

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

SIMONE SOARES OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DO CONSÓRCIO DE
BACTÉRIAS NITRIFICANTES PELO MÉTODO FISH
(FLUORESCENT *IN SITU* HYBRIDIZATION) NO
BIOFILME E ÁGUA DE SISTEMAS DE CULTIVO DO
CAMARÃO-ROSA *Farfantepenaeus paulensis*.**

RIO GRANDE - RS

Fundação Universidade Federal do Rio Grande

Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura

Caracterização do Consórcio de Bactérias Nitrificantes pelo
Método FISH (Fluorescent *in situ* Hybridization) no Biofilme e
na Água de Sistemas de Cultivo do Camarão-Rosa
Farfantepenaeus paulensis.

Simone Soares Oliveira

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo César Abreu
Co-orientador: Prof. Dr. Wilson Wasielesky

Rio Grande
Julho de 2004

Índice

Resumo	1
Abstract	3
Introdução	5
Objetivos	9
Material e Métodos	10
Experimento Larvicultura	10
Experimento Berçário	13
Resultados	15
1) Comparação entre contagens de bactéria: TOTAL x FISH	15
2) Larvicultura	16
3) Berçário	21
4) Balanço de Massa de Nitrogênio	29
Discussão	30
1) Comparação entre contagens de bactéria: TOTAL x FISH	30
2) Sucessão Microbiana	31
2.1) Larvicultura	32
2.2) Berçário	34
3) Compostos Nitrogenados e grupos específicos	35
3.1) Larvicultura	35
3.2) Berçário	37
4) Balanço de Massa de Nitrogênio	39
Conclusões e Perspectivas	42
Literatura Citada	43
Anexo	52

*Á minha mãe Glaci
e ao meu filho Pedro,
por toda paciência e
carinho. Amo vocês!*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Paulo Abreu, pela orientação neste trabalho e contribuição à minha formação profissional e pessoal.

Aos professores Luís Fernando Marins e Vivian Pellizari por suas críticas e sugestões como membros da banca examinadora.

Ao meu querido Mano ("Co"), pelos ensinamentos em aquicultura, apoio e amizade dedicado durante a realização deste trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de Ecologia de Fitoplâncton e Microorganismos Marinhos: Bia, Carlos, Clarisse, Dionéia, Giuli, Joana, Lucélia, Márcio, Marli, Odete, Paulo, Renato, Sirlei, Valnei, Virgínia, Vivi Juliano.

Ao pessoal da EMA, professores, funcionários e estagiários, que me auxiliaram na realização dos experimentos: Angela, Bruno, Dariano, Eduardo (sempre com uma idéia brilhante!), Jorginho, Lisa, Leandro, Leonardo, Luciano, Mano, Marcos Abe, Marquinhos, Sr. Hermes, Santa Casa, Ronaldo, Sandro.

Á FAPERGS pela concessão de bolsa durante a realização do trabalho.

Ao Dariano pelos ensinamentos em cultivo de camarão e por me dar o Pedro.

Ás queridas amigas: Cris, Lucélia, Tati, Vivian e meninas super-poderosas: Vivi e Joana, que sempre estiveram por perto, Adoro Vocês!

Ao pessoal do Larus: Anderson, Alemão, Anália, Carol, Cássio, Cris, Dóris, Faiston, Jose, Juliano, Katriana, Loreta, Luís, Medicina, Neve, Priscila, Renato, Tiago, Valéria. Obrigada pela amizade e oportunidade de convivência com pessoas incríveis como vocês!

À minha "irmã" Mauren, por fazer parte da minha vida.

Aos meus divertidos e inigualáveis amigos, por proporcionarem os almoços mais divertidos da minha vida: Giuli, Márcio, Japa.

Ao Carlos (Japa) pela inesgotável paciência e por sua inteligência.

Ao Lu, por todo incentivo, paciência e carinho! Te adoro!

Ao meu irmão Moisés, por estar sempre do meu lado e aos meus irmãos Júlio e Denis, que embora longe, estão "sempre por perto". E aos seus filhos lindos: Aline, Amanda, César, Júlia, Bibi, Andressa e Ângelo

Á minha querida mãe, "culpada" pela realização da maioria dos meus sonhos.

Á razão da minha vida e de tudo o que faço, Pedro: obrigada pela sua paciência, carinho e alegria. Você é minha maior fonte de inspiração e de orgulho!

Resumo

Uma das principais preocupações em sistemas de cultivo é o acúmulo de produtos nitrogenados, especialmente amônia (NH_4). A troca de água de tanques, bem como a adição de fitoplâncton, são algumas das técnicas empregadas para se reduzir o nível de amônia nos sistemas de cultivo. Outra possibilidade seria a adição de bactérias nitrificantes como probióticos. Entretanto é necessário que esses microorganismos sejam obtidos da própria microbiota presente nos tanques para que não haja qualquer problema devido à adição de um organismo exótico. Devido a limitações técnicas, a identificação e isolamento de bactérias em ambientes de cultivo, como na natureza era sempre feita em pequena escala e em laboratórios especializados. Com o avanço de técnicas de biologia molecular é possível identificar grupos filogenéticos, determinar a variação espacial e temporal de espécies de microorganismos e elucidar função e atividade de comunidades coletadas do ambiente. Com o objetivo de estabelecer aspectos da sucessão bacteriana em tanques de cultivo através de técnicas de biologia molecular e relacionar a presença de bactérias nitrificantes no biofilme e na água foi utilizado neste estudo o método FISH (Fluorescent *in situ* hybridization). Este método é baseado na hibridização com marcadores fluorescentes de segmentos do rRNA 16S que demarcam grupos específicos de bactérias. Foram utilizadas as sondas α -, β - e γ -proteobactérias, que contempla a maioria das bactérias nitrificantes. Os experimentos foram conduzidos na Estação Marinha de Aqüicultura – EMA/FURG, no período de novembro de 2002 a fevereiro de 2003, nas fases de larvicultura e berçário do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis*. Foi adicionado aos tanques substrato artificial para formação de biofilme, que eram coletados diariamente para análise da composição da assembléia de bactérias e clorofila *a*. Amostras de água eram coletadas para análise de amônia, nitrito e nitrato, além de dados de abundância de bactérias. No experimento na larvicultura foi observada a maior concentração de amônia na água, que atingiu 413,98 μM no tempo 2, diminuindo para 73,92 μM no tempo seguinte. Os grupos β - e γ -proteobactérias estiveram mais relacionados com a variação da amônia nos tanques e, através do balanço de massa de nitrogênio na larvicultura, foi possível verificar que a maior absorção de nitrogênio dos tanques ocorreu devido a nitrificação (22,3%). No segundo experimento (berçário) foi possível avaliar o impacto da predação do camarão sobre o biofilme, observando-se um efeito positivo sobre as microalgas quanto sobre as

bactérias do biofilme, isto é, a maior abundância de bactérias foi obtida em substratos sujeitos à predação do camarão, assim como a maior concentração de clorofila *a*. A concentração de compostos nitrogenados influenciou a composição da assembléia de bactérias no biofilme e na água, principalmente com a predominância de bactérias dos grupos β - e γ -proteobactérias, relacionadas com a variação da amônia, enquanto que bactérias do grupo α -proteobactéria estiveram relacionadas com a variação de nitrito.

Abstract

One of the main concerns in culture systems is the accumulation of nitrogen products, especially ammonium (NH_4). Water exchange, as well as, the addition of phytoplankton are the main techniques used to reduce the ammonium levels in the culture systems. Other possibility would be the accretion of nitrifying bacteria as probiotics. However, it is necessary that these microorganisms are obtained from the tanks microbiota, to avoid problems due to the introduction of exotic microorganisms. Due to technical limitation, the identification and isolation of bacteria from raising environment, as well as from nature, was always conducted in small scale at specialized laboratories. With the progress of molecular biology techniques it is possible to identify phylogenetic groups, to determine the space and time variation of species and to elucidate function and activity of microorganisms present in environmental samples. With the objective to identify the aspects of the bacterial succession in culture tanks through molecular biology techniques and to relate the presence of nitrifying bacteria in the biofilm and in the water, the FISH (Fluorescent *in situ* hybridization) method was used. It is based on the hybridization of fluorescent probes of 16S-rRNA that mark specific groups of bacteria. The probes α -, β - and γ -proteobactérias probes were used. The experiments were conducted in the Aquaculture Marine Station - EMA/FURG, in the period of November of 2002 to February of 2003, in the hatchery and nursery phases of the pink-shrimp *Farfantepenaeus paulensis* raising. Artificial substrates were added to the tanks for biofilm formation, and were daily collected and analyzed for the composition of the bacterial assemblage and chlorophyll *a*. Water samples were also daily collected for analysis of ammonium, nitrite and nitrate, besides data of bacterial abundance. In the hatchery experiment the largest concentration of ammonia was measured in the water, reaching 413,98 μM on the 2 time and decreasing to 73,92 μM in the following time. The β - and γ -proteobactérias groups were better related with the ammonium variation in the tanks, and through the nitrogen mass balance in the hatchery it was possible to verify that the largest uptake of nitrogen of the tanks was through nitrification (22,3%). In the second experiment (nursery) it was possible to evaluate the impact of the shrimp grazing on the biofilm, generating a positive effect on microalgae as on bacteria present in the biofilm. Larger abundance of bacteria was obtained in substrate to the shrimp grazing, similarly to the chlorophyll *a* concentration. The concentration of nitrogen

compounds influenced the composition of the assemblage of bacteria in the biofilm and in the water with the predominance of β - and γ -proteobacteria groups, related to the ammonium variation, while the α -proteobacteria were related to the nitrite variation.

Introdução

Uma das principais preocupações com os sistemas de cultivo intensivo de camarão é o acúmulo de produtos nitrogenados, especialmente amônia (NH_4). Vários autores já demonstraram que o acúmulo desse composto pode ser tóxico para os camarões, afetando seu consumo alimentar, crescimento e a sobrevivência destes organismos (Cavalli *et al.*, 1996; Miranda F^o, 1997; Ostrensky & Poerch, 1992; Ostrensky & Wasielesky, 1995; Tomasso, 1994; Wasielesky *et al.*, 1994).

Thompson *et al.* (2002), em um estudo sobre a eficiência do biofilme (matriz orgânica colonizada por microorganismos que se estabelece sobre qualquer superfície submersa) na manutenção da qualidade de água em tanques de cultivo, relacionaram a redução na concentração de amônia, principalmente à absorção deste elemento pelas microalgas e cianobactérias presentes no biofilme. Entretanto, o surgimento de compostos nitrogenados menos tóxicos como nitrito e nitrato nos tanques de cultivo após os máximos valores de amônia alcançados, indicaram que as bactérias nitrificantes presentes no biofilme e na água têm também um importante papel na manutenção da qualidade da água.

Alguns dos cuidados fundamentais com a qualidade da água em sistemas de cultivo estão relacionadas com as substâncias formadas no decorrer do ciclo do nitrogênio, o que para inúmeros aqüicultores representa um grande problema. O nitrogênio é um elemento importante em sistemas aquáticos, sendo vital como macronutriente; é a chave para a formação de aminoácidos e conseqüentemente das proteínas. Na água, encontra-se sob as formas de gás dissolvido, combinações orgânicas e inorgânicas, sendo fixado na forma molecular pelas bactérias, cianobactérias e alguns fungos. A amônia (NH_3) é a primeira substância desse ciclo, ocorrendo como resultado da digestão dos alimentos ingeridos pelos organismos aquáticos ou pela ação de certas bactérias decompositoras, sobre as sobras de alimentos e dejetos presentes no sistema. É tóxica, porém bastante volátil. A amônia orgânica (NH_3) na água transforma-se em amônia inorgânica livre (NH_4^+), que posteriormente é oxidada por bactérias nitrificantes presentes no substrato (na camada solo/água ou do filtro biológico), transformando-se em nitrito (NO_2^-), substância mais tóxica. O nitrito (NO_2^-) na presença de oxigênio e de bactérias especializadas irá formar o nitrato (NO_3^-), a princípio uma substância menos tóxica, mas bem menos volátil (Pádua, 2004; Vinatea-Arana, 1997; Ostrensky &

Poerch, 1992). Em altos níveis de amônia é sugerida renovação diária da água dos tanques (Wasielesky, 2000; Santos, 2003; Ostrensky & Wasielesky, 1995) diluindo assim a carga orgânica do sistema. É importante também retirar o excesso de alimento e manter a oxigenação da água. A adição de fitoplâncton aos sistemas de cultivos é uma prática muito utilizada no manejo para melhoria da qualidade da água. Alguns autores afirmam que a liberação de oxigênio na água mediante processo fotossintético é a principal fonte de obtenção do oxigênio dissolvido em sistemas de cultivo, além de garantirem uma fonte de alimento aos organismos cultivados (Kubitza, 2003; Burford *et al.*, 2003).

Além da manutenção da qualidade de água, os microorganismos presentes no biofilme podem ter grande importância como fonte de alimento para os organismos cultivados e no controle das doenças (Abreu *et al.*, 1998). Porém, pouco se sabe sobre a estrutura da comunidade de bactérias que compõem o biofilme. O grande obstáculo para essa compreensão tem sido a dificuldade na identificação das bactérias devido às técnicas convencionalmente utilizadas. Com o avanço da biologia molecular e o uso dessas novas técnicas no estudo da ecologia de microorganismos, é possível agora identificar grupos filogenéticos, determinar a variação espacial e temporal de espécies de microorganismos e elucidar função e atividade das comunidades microbianas diretamente em amostras coletadas no ambiente, sem a necessidade de cultivo mono-específicos de bactérias (Aoi, 2002).

Atualmente a maior parte dos estudos sobre composição microbiana é baseado em alguma técnica de biologia molecular. Busse *et al.* (1996) faz uma revisão dos principais métodos de classificação e identificação de bactérias e destaca a importância da utilização de várias técnicas ao identificar bactérias. Este autor ainda descreve inicialmente os métodos mais antigos como: morfologia, tamanho e cor das células e das colônias, motilidade, coloração através método Gram, características fisiológicas (temperatura, pH, salinidade preferenciais), bioquímicas (fonte de carbono, enzimas), além de testes inibitórios (seletividade do meio, antibióticos) sorológicos (aglutinação e imunodifusão) e quimiotaxonômicos, através da análise do conteúdo de ácidos graxos, parede celular, pigmentos, etc. Utilizando algumas destas técnicas, alguns trabalhos puderam caracterizar a comunidade microbiana do biofilme. Por exemplo, Abrahan & Palaniappan (2004) estudaram a distribuição de vîrios em cultivo de camarão

utilizando técnicas bioquímicas de identificação destes microorganismos; Gomez *et al.* (2003) analisou a influência da concentração de etanol na composição de bactérias nitrificantes em filtros, obtendo cepas de bactérias através de inóculo em placas com meio específico para o crescimento destas células, além de utilizar a morfologia das células, o método Gram, a motilidade e testes de catalase entre outros; Jackson *et al.* (2001) em estudo de mudanças na formação do biofilme afirma que os métodos moleculares sozinhos não fornecem muita informação e utilizou a técnica de DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis) juntamente com a técnica mais antiga de determinação de abundância bacteriana NMP(número mais provável) . Já Buswell *et al.* (1997) analisando a co-agregação entre bactérias do biofilme utilizou técnicas de isolamento, método de Gram e morfologia das células e das colônias para caracterizar os grupos de bactérias.

