



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
AQUICULTURA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE



### **Dissertação de Mestrado**

Avaliação do processo de nitrificação no cultivo do camarão branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei* (**Boone 1931**) com uso de substrato artificial e inóculo de bactérias em sistema de bioflocos (BFT).

Aluna: Nathalia Brenda Veiga dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Wilson Wasielesky Jr.

Co-orientador: Dr. Plínio Schmidt Furtado

Rio Grande - RS, 2016

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

Avaliação do processo de nitrificação no cultivo do camarão branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei* (**Boone 1931**) com uso de substrato artificial e inóculo de bactérias em sistema de bioflocos (BFT).

**Nathalia Brenda Veiga dos Santos**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Aquicultura no Programa de Pós-graduação em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande.

Orientador: Prof. Dr. Wilson Wasielesky Jr. (IO – FURG)

Co-orientador: Dr. Plínio Schmidt Furtado (IO – FURG)

Rio Grande – RS – Brasil

Novembro 2016

## SUMÁRIO

1	LISTA DE FIGURAS.....	I
2	LISTA DE TABELAS.....	III
3	DEDICATÓRIA.....	V
4	AGRADECIMENTOS.....	VI
5	RESUMO.....	VII
6	ABSTRACT.....	VIII
7	1. INTRODUÇÃO.....	1
8	2. OBJETIVO GERAL.....	7
9	2.1 - Objetivos específicos.....	7
10	3. MATERIAL E MÉTODOS.....	7
11	3.1 – Local e instalações.....	7
12	3.2 - Origens dos camarões.....	7
13	3.3– Delineamento experimental.....	8
14	3.4- Fertilização orgânica.....	9
15	3.5 - Parâmetros físicos e químicos da água.....	9
16	3.6 – FISH (Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente).....	10
17	3.7 – Análise de Microrganismos.....	12
18	3.8 – Desempenho zootécnico dos camarões.....	12
19	3.9- Análise Estatística.....	12
20	4. RESULTADOS.....	13
21	5. DISCUSSÃO.....	29
22	6. CONCLUSÃO.....	34
23	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
24	ANEXOS.....	44

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Etapas da formação e estrutura de um biofilme. Fonte: Conell, 2014. .... 5
- Figura 2:** Crescimento das bactérias nitrificantes e bactérias heterotróficas no Biofilme. Adaptado: Golz, 1995. .... 6
- Figura 3:** Travesseiros feitos de tela plástica com abertura de 5 mm (34cmCx18cmLx8cmA) contendo 40 “bioballs” de 32mm<sup>2</sup>. .... 9
- Figura 4:** Média ± desvio padrão dos valores de Nitrogênio Amoniacal Total (NAT – mg/L (a)), nitrito (N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> – mg/L (b)) e nitrato (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> – mg/L (c)) na água de cultivo dos tratamentos Controle: Água clara onde foram formados os bioflocos; IN (10%): Água clara com inóculo de bioflocos (10%); BI: Água clara com substrato (“bioballs” imaturos); BM: Água clara com inóculo de “bioballs” maduros, ao longo dos 28 dias de experimento com *L.vannamei*. Letras diferentes indicam médias significativas diferentes (P <0,05). .... 15
- Figura 5:** Média ± desvio padrão da quantidade total de melação aplicado na água de cultivo dos tratamentos Controle: Água clara onde foram formados os bioflocos; IN (10%): Água clara com inóculo de bioflocos (10%); BI: Água clara com substrato (“bioballs” imaturos); BM: Água clara com inóculo de “bioballs” maduros, ao longo dos 28 dias de experimento com *L.vannamei*. Letras diferentes indicam médias significativas diferentes (P <0,05). .... 16
- Figura 6:** Média ± erro padrão (n=3) da densidade de microrganismos (10<sup>5</sup>cel./ml) detectadas pelo DAPI (total de microrganismos) na água dos diferentes tratamentos Controle: Água clara onde foram formados os bioflocos; IN (10%): Água clara com inóculo de bioflocos (10%); BI: Água clara com substrato (“bioballs” imaturos); BM: Água clara com inóculo de “bioballs” maduros, ao longo dos 28 dias de experimento com *Litopenaeus vannamei*. Letras diferentes indicam médias significativas diferentes (P <0,05). .... 19
- Figura 7:** Densidade de microrganismos (DAPI – todos os microrganismos (a)) e bactérias (10<sup>5</sup> cel./g) detectadas pelas sondas, NTSPA 712 – *Phylum Nitrospira* (b), NIT 3- *Nitrobacter spp* (c), NSO 190-1225 – *Nitrosomonadales* (d), NTSPA 685 – *Nitrospira mascoviensis*, *N. marina* (e), NSMR 76 – *Nitrosomonas marina like* (f), PAE

997 – *Pseudomonas spp* (h) e NITCOC – *Nitrococcus mobilis* (g) na parte externa dos “bioballs” dos tratamentos BI: Água clara com substrato (“bioballs” imaturos) e BM: Água clara com inóculo de “bioballs” maduros, ao longo dos 28 dias de experimento com o *Litopenaeus vannamei*. Resultados apresentados em média ± erro padrão (n=3). Letras diferentes indicam médias significativas diferentes (P <0,05). Gráficos organizados em ordem decrescente taxonômica das bactérias. .... 23

**Figura 8:** Comunidades de microrganismos presentes na água de cultivo nos diferentes tratamentos Controle: Água clara onde foram formados os bioflocos - a; IN (10%): Água clara com inóculo de bioflocos (10%) - b; BI: Água clara com substrato (“bioballs” imaturos) - c; BM: Água clara com inóculo de “bioballs” maduros - d, ao longo dos 28 dias de experimento com *Litopenaeus vannamei*. Resultados apresentados em média ± erro padrão (n=3). .... 27

