artificial adicionado de 200% para 400% no sistema de cultivo superintensivo sem renovação de água manteve as concentrações de nitrito abaixo dos níveis recomendados para o camarão *L. vannamei*. Porém, de acordo com os resultados obtidos no tratamento com adição de 400% de substrato, o processo microbiano de remoção de amônia pareceu ser realizado principalmente pelas bactérias heterotróficas, o que produziu um efluente com menor potencial de eutrofização ao final do estudo em relação aos compostos nitrogenados.
- O reuso da água de um cultivo prévio confirmou a eficiência de bioflocos já formados na manutenção de níveis de amônia e nitrito próximos a zero durante todo o cultivo. Contudo, devido à remoção microbiana desses compostos ser feita predominantemente pelas bactérias autotróficas nitrificantes, houve um acúmulo de nitrato ao final do experimento, podendo ser um fator limitante na reutilização de água durante vários ciclos de cultivo.
- O tratamento controle evidenciou a necessidade de se utilizar técnicas para que se encontre um balanço entre as taxas de formação e transformação do nitrito dentro do sistema, para que este não acumule e torne-se tóxico aos animais, sem que haja necessidade de renovação de água. Além disso, observou-se também que as bactérias nitrificantes necessitam de um tempo maior para se estabelecer de forma efetiva dentro do sistema, evitando grandes flutuações de amônia e nitrito.
- A adição prévia de nitrito de sódio no sistema pareceu agir na formação dos bioflocos, aumentando a quantidade de sólidos suspensos totais e volume dos bioflocos aonde este composto foi utilizado 20 dias antes do cultivo. Assim, recomenda-se o uso de pequenas quantidades desse sal para que não ocorra acúmulo de matéria orgânica no cultivo.
- O biofilme parece atuar na formação dos bioflocos, contendo um acúmulo de sólidos, devido ao aumento de superfície para adesão das partículas. Além disso, nos tratamentos em que foram utilizados substratos artificiais, pareceu ocorrer uma maior compartimentalização nos processos de formação de nitrito e nitrato, evitando que haja um acúmulo de compostos nitrogenados ao mesmo tempo durante o cultivo.

- A adição de substratos artificiais pode ter contribuído com os melhores resultados de crescimento e sobrevivência dos camarões na maior parte dos tratamentos em que foram utilizados em ambos os experimentos.
- Em ambos os experimentos, ficou comprovado que o controle de sólidos suspensos totais é uma técnica de manejo que deve ser adotada no cultivo em sistema de bioflocos, visto que, de acordo com os resultados obtidos, este parece ter sido um dos principais fatores que afetou o crescimento dos camarões, além das elevadas concentrações de nitrito na água.