Na última década muitos métodos moleculares têm sido desenvolvidos e seu potencial para ecologia microbiana tem sido provado (Amann & Ludwig, 2000). Um grande número de técnicas está surgindo para determinar a atividade de microorganismos não-cultivados (Giovannoni & Rappé, 2000), e caracterizar estas comunidades *in situ* e a partir de pequenas amostras (Araya *et al.*, 2002; DeLong *et al.*, 1989). As técnicas de biologia molecular apresentam-se cada vez mais abrangentes e acessíveis, além da facilidade de manuseio. O desenvolvimento de tecnologias como *in situ* PCR e citometria de fluxo prometem aumentar a velocidade com que novas espécies de bactérias possam ser identificadas em amostras do ambiente, sem a necessidade de seu cultivo (Burton, 1996).

Os métodos de biologia molecular que podem ser empregados na identificação de espécies, ou grupos de bactérias incluem: polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP); amplificação de DNA (AFLP, AP-PCR, RAPD, ARDRA); hibridização de DNA-DNA e DNA-rRNA; seqüenciamento de r-RNA e DNA entre outros (Olive & Bean, 1999; Busse *et al.* 1996).

Neste estudo foi empregado o método de biologia molecular denominado FISH (Fluorescent *in situ* Hybridization) (Pernthaler *et al.* 2000), que permite enumerar e identificar grupos de bactérias provenientes de amostras do ambiente. Este método é baseado na hibridização com marcadores (sondas) fluorescentes de segmentos do 16S-rRNA, que demarcam bactérias de espécies ou grupos específicos. Em princípio, o

FISH permite não só a identificação filogenética de grandes grupos, mas também a determinação da abundância e tamanho das células demarcadas.

As bactérias nitrificantes fazem parte dos grupos α , β , e γ -proteobactéria e são responsáveis pela oxidação da amônia a nitrato via nitrito (nitrificação) e seguido pela desnitrificação, que reduz o nitrato a nitrogênio gasoso, processos que também reduzem o nível de amônia nos tanques de cultivo. As sub-classes β , e γ -, da classe *Proteobacteria*, contém a maior parte das espécies de bactérias nitrificantes, isto é, aquelas responsáveis pela oxidação da amônia. Entre estas, se destacam os gêneros *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* e *Nitrospira* (Bothe *et al.*, 2000). Vários trabalhos têm sido realizados aplicando-se o método FISH para estudo das comunidades de bactérias nitrificantes em biofilme. Araya *et al.* (2002) encontrou dominância do grupo β -proteobactéria no biofilme bacteriano em um rio eutrófico; Biesterfeld *et al.* (1998) analisando biofilme em filtros, encontrou forte correlação entre a presença de bactérias dos grupos α - e β -proteobactéria e redução dos níveis de amônia em água doce, enquanto que Hovanec *et al.* (1998), combinando o uso de FISH e monitoramento da química da água, sugeriu uma correspondência entre mudanças na composição da comunidade bacteriana e o início da oxidação da amônia.

Rickard *et al.* (2003a) identificaram grupos de bactérias pelo seqüenciamento parcial de genes do 16S rRNA e encontraram que o biofilme formado num tanque de vidro é composto por 29 grupos de bactérias heterotróficas e 15 destes grupos são encontrados no plâncton; Hibiya *et al.* (2003) revelaram em seu estudo utilizando FISH que bactérias que oxidam amônia estão distribuídas principalmente no interior do biofilme e as demais bactérias, juntamente com as denitrificantes, estão localizadas nas regiões mais externas; O método FISH foi também utilizado por Falkentoft *et al.* (2002) para identificar modificações na composição da população bacteriana num biofilme utilizado para a remoção de fósforo; Dang & Lovell (2000) encontraram que o biofilme é composto principalmente por grupos afiliados de *Roseobacter* (α -proteobactéria) e *Alteromonas* (γ -proteobactéria) em seus estágios de colonização, utilizando ARDRA (amplified DNA restriction analysis) e Okabe *et al.* (1999) utilizaram FISH para analisar a organização espacial das bactérias nitrificantes num biofilme de tratamento de esgoto doméstico e encontraram que o gênero *Nitrosomonas* é o mais abundante entre as bactérias que oxidam amônia.

Da mesma forma, a partir desta técnica de biologia molecular, pretende-se esclarecer neste trabalho alguns aspectos da sucessão microbiana durante a formação do biofilme, bem como estabelecer a importância das bactérias nitrificantes na ciclagem de nutrientes nitrogenados em tanques de cultivo. Além disso, foi avaliado o possível impacto da predação do camarão sobre a assembléia de bactérias do biofilme.

Objetivos

Geral:

Estudo da composição da comunidade bacteriana presente na água e no biofilme de tanques de cultivo do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* através da técnica de biologia molecular FISH (Fluorescent *in situ* hybridization).

Específicos:

1. Avaliar a sucessão bacteriana, especialmente de bactérias nitrificantes em tanques de cultivo através de técnica de FISH;
2. Relacionar a presença das bactérias nitrificantes do biofilme e da água com elementos nitrogenados da água;
3. Avaliar o efeito da predação do camarão sobre o biofilme dos tanques de berçário.

Material e Métodos

Foram realizados 2 experimentos, nas fases de larvicultura e berçário do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Pérez Farfante, 1967)(Decapoda-Penaeidae), na Estação Marinha de Aquacultura - EMA/FURG, sul do Brasil. Os experimentos foram conduzidos em tanques de concreto cilíndrico-cônicos (previamente limpos para remoção de biofilme existente) com capacidade para 12000 L, com área de fundo de 10 m² e 3,6m de diâmetro interno, localizados no setor de larvicultura (EMA-FURG). As metodologias utilizadas tanto para o experimento larvicultura, bem como para o experimento berçário seguem protocolo proposto por Santos (2003) as quais são rotineiramente utilizadas na EMA para a produção de pós-larvas. Para confecção das lâminas pelo método FISH foram selecionados dias específicos dos experimentos, relacionados às maiores variações dos compostos nitrogenados na água.

Experimento na Larvicultura

Foram utilizados dois tanques da larvicultura que eram abastecidos com água salgada previamente filtrada em filtros de areia. O volume de água foi alterado ao longo do experimento em função do desenvolvimento dos organismos cultivados. O volume inicial foi de 3000 L e final de 9000 L. A renovação de água teve início somente no nono dia de experimento quando, a partir daí, manteve uma média diária de renovação de 70% do volume total do tanque.

Foram estocados aproximadamente 416 náuplios II.L⁻¹ de *F.paulensis* em cada tanque, provenientes de desovas em laboratório de matrizes capturadas no litoral de Santa Catarina, Brasil. O tipo e a quantidade de alimento fornecido foi diferenciado em função de cada estágio larval.

Para análise da formação do biofilme, foram colocadas junto à parede do tanque 35 placas de PVC de 6x6cm, previamente lixadas e pintadas com tinta EPOXI, reproduzindo as mesmas condições físicas da parede do tanque (Vide Anexo 1). Estas placas eram coletadas diariamente, perfazendo 35 dias de experimento. A cada dois dias foram coletadas amostras de água para análise de nutrientes (amônia, nitrito e nitrato) com três repetições. As análises para determinação de amônia foram realizadas logo após a coleta, utilizando o método UNESCO (1983). Para nitrito e nitrato, as amostras de água foram filtradas em filtros Whatman GF/F e congeladas para posterior análise no

laboratório (Strickland & Parsons, 1972). As análises destes nutrientes foram realizadas três meses após a coleta e congelamento das amostras. A temperatura da água foi medida diariamente utilizando termômetro de mercúrio com precisão de 0,5°C.

Para obtenção da concentração de clorofila *a*, pedaços de 2x2cm das placas foram colocados em vials com 10 ml de acetona 90% (Merck® PA), armazenados no escuro por 24 h a -12°C. A medida do teor de clorofila *a* foi realizada utilizando um fluorímetro Turner TD700, previamente calibrado, de acordo com Welschmeyer (1994).

O biofilme das placas foi extraído utilizando-se um aparelho de ultra-som (Cole Palmer Mod. 4710 Series Ultrasonic Homogenizer) aplicando-se três pulsos de 15 segundos em cada lado da placa, numa frequência de 20-kHz. O biofilme foi ressuspendido em água salgada filtrada e concentrada em filtro de polycarbonato Nuclepore 0,2µm. As bactérias do biofilme retidas no filtro e também da água do tanque foram fixadas com paraformaldeído 2% recém preparado. A preparação das amostras pelo método FISH foi realizada de acordo com o protocolo proposto por Pernthaler *et al.* (2000), com algumas modificações, como descrito a seguir. Cada filtro (amostra) foi cortado em seções, mantendo sempre pedaços de filtro reservados para a necessidade de repetição do procedimento. Para cada sonda, um pedaço de filtro foi colocado sobre uma lâmina de vidro coberta com parafilme. Em seguida foi adicionado sobre cada pedaço de filtro 40µl da solução contendo a sonda específica em uma concentração final de 2,5ng.µl⁻¹. As lâminas foram colocadas em tubos fechados, um para cada sonda, saturados com solução de hibridização (NaCl 0,9M; Tris-HCl 20mM pH7,2; EDTA5mM; SDS 0,01%; formamida 30%). Estes tubos foram incubados a 42°C por uma noite em estufa bacteriológica. Após este período de hibridização, as amostras foram transferidas para placa de acrílico contendo solução de lavagem (Tris-HCl 20mM pH 7,2; EDTA 10mM; SDS 0,01%; NaCl 102mM) e mantidas durante 15 min a 48°C novamente em estufa. Posteriormente, cada pedaço de filtro foi corado com DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole) numa concentração de 20µg.µl⁻¹ por 3 minutos e lavados em etanol 80%. Os pedaços de filtro foram então colocados entre lâmina e lamínula, utilizando-se como óleo de imersão uma mistura de Citifluor e Vectashield.

Para esta análise foram utilizadas as seguintes sondas: Eubactéria (Controle Positivo) (5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3') Controle Negativo (5'-CCTAGTGACGCCGTCGAC -3'), Alfa 968 (5'-GGTAAGGTTCTGCGCGTT-3')

(Amann *et al.*, 1990), Beta 42a (5'-GCCTTCCCACCTTCGTTT-3') e Gama 42a (5'-GCCTTCCCACATCGTTT-3') (Manz *et al.*, 1992), obtidas comercialmente da empresa Operon Technologies®. Segundo César (2002), o controle negativo é uma sonda que apresenta uma seqüência não compatível com qualquer grupo de bactérias e é empregado para avaliar a eficiência de hibridização. O total de células negativas encontradas deve ser subtraído do total de células hibridizadas com marcadores específicos, e estas não devem superar a 10% do total de bactérias determinado pela contagem de bactérias marcadas com DAPI. Caso contrário, a amostra deve ser descartada. O controle positivo foi utilizado para nos certificar que as células contadas pertenciam ao grupo Eubactéria.

As bactérias marcadas com as sondas e com DAPI foram visualizadas em microscópio de epifluorescência Zeiss Axioplan com lâmpada Osram HPG 50W equipado com conjunto de filtros ópticos UV (BP 365/11 FT 395 LP 397 - 487901) e filtro HQ:CY3 (HQ 545/30, 610/75, Q570/p). A quantificação das bactérias foi realizada a partir de imagens captadas das lâminas utilizando câmera de vídeo CCD Watec, com sensibilidade luminosa de 0,0003 lux, acoplada ao microscópio de epifluorescência e a um microcomputador. Para captura das imagens foi utilizado o programa Capture X (X'treme 98 Windows 98). De cada amostra foram obtidas 5 imagens (Vide Anexo 2), que foram analisadas com o programa "freeware" Image Tool-UTHSCA (University of Texas Health Science Center, San Antonio - Texas/USA).

Foi realizado um balanço de massa de nitrogênio a fim de se avaliar a importância de determinados processos na absorção de amônia nos tanques e assim determinar qual compartimento seria o maior responsável pela retirada deste elemento nitrogenado. Para avaliar o conteúdo de nitrogênio das bactérias livres e aderidas, foi utilizada a seguinte equação: $B = Abund \times f \times BV_{\text{médio}}$, onde abund = abundância média de bactérias em mL ou cm²; $f = 60,15 \text{ fgN}\mu\text{m}^{-3}$, um fator médio de conversão para nitrogênio sugerido por Kemp *et al.*, 1993 e $BV_{\text{médio}}$ é o biovolume médio das bactérias que neste caso foi utilizado o valor de 1 μm^3 . A determinação do conteúdo de nitrogênio das microalgas foi realizado através relação molar de 50:1 para C:Cl_a, e a partir deste extrapolado para nitrogênio através da razão atômica de Redfield (106C:16N:1P – Brock, 1985; De Angelis, 1992). A taxa de nitrificação foi calculada através da soma nitrito + nitrato após a diminuição da amônia e a desnitrificação e volatilização da

amônia através de taxas sugeridas na bibliografia (16,4% por desnitrificação – Páez-Osuna, 1997; Volatilização da amônia 11% - Vinatea-Arana 1997; Baumgarten *et al.* 1996). Todos resultados foram convertidos em gN e expressos em % sobre o total de nitrogênio

Experimento no Berçário

Este experimento foi realizado em laboratório, em dois tanques do setor de larvicultura da Estação Marinha de Aquicultura, como os acima descritos, durante 30 dias. O volume de água utilizado foi de 7000 L e a taxa de renovação diária foi de 50% do volume total, com adição de fitoplâncton (*Tetraselmis tetrathele*) para manutenção da qualidade da água e alimento para as pós-larvas de camarão. Foram utilizados juvenis de *F. paulensis* (PL₂₆, peso médio inicial de $5,5 \pm 3,0$ mg), provenientes de larvicultura realizada na EMA. A densidade de estocagem foi de 50 camarões.m⁻² em cada tanque. Os juvenis foram alimentados com 5g de ração comercial marca ZEIGLER® 5 vezes por dia (às 9:00; 11:00; 14:00; 17:00 e 22:00 horas) a uma taxa inicial de arraçoamento de 100% da biomassa, reduzida para 50% nos últimos dias de experimento em função dos dados de crescimento observados através de biometrias.

Como substrato para formação do biofilme, foram colocadas verticalmente 6 telas de polietileno branco com 1,5 m de comprimento e 0,6 m de largura e 1mm de abertura de malha, com objetivo de aumentar a superfície disponível para a distribuição das pós-larvas no tanque (Vide Anexo 3). O aumento de superfície foi na ordem de 108 %. Para analisar se havia alguma alteração na composição da comunidade bacteriana, provocada pela predação do camarão sobre o biofilme, foi adicionado a cada tanque, telas protegidas por armações de PVC, a fim de evitar o contato dos juvenis com as telas de polietileno. As telas protegidas e não protegidas foram distribuídas na superfície (10 cm abaixo da coluna d'água) e fundo (10 cm acima do fundo) dos tanques, recebendo as seguintes denominações: superfície exposto (S), fundo exposto (F), superfície protegido (SP) e fundo protegido (FP). (Anexo 4)

Foram utilizados os mesmos procedimentos de coleta, preparação e análise das amostras pelo método FISH como descrito acima, no experimento larvicultura, assim como para a análise de nutrientes na água. Para a clorofila *a*, foram coletados pedaços de tela de 2x2cm de todos tratamentos. Neste caso a concentração do pigmento foi determinada por espectrofotometria (Strickland & Parsons 1972), em um espectrofotômetro digital B 342 II-Micronal, determinando-se as absorvâncias nos comprimentos de onda 630 e 664 nanômetros. O cálculo das concentrações foi realizado utilizando as equações propostas por Jeffrey & Humphrey (1975). Foram coletados dados de temperatura (termômetro de mercúrio com precisão de 0,5°C), salinidade (refratômetro ótico com precisão de 1), pH (pHmetro HandyLab com precisão de 0,01), oxigênio dissolvido (oxímetro Handylab) e transparência (Disco de Secchi).

Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada através de análise de variância (ANOVA – one way, $\alpha=0,05$), depois de verificadas a normalidade e homocedasticidade das variâncias através do teste de Levene e do teste K-S, respectivamente (Sokal e Rohlf, 1969). As médias de abundância, e concentração de clorofila *a* nas telas dos tanques dos tratamentos foram submetidas ao “teste t” (Sokal e Rohlf, 1969) para detectar a ocorrência de diferenças significativas ($\alpha=0,05$).

Resultados

1. Comparação entre contagens de bactéria: TOTAL x FISH

Para se verificar se a manipulação das amostras durante o preparo do método de FISH estava causando perda de bactérias, fez-se uma comparação entre a abundância das bactérias marcadas com DAPI antes e depois do tratamento das amostras. Os resultados desta estão apresentados nas figuras 1 e 2. Não foram identificadas diferenças significativas entre as contagens de bactérias totais (somente DAPI) e com FISH (DAPI + Cy3) ($p > 0,05$), da mesma forma que não foram encontradas diferenças significativas entre as médias das contagens para cada sonda realizadas nos pedaços de filtros tratados com FISH, admitindo-se, assim, que a abundância bacteriana não sofreu grandes reduções devido à manipulação durante o tratamento dos filtros nos dois experimentos.

Figura 1 - Abundância de bactérias (10^6 bact.cm⁻²) em filtros tratados e não tratados com FISH, experimento larvicultura.

Figura 2 - Abundância de bactérias (10^6 bact.cm⁻²) em filtros tratados e não tratados com FISH, experimento berçário.

2. Larvicultura

A larvicultura foi realizada com temperatura da água variando entre 24 e 26°C, fotoperíodo natural e salinidade média de 30.

A concentração de amônia na água dos tanques de larvicultura apresentou três picos e a mesma tendência entre os tanques ($p > 0,05$) (Figura 3), sendo no tempo 2 (terceiro dia de experimento) a maior concentração obtida para os dois tanques (413,50 e 289,4 μ M, respectivamente). Os picos seguintes apresentaram a concentração de 122,20 e 128,83 μ M no tempo 4 e 73,58 e 114,62 μ M no tempo 6, tanques 1 e 2 respectivamente. As menores concentrações obtidas foram no início do experimento, no qual a concentração variou de 3,12 a 3,67 μ M. A partir do 9º dia de experimento (tempo 6) a água dos tanques passou a ser renovada, numa taxa diária de 70% do volume total. Até então era somente aumentado o volume para adequar ao desenvolvimento larval.

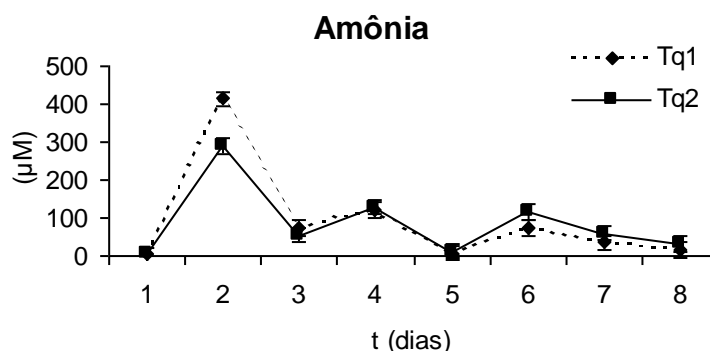


Figura 3 - Concentração média \pm DP de amônia (μ M) nos tanques 1 e 2 da larvicultura.

A água dos dois tanques apresentaram tendências totalmente diferentes em relação à concentração de nitrito ($p < 0,05$), especialmente após tempo 6, quando esse composto atingiu 11,13 μ M e logo em seguida diminuiu para 5,74 μ M. No tanque 1, não foram observadas variações significativas ao longo do experimento, e sua concentração média manteve-se em torno de 1,33 \pm 0,32 μ M (Figura 4).

Ao contrário do nitrito, a concentração de nitrato não apresentou diferença significativa entre os tanques ($p > 0,05$). No tanque 2 ocorreu um pico no 9º dia de experimento (tempo 5) 22,7 μ M e essa concentração diminuiu para 8,2 μ M no último dia de experimento (tempo 8). O nitrato do tanque 1 manteve sua concentração em torno de

11,34 $\mu\text{M} \pm 2,6$, não apresentando variações significativas ao longo do experimento ($p>0,05$) (Figura 5).

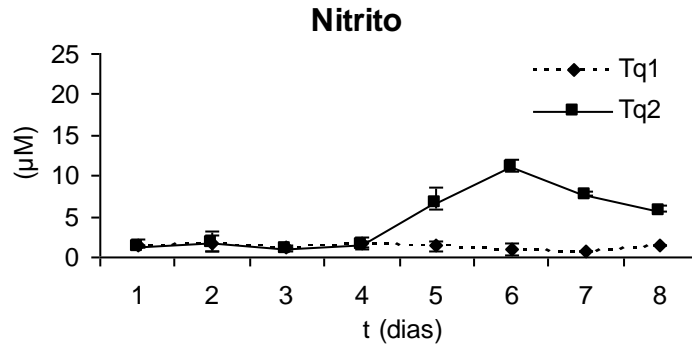


Figura 4 - Concentração de nitrito (NO_2^- - μM) nos tanques da larvicultura

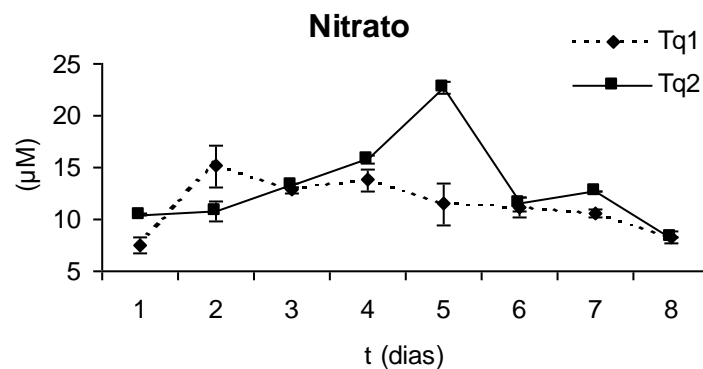


Figura 5 - Concentração de nitrato (NO_3^- - μM) nos tanques de larvicultura.

A clorofila *a* medida no biofilme extraído das placas dos tanques atingiu sua maior concentração no tempo 6, atingindo 1,21 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ no tanque 1 e 0,56 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ no tanque 2 (Figura 6). A clorofila *a* do tanque 1 apresentou as maiores concentrações observadas (média=0,54 \pm 0,46 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) enquanto que no tanque 2 a concentração média foi de 0,29 \pm 0,21 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Não houve diferença significativa nas concentrações de clorofila *a* entre os tanques.

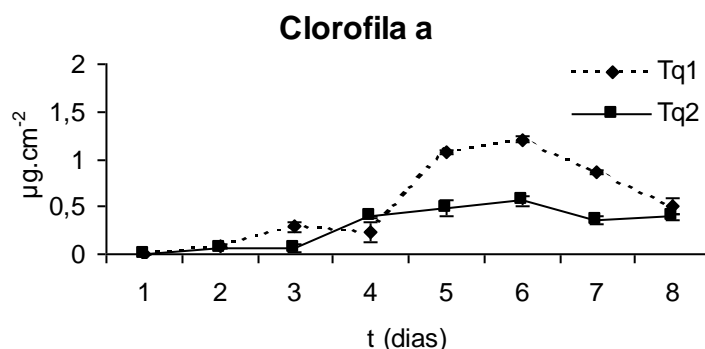


Figura 6 - Concentrações de clorofila *a* ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) nos tanques de larvicultura.

Não houve diferença significativa entre os grupos α -, β - e γ -proteobactéria na água dos dois tanques. Da mesma forma, a abundância destas bactérias no biofilme das placas apresentou a mesma tendência entre os três grupos analisados. No tempo 4 foi observado um aumento na abundância dos 3 grupos no biofilme, sendo que os grupos β - e γ -proteobactéria apresentaram as maiores abundâncias ($10,89 \cdot 10^6 \text{ bact}\cdot\text{cm}^{-2}$ e $12,42 \cdot 10^6 \text{ bact}\cdot\text{cm}^{-2}$) (Figura 7). No tempo 6 foi observado outro pico para as bactérias do grupo γ - ($7,92 \cdot 10^6 \text{ bact}\cdot\text{cm}^{-2}$) e α -proteobactéria ($21,33 \cdot 10^6 \text{ bact}\cdot\text{cm}^{-2}$), que atingiram a maior abundância observada ao longo do experimento no tanque 1. Todos os grupos tenderam a reduzir sua abundância ao final do experimento, quando apresentaram $1,58 \cdot 10^6 \text{ bact}\cdot\text{cm}^{-2}$ grupo α , $0,5 \cdot 10^6 \text{ bact}\cdot\text{cm}^{-2}$ no grupo β - e $2,10 \cdot 10^6 \text{ bact}\cdot\text{cm}^{-2}$ do grupo γ -proteobactéria.

Na água do tanque 1 (Figura 9), todos grupos apresentaram aumento na abundância no tempo 4, destacando as bactérias do grupo α -proteobactéria, que apresentaram a maior abundância, atingindo $21,33 \cdot 10^6 \text{ bact}\cdot\text{mL}^{-1}$. O grupo β apresentou abundância de $0,78 \cdot 10^6 \text{ bact}\cdot\text{mL}^{-1}$ e o grupo γ $0,49 \cdot 10^6 \text{ bact}\cdot\text{mL}^{-1}$. Os grupos α e β , logo após o aumento do tempo 4, diminuíram sua abundância, chegando a $0,17 \cdot 10^6 \text{ bact}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $0,14 \cdot 10^6 \text{ bact}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente, e o grupo que se destacou nesse tempo foi o γ -proteobactéria, que atingiu sua abundância máxima no experimento, com $0,68 \cdot 10^6 \text{ bact}\cdot\text{mL}^{-1}$. Os grupos não se diferenciaram estatisticamente na água do tanque 1 ($p > 0,05$).

No biofilme do tanque 2, os maiores valores de abundância bacteriana também ocorreram no tempo 4 (Figura 8), porém, ao contrário do tanque 1, o grupo que se

destaca é o das α -proteobactérias, que chegaram a $25,38 \cdot 10^6$ bact.cm⁻². Após esse tempo, há uma diminuição acentuada na abundância de todos os grupos, com exceção do grupo γ -proteobactéria, que não havia se destacado significativamente no tempo 4, mas atinge $11,95 \cdot 10^6$ bact.cm⁻² no tempo 7, diminuindo para $0,68 \cdot 10^6$ bact.cm⁻² no último dia de experimento (tempo 8). O grupo α -proteobactéria após atingir seu máximo no tempo 4, torna a baixar, atingindo mínimo de $3,2 \cdot 10^6$ bact.cm⁻² (tempo 6) e logo após ocorre um pequeno aumento, para $9,2 \cdot 10^6$ bact.cm⁻² no final do experimento. O grupo β -proteobactéria apresentou a mesma tendência do grupo α -, porém com abundâncias menores, variando de $0,14 \cdot 10^6$ bact.cm⁻² (tempo 3) a $9,54 \cdot 10^6$ bact.cm⁻² (tempo 4).

No tanque 2, assim como no tanque 1, não houveram diferenças estatísticas significativas entre os grupos de proteobactérias na água (Figura 10). O grupo α -proteobactéria se destaca, com altos valores observados no tempo 3, dois dias antes do pico observado para as bactérias no biofilme deste tanque. Nesse dia (tempo 3), as α -proteobactéria atingiram $1,23 \cdot 10^6$ bact.mL⁻¹, seguida pelo grupo γ - ($0,64 \cdot 10^6$ bact.mL⁻¹) e β -proteobactéria ($0,1 \cdot 10^6$ bact.mL⁻¹). O grupo γ - teve seu máximo no tempo 4 ($0,83 \cdot 10^6$ bact.mL⁻¹), e logo após esse dia, foi observada a diminuição na abundância destes microorganismos. No fim do experimento o número de bactérias foi de $0,30 \cdot 10^6$ bact.mL⁻¹ do grupo α -, $0,1 \cdot 10^6$ bact. mL⁻¹ do grupo β e $0,05 \cdot 10^6$ bact.mL⁻¹ do grupo γ -proteobactéria. O grupo β -proteobactéria não apresentou variação significativa ao longo do experimento, ficando sua abundância em torno de $0,12 \pm 0,04 \cdot 10^6$ bact.mL⁻¹.

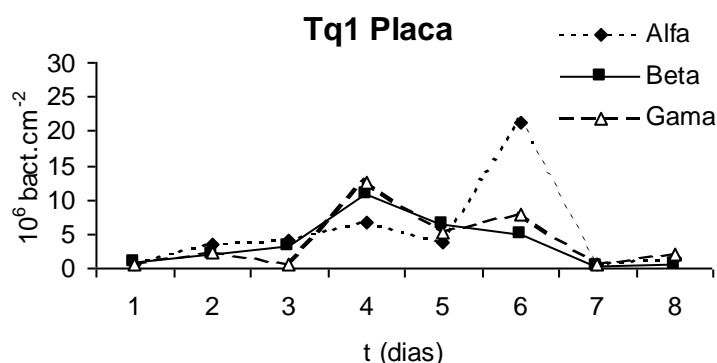


Figura 7 - Abundância (10^6 bact.cm⁻²) de α -, β - e γ -proteobactérias no biofilme das placas do tanque 1 da larvicultura.

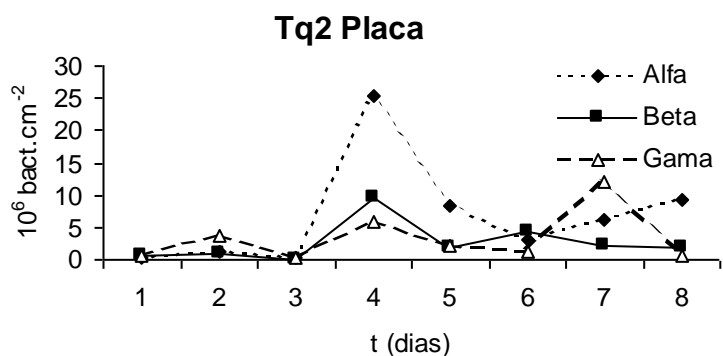


Figura 8 - Abundância ($10^6 \text{ bact.cm}^{-2}$) de α , β e γ -proteobactérias no biofilme das placas do tanque 2 da larvicultura.

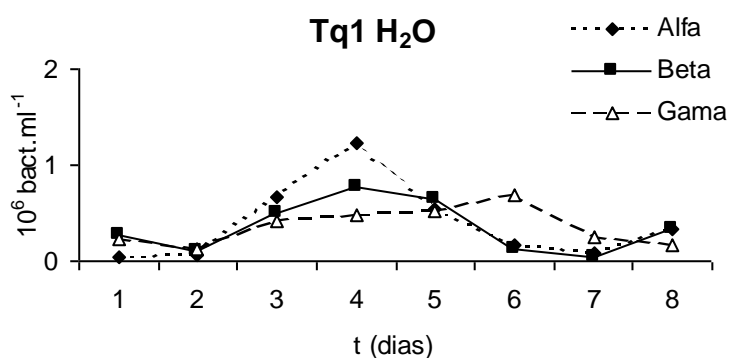


Figura 9 - Abundância ($10^6 \text{ bact.ml}^{-1}$) de α , β e γ -proteobactérias na água do tanque 1 da larvicultura.