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Qualidade da água de cultivo de origem dos camarões e “bioballs”.....	8
<b>Tabela 2:</b> Sondas utilizadas para identificação e contagem das bactérias presentes nas amostras. ....	11
<b>Tabela 3:</b> Média $\pm$ desvio padrão dos parâmetros de qualidade da água dos diferentes tratamentos Controle: Água clara onde foram formados os bioflocos; IN (10%): Água clara com inóculo de bioflocos (10%); BI: Água clara com substrato (“bioballs” imaturos); BM: Água clara com inóculo de “bioballs” maduros, ao longo dos 28 dias de experimento com <i>L.vannamei</i> .....	13
<b>Tabela 4:</b> Médias $\pm$ desvio padrão da densidade total de microrganismos (DAPI) e bactérias ( $10^5$ cel./ml) detectadas pelas sondas NTSPA 712 – <i>Phylum Nitrospira</i> , NIT 3- <i>Nitrobacter spp</i> , NSO 190-1225 – <i>Nitrosomonadales</i> , NTSPA 685 – <i>Nitrospira mascoviensis</i> , <i>N. marina</i> , NSMR 76 – <i>Nitrosomonas marina like</i> , PAE 997 – <i>Pseudomonas spp</i> e NITCOC – <i>Nitrococcus mobilis</i> na água dos diferentes tratamentos Controle: Água clara onde foram formados os bioflocos; IN (10%): Água clara com inóculo de bioflocos (10%); BI: Água clara com substrato (“bioballs” imaturos); BM: Água clara com inóculo de “bioballs” maduros, ao longo dos 28 dias de experimento com <i>Litopenaeus vannamei</i> . Sondas organizadas em ordem decrescente taxonômica das bactérias (da esquerda para direita). ....	17
<b>Tabela 5:</b> Médias $\pm$ desvio padrão da porcentagem da densidade de bactérias ( $10^5$ cel./ml) detectadas pelas sondas NTSPA 712 – <i>Phylum Nitrospira</i> , NIT 3- <i>Nitrobacter spp</i> , NSO 190-1225 – <i>Nitrosomonadales</i> , NTSPA 685 – <i>Nitrospira mascoviensis</i> , <i>N. marina</i> , NSMR 76 – <i>Nitrosomonas marina like</i> , PAE 997 – <i>Pseudomonas spp</i> e NITCOC – <i>Nitrococcus mobilis</i> em relação ao DAPI (total de microrganismos) na água dos diferentes tratamentos Controle: Água clara onde foram formados os bioflocos; IN (10%): Água clara com inóculo de bioflocos (10%); BI: Água clara com substrato (“bioballs” imaturos); BM: Água clara com inóculo de “bioballs” maduros, ao longo dos 28 dias de experimento com <i>Litopenaeus vannamei</i> . Sondas organizadas em ordem decrescente taxonômica das bactérias (da esquerda para direita).....	18

**Tabela 6:** Porcentagem da densidade de bactérias detectadas pelas sondas NTSPA 712 – *Phylum Nitrospira*, NIT 3- *Nitrobacter spp*, NSO 190-1225 – *Nitrosomonadales*, NTSPA 685 – *Nitrospira mascoviensis*, *N. marina*, NSMR 76 – *Nitrosomonas marina like*, PAE 997 – *Pseudomonas spp* e NITCOC – *Nitrococcus mobilis* em relação ao DAPI (total de microrganismos) na parte externa dos “bioballs” dos tratamentos BI: Água clara com substrato (“bioballs” imaturos) - a e BM: Água clara com inóculo de “bioballs” maduros - b, ao longo dos 28 dias de experimento com o *Litopenaeus vannamei*. Valores entre parênteses são médias  $\pm$  desvio padrão da densidade de bactérias em  $10^5$  cel./g. Sondas organizadas em ordem decrescente taxonômica das bactérias (da esquerda para direita). ..... 23

**Tabela 7:** Concentração (%) de bactérias nitrificantes (AOB e NOB) e heterotróficas (*pseudomonas spp.*) em relação ao total de microrganismos presentes nos bioflocos dos tratamentos Controle: Água clara onde foram formados os bioflocos; IN (10%): Água clara com inóculo de bioflocos (10%); BI: Água clara com substrato (“bioballs” imaturos); BM: Água clara com inóculo de “bioballs” maduros, ao longo dos 28 dias de experimento com o *Litopenaeus vannamei*. Valores entre parênteses são médias  $\pm$  desvio padrão da densidade de bactérias em  $10^5$  cel./ml. .... 24

**Tabela 8:** Concentração (%) de bactérias nitrificantes (AOB e NOB) e heterotróficas (*pseudomonas spp.*) em relação ao total de microrganismos presentes na parte externa dos “bioballs” dos tratamentos BI: Água clara com substrato (“bioballs” imaturos) e BM: Água clara com inóculo de “bioballs” maduros, ao longo dos 28 dias de experimento com o *Litopenaeus vannamei*. Valores entre parênteses são médias  $\pm$  desvio padrão da densidade de bactérias em  $10^5$  cel./g..... 25

**Tabela 9:** Médias  $\pm$  desvio padrão dos principais parâmetros de desempenho zootécnico nos diferentes tratamentos Controle: Água clara onde foram formados os bioflocos; IN (10%): Água clara com inóculo de bioflocos (10%); BI: Água clara com substrato (“bioballs” imaturos); BM: Água clara com inóculo de “bioballs” maduros, ao longo dos 28 dias de experimento com *L. vannamei*..... 28

## **DEDICATÓRIA**

**Á minha mãe Rosemeire, meu pai Sérgio,  
meu namorado João Paulo, familiares, amigos, que  
sempre apoiam minhas decisões, e ao meu cachorro Tobias  
que não faz idéia do quanto me faz bem.**

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e professor Dr. Wilson Wasielesky Jr., por permitir que eu fizesse parte do Projeto Camarão, pelo desenvolvimento desse trabalho e ensinamentos transmitidos que muito me ajudaram, contribuíram e irão contribuir para meu desenvolvimento profissional.

Ao meu co-orientador Dr. Plínio Schmidt Furtado que muito me ajudou durante todo o mestrado. Que foi como ele mesmo diz, como um tio pra mim, me fazendo pensar e ler cada dia mais.

A professora Dra. Dionéia Cesar da Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF, por me receber em sua casa e seu laboratório para realização da técnica FISH.