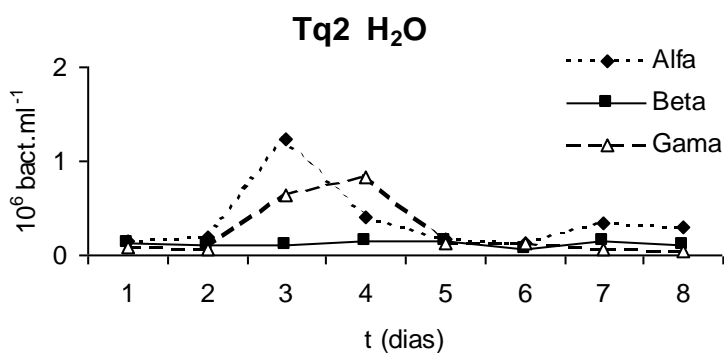


Figura 10 - Abundância ($10^6 \text{ bact.ml}^{-1}$) de α , β e γ -proteobactérias na água do tanque 2 da larvicultura.

O coeficiente de correlação de Pearson (r) não indicou correlações positivas ou negativas entre amônia, nitrito, nitrato e clorofila a com os grupos α , β e γ -proteobactéria nas placas e água, porém somente o grupo γ -proteobactérias na água, que apresentou uma correlação negativa com o nitrito. (Tabela 1).

Tabela 1 - Coeficiente de correlação de Pearson (r) ($P < 0,05$) entre bactérias dos grupos α , β e γ -proteobactéria das placas e da água e compostos nitrogenados e clorofila a dos tanques de larvicultura de *Farfantepenaeus paulensis*.

	ALFAPLACA		BETAPLACA		GAMAPLACA		ALFA H ₂ O		BETA H ₂ O		GAMA H ₂ O	
	Tq1	Tq2	Tq1	Tq2	Tq1	Tq2	Tq1	Tq2	Tq1	Tq2	Tq1	Tq2
AMÔNIA	0,04	0,01	0,03	0,17	0,06	0,16	-0,11	-0,21	-0,25	-0,30	-0,32	0,06
NITRITO	-0,23	-0,07	0,32	0,09	0,27	0,16	0,35	-0,42	0,46	-0,36	-0,26	-0,5*
NITRATO	0,20	0,33	0,51	0,22	0,38	0,13	0,40	0,01	0,22	0,53	0,19	0,26
CLOROFILA a	0,53	0,48	0,13	0,54	0,22	0,18	-0,12	-0,36	-0,11	-0,08	0,62	-0,07

* $p < 0,05$

3. Berçário

Os resultados de temperatura, salinidade, pH, oxigênio dissolvido estão apresentados na Tabela 2. A temperatura da água dos cultivos manteve-se em torno de $26 \pm 0,6^\circ\text{C}$, com o aumento médio de 1°C a partir do tempo 6. A salinidade variou de 26 a 30 e o pH manteve-se alcalino na maior parte do experimento, sendo o menor valor observado no último dia (tempo 12) ($7,46 \pm 0,02$). O oxigênio dissolvido na água manteve-se em torno $6,56 \pm 0,77 \text{mg.L}^{-1}$, sendo as maiores concentrações medidas nos primeiros dias e uma tendência a diminuição no final do experimento.

Tabela 2: Temperatura da água, salinidade, pH e oxigênio dissolvido (mg.L^{-1}) dos tanques de berçário do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis*

Data (tempo)	Temperatura da Água ($^\circ\text{C}$)	Salinidade	pH	Oxigênio dissolvido (mg.L^{-1})
20/12 - t1	24,3 ($\pm 0,4$)	26	8,13 ($\pm 0,03$)	7,66 ($\pm 0,48$)
22/12 - t2	24,0	28	8,10 ($\pm 0,01$)	7,14 ($\pm 0,08$)
24/12 - t3	23,0	29	8,09 ($\pm 0,03$)	7,43 ($\pm 0,06$)
26/12 - t4	25,0 ($\pm 0,1$)	28	8,20 ($\pm 0,01$)	7,50 ($\pm 0,25$)
28/12 - t5	25,5 ($\pm 0,7$)	28	8,10 ($\pm 0,01$)	6,59 ($\pm 0,18$)
30/12 - t6	26,0	26	8,02 ($\pm 0,01$)	6,06 ($\pm 0,01$)
02/01 - t7	26,5 ($\pm 0,7$)	30	8,10 ($\pm 0,01$)	5,63 ($\pm 0,05$)
05/01 - t8	26,0 ($\pm 0,1$)	28	7,88 ($\pm 0,06$)	7,96 ($\pm 0,06$)
08/01 - t9	25,0 ($\pm 0,1$)	29	8,01 ($\pm 0,04$)	7,30 ($\pm 0,35$)
11/01 - t10	27,0	29	8,04 ($\pm 0,05$)	6,48 ($\pm 0,40$)
14/01 - t11	26,0	30	8,10 ($\pm 0,04$)	6,63 ($\pm 0,21$)
17/01 - t12	26,0	30	7,46 ($\pm 0,02$)	5,83 ($\pm 0,40$)

A água dos dois tanques não apresentou diferença significativa para nitrito, nitrato, amônia e clorofila *a* ($p>0,05$). Portanto os resultados serão apresentados como médias e desvio padrão destas variáveis analisadas nos dois tanques.

A concentração de amônia ao longo do experimento apresentou dois picos, um logo nos tempos iniciais, atingindo $80,8\pm 10,25\mu\text{M}$, que logo diminuiu para $48\pm 6,53\mu\text{M}$ no tempo 3 e voltou a subir, quando atingiu o maior valor obtido no experimento ($112,17\pm 3,3\mu\text{M}$ – tempo 5). Logo após tornou a diminuir, tendência que manteve até o fim do experimento, alcançando $3,25\pm 0,25$ no último dia – tempo 11 (Figura 11). A partir do tempo 7 foi iniciada a sifonação diária dos tanques, com o objetivo de retirar o excesso de matéria orgânica do fundo dos tanques.

O nitrito apresentou a mesma tendência observada para o nitrato e inversa ao da amônia, isto é, baixas concentrações nos tempos iniciais e um aumento acentuado nos tempos finais. A menor concentração de nitrito observada foi no tempo 5 ($0,51\pm 0,19\mu\text{M}$), e a maior foi obtida no tempo 11 ($21,93\pm 0,57\mu\text{M}$) (Figura 12).

A concentração inicial de nitrato obtida foi de $6,72\mu\text{M}$ (Figura 13). Este nutriente apresentou aumento a partir do tempo 7, atingindo $40,12\mu\text{M}$ no tempo 12. A concentração de nitrato apresentou uma redução acentuada no tempo 11, chegando a $15,14\mu\text{M}$. Comparando os gráficos de nitrito e nitrato é possível observar a mesma tendência na variação destes compostos. Cabe salientar que a variação da concentração do nitrito sempre se deu antes das variações observadas para o nitrato. O nitrito obteve um aumento na sua concentração no tempo 9 enquanto que, para o nitrato, esse aumento se deu no tempo 10. As reduções significativas são também observadas tanto para nitrito quanto para nitrato, mas em dias diferentes, tempo 10 para nitrito e tempo 11 para nitrato, data na qual o nitrito volta a subir.

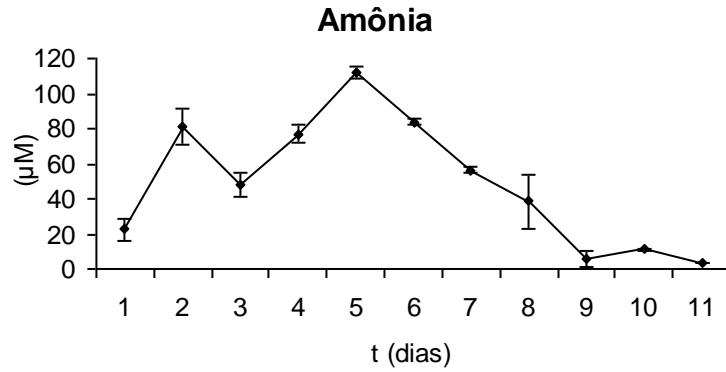


Figura 11 - Concentração média±DP de amônia (μM) nos tanques do berçário.

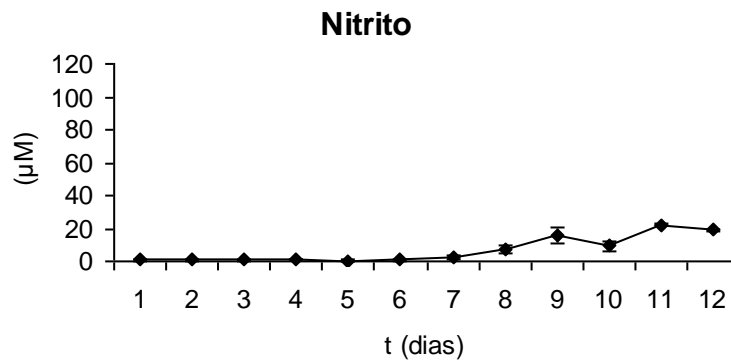


Figura 12 - Concentração média±DP de nitrito (NO_2^- - μM) nos tanques do berçário.

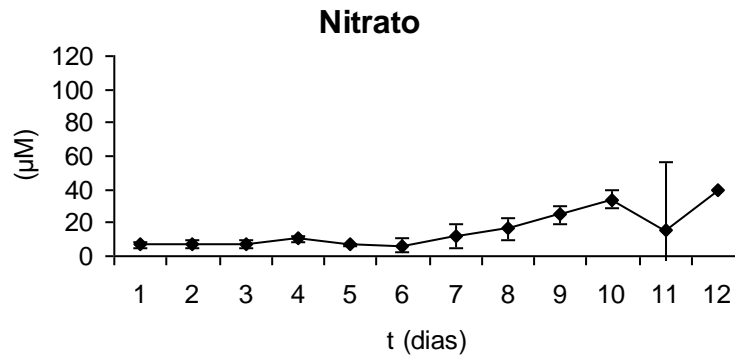


Figura 13 - Concentração média±DP de nitrato (NO_3^- - μM) nos tanques do berçário.

A concentração de clorofila *a* no biofilme apresentou a mesma tendência e nos quatro tratamentos, não havendo diferença estatística significativa entre Superfície (S) e Superfície Protegido (SP); Fundo (F) e Fundo Protegido (FP); S e F; SP e FP ($p > 0,05$) (Figura 14). Foram observadas concentrações baixas ao longo de todo experimento e um aumento significativo nos últimos dias. O tratamento S apresentou a maior concentração obtida ($43,26 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$), os valores tenderam a aumentar, ao contrário do

SP, que acompanhou o aumento do S, e chegou a atingir maior concentração ($23,26 \pm 28,12 \mu\text{g.cm}^{-2}$), porém tende a diminuir no final do experimento. O F apresentou um aumento similar ao observado para S, diferenciou-se no último dia, quando obteve $24,84 \pm 11,53 \mu\text{g.cm}^{-2}$. Os menores valores obtidos foram para o tratamento FP, que manteve sua concentração em torno de $1,8 \pm 2,33 \mu\text{g.cm}^{-2}$, um pequeno aumento é observado ao final do experimento ($7,63 \pm 3,46 \mu\text{g.cm}^{-2}$).

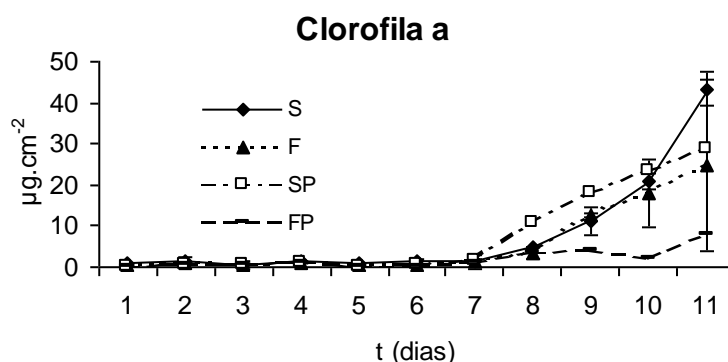


Figura 14 - Concentrações de clorofila *a* (média \pm DP - $\mu\text{g.cm}^{-2}$) nos tanques do berçário.

A análise da abundância das bactérias na água demonstrou não haver diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos, porém, no tempo 7 o grupo γ -proteobactéria se destacou dos demais, atingindo $1,71 \pm 0,13 \cdot 10^6 \text{ bact.mL}^{-1}$, enquanto os grupos α - e β -proteobactéria apresentaram $0,22 \pm 0,05 \cdot 10^6 \text{ bact.mL}^{-1}$ e $0,53 \pm 0,59 \cdot 10^6 \text{ bact.mL}^{-1}$, respectivamente (Figura 15). Logo após esse pico, o grupo γ -proteobactéria diminuiu sua abundância ficando em torno de $0,1 \pm 0,01 \cdot 10^6 \text{ bact.mL}^{-1}$, não se diferenciando muito deste valor até o fim do experimento. O grupo β -proteobactéria apresentou no tempo 4 um pequeno aumento (de $0,14 \pm 0,09 \cdot 10^6 \text{ bact.mL}^{-1}$ tempo 3 para $0,76 \pm 0,77 \cdot 10^6 \text{ bact.mL}^{-1}$ tempo 4), seguido por um declínio no tempo 5 ($0,23 \pm 0,18 \cdot 10^6 \text{ bact.mL}^{-1}$) e um novo aumento no tempo 6 ($0,55 \pm 0,49 \cdot 10^6 \text{ bact.mL}^{-1}$) que tendeu a diminuir até o final do experimento. O grupo α -proteobactéria não apresentou variação significativa ao longo do experimento, apenas no último dia, quando apresentou a maior abundância naquela data ($0,59 \pm 0,45 \cdot 10^6 \text{ bact.mL}^{-1}$), enquanto os grupos β - e γ -proteobactéria apresentaram abundâncias de $0,20 \pm 0,01 \cdot 10^6 \text{ bact.mL}^{-1}$ e $0,22 \pm 0,04 \cdot 10^6 \text{ bact.mL}^{-1}$, respectivamente.

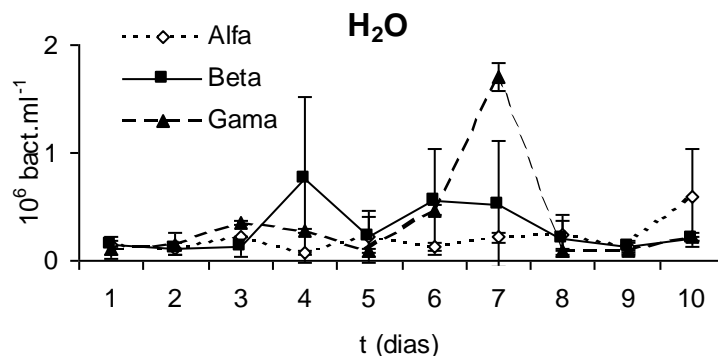


Figura 15 - Abundância (10^6 bact.mL⁻¹) de α , β e γ -proteobactérias na água dos tanques do berçário.