A banca Prof. Dr. Felipe do Nascimento Vieira (UFSC), Prof. Dr. Dariano Krummenauer (IO – FURG), Dr. Plínio Schmidt Furtado (IO – FURG) e Prof. Dr. Wilson Wasielesky Jr. (IO – FURG) por terem aceitado o convite e estarem contribuindo com esta dissertação.

A Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa, que foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho e pela minha estadia em Rio Grande.

A UFJF por permitir a realização da técnica nas dependências da universidade.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura/FURG, pelos ensinamentos e esclarecimentos sobre diferentes assuntos.

Aos amigos que fiz ao longo do mestrado, alunos e funcionários da EMA, pela ajuda profissional e pessoal, pelas conversas e momentos de confraternização.

A Deus e em especial aos meus pais (Rosemeire e Sérgio), por todo carinho, amor, conselhos, ajuda emocional e financeira. Por todo o apoio e confiança que sempre depositaram em mim.

Obrigada a todos vocês!

## RESUMO

O camarão-branco-do-pacífico *Litopenaeus vannamei* é o camarão marinho mais cultivado em todos os tipos de sistemas, assim como no sistema de bioflocos (Biofloc Technology System - BFT). Os flocos são formados por microrganismos (bactérias, ciliados, diatomáceas, nematoides, etc.), fezes, restos de ração, carapaças, entre outros, sendo as bactérias autotróficas responsáveis pelo processo de nitrificação. Essa é uma etapa crucial para esse tipo de cultivo, uma vez que os compostos nitrogenados, em elevadas concentrações, são tóxicos para os camarões. O presente trabalho teve como objetivo promover e identificar o desenvolvimento de bactérias nitrificantes através da adição de substratos artificiais e inóculo de bioflocos no cultivo de *L.vannamei* em sistema BFT. O delineamento experimental consistiu em quatro tratamentos com três repetições (4x3), sendo esses: **Controle:** Água clara onde foram formados os bioflocos; **IN (10%):** Água clara com inóculo de bioflocos (10%); **BI:** Água clara com substrato (“bioballs” imaturos); **BM:** Água clara com inóculo de “bioballs” maduros provenientes de um sistema de recirculação. Para tal, foram estocados juvenis de camarão ( $4,92 \pm 0,45\text{g}$ ) em 12 tanques de 200L de volume útil, densidade de estocagem de 200 camarões/m<sup>3</sup>. Os camarões foram alimentados 2x/dia com ração comercial contendo 38% de proteína bruta (Guabi- potimar/38% PB Active), seguindo tabela de alimentação e observações diárias do consumo alimentar, ao longo de quatro semanas de experimento (28 dias). Foram coletadas amostras de bioflocos e dos “bioballs” para detectar o crescimento da população de bactérias nitrificantes e heterotróficas (*pseudomonas spp.*) através do FISH (Hibridização *in situ* Fluorescente). Não foi observada diferença significativa entre os tratamentos ( $P>0,05$ ) para sobrevivência, obtendo os valores médios superiores a 88%. O tratamento IN (10%) obteve menor concentração de amônia e nitrito e maior concentração de nitrato, enquanto BM obteve maior peso final e biomassa final, produtividade, ganho de peso semanal e menor conversão alimentar aparente para resultados de desempenho zootécnico. Ambos apresentaram uma maior quantidade de diatomáceas cêntricas em relação aos outros tratamentos. Verificou-se que o uso de inóculos no início da produção seja na forma de bioflocos ou substratos que já contenham bactérias nitrificantes é uma opção eficaz para evitar concentrações elevadas de nitrito e propiciar uma melhor qualidade de água ao longo do cultivo.

**Palavras-chave:** Bactérias heterotróficas, bactérias nitrificantes, “bioballs”, bioflocos, FISH.

## ABSTRACT

*Litopenaeus vannamei* is the most cultured marine shrimp in all types of systems, as well as the Biofloc Technology System (BFT). Flakes are formed by microorganisms (bacteria, ciliates, diatoms, nematodes, etc.), feces, feed remains, carapace, among others, autotrophic bacteria being responsible for the nitrification process. This is a crucial step in this type of farming, since the nitrogenous compounds in high concentrations are toxic to the shrimps. This study aimed to identify and promote the development of nitrifying bacteria by adding artificial substrates and bioflocs inoculum in *L. vannamei* cultivation in BFT system. The experiment consisted of four treatments with three repetitions (4x3), these being: Control: clear water where bioflocs were formed; IN (10%): Clear water with bioflocs inoculum (10%); BI: Clear water with substrate (immature “bioballs”); BM: Clear water with mature “bioballs” inoculum from a recirculation system. To this end, they were stocked shrimp juveniles ( $4.92 \pm 0.45\text{g}$ ) in 12 tanks 200L working volume, stocking density of 200 shrimp /  $\text{m}^3$ . The shrimps were fed 2x / day with commercial feed containing 38% crude protein (Guabipotimar / 38% PB Active), following feeding table and daily observations of food intake over four weeks of the experiment (28 days). Bioflocs and “bioballs” samples were collected to detect the growth of the population of nitrifying and heterotrophic (*pseudomonas spp.*) bacteria by FISH (Fluorescent *in situ* Hybridization). There was no significant difference between treatments ( $P > 0.05$ ) for survival, obtaining the mean values greater than 88%. The IN (10%) treatment had lower concentrations of ammonia and nitrite and nitrate concentration increased, while BM had higher final weight and final biomass, productivity, weekly weight gain and lower conversion apparent feed for production performance results. Both had higher amount of centric diatoms in relation to other treatments. It has been found that the use of inoculum at the beginning of production in the form of bioflocs or substrates that already contain nitrifying bacteria is an effective option to avoid high concentrations of nitrite and to provide a better quality of water throughout the crop.

**Keywords:** Heterotrophic bacteria, nitrifying bacteria, “bioballs”, bioflocs, FISH.

# 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos carcinicultores, governos e indústrias estão se tornando conscientes da crescente necessidade de criação de camarões de uma maneira mais responsável, tentando mitigar impactos causados pelo sistema tradicional, como: uso de ecossistemas de mangue de proteção para a construção do tanque; salinização das águas subterrâneas e terras agrícolas; poluição das águas costeiras por efluentes de tanques; questões de biodiversidade decorrentes da recolha de sementes selvagens e reprodutores, introdução de espécies exóticas e seus patógenos; conflitos sociais com outros usuários de recursos; descargas agrícolas, causando auto poluição em áreas de cultivo de camarão; entre outros (FAO, 2016).