No biofilme, de modo geral, pode-se perceber diferentes tendências entre os tratamentos Superfície (S) e Fundo (F). No tratamento S (Figura 16), as maiores abundâncias são observadas no início do experimento e tenderam a diminuir nos últimos dias, enquanto que, para o tratamento F (Figura 17) acontece o contrário, chegando ao final do experimento é observado tendência de aumento na abundância. Os grupos α -, β - e γ -proteobactéria atingiram uma maior abundância média quando comparados com os mesmos grupos no tratamento Superfície Protegido (SP) (Figura 18). O grupo α - no tratamento S apresentou 2 picos, no tempo 4 ($38,12 \pm 31,19$ 10^6 bact.cm⁻²) e tempo 8 ($48,4 \pm 2,83$ bact.cm⁻²), e picos semelhantes foram observados no tratamento SP, porém dias antes (tempo 2 – $16,17 \pm 1,12$ bact.cm⁻² e tempo 7, $27,23 \pm 0,67$ bact.cm⁻²). As tendências ao final do experimento são de diminuição da abundância das α -proteobactéria no tratamento S e aumento para mesmas no tratamento SP. Para o grupo β -proteobactéria são observadas tendências semelhantes entre os tratamentos a partir do tempo 6, ao contrário do início, que são observadas tendências inversas. No tempo 2, nos dois tratamentos, foram obtidas abundâncias bastante similares entre os tratamentos ($6,3 \pm 1,27$ bact.cm⁻² no S e $7,08 \pm 0,98$ bact.cm⁻² no SP). Após essa data, até o tempo 6, as tendências foram totalmente diferentes entre os tratamentos. No tratamento S a abundância ficou em torno de ($21,67 \pm 17,65$ bact.cm⁻²) e no SP em torno de $0,48 \pm 0,4$ bact.cm⁻². Apresentaram novamente abundâncias muito semelhantes no tempo 6 ($4,37 \pm 0,83$ bact.cm⁻² no S e $2,21 \pm 0,06$ bact.cm⁻² no SP) e a partir daí, mantiveram a mesma tendência até o final do experimento. No tratamento F, todos grupos mantiveram a mesma tendência, sendo observado um aumento a partir do tempo

6 para os três grupos, atingindo a maior abundância nos últimos dias de experimento, no qual o grupo α atingiu a maior abundância ($71,10 \pm 19,09$ bact.cm⁻²) seguido por β ($38,85 \pm 0,21$ bact.cm⁻²) e γ ($37,8 \pm 17,82$ bact.cm⁻²). Da mesma forma, não foi verificada diferença entre os grupos no tratamento Fundo Protegido (FP) (Figura 19), porém destacam-se dois picos, um no tempo 4, no qual o grupo γ -proteobactéria atingiu $43,49 \pm 38,7$ bact.cm⁻² e outro no tempo 8, onde o grupo β -proteobactéria atingiu $42,53 \pm 0,32$ bact.cm⁻². O grupo α apresentou baixa abundância no início do experimento, porém no final foi o grupo que se destacou, sua abundância variou de $0,12 \pm 0,09$ bact.cm⁻² no primeiro dia e $24,08 \pm 4,14$ bact.cm⁻² no último.

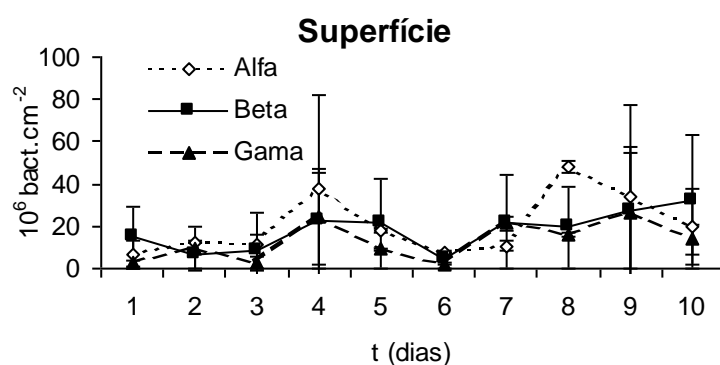


Figura 16 - Abundância (10^6 bact.cm⁻²) de α , β e γ -proteobactérias no biofilme - tratamento Superfície - dos tanques no berçário.

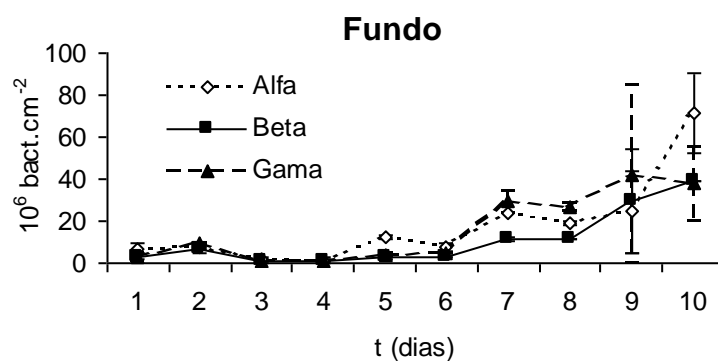


Figura 17 - Abundância (10^6 bact.cm⁻²) de α , β e γ -proteobactérias no biofilme - tratamento Fundo - dos tanques no berçário.

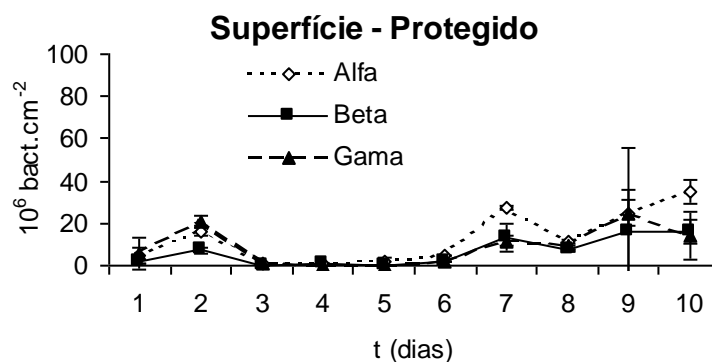


Figura 18 - Abundância (10^6 bact.cm⁻²) de α , β e γ -proteobactérias no biofilme - tratamento Superfície Protegido - dos tanques no berçário.

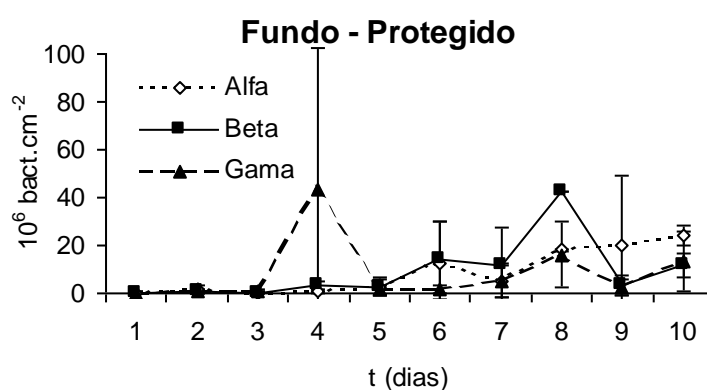


Figura 19 - Abundância (10^6 bact.cm⁻²) de α , β e γ -proteobactérias no biofilme - tratamento Fundo Protegido - dos tanques no berçário.

Houveram correlações negativas entre a amônia e bactérias de todos os grupos no tratamento fundo, ao contrário do nitrito e nitrato, que apresentaram correlações positivas com as bactérias de todos os grupos. As bactérias do fundo se correlacionaram positivamente com a clorofila *a* medida neste mesmo tratamento, assim como as bactérias dos grupos alfa e beta do tratamento fundo protegido (Tabela 3).

Tabela 3. Coeficiente de correlação de Pearson (r) ($P < 0,05$) entre bactérias dos grupos α , β e γ -proteobactéria, nos tratamentos superfície, fundo, superfície protegido e fundo protegido e compostos nitrogenados e clorofila a nos tanques e na água do berçário de *Farfantepenaeus paulensis*.

	α - SUP	β - SUP	γ - SUP	α - FUN	β - FUN	γ - FUN	α - SP	β - SP	γ - SP	α - FP	β - FP	γ - FP
Amônia	-0,12	-0,23	-0,16	-0,52*	0,64*	-0,57*	-0,58*	-0,48	-0,36	-0,43	-0,15	-0,01
Nitrito	0,33	0,38	0,28	0,85**	0,80**	0,70**	0,74**	0,51 *	0,25	0,72*	0,59*	0,12
Nitrato	0,45	0,39	0,40	0,65*	0,68 *	0,79**	0,70**	0,55 *	0,29	0,66*	0,60*	-0,04
Cla SUP	0,22	0,45	0,28									
Cla FUN				0,73	0,58*	0,55*						
Cla SP							0,55*	0,35	0,22			
Cla FP										0,55*	0,51*	0,14

	ALFA H ₂ O	BETA H ₂ O	GAMA H ₂ O
AMÔNIA	-0,27	0,24	0,09
NITRITO	0,56*	-0,08	-0,01
NITRATO	0,26	-0,22	0,08

* $P \leq 0,05$ ** $P \leq 0,01$

4. Balanço de Massa de Nitrogênio - Larvicultura:

Foi encontrado um acúmulo máximo de 21gN nos tanques no tempo 2 que diminuiu para 3,5gN (16,5%) tempo 3 e somados justificaram a perda de 75,7% do que entrou de nitrogênio. Aproximadamente 24,3 % foi atribuído à fatores não identificados ou não medidos neste experimento (Figura 20) e maior parte da amônia foi retirada por processos de nitrificação, seguido pela desnitrificação e volatilização da amônia. A menor parcela foi acumulada pelos microorganismos, que entre bactérias e microalgas acumularam 9% do total de nitrogênio disponível.

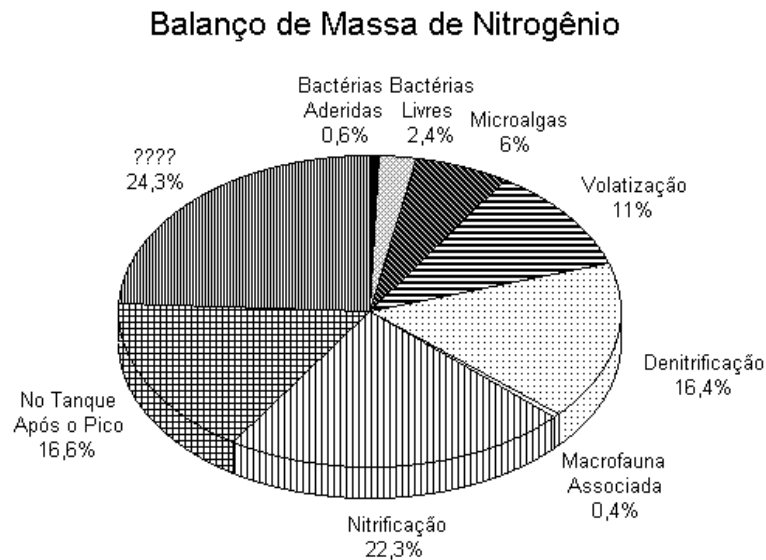


Figura 20 – Balanço de massa de nitrogênio do experimento larvicultura (% de bactérias aderidas, livres, microalgas, volatilização da amônia, desnitrificação, macrofauna associada (neste caso, considerado os organismos cultivados), nitrificação, restante no tanque após o pico e fatores indeterminados)

Discussão

1. Precisão e Acurácia das amostras analisadas pelo método FISH

Os protocolos convencionalmente utilizados para execução do método FISH sugerem que os dados obtidos sejam apresentados como percentual de bactérias marcadas em relação ao total de bactérias coradas somente com DAPI (Azam, 2001; Glöckner *et al.*, 1996). Tal medida visa minimizar as prováveis perdas de organismos devido à manipulação dos filtros pelo método FISH (M. Cottrell, *com. pess.*). Em nosso trabalho, não encontramos tendências claras de dominância deste ou daquele grupo de bactérias em relação aos compostos nitrogenados, quando analisamos os resultados na forma de percentual, como observado nas figuras abaixo (Figuras 21 e 22). Ao contrário, quando os mesmos dados são apresentados como abundância de bactérias marcadas com Cy3 por uma área conhecida, observa-se tendências mais claras e possíveis de se relacionar com as outras variáveis envolvidas nos experimentos, especialmente com os elementos nitrogenados. Para testar a validade dos resultados apresentados como abundância, e nos certificar que as perdas ocorridas não eram significativas, foram realizadas contagens de bactérias marcadas com DAPI em amostras submetidas e não submetidas à técnica de FISH. A acurácia das contagens foi verificada pela comparação das médias das contagens de bactérias marcadas com DAPI e com as diferentes sondas. O resultado da análise não indicou qualquer diferença estatística ($p > 0,05$) entre as contagens, isto é, o número total de bactérias foi similar nos diferentes filtros tratados para determinação dos grupos α -, β - e γ -proteobactéria. Além de acurados, os dados são também precisos, uma vez que não houve diferença significativa entre as contagens de bactérias marcadas com DAPI antes e depois da aplicação do método FISH para a mesma amostra ($p > 0,05$). Portanto, os resultados deste trabalho serão apresentados como abundância, sem qualquer prejuízo significativo às contagens como indicado no protocolo utilizado. De maneira similar, outros trabalhos têm utilizado o método FISH e apresentado seus resultados em abundância, como por exemplo os estudos realizados por Garcia-Armisen & Servais (2004) no qual utilizam FISH para enumerar *Escherichia coli* em amostras do ambiente; López-Archilla *et al.* (2004) estudando a comunidade de macrofilamentos microbianos; Matteuzzi *et al.* (2004) em estudo para identificar grupos da microbiota intestinal sob efeito de prebióticos e Dedysh *et al.* (2003) estudando bactérias metanotróficas.

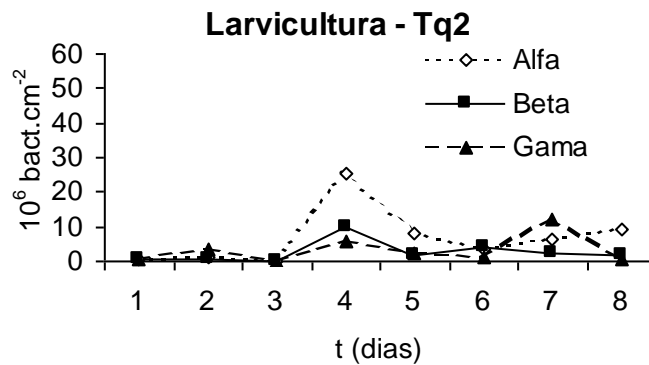


Figura 21 - Abundância de bactérias no biofilme das placas da larvicultura.

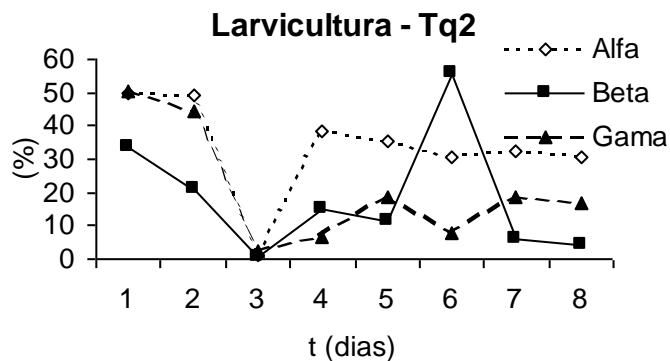


Figura 22 - Percentual de bactérias no biofilme das placas da larvicultura.

2. Sucessão Microbiana

Analisando a abundância de bactérias nos tanques de larvicultura e berçário não foi possível estabelecer padrões claros de sucessão entre os diferentes grupos de bactéria estudados. O que se esperaria é que nos substratos (placas e telas) fornecidos aos microorganismos ocorresse uma sucessão ecológica microbiana, porém, não foram identificadas fases de sucessão entre os diferentes grupos analisados, mas sim picos de abundância de determinados grupos de bactérias ao longo do tempo, provavelmente em resposta à variação de nutrientes na água. É possível que a falta de sucessão possa estar relacionada ao tipo de substrato fornecido (Burns & Ryder, 2001, Dang & Lovell, 2000), mas também ao pequeno número de grupos analisados (apenas proteobactérias). A seqüência sucessional de microorganismos no desenvolvimento de biofilmes em ambientes aquáticos não têm sido muito investigada, sabe-se, no entanto que o seu desenvolvimento ocorre através de uma seqüência específica, porém os processos químicos e biológicos da sucessão microbiana são pouco compreendidos (Rickard *et al.*,

2003b; Buswell *et al.*, 1997; Wimpenny, J. 1996; Cooksey & Wigglesworth-Cooksey, 1995).