Sendo o sistema de bioflocos (Biofloc Technology System – BFT) uma forma de cultivo com potencial para abordar todas estas preocupações a fim de continuar o crescimento da carcinicultura sem problemas a longo prazo por ser baseado no crescimento de microrganismos no meio de cultura, beneficiado pela troca zero ou mínima de água (Schryver *et al.*, 2008). Composto por microrganismos (bactérias, ciliados, diatomáceas, nematóides, etc.), fezes, restos de ração, carapaças, entre outros.

Os microrganismos possuem duas principais funções no sistema de cultivo, a primeira é a manutenção da qualidade da água, pela transformação dos compostos nitrogenados em proteína digestível, realizada pelas bactérias nitrificantes e heterotróficas presentes no meio. A segunda é a nutrição animal, aumentando a viabilidade do cultivo, reduzindo a conversão alimentar aparente e os custos de alimentação, que chegam a representar pelo menos 50% do total dos custos de produção aquícola devido ao elevado custo da proteína nas dietas comerciais (Emerenciano *et al.*, 2013; Schweitzer *et al.* 2013).

Como todo sistema de produção o BFT possui vantagens e desvantagens em relação aos outros (ex.: cultivo tradicional). Sendo as vantagens: um aumento na produtividade, utilização de menores áreas de cultivo, aumento da biossegurança, diminuição ou isenção da renovação de água, maior estabilidade do sistema, diminuição da quantidade de proteína nas rações, maior disponibilidade de alimento natural, comunidade microbiana atuando como probiótico, uso de probiótico na prevenção de doenças no cultivo (ex.: *Vibrio*) e melhor taxa de sobrevivência, menores unidades de cultivo com maior controle, menor impacto ambiental (ex.: diminui/evita a percolação da água para o subsolo), possibilidade de cultivo em regiões afastadas da costa, menor

34 taxa de conversão alimentar. Desvantagens como maiores gastos de energia (aeração),  
35 maior custo operacional e risco do aparecimento de cianobactérias devido ao acúmulo  
36 de fósforo no sistema (Schryver *et al.*, 2008; Krummenauer *et al.*, 2014; Lara *et al.*,  
37 2016;). Sendo o sistema de ar difuso (blower) a aeração mais indicada observada no  
38 trabalho de Lara *et al.*, 2016 para esse tipo de cultivo, por ser eficiente na agregação das  
39 partículas e formação do bioflocos, contribuindo para o crescimento de camarão.

40 A aquicultura é definida como o cultivo de produtos aquáticos sob condições  
41 controladas, onde o principal objetivo é produzir um produto comercial da forma mais  
42 eficiente e rentável possível, implicando em um sistema com alta densidade de  
43 estocagem, alimentos de alta qualidade e gestão da qualidade da água, como ocorre no  
44 sistema BFT (Ebeling *et al.*, 2006). Contudo a reutilização da água gera um aumento na  
45 concentração de sólidos suspensos totais, dióxido de carbono e nitrato (Colt, 2006;  
46 Ebeling *et al.*, 2006; Kuhn *et al.*, 2010).

47 Dentre os compostos nitrogenados, a amônia é o principal composto por ser  
48 excretado pela maioria dos animais aquáticos (Kinne, 1976), sendo essa a forma de  
49 nitrogênio mais tóxica para os camarões. De acordo com Regnault (1987) é o principal  
50 produto da catálise protéica (60-70% do total de N) e circula por diferentes vias, como a  
51 nitrificação, a assimilação pelos microrganismos fotoautotróficos e heterotróficos  
52 (bactérias) ou é perdida para a atmosfera devido à volatilização de amoníaco gasoso  
53 (Silva *et al.*, 2013).

54 Em meio aquoso, a amônia é encontrada em duas diferentes formas, a amônia  
55 ionizada ( $\text{NH}_4^+$ ) e a não ionizada ( $\text{NH}_3$ ) que juntas formam a amônia total ( $\text{NH}_4^+ +$   
56  $\text{NH}_3$ ). Sendo a forma não ionizada considerada mais tóxica para os animais devido à  
57 capacidade de difusão pelas membranas celulares (Fromm & Gillette, 1968).

58 Sua toxicidade está relacionada a vários processos metabólicos internos.  
59 Diminuindo a absorção de sódio por parte dos camarões, inibindo o funcionamento da  
60 bomba de sódio/potássio, que é um importante mecanismo na osmorregulação dos  
61 animais, além de alterar o pH das células, afetando todo o mecanismo enzimático do  
62 mesmo (Barbieri & Ostrensky, 2002).

63 O nitrito é o composto intermediário no processo de nitrificação da  
64 transformação da amônia em nitrato, é uma forma altamente tóxica para organismos  
65 aquáticos de acordo com sua concentração no meio, salinidade da água de cultivo e do  
66 estágio de desenvolvimento do animal, causando mortalidade em larviculturas e  
67 sistemas de cultivo (Brownell, 1980).

68 Sendo aconselháveis até 2,5 e 10 mg/L de nitrito para a criação de *L. vannamei*  
69 (8,0 ± 0,50 g) em salinidades de 8 e 24 g/L, respectivamente (Furtado *et al.*, 2016). Em  
70 elevadas concentrações, pode causar problemas hemolinfáticos transformando a  
71 hemocianina em metahemocianina, impedindo o transporte do oxigênio para os tecidos  
72 (Gross 2004), diminuindo a disponibilidade de oxigênio para o metabolismo (Tahon *et*  
73 *al.*, 1988) podendo acarretar em hipóxia e mortalidade significativa do cultivo (Chen *et*  
74 *al.*, 1986).