De maneira geral o biofilme de ambientes naturais é composto de uma variedade de microorganismos (bactérias, fungos, microalgas) e seus produtos de secreção (Sekar *et al.*, 2002). Assim que o substrato é submerso num ambiente aquático ocorre adsorção de matéria orgânica dissolvida formando uma fina película, que é rapidamente colonizado por populações de bactérias que, em virtude de seu reduzido tamanho, independência da luz e altas taxas de crescimento, tornam-se predominantes nos primeiros estágios de formação dos biofilmes (Thompson *et al.*, 1999, 2002; Shankar & Mohan, 2001). Esta população heterotrófica inicial é dependente da disponibilidade de carbono orgânico dissolvido na água. A população colonizadora promoverá uma mudança do ambiente no biofilme, proporcionando condições favoráveis ao estabelecimento de outros grupos de espécies, como microalgas, principalmente Chlorophyta (algas verdes) (Lock *et al.*, 1984), Bacillariophyta (diatomáceas) e Cyanobacteria (Peterson, 1996).

Sekar *et al.*, 2002, identificou em seu estudo, microalgas e cianobactérias que colonizavam o biofilme num sistema lêntico, e Dang & Lovell (2000) realizaram um experimento com diferentes substratos para avaliar a formação de biofilme num estuário, utilizando técnicas de biologia molecular e confirmaram a influência do tipo de substrato na colonização além de uma alternância de espécies entre os grupos γ - e α -proteobactéria durante a sucessão.

2.1 Larvicultura

O total de bactérias no experimento de larvicultura apresentou menor abundância nos primeiros dias, tanto na água como nas placas dos dois tanques, o que se justifica por se tratar do início do experimento e assim, início da colonização do substrato. A partir do tempo 4 são observadas variações na abundância de bactérias totais dos tanques (placas e água). Em relação aos grupos específicos (α -, β - e γ -proteobactéria) não houve uma sucessão clara, considerando-se as variações observadas para os diferentes grupos.

Por outro lado, comparando-se os gráficos de abundância de bactérias no biofilme e livres na água é possível notar que houve uma diminuição das α -

proteobactérias na água a partir do tempo 4 no tanque 1. Logo após, é observado um aumento desse mesmo grupo no biofilme das placas, quando atingiu uma elevada abundância no tempo 6. No tanque 2 é observado um padrão similar, porém num intervalo de tempo menor (tempo 3 na água para tempo 4 no biofilme). Com isto, podemos supor que bactérias livres na água tenham sido limitadas por algum fator e teriam então migrado e se aderido para o biofilme, o que é, muitas vezes, uma estratégia destes microorganismos. É interessante notar que a transferência das bactérias da água para o biofilme ocorre simultaneamente com a redução de amônia na água, podendo ser este o fator limitante para a permanência das bactérias na água.

Stolp (1993) afirma que bactérias podem superar os baixos níveis de nutrientes na coluna d'água se aderindo a alguma superfície, na qual seu crescimento será favorecido pela maior disponibilidade de nutrientes orgânicos. Outros autores têm também discutido as possíveis vantagens de bactérias livres se aderirem ao biofilme. Dang & Lovell, (2000) consideram como vantagens das bactérias aderidas o maior acesso a nutrientes, proteção contra toxinas (biocidas, metais pesados e radiação UV), manutenção da atividade de enzimas extracelulares e proteção contra predação. Pedrós-Pedrós-Alió & Brock (1983) mostraram que bactérias aderidas são maiores, tem uma maior frequência de divisão celular e que foram responsáveis pela maior parte da absorção de acetato que bactérias planctônicas. Afirmaram ainda que a disponibilidade de substrato, a força de corrente ou fluxo da água do sistema e a alimentação pelo zooplâncton são fatores que podem controlar a abundância das bactérias na água em ambientes naturais, enquanto que as forças que levam estes organismos aos substratos são principalmente físicas (adsorção de matéria orgânica dissolvida e aderência ao substrato) e químicas (localização de sítios propícios à fixação e produção de biopolímeros). Anésio *et al.* (2003) encontrou que bactérias livres e aderidas apresentam diferentes funções metabólicas, sendo as bactérias livres mais abundantes quando a disponibilidade de carbono orgânico dissolvido é maior, após esse período, são as bactérias aderidas que irão predominar.

O fato das α -proteobactérias terem migrado para o biofilme pode também estar relacionado ao estágio de colonização de superfícies. Da mesma forma, encontramos uma alternância no biofilme das espécies dos grupos α e γ -proteobactéria, sendo que estas aparecendo em maior abundância antes das α -proteobactérias. De maneira similar,

Dang & Lovell (2000), encontraram nos estágios iniciais de sucessão uma maior abundância de bactérias do grupo γ -proteobactéria, que logo foram substituídas por α -proteobactérias.

2.2 Berçário

Analisando as bactérias totais (coradas com DAPI) do biofilme dos tanques, pode-se perceber que a abundância apresentou dois picos, um nos primeiros dias, com posterior redução da abundância até a metade do experimento e novo aumento do número de bactérias, com valores semelhantes ao início do experimento. Estes eventos podem indicar sinais de interações positivas e/ou negativas entre os grupos constituintes da assembléia bacteriana, bem como com as condições nutritivas do meio e também pressão de predação (Burns & Ryder, 2001). Similar ao observado no experimento anterior, nenhum grupo de bactérias analisado se destacou. Além disso, chama a atenção o fato de que a abundância bacteriana permaneceu baixa nos tratamentos localizados nos fundos dos tanques (F e FP) por um tempo maior, havendo incremento no número de células somente no final do experimento. Por outro lado, os tratamentos da superfície apresentaram maiores abundâncias bacteriana e também maior variabilidade das contagens. A partir destes fatos, podemos supor que a colonização do substrato no fundo é limitada por algum fator que não atua na superfície dos tanques. Provavelmente a luminosidade tenha limitado o crescimento de microalgas e cianobactérias que fornecem matéria orgânica para as bactérias. Nos estágios mais adiantados da sucessão no biofilme, as bactérias heterotróficas são dependentes da produção autotrófica das algas e das cianobactérias que se aderiram ao biofilme (Jackson *et al.*, 2001). Roman & Sabater (1999) estudaram a influência do biofilme autotrófico sob o metabolismo heterotrófico num riacho no Mediterrâneo e concluíram que o acúmulo de algas na comunidade epifítica do biofilme influencia o uso de matéria orgânica pela comunidade heterotrófica, aumentando a quantidade de substrato orgânico disponível para as bactérias. Outro fator que pode ter gerado essa diferença de abundância bacteriana entre a superfície e o fundo seria uma possível estratificação da concentração de oxigênio dissolvido nos tanques. Diana *et al.* (1991), trabalhando em viveiros com tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com uma profundidade de 0,9 m, também encontraram estratificação da temperatura e do oxigênio na coluna d'água em experimento com

grande input de nutrientes e fertilização inorgânica. Chang & Ouyang (1988) observaram que durante o dia em experimento com peixes em tanques de 1 a 2,5 m de profundidade e circulação da água vertical, o epilimnion ficou super-saturado de oxigênio enquanto que o hipolimnion dos tanques apresentou baixa concentração de oxigênio (2mg/l).

Além destes fatores, a predação do camarão sobre o biofilme pode ter alterado a composição da assembléia bacteriana. A herbivoria por invertebrados aquáticos pode trazer benefícios indiretos e impactos negativos diretos sobre a composição e biomassa do biofilme (Burns & Ryder, 2001). Sabe-se que camarões peneídeos, tanto no ambiente natural como em viveiros de cultivo, são grandes consumidores de detritos, bactérias, protozoários, microalgas, macroalgas, anfípodos, poliquetas, dentre outros (Gleason, 1986; Stoner & Zimmerman, 1988; Chen & Chen, 1992; Nunes *et al.* 1997).

Neste caso, a abundância e a composição de bactérias do biofilme pode ter sofrido a influência da predação do camarão, e da mesma forma como ocorrido para as microalgas, como detectado pela clorofila *a* e discutido a seguir, a predação tenha estimulado o crescimento destes microorganismos, pois as maiores abundâncias encontradas foram nos experimentos expostos à predação.

3. Compostos nitrogenados e grupos específicos de bactérias

3.1 Larvicultura

Nos dois tanques da larvicultura, os três grupos analisados apresentaram um aumento em sua biomassa após a diminuição da amônia, tanto no biofilme como na água. É possível notar relações entre a variação dos compostos nitrogenados e a abundância de grupos específicos. Por exemplo, os grupos β - e γ -proteobactéria que incluem bactérias que oxidam amônia (Ward, 2000) apresentaram um aumento em sua abundância após a diminuição do amônio na água do tanque 1 no tempo 4 . Estes resultados sugerem que as bactérias dos grupos β - e γ - possam ter absorvido uma fração dessa amônia disponível, transformando-a em nitrito. César, 2002 encontrou um aumento na proporção de β -proteobactérias em experimento enriquecido com cloreto de amônio. Da mesma forma, Burrell *et al.*, 2001, encontrou maior eficiência na nitrificação em cultivos enriquecidos com bactérias do grupo β -proteobactéria e sugerem o inoculo de *Nitrosomonas* (β -proteobactéria) em sistemas de cultivos

aquáticos a fim de acelerar a remoção de amônia da água; Sylin-Roberts & Lewis (2000) utilizando FISH e PCR encontraram uma maior prevalência de espécies do gênero *Nitrosomonas* (grupo β -proteobactéria) em biofilmes de tratamento de esgoto; Biesterfeld *et al* (1998) correlacionou a presença de *Nitrosomonas* (β -) e *Nitrosococcus* (γ -) com a remoção de amônia em biofilme de filtros e Wagner *et al* (1998) encontraram alta dominância de *Nitrosococcus mobilis* (β -) em sistema de tratamento de esgoto. De maneira similar, Hovanec & DeLong (1996) encontraram cerca de 20% do total de bactérias de um biofilme marinho composto por bactérias do grupo β -proteobactérias e Nogueira *et al.* (2002) estudando a composição e dinâmica em bio-reatores encontraram integrantes da sub-classe β -proteobactéria em abundância considerável. Desta forma, pode-se concluir que a maior parte das bactérias nitrificantes presentes em água de cultivo, esgotos e em locais onde há incremento de amônia são dos grupos β - e γ -proteobactérias.

A alta abundância das bactérias do grupo α -proteobactéria nas placas e na água dos dois tanques em certos momentos do experimento larvicultura pode estar relacionada à presença de alguma das espécies de *Nitrobacter sp* pertencentes a este grupo e que são responsáveis pela oxidação do nitrito a nitrato (Ward, 2000). É possível que uma parte da amônia disponível a partir do tempo 2 tenha passado a nitrito por ação das bactérias nitrificantes pertencentes aos grupos β - e γ -proteobactérias, que então disponibilizaram certa quantidade de nitrito para as α -proteobactérias. No tanque 2 estes processos se tornam mais claros quando observamos o aumento do nitrito a partir do tempo 4, quando o grupo α -proteobactéria atinge a maior abundância nas placas logo após um aumento significativo deste grupo na água e o aumento do nitrato a partir do mesmo dia. No tanque 1 as respostas não são tão claras, porém cabe salientar que este tanque apresentou um comportamento diferenciado, com menor produção de nitrito. Apesar de que a abundância dos três tipos de bactérias terem sido similares nos dois tanques, nota-se que o crescimento especialmente das α -proteobactérias foi mais lento no tanque 1 do que no tanque 2. A alta abundância das α -proteobactérias tempo 4 na água e tempo 6 nas placas do tanque 1 sugere que estes microorganismos possam ter demorado mais em transformar a amônia em nitrito, gerando as baixas concentrações deste último elemento. O mesmo não é observado no tanque 2 no qual no mesmo

período, a concentração de nitrito apresenta um aumento significativo. Schramm *et al.*(1996), analisando a estrutura e função de um biofilme nitrificante encontrou bactérias do grupo α - responsáveis pela oxidação do nitrito. Nogueira *et al.* (2002) encontrou *Nitrobacter* (α -proteobactéria) somente quando a concentração de nitrito estava elevada em experimento num bio-reator nitrificante, similar ao observado por Mobarry *et al.* (1996) em tanque de floculação utilizados no tratamento de esgotos.

É importante ressaltar que a quantidade de nitrito e nitrato que foi medida na água dos tanques é pequena em relação à diminuição das concentrações de amônio nos tanques. Isto indica que outros processos de absorção e/ou eliminação deste elemento nitrogenado devem ter ocorrido simultaneamente nos tanques. Para melhor compreender os caminhos que se reduz amônio nos tanques é que se elaborou o balanço de massa do nitrogênio, para indicar qual o principal (ou principais) processos que mais retiram amônia dos tanques. Este tema será discutido em detalhes no item 4 desta Discussão.

3.2 Berçário

Os grupos β - e γ -proteobactéria (responsáveis pela oxidação da amônia) no tratamento superfície apresentaram maior abundância quando houve maior disponibilidade da amônia, como também observado no experimento anterior. Porém, nenhum grupo se destacou especialmente no biofilme, havendo um pequeno predomínio de γ -proteobactéria na água no começo de janeiro. O grupo α -proteobactéria acompanhou o aumento dos demais grupos, porém se manteve sempre em maior número no tratamento superfície.

Ao contrário do que se esperava, as maiores abundâncias de bactérias não foram observadas nos tratamentos protegidos da predação dos camarões, mas sim nos tratamentos expostos à predação (sem proteção) tanto da superfície quanto do fundo. Padrão similar ocorreu para a clorofila *a*, com a maior concentração deste pigmento obtido no tratamento desprotegido na superfície, e a menor no tratamento Fundo Protegido. A baixa concentração de clorofila *a* no Fundo certamente está relacionada à pequena disponibilidade de luz, resultante da alta turbidez da água. Além disso, o substrato FP encontrava-se protegido da predação dos camarões, sendo que a estrutura que fazia tal proteção pode ter propiciado um sombreamento maior sobre as telas onde

crecia o biofilme, dificultando ainda mais a penetração de luz. Outro importante fator é a aeração dos tanques, que se dá de baixo para cima na coluna d'água, o que promove um fluxo forte e contínuo de água. Tal fato pode ter dificultado a fixação das microalgas nas telas e contribuído para as baixas concentrações de clorofila *a* nos tratamentos no fundo dos tanques. Os tratamentos Superfície e Superfície Protegido foram certamente beneficiados pela disponibilidade de luz e menor turbulência da água. Por outro lado, além destes dois fatores há que se considerar o efeito da herbivoria causada pelos próprios camarões sobre o biofilme. A herbivoria do *Paratya australiensis* (CRUSTACEA: DECAPODA) reduziu a biomassa de Cyanobacteria e diatomáceas e aumentou o crescimento de algas verdes em biofilmes de rios rasos (Burns & Ryder, 2001) e Pringle *et al.* (1993) descreve em seu trabalho que a herbivoria diminui a densidade dos microorganismos presentes no sedimento, aumentando a intensidade de luz para o biofilme em rios.

Da mesma forma, a abundância de bactérias pode ter sido beneficiada nos tratamentos expostos à predação, tanto na superfície quanto no fundo. Estes resultados indicam que a predação do camarão deve agir estimulando o crescimento tanto de bactérias quanto das microalgas. Provavelmente a ação dos camarões sobre o biofilme disponibiliza mais nutrientes para bactérias e microalgas seja pela excreção dos próprios camarões, ou pela mineralização decorrente dos processos de consumo e digestão dos microorganismos consumidos pelos camarões. Além disso, o consumo do biofilme pelos camarões fornece constantemente novas superfícies para serem colonizadas pelas bactérias, microalgas, cianobactérias e outros microorganismos. Desse modo, a presença dos camarões pode ter contribuído positivamente no desenvolvimento do biofilme. Schmid-Araya & Schmid (2000) discutem a importância da meiofauna na cadeia alimentar bentônica e destacam sua importância como “link” entre bactérias e organismos que ocupam níveis mais altos da cadeia trófica. Esta ação de predação aumenta a taxa de mineralização e estimula a atividade microbiana.