75 O nitrato é o último produto da nitrificação, sendo considerado o menos tóxico  
76 do processo, mas que em elevadas concentrações, dependendo da salinidade da água de  
77 cultivo, acima de 300 mg/L para camarões marinhos, passa a ser letal sendo aceito até  
78 177 mg/L para a criação de *L.vannamei* em sistemas BFT a uma salinidade 24 como  
79 reportado por Furtado *et al.* (2015a) e níveis inferiores a 220 ppm de nitrato a salinidade  
80 11ppt como observado por Kuhn *et al.* (2010).

81 Podendo causar efeitos letais e subletais para diferentes organismos (ex.: peixes,  
82 crustáceos) como: comprimentos antenais suprimidos, lesões no hepatopâncreas e  
83 anomalias branquiais (ex.: incrustação) como observados nos experimentos realizados  
84 por Poersch *et al.* (2007) e Kuhn *et al.* (2010) acumulando em grandes quantidades  
85 principalmente em sistemas fechados.

86 A nitrificação é um processo crucial para o cultivo em sistema de bioflocos. É o  
87 processo de transformação da amônia em nitrato realizado pelas bactérias nitrificantes  
88 autotróficas, dependente das concentrações de amônia e nitrito, relação  
89 carbono/nitrogênio, temperatura, pH, oxigênio dissolvido, alcalinidade, carbono  
90 orgânico e inorgânico (Ebeling *et al.*, 2006).

91 Algumas bactérias autotróficas absorvem o carbono inorgânico presente no  
92 sistema sendo conhecidas como Amônia – Oxidantes (AOB) e Nitrito – Oxidantes  
93 (NOB). As AOB possuem maior eficiência na transformação do nitrogênio em relação  
94 às bactérias heterotróficas, porém levam maior tempo para oxidar a amônia em nitrito,  
95 sendo pertencentes aos gêneros *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus*  
96 e *Nitrosovibrio*. As NOB realizam a oxidação do nitrito a nitrato, pertencem em sua  
97 maioria aos gêneros *Nitrobacter*, *Nitrococcus* e *Nitrospira*, porém possuem um  
98 crescimento mais demorado do que as AOB, acumulando uma quantidade significativa  
99 de nitrito no sistema (Lara, 2012; Serra *et al.*, 2015).

100 Já algumas bactérias heterotróficas utilizam material orgânico pré-formado  
101 (carboidratos e proteínas) como fonte de carbono e energia. Promovem uma redução

102 mais rápida nas concentrações de amônia do que o processo de nitrificação (Serra *et al.*,  
103 2015), crescendo 10 vezes mais rápido do que as bactérias nitrificantes (Hargreaves,  
104 2006).

105 Foi demonstrado por Zhu & Chen (2001) que a taxa de nitrificação diminuiu  
106 com o aumento da concentração de matéria orgânica, uma vez que conseqüentemente,  
107 num processo de biofiltração multi-espécies, em que os dois tipos de bactérias  
108 coexistem, as heterotróficas são capazes de utilizar mais oxigênio e ocupam mais  
109 espaço do que as nitrificantes, inibindo significativamente a nitrificação em um  
110 biofiltro.

111 Sendo observado que o reuso de um inóculo mínimo de 2,5% de água de um  
112 cultivo anterior, para produção de *L. vannamei* em sistema BFT, acelerou a formação  
113 dos agregados microbianos na água (Krummenauer *et al.*; 2012) e que o uso de  
114 substratos artificiais aumenta a fixação de bactérias nitrificantes contribuindo para uma  
115 melhor manutenção da qualidade da água no sistema (Lara 2012; Furtado *et al.*, 2015b).  
116 Assim como a relação carbono/nitrogênio ideal (C/N - 15:1) para o desenvolvimento  
117 das comunidades microbianas (Azim *et al.*, 2008), avaliação da atividade fotossintética  
118 e respiração dos microrganismos (Vinatea *et al.*, 2010), caracterização das comunidades  
119 microbianas presentes nos cultivos e o controle dos sólidos suspensos totais, realizado  
120 pelos clarificadores (Schryver *et al.*, 2008; Gaona *et al.*, 2011).

121 Por esse motivo diferentes tipos de substratos (needlona, “bioballs” ou biorings,  
122 bambu, tela de mosquito, bidim, entre outros) estão sendo testados ao redor do  
123 mundo (Baldwin *et al.*, 2003; Lara, 2012; Rodrigues, 2013; Legarda, 2015; Rodrigues,  
124 2015) para diferentes animais aquáticos (ex.: peixes, camarões) com o intuito de avaliar  
125 qual deles tem uma maior eficiência no processo de nitrificação. Segundo Ballester *et*  
126 *al.*(2007) o substrato artificial aumentou a taxa de nitrificação nos tanques, que resultou  
127 em concentrações decrescentes de amônia.

128 Dentre os diferentes tipos de substratos os “bioballs” apresentam propriedades  
129 ideais para uso em estudos de biofilmes aquáticos. São esferas plásticas com elevada  
130 área superficial, robustas, relativamente pequenas (3,5 cm de diâmetro x 4,0 cm de  
131 altura), com uma superfície muito elevada em relação ao volume (cerca de 130: 1)  
132 (Baldwin *et al.*, 2003) sendo utilizado para filtração biológica/biofiltração em sistemas  
133 de recirculação aquícola (RAS).

134 O Biofilme é um conjunto de células microbianas aderidas a uma superfície,  
135 envolvidas por uma matriz adesiva, excretada pelas próprias células. Geralmente essa

136 matriz é formada por uma mistura de substâncias poliméricas extracelulares ou  
137 polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos (Figura 1) (Conell, 2014).



138

139

140

141

(A) Adesão de um pequeno número de células a uma superfície sólida.

(B) Comunicação intercelular, crescimento e síntese de polissacarídeos.

(C) Aumento do crescimento e dos polissacarídeos.

142 **Figura 1:** Etapas da formação e estrutura de um biofilme. Fonte: Conell, 2014.

143

144

145

146

147

148

149

Sendo favorável para às populações microbianas por reter os nutrientes necessários ao desenvolvimento microbiano, impedir o descolamento das células de superfícies presentes em sistemas de fluxo de corrente, aumentar a resistência às forças físicas que poderiam remover as células não aderidas, melhorar os mecanismos de autodefesa, permitir maior sobrevivência das células e uma maior quantidade e reposição de nutrientes, acarretando em uma elevada quantidade e atividade microbiana na superfície do substrato (Madigan *et al.*, 2010).

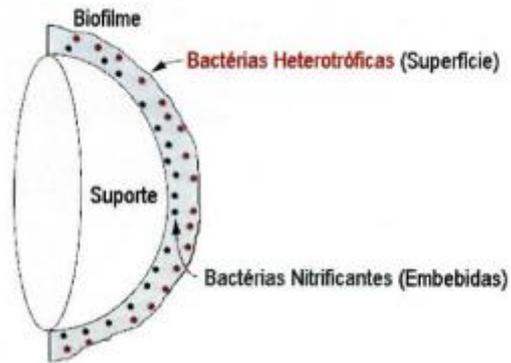
150

151

152

153

O biofilme de um biofiltro de um RAS geralmente é constituído com uma camada interna formada por uma população rica em microrganismos nitrificantes e com uma camada externa dominada por microrganismos heterotróficos (Malone & Pfeiffer, 2006) (Figura 2).



154

155 **Figura 2:** Crescimento das bactérias nitrificantes e bactérias heterotróficas no Biofilme.  
 156 Adaptado: Golz, 1995.

157 A técnica do reuso tem se mostrado eficaz na manutenção dos níveis de amônia e  
 158 nitrito abaixo dos valores recomendados para o cultivo da espécie, sendo isso verificado  
 159 por vários autores (Lara, 2012; Krummenauer *et al.*, 2014) sendo realizados estudos  
 160 com reuso de bioflocos e controle dos níveis de sólidos suspensos totais (Gaona *et al.*,  
 161 2011) para manter as concentrações de nitrito dentro dos valores recomendados,  
 162 permitindo uma ciclagem dos nutrientes no sistema e uma menor ou nula emissão  
 163 dessas cargas no ambiente.

164 Para verificar a aderência das bactérias no substrato e sua presença na água do  
 165 cultivo, foi realizada a técnica molecular FISH (“Hibridização *in situ* Fluorescente”)  
 166 que se baseia na ligação de marcadores fluorescentes as sondas de DNA e a ligação  
 167 dessas sondas ao RNA ribossomal (rRNA) das bactérias.

168 Esse rRNA só está presente em organismos biologicamente ativos, detectando  
 169 apenas os que estão realizando uma tarefa específica (ex.: sintetizando proteína)  
 170 (Schryver *et al.*, 2008). Permitindo, de uma forma geral, a visualização, identificação e  
 171 contagem direta das células bacterianas especificamente marcadas, visualizadas com  
 172 auxílio de microscópios de epifluorescência ou confocal (Zwirgmaier, 2005)  
 173 verificando a presença de determinados grupos e espécies de bactérias no cultivo  
 174 (Schryver *et al.*, 2008).

175 Sendo o DAPI um corante fluorescente amplamente utilizado na microscopia de  
 176 fluorescência. Liga-se fortemente a regiões ricas de DNA, passando através de uma  
 177 membrana celular intacta, corando células de todos os microrganismos presentes na  
 178 amostra e não apenas das bactérias. Sendo este trabalho realizado utilizando-se inóculo  
 179 de bioflocos e o uso de “bioballs” como substrato para maior fixação de bactérias.

180 **2. OBJETIVO GERAL**

181 Promover e identificar o desenvolvimento de bactérias nitrificantes através da  
182 adição de substratos artificiais (“bioballs”) e inóculo de bioflocos no cultivo de *L.*  
183 *vannamei* em sistema BFT.

184 **2.1 - Objetivos específicos**

- 185 • Analisar a qualidade da água com ênfase nos compostos nitrogenados ao  
186 longo do cultivo de *L. vannamei* em sistema BFT.
- 187 • Avaliar o desempenho zootécnico dos camarões.
- 188 • Identificar os grupos de bactérias nitrificantes (amônia-oxidantes e nitrito-  
189 oxidantes) e heterotróficas (*pseudomonas spp.*) nos substratos e na água dos  
190 cultivos.
- 191 • Caracterizar a comunidade de microrganismos formadora dos bioflocos nos  
192 diferentes tratamentos.
- 193 • Verificar a viabilidade de utilizar “bioballs” como substrato para bactérias  
194 nitrificantes no sistema BFT.

195 **3. MATERIAL E MÉTODOS**

196 **3.1 – Local e instalações**

197 O estudo foi realizado na Estação Marinha de Aquicultura Prof. Marcos Alberto  
198 Marchiori (EMA), do Instituto Oceanográfico (IO) da Universidade Federal do Rio  
199 Grande (FURG), localizada na praia do Cassino, Rio Grande – RS - Brasil (32° 19’ S,  
200 52° 15’ W).

201 **3.2 - Origens dos camarões**

202 Os camarões utilizados no presente estudo foram adquiridos do laboratório  
203 Aquatec Ltda., localizado no município de Canguaretama – Rio Grande do Norte. Após  
204 a chegada à EMA, os náuplios de *L.vannamei* foram mantidos no setor de larvicultura  
205 de camarões marinhos e cultivados segundo metodologia adaptada de Marchiori (1996).

206 Posteriormente os mesmos foram estocados em um berçário (1500/m<sup>2</sup>) em  
207 sistema BFT, transferidos para o setor de engorda (300/m<sup>2</sup>) e cultivados até atingirem o  
208 peso médio de 4,92 ± 0,45g. Só então foram alocados nas unidades experimentais cujo  
209 volume útil era de 200 litros, sendo estocados 40 camarões em cada tanque,  
210 correspondendo a 200 camarões/m<sup>3</sup>.

211 **3.3– Delineamento experimental**

212 O delineamento experimental consiste em quatro tratamentos com três repetições  
 213 cada (4x3), sendo **Controle:** Água clara onde foram formados os bioflocos; **IN (10%):**  
 214 Água clara com inóculo de bioflocos (10%); **BI:** Água clara com substrato (“bioballs”  
 215 imaturos); **BM:** Água clara com inóculo de “bioballs” maduros. Os parâmetros de  
 216 qualidade da água de cultivo de origem dos camarões e dos “bioballs” maduros foram  
 217 analisadas antes do início do experimento, como demonstrado na Tabela 1.