4. Balanço de Massa de Nitrogênio

O principal objetivo deste trabalho foi o de caracterizar, através da técnica FISH, grupos de bactérias nitrificantes que deverão, num futuro próximo, ser identificadas em nível de espécie através do seqüenciamento de seu genoma. Posteriormente, as bactérias mais ativas poderão ser cultivadas e adicionadas a tanques de cultivo como probióticos (Verschuere *et al.* 2000). Entretanto, para se determinar a importância das bactérias nitrificantes é necessário se determinar o grau de atividade destes microorganismos em comparação com outros mecanismos de retenção e eliminação da amônia dos tanques de cultivo, quais sejam, absorção deste elemento nitrogenado na biomassa microbiana autotrófica e heterotrófica presente no biofilme e na água, processos de desnitrificação e volatilização e exportação por troca de água. Neste sentido decidiu-se realizar um balanço de massa de nitrogênio nos tanques de cultivo durante o experimento de Larvicultura.

A água que abastece os tanques de cultivo é proveniente do mar, e já entra nos tanques enriquecida de nutrientes, especialmente de nitrogenados. Páez-Osuna *et al.* (1997) encontraram em seu trabalho que este incremento pode chegar a 17,8% do input de nitrogênio em tanques. Ao receber as microalgas provenientes dos cultivos massivos, que mantêm a qualidade da água e servem de alimento para os camarões, outra fração de água enriquecida é adicionada aos tanques. Além disso, há também a excreção dos camarões que estão sendo cultivados, bem como, decomposição de restos de ração que permanecem nos tanques. Essa carga orgânica é facilmente visualizada nos resultados da concentração de amônia obtidos na água dos tanques da larvicultura.

Por apresentar um período sem renovação de água, período no qual a concentração de amônia atingiu os maiores níveis, foi realizado o cálculo balanço de massa de nitrogênio apenas nos tanques de larvicultura, no qual se analisou a importância da perda da amônia na forma gasosa, incorporação desta pelo fitoplâncton, bactérias livres e aderidas e também pela nitrificação e desnitrificação.

Neste sentido, consideramos como principal entrada de nitrogênio a amônia presente nos tanques e proveniente de diversas fontes. Entre os tempos 2 e 3 houve uma redução de 17,5 mg de nitrogênio-NH₄, o que equivale a uma redução de 83,4% da

concentração inicial. Neste mesmo período procuramos determinar quanto desta amônia foi incorporado, ou eliminado pelos diferentes processos.

Sob determinadas condições de pH, temperatura e salinidade da água a reação de equilíbrio de amônia pode se deslocar e formar nitrogênio gasoso, e este pode se perder dos tanques dessa forma (Vinatea-Arana, 1997; Baumgarten *et al.* 1996). De acordo com os valores médios de temperatura e de salinidade pode-se dizer que cerca de 11% da amônia presente nos tanques pode ter sido perdida ao ser transformado em nitrogênio gasoso.

A atividade das bactérias é essencial nos processos de remoção de nitrogênio, seja pela nitrificação, desnitrificação ou incorporação do nitrogênio em sua biomassa. Em nosso estudo foi verificado que o processo de nitrificação eliminou aproximadamente 22,3% do nitrogênio dos tanques.

A retirada de nitrogênio por desnitrificação não foi medida neste experimento, portanto foi utilizado valor citado na literatura. Páez-Osuna *et al.* (1997) assumiram em seu trabalho num cultivo semi-extensivo de camarões marinho que 27,4% do nitrogênio foi removido via desnitrificação e volatilização da amônia; Hopkins *et al.* (1993) encontrou entre 13 e 46% a menos de nitrogênio em cultivos intensivos de camarão devidos à desnitrificação e volatilização da amônia e Boyd (1985) reportou que 57% do input de nitrogênio em tanques de cultivo de peixes podem ter sido perdidos por desnitrificação e difusão da amônia. Considerando que, como dito anteriormente, a volatilização da amônia tenha eliminado 11% do nitrogênio amoniacal, assumimos uma taxa de desnitrificação de 16,4% do nitrogênio acumulado, considerando a semelhança das condições experimentais entre deste trabalho com aqueles desenvolvidos por Páez-Osuna *et al.* (1997). Este ainda cita que 0,4% pode ter sido utilizado pela macrofauna associada.

Através fator de conversão para nitrogênio (Kemp *et al.*, 1993) e do biovolume das bactérias, foi possível determinar que bactérias livres na água incorporaram cerca de 2,4% do nitrogênio em sua biomassa, enquanto que a porção que cabe às bactérias aderidas ficou em torno de 0,6%. Essa diferença se deve à maior biomassa de bactérias encontradas livres na água que aderidas ao biofilme provavelmente por se tratar dos primeiros dias de experimento.

Outra forma pela qual o nitrogênio pode ter sido retirado da água dos tanques é pela incorporação na biomassa de microalgas e cianobactérias. Através da medida de clorofila *a* é possível estimar o conteúdo de carbono dos organismos fotossintéticos e pela relação molar de 50C:1Cla pudemos estimar a quantidade de nitrogênio considerando-se a razão atômica de Redfield (106C:16N:1P – Brock, 1985; De Angelis, 1992). Estes cálculos indicaram que cerca de 6% do nitrogênio foi incorporado pelas microalgas e cianobactérias. A relação molar utilizada para este trabalho é uma indicação do que pode ocorrer para esta região. Sabe-se que o fator de conversão de carbono para clorofila pode variar de 30-100. Proença (1990) encontrou para a região da lagoa dos Patos uma relação de 50:1, e esta vem sendo adotada por estudos nessa região.

Estes fatores em conjunto representam 75,7% do total de nitrogênio removido dos tanques. Isto significa que outros processos não medidos neste experimento são responsáveis pela redução de 27,4% da amônia presente nos tanques. É possível haver perdas de nitrogênio por sedimentação de partículas ricas em nitrogênio. Além disso, a técnica utilizada para medida de amônia (UNESCO, 1983) fornece uma margem de erro de 5%, que poderia ser considerado no cálculo.

Nenhum trabalho de balanço de massa foi encontrado para sistemas de larvicultura de camarão que pudesse servir de comparação para os resultados obtidos neste estudo. Entretanto, Zimmo *et al.* (2004) demonstram que a desnitrificação é o maior mecanismo de remoção de nitrogênio em tanques de estabilização. Trott *et al.* (2004) atribuiu em seu trabalho num receptor de efluente de uma fazenda de camarão que os processos como a produção primária pelo fitoplâncton, crescimento bacteriano e a herbivoria pelo zooplâncton foram as maiores vias de ciclagem de C e N. Podemos dizer que em nosso estudo a nitrificação foi a maior responsável pela remoção do nitrogênio dos tanques, seguido pelos processos de desnitrificação + volatilização da amônia.

Conclusões

- Os processos de nitrificação e desnitrificação têm grande importância na remoção de compostos nitrogenados em tanques de cultivo de larvicultura, representando uma remoção de até 39% da amônia presente na água dos tanques nesta fase de cultivo do camarão-rosa.
- A predação do camarão e a disponibilidade de luz tem impacto positivo sobre as microalgas e bactérias do biofilme.
- A concentração de compostos nitrogenados influenciou a composição da assembléia de bactérias no biofilme e na água, sendo que os grupos β - e γ -proteobactérias se relacionaram com a variação da amônia, enquanto que bactérias do grupo α -proteobactéria estiveram relacionadas com a variação de nitrito nos tanques de larvicultura.

Perspectivas de Estudos Futuros:

- Criação de novas sondas a partir de isolamento de bactérias que ocorrem na região;
- Utilização destes organismos como probióticos em tanques de cultivo.

Literatura Citada

- ABRAHAM, T.J. & R. PALANIAPPAN. 2004. Distribution of luminous bacteria in semi-intensive penaeid shrimp hatcheries of Tamil Nadu, Índia. *Aquaculture*. 232: 81-90.
- ABREU, P.C., F. L. THOMPSON, W. WASIELESKY JR. & R. O. CAVALLI. 1998. New perspectives in the use of microorganisms in shrimp culture: food source, water quality and diseases control. *Anais do Aquicultura Brasil'98*. 2:703-712.
- AMANN, R. & W. LUDWIG. 2000. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *FEMS Microbiology Reviews*. 24:555-565.
- AMANN, R.I., B.J. BINDER, R.J. OLSON, S.W. CHISHOLM, R. DEVEREUS & D.A.STAHL. 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied Environmental Microbiology*. 56:1919-1925.
- ANESIO, A.M., P. C. ABREU & B. A. BIDDANDA. 2003. The role of free and attached microorganisms in the decomposition of estuarine macrophyte detritus. *Estuarine Coastal and Shelf Science*. 56:197-201.
- AOI, Y. 2002. *In Situ* identification of microorganisms in biofilm communities. *Journal of bioscience and bioengineering*. 94(6): 552-556.
- ARAYA, R., K. TANI, T. TAKAGI, N. YAMAGUCHI & M. NASU. 2002. Bacterial activity and community composition in stream water and biofilm from an urban river determined by fluorescent in situ hybridization and DGGE analysis. *FEMS Microbiology reviews*. 1444: 1-9.
- AZAM, F. 2001. Introduction, history, and overview: the 'methods to our madness. In PAUL, J.H. (Ed.). *Methods in Microbiology - Marine Microbiology*. Academic Press. 30:1-12
- BAUMGARTEN, M.G.Z., J.M.B. ROCHA & L.F.H. NIENCHESKI. 1996. *Manual de Análises em Oceanografia Química*. Rio Grande: Ed. FURG, 132p.
- BIESTERFELD, S., L. FIGUEROA, M. HERNANDEZ & P. RUSSELL. 1998. Use of fluorescent oligonucleotide probes to characterize vertical population distributions

- of nitrifying bacteria in a full-scale nitrifying trickling filter. IAWQ Conference on Microbial Ecology of Biofilms: Concepts, Tools and Applications. 1998.
- BOTHE, H., H. JOST, M. SCHLOTTER, B.B. WARD & K-P WITZEL. 2000. Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. FEMS Microbiology reviews. 24:673-690.
- BOYD, C.E. 1985. Chemical budgets for channel catfish ponds. Transactions of the American Fisheries Society. 114:267-270.
- BROCK, T.D. 1985. A eutrophic lake. Lake Mendota. Wisconsin. Ecological Studies 55. Springer-Verlag. USA. 308p.
- BURFORD, M.A., P.J. THOMPSON, R.P. McINTOSH, R.H. BAUMAN & D.C. PEARSON. 2003. Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize Aquaculture. 219(1) 393-411.
- BURNS, A. & D. RYDER. 2001. Potential for biofilm as biological indicators in Australian riverine systems. Ecological Management & Restoration. 2:53-63
- BURRELL, P.C., C.M. PHALEN, & T. A. HOVANEC. 2001. Identification of bacteria responsible for ammonia oxidation in freshwater aquaria. Applied and Environmental Microbiology. 67(12) 5791-5800.
- BURTON, R.S. 1996. Molecular tools in marine ecology. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 200: 85-101.
- BUSSE, H.J., E.B.M. DENNER & E. LUBITZ. 1996. Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. Journal of Biotechnology. 47:3-38.
- BUSWELL, C., Y. M. HERLIHY, P.D. MARSH, C.W. KEEVIL & S.A. LEACH. 1997. Coaggregation amongst aquatic biofilm bacteria. Journal of Applied Microbiology. 83:477-484.
- CAVALLI, R.O., W. WASIELESKY JR, C.S. FRANCO & C. MIRANDA FILHO. 1996. Evaluation of the short-term toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to *Penaeus paulensis* (CRUSTACEA, DECAPODA) Broodstock. Arq. Biol. Tecnol., 39(3): 567-575.
- CESAR, D.E. 2002. Estrutura e dinâmica do bacterioplâncton e suas relações com nutrientes inorgânicos e predação no estuário da Lagoa dos Patos / RS. Tese de Doutorado em Oceanografia Biológica, FURG, Rio Grande, RS, 151p.

- CHANG, W.Y.B. & H. OUYANG. 1988. Dynamics of dissolved oxygen and vertical circulation in fish ponds. *Aquaculture*. 74:263-276.
- CHEN, Y.L.L. & H. Y. CHEN. 1992. Juvenile *Penaeus monodon* as zooplankton predators. *Aquaculture*. 103:35-44.
- COOKSEY, K.E. & B. WIGGLESWORTH-COOKSEY. 1995. Adhesion of bacteria and diatoms to surfaces in the sea – a review. *Aquatic. Microb. Ecol.* 9:87-96.
- DANG, H. & C.R. LOVELL. 2000. Bacterial primary colonization and early succession on surfaces in marine waters as determined by amplified rRNA gene restriction analysis and sequence analysis of 16S rRNA genes. *Applied Environ. Microbiol.* 66: 467-475.
- DeANGELIS, D. 1992. Dynamics of nutrient cycling and food webs. Chapman 7 Hill. Great Britain. 270p.
- DEDYSH, S.N., P.F. DUNFIELD, M. DERAKSHANI, S. STUBNER, J. HEYER & W. LIESACK. 2003. Differential detection of type II methanotrophic bacteria in acidic peatlands using newly developed 16S rRNA-targeted fluorescent oligonucleotide probes. *FEMS Microbiology Ecology*. 43:299-208.
- DELONG, E.F., G. S. WICKHAM & N. R. PACE. 1989. Phylogenetic stains ribosomal RNA-based markers for the identification of single cells. *Science*. 243:1360-1363.
- DIANA, J.S., C.K. LIN & P.J. SCHNEEBERGER. 1991. Relationship among nutrient inputs, water nutrient concentrations, primary production, and yield of *Oreochromis niloticus* in ponds. *Aquaculture*. 92: 323-341.
- FALKENTOFT, C.M., E. MÜLLER, P. ARNZ, P. HARREMOËS, H. MOSBAEK, P.A. WILDERER & S. WUERTZ. 2002. Population changes in a biofilm reactor for phosphorus removal as evidenced by the use of FISH. *Water Research*. 36: 491-500.
- GARCIA-ARMISEN, T. & P. SERVAIS. 2004. Enumeration of viable *E. coli* in rivers and wastewaters by fluorescent *in situ* hybridization. *Journal of Microbiological Methods*. 58(2) 269-279.
- GIOVANNONI, S & M. RAPPÉ. 2000. Evolution, diversity, and molecular ecology of marine prokaryotes. In KIRCHMAN, D.L. (Ed.) *Microbial Ecology of the Oceans*. Wiley-Liss 3:47-84.