218 **Tabela 1:** Qualidade da água de cultivo de origem dos camarões e “bioballs”.

Qualidade da água	Bioflocos	“Bioballs”
N-AT (N- (NH <sub>3</sub> + NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) mg/L)	0,08	0,06
N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	0,03	0,03
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	52,0	11,0
Alcalinidade (mg/L de CaCO <sub>3</sub> )	125,0	180,0
pH	7,20	7,95
Salinidade (g/L)	35,0	31,0
Temperatura (°C)	24,0	25,2
SST (mg/L)	250	50
O.D. (mg/L)	5,04	6,52

219 N-AT – Nitrogênio Amoniacal Total; N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> - Nitrito; N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> - Nitrato; pH – potencial  
 220 Hidrogeniônico; SST – Sólidos Suspensos Totais; O.D. – Oxigênio Dissolvido.

221 Os camarões foram alimentados com ração comercial (Guabi- potimar / 38% PB  
 222 Active), com auxílio de bandejas, duas vezes ao dia (08:00 e 17:00h), durante quatro  
 223 semanas. Inicialmente a taxa de alimentação foi estabelecida segundo Jory *et al.* (2001),  
 224 sendo este valor ajustado posteriormente de acordo com a biomassa semanal estimada.  
 225 Era adicionado profilaticamente à água de cultivo 1ppm de probiótico (PRO-W  
 226 Sanolife, Salt Lake City, Utah - USA) uma vez por semana, de acordo com o  
 227 recomendado pelo fabricante (INVE).

228 Os “bioballs” foram alocados em travesseiros feitos de tela plástica com abertura  
 229 de cinco mm (34cmCx18cmLx8cmA) contendo 40 “bioballs” de 32mm<sup>2</sup> cada (1280  
 230 mm<sup>2</sup> /tanque). Os travesseiros foram presos às bordas dos tanques com fios de nylon  
 231 (Figura 3), permanecendo submerso durante todo o período experimental. A quantidade

232 de “bioballs” foi baseada na área de fundo do tanque (0,36 m<sup>2</sup>), sendo aumentada de  
233 acordo com Lara (2012). Dessa forma incrementa-se a área de substrato aumentando a  
234 área de superfície para maior fixação das bactérias.



235  
236 **Figura 3:** Travesseiros feitos de tela plástica com abertura de 5 mm  
237 (34cmCx18cmLx8cmA) contendo 40 “bioballs” de 32mm<sup>2</sup>.

### 238 **3.4- Fertilização orgânica**

239 Os bioflocos utilizados no experimento foram inoculados a partir do sistema de  
240 cultivo onde estavam alocados os camarões até atingirem o peso médio de  $4,92 \pm 0,45$ g.  
241 Foi utilizado como fonte de carbono orgânico o melaço de cana de açúcar contendo  
242 37,46% de carbono determinado com o uso do equipamento CHN Analyser  
243 (PerkinElmer PE 2400).

244 Para adição da fonte de carbono foram utilizados como base os trabalhos de  
245 Ebeling *et al.* (2006) e Avnimelech (1999), onde se determina que são necessários 6 g  
246 de carbono para converter 1g de amônia em biomassa bacteriana, favorecendo uma  
247 relação nominal (em peso) de carbono/nitrogênio (C/N) de aproximadamente 15:1.  
248 Quando a amônia total ultrapassava 1 mg/L era realizada a fertilização orgânica (fonte  
249 de carbono /melaço) para ajustar a relação C/N, em todos os tanques, quando  
250 necessário.

### 251 **3.5 - Parâmetros físicos e químicos da água**

252 A temperatura da água foi controlada em aproximadamente 28 °C com uso de  
253 aquecedores com termostatos (Aquarium Heater H – 606 China) distribuídos nos  
254 tanques. A aeração foi provida por um blower e distribuída por duas mangueiras com  
255 pedras porosas alocadas em cada tanque. A salinidade foi mantida em torno de 32 g/L  
256 sendo mensurada uma vez por semana com o auxílio de um refratômetro portátil (Hand

257 Held, Atago - Japão) realizando-se, quando necessário, a adição de água doce dechlorada  
258 para correção da mesma.

259 Os parâmetros de qualidade da água como temperatura, pH e oxigênio  
260 dissolvido foram medidos duas vezes ao dia com auxílio dos multiparâmetros (Pro 20 e  
261 Professional Plus - Professional Series YSI, Ohio - USA). O experimento foi realizado  
262 em uma sala com temperatura controlada em 30°C.

263 As concentrações de nitrogênio amoniacal total ( $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ ) e nitrito ( $\text{N-NO}_2^-$ )  
264 foram mensuradas diariamente, conforme metodologias preconizadas pela UNESCO  
265 (1983) e Bendschneider & Robinson (1952), respectivamente, e o nitrato ( $\text{N-NO}_3^-$ ) foi  
266 mensurado a cada sete dias seguindo a metodologia de Aminot & Chaussepied (1983).

267 Alcalinidade foi medida seguindo a metodologia proposta por APHA (1989)  
268 duas vezes por semana. Quando atingia concentração inferior a 125mg  $\text{CaCO}_3/\text{L}$  passou  
269 a ser determinada a cada três dias, sendo adicionados 0,03 g/L de cal hidratada ( $\text{Ca}$   
270  $(\text{OH})_2$ ) nos tanques para manter o valor acima de 125mg  $\text{CaCO}_3/\text{L}$  (Furtado *et al.* 2014).

271 Os sólidos suspensos totais foram mensurados semanalmente de acordo com a  
272 metodologia de Strickland & Parsons (1972), onde o valor do SST foi estimado pela  
273 diferença entre o peso final e inicial de cada filtro (AOAC 1999). Sendo filtrado 1/3 da  
274 água dos tanques, com uma malha de 50 micras, sempre que os sólidos atingiam  
275 concentrações superiores a 500 mg/L para redução dos mesmos das unidades  
276 experimentais (Gaona *et al.*, 2011).