- GLEASON, D.F. 1986. Utilization of salt marsh plants by post-larval brown shrimp: carbon assimilation rates and food preferences. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 31:151-158.
- GLÖCKNER, F.O., R.J.AMANN, A. ALFREIDER, J. PERNTHALER, R. PSENNER, K. TREBESIUS & K.L. SCHLEIFER. 1996. An In Situ Hybridization protocol for detection and identification of planktonic bacteria. *System. Appl. Microbiol.* 19:403-406.
- GOMEZ, M.A., J.M. GALVEZ, E. HONTORIA & J. GONZÁLEZ-LÓPEZ. 2003. Influence of ethanol concentration on biofilm bacterial composition from a denitrifying submerged filter used for contaminated groundwater. *Journal of bioscience and Bioengineering.* 95(3) 245-251.
- HIBIYA, K., A. TERADA, S. TSUNEDA & A. HIRATA. 2003. Simultaneous nitrification and denitrification by controlling vertical and horizontal microenvironment in a membrane-aerated biofilm reactor. *Journal of Biotechnology.* 100:23-32.
- HOPKINS, J.S., R.D. HAMILTON, R.D. SANDIFER, C.L. BROWDY & A.D. STOKES. 1993. Effect of water exchange rate on production, water quality, effluent characteristics and nitrogen budgets of intensive shrimp ponds. *Journal of the World Aquaculture Society.* 24:304-320.
- HOVANEC, T.A., L.T. TAYLOR, A. BLAKIS & E. F. DELONG. 1998. Nitrospirilla-like bacteria associated with nitrite oxidation in freshwater aquaria. *Applied and environmental microbiology.* 64(1) 258-264.
- HOVANEC, T.A. & DeLONG, E.F. 1996. Comparative analysis of nitrifying bacteria associated with freshwater and marine aquaria. *Applied and environmental microbiology.* 62(8) 2888-2896.
- JACKSON, C.R., P.F. CHURCHILL & E.E. RODEN. 2001. Successional changes in bacterial assemblage structure during epilithic biofilm development. *Ecology* 82:555-566.
- JEFFREY S. W. & G.F. HUMPHREY. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanz.* 167: 191-194.
- KEMP, P.F., B.F.SHERR, E.B. SHERR, J.J.COLE. 1993. handbook of methods in aquatic microbial ecology. Lewis. 777p.

- KUBITZA, F. 2003. Qualidade da Água no cultivo de peixes e camarões. 1ª Ed. 229p.
- LOCK, M.A., R.R. WALLACE, J.W. COSTERTON, R.M. VENTULLO & S. E. CHARLTON. 1984. River epilithon: toward a structural-functional model. *Oikos*. 42:10-22.
- LÓPEZ-ARCHILLA, A., E. GERARD, D. MOREIRA & P. LÓPEZ-GARCÍA. 2004. Macrofilamentous microbial communities in the metal-rich and acidic River Tinto, Spain. *FEMS Microbiology Letters*. 234(2) 221-228.
- MANZ, W.R., W.L. AMANN, M. WAGNER & K.-H. SCHLEIFER. 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasse of proteobacteria: problems and solutions. *Systematic Applied Microbiology*. 15:593-600.
- MATTEUZZI, D., E. SWENNEN, M. ROSSI, T. HARTMAN & V. LEBET. 2004. Prebiotic effects of a wheat germ preparation in human healthy subjects. *Food Microbiology*. 21:119-124.
- MIRANDA Fº, K.C. 1997. Efeito da amônia na sobrevivência e crescimento de juvenis de camarão-rosa *Penaeus paulensis* Pérez Farfante, 1967 (CRUSTACEA: DECAPODA). Dissertação de Mestrado, Fundação Universidade do Rio Grande, Rio Grande, RS, 122p.
- MOBARRY, B.K., M. WAGNER, V. URBAIN, B.E. RITTMANN & D.A. STAHL. 1996. Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 62(6) 2156-2162.
- NOGUEIRA, R., L.F. MELO, U. PURKHOLD, S. WUERTZ & M. WAGNER. 2002. Nitrifying and heterotrophic population dynamics in biofilm reactors: effects of hydraulic retention time and the presence of organic carbon. *Water Research*. 36:469-481.
- NUNES, A.J.P., T.C.V. GESTEIRA & S. GODDARD. 1997. Food ingestion and assimilation by the Southern brown shrimp *Penaeus subtilis* under semi-intensive culture in NE Brazil. *Aquaculture*. 149:121-136.
- OKABE, S., H. SATOH & Y. WATANABE. 1999. In situ analysis of nitrifying biofilms as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(7): 3182-3191.

- OLIVE, D.M. & P. BEAN. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of clinical microbiology*. 37(6) 1661-1669.
- OSTRENSKY, A & L.H. POERCH. 1992. Toxicidade aguda do nitrito na larvicultura do camarão -rosa *Penaeus paulensis* Pérez-Farfante, 1967. *Nerítica*, 7:101-107.
- OSTRENSKY, A. & W. WASIELESKY. 1995. Acute toxicity of ammonia to various life stages of São Paulo shrimp, *Penaeus paulensis* Pérez-Farfante, 1967. *Aquaculture*. 132: 339-347.
- PÁDUA, H.B. 2004. Amônias. www.setorpesqueiro.com.br/aquicultura/helcias/amonias.asp
- PÁEZ-OSUNA, F., S.R. GUERRERO-GALVÁN, A.C. RUIZ-FERNÁNDEZ & R. ESPINOZA-ÂNGULO. 1997. Fluxes and mass balances of nutrients in a semi-intensive shrimp farm in North-Western Mexico. *Marine Pollution Bulletin*. 34(5) 290-297.
- PEDRÓS-ALIÓ, C. & T.D. BROCK. 1983. The importance of attachment to particles for planktonic bacteria. *Arch. Hydrobiol.* 98(3) 354-376.
- PERNTHALER, J., F. O. GLÖCKNER, W. SCHÖNHUBER & R. AMANN. 2000. Fluorescence *in situ* Hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes. In PAUL, J.B. 2001. *Methods in Microbiology - Marine Microbiology*. Academic Press, 30 207-225p.
- PETERSON, C.G. 1996. Response of benthic algal communities to natural physical disturbance. In STEVENSON, R. J., M.L. BOTHWELL & R. L. LOWE eds. *Algal Ecology: Freshwater Benthic Ecosystems* pp. 375-403. Academic Press, San Diego.
- PRINGLE, C.M., G.A. BLAKE, A.P. COVICH, K.M. BUZBY & A. FINLEY. 1993. Effects of omnivorous shrimp in a montane tropical stream: sediment removal, disturbance of sessile invertebrates and enhancement of under-storey algal biomass. *Oecologia*. 93:1-11.
- PROENÇA, L.A.O. 1990. Ciclo anual da produção primária, biomassa do fitoplâncton e carbono orgânico particulado em área rasa da porção sul da Lagoa dos Patos. Tese de Mestrado em Oceanografia Biológica, FURG, Rio Grande, RS, 81p.

- RICKARD, A.H., A.J. MCBAIN, R.G. LEDDER, P.S. HANDLEY & P. GILBERT. 2003a. Coaggregation between freshwater bacteria within biofilm and planktonic communities. *FEMS Microbiology Letters*. 220:133-140.
- RICKARD, A.H., P. GILBERT, N.J. HIGH, P.E. KOLENBRANDER & P.S. HANDLEY. 2003b. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *TRENDS in Microbiology*. 11(2) 94-100.
- ROMAN, A. M. & S. SABATER. 1999. Effect of primary producers on the heterotrophic metabolism of stream biofilm. *Freshwater Biology*. 41:729-736.
- SANTOS, M. H. S. 2003. Alimentação do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Pérez Farfante, 1967) (Decapoda-Penaeidae) Cultivado. Tese de Doutorado em Oceanografia Biológica, FURG, Rio Grande, RS, 229p.
- SCHMID-ARAYA, J.M. & P.E. SCHMID. 2000. Trophic relationships: integrating meiofauna into a realistic benthic food web. *Freshwater Biology*. 44:149-163.
- SCHRAMM, A., L.H. LARSEN, N.P. REVSBECH, N.B. RAMSING, R. AMANN & K. H. SCHLEIFER. 1996. Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by In Situ Hybridization and the use of microelectrodes. *Applied and Environmental Microbiology*. 62(12) 4641-4647.
- SEKAR, R., K. V. K. NAIR, V.N.R. RAO & V. P. VENUGOPALAN. 2002. Nutrient dynamics and successional changes in a lentic freshwater biofilm. *Freshwater Biology*. 47:1893-1907.
- SHANKAR, K.M. & C.V. MOHAN. 2001. The potential of biofilm in aquaculture. *World Aquac.* 32(2):62-63.
- SILYN-ROBERTS, G. & G. LEWIS. 2000. *In situ* analysis of *Nitrosomonas spp.* in wastewater treatment wetland biofilms. *Water Resource*. 35(11) 2731-2739.
- SOKAL, R.R. & F. J. ROHLF. 1969. *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*. W. H. Freeman and Company, New York, USA, 776p.
- STOLP, H. 1993. *Microbial Ecology: organisms, habitats, activities* (Cambridge Studies in ecology). Atheneum Press, Newcastle, Great Britain, 308pp.
- STONER, A.W. & R. J. ZIMMERMAN. 1988. Food pathways associated with penaeidae shrimps in a mangrove-fringed estuary. *Fish. Bull.* 86(3):543-551.
- STRICKLAND, J. D. H. & T.R. PARSONS. 1972. *A Practical handbook of seawater analysis*. Fish Research Board of Canada. Ottawa, 310p.

- THOMPSON, F.L., P.C. ABREU & W. WASIELESKY JR. 2002. Importance of biofilm for water quality and nourishment in intensive shrimp culture. *Aquaculture*. 203: 263-278.
- THOMPSON, F.L., P.C. ABREU & R. CAVALLI. 1999. The use of microorganisms as food source for *Penaeus paulensis* larvae. *Aquaculture*. 174: 139-153.
- TOMASSO, J.R. 1994. Toxicity of nitrogenous wastes to aquaculture animals. *Reviews in Fisheries Science*, 2(4): 291-314.
- TROTT, L.A., A.D. MCKINNON, D. M. ALONGI, A. DAVIDSON & M.A. BURFORD. 2004. Carbon and nitrogen processes in a mangrove creek receiving shrimp farm effluent. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 59:197-207.
- UNESCO. 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring. Intergovernmental Oceanographic Commission. Manual and guides, 12.
- VERSCHUERE, L, G. ROMBAUT, P. SORGELOOS & W. VERSTRAETE. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in Aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64(4) 655-671.
- VINATEA-ARANA, LUIS. 1997. Princípios químicos de qualidade da água em aqüicultura: uma revisão para peixes e camarões. 1ª ed., Florianópolis: EDUFSC, v.1 165p.
- WAGNER, M., D.R. NOGUERA, S. JURETSCH, O. G. RATH, H.P. KOOPS & K.H. SCHLEIFER. 1998. Combining fluorescent in situ hybridization (FISH) with cultivation and mathematical modeling to study population structure and function of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge. *Water Science and Technology*. 37(5)441-449.
- WARD, B.B. 2000. Nitrification and the marine nitrogen cycle. *In* D. L. Kirchman (Ed.) *Microbial Ecology of the Oceans*. Willey-Liss 3:47-84.
- WASIELESKY JR, W. 2000. Cultivo de juvenis do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (DECAPODA: PENAEIDAE) no Estuário da Lagoa dos Patos: Efeitos dos parâmetros ambientais. Tese de Doutorado em Oceanografia Biológica, FURG, Rio Grande, RS, 229p.
- WASIELESKY JR., W., M. A. MARCHIORI & M.H. SANTOS. 1994. Efeito da amônia no crescimento de pós-larvas do camarão-rosa *Penaeus paulensis* Pérez Farfante, 1967 (Decapoda: Penaeidae). *Nauplius*, 2:99-105.

- WELSCHMEYER, N.A. 1994. Fluorometric analysis of chlorophyll a in the presence of chlorophyll b and pheopigments. *Limnol. Oceanogr.* 39: (8)1985-1992.
- WIMPENNY, J. 1996. Ecological determinants of biofilm formation. *Biofouling.* 10:43-63.
- ZIMMO, O.R., N.P. VAN DER STEEN & H.J. GIJZEN. 2004. Nitrogen mass balance across pilot-scale algae and duckweed-based wastewater stabilization ponds. *Water Research.* 38:913-920.

ANEXO



Foto 1: Tanques de Cultivo do Setor Larvicultura (EMA-FURG) e substratos para formação do biofilme

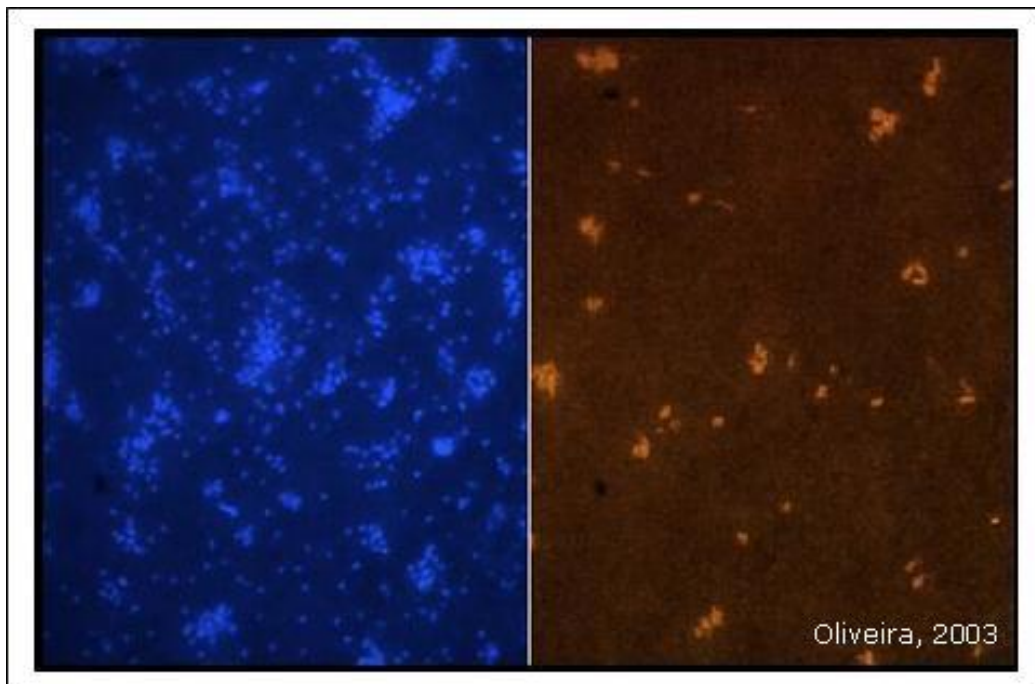


Foto 2: Imagens das amostras de bactérias após método FISH. À esquerda, bactérias coradas com DAPI e a direita bactérias marcadas com a sonda Gama-proteobactéria (Larvicultura - dia 21/11/02)

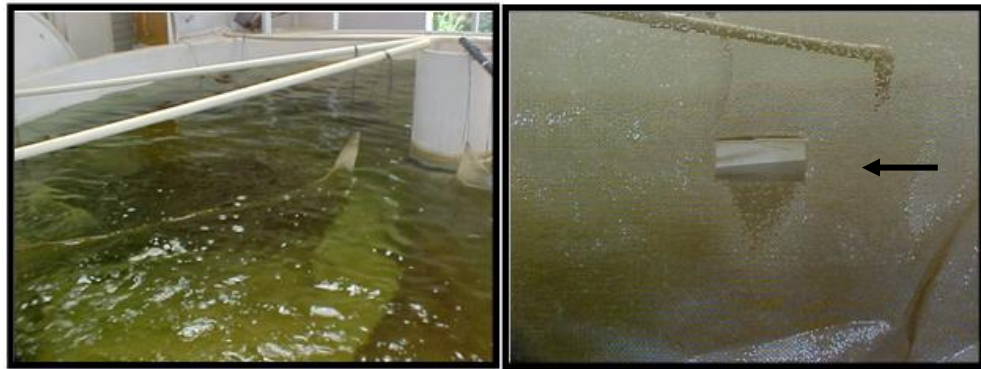


Foto 3: Tanque da Larvicultura no qual foi realizado o experimento Berçário. No detalhe, a tela de polietileno cortada para análise do biofilme e clorofila *a*.

Esquema 1: Tratamentos - Experimento Berçário: Superfície e Fundo Exposto e Superfície e Fundo Protegidos à predação do camarão.

160

120