### 277 **3.6 – FISH (Hibridização *in situ* Fluorescente)**

278 Coletas de água de todos os tanques foram realizadas semanalmente para  
279 identificação das bactérias nitrificantes e heterotróficas (*pseudomonas spp.*) pela  
280 metodologia FISH, sendo coletados 4,5 ml da água do tanque em tubo Falcon (15 ml) e  
281 adicionado 0,5 ml da solução de paraformaldeído 2%.

282 Também foram coletados substratos (quatro pinos da área externa dos  
283 “bioballs”) dos tratamentos BI e BM, em triplicata, em eppendorfs de 1,5 ml e fixados  
284 em paraformaldeído 2%.

285 A técnica foi realizada de acordo com o protocolo do LEBIOMM adaptada de  
286 Cottrell & Kirchman (2003) onde, de uma forma geral, as amostras foram fixadas,  
287 sonicadas, centrifugadas, filtradas, hibridizadas, lavadas, coradas com DAPI, realizada a  
288 montagem das lâminas e visualizadas em microscópio de epifluorescência,  
289 respectivamente. Sendo as sondas utilizadas especificadas na Tabela 2 a seguir.

290 **Tabela 2:** Sondas utilizadas para identificação e contagem das bactérias presentes nas amostras.

Sonda	Sequência de sonda (5' - 3')	Local de destino (rRNA) e posição	Especificidade	*%FA	**NaCl (mM)	Referência
NON	TAGTGACGCCGTCGA	-	Controle Negativo	30	0,9	Yokokawa & Nagata (2005)
NIT3	CCTGTGCTCCATGCTCCG	16S (1030–1047)	<i>Nitrobacter spp.</i> – NOB	40	56	Wagner <i>et al.</i> (1996)
NITCOC 206	CGGTGCGAGCTTGCAAGC	-	<i>Nitrococcus mobilis</i> – AOB	20	-	Juretschko <i>et al.</i> (2000)
NSO 190	CGATCCCCTGCTTTTCTCC	16S (190–208)	<i>Nitrosomonadales</i> – AOB	35	20	Mobarry <i>et al.</i> (1996)
NSO 1225	CGCCATTGTATTACGTGTGA	16S (1224–1243)	<i>Nitrosomonadales</i> – AOB	35	80	Mobarry <i>et al.</i> (1996)
NSMR 76	CCC CCC TCT TCT GGA TAC	16S (132–149)	<i>Nitrosomonas marina-like</i> – AOB	20	225	Burrell <i>et al.</i> (2001)
NTSPA 685	CAC CGG GAA TTC CGC GCT CCT C	16S (664–685)	<i>Nitrospira moscoviensis</i> , <i>Nitrospira marina</i> – NOB	20	225	Burrell <i>et al.</i> (2001)
NTSPA 712	CGCCTTCGCCACCCGGCCTTCC	-	Phylum <i>Nitrospira</i> – NOB	50	28	Daims <i>et al.</i> (2001)
PAE 997	TCTGGAAAGTTCTCAGCA	16S (997-1014)	<i>Pseudomonas spp.</i> – Heterotrófica	35	-	Amann <i>et al.</i> (1996)

291 \*Porcentagem de formamida (FA) na solução de hibridação. \*\*Concentração de cloreto de sódio na solução de lavagem.

292 Concentrações dos microrganismos e bactérias apresentadas em cel./ml (BFT), cel./g (“bioballs”) e porcentagem (%) estão representadas nos gráficos  
293 em ANEXOS.

294 Essa análise foi realizada na Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), no Instituto de Ciências Biológicas do Departamento de  
295 Biologia em Minas Gerais.

296 **3.7 – Análise de Microrganismos**

297 No último dia do experimento foram coletados 20 ml de água, dos 12 tanques de  
298 cultivo, para identificação e contagem da comunidade planctônica presente nos  
299 bioflocos. Essas amostras foram fixadas com Lugol (2%) e identificadas no laboratório  
300 de microscopia, onde foram utilizadas subamostras de 2,1 ml levadas a câmara de  
301 sedimentação e contados em microscópio invertido de acordo com a metodologia  
302 Utermohl (1958).

303 **3.8 – Desempenho zootécnico dos camarões**

304 Foi estimado o peso médio inicial dos camarões a serem estocados em cada  
305 tanque a partir da biometria inicial de 12 indivíduos por tanque. No decorrer do  
306 experimento, foram realizadas biometrias semanais com 12 camarões por unidade  
307 experimental. As amostragens foram aleatórias e os camarões pesados individualmente,  
308 utilizando balança digital com precisão de 0,01g (Marte Slim, AS 1000 C, São Paulo -  
309 SP) ajustando a ração ao longo do experimento de acordo com a estimativa da biomassa  
310 calculada através do peso médio e sobrevivência. Na biometria final, os camarões de  
311 cada tanque foram contados e pesados individualmente.

312 O desempenho zootécnico dos camarões foi avaliado pela biomassa final (g),  
313 ganho de peso semanal (g/semana), peso final (g), sobrevivência (%), produtividade  
314 ( $\text{kg/m}^3$ ) e a conversão alimentar aparente (CAA) segundo as fórmulas:

315 • Sobrevivência (S):  $S(\%) = (NfC/NiC) \times 100$

316 Onde: NiC= número inicial de camarões

317 NfC= número final de camarões

318 • Produtividade (P):  $P (\text{kg/m}^3) = BT / \text{volume do tanque em m}^3$

319 Onde: BT= biomassa total em kg (biomassa final – biomassa inicial)

320 • Conversão alimentar aparente:  $CAA = R / GB$

321 Onde: R= ração ofertada (g)

322 GB= ganho de biomassa (g)

323 **3.9- Análise Estatística**

324 A comparação entre os diferentes tratamentos foi realizada pela análise de  
325 variância de uma via (ANOVA). Foram testadas homocedasticidade e normalidade dos  
326 dados sendo as médias submetidas ao teste Tukey ( $P < 0,05$ ) (Sokal & Rohlf, 1969).  
327 Alguns dados foram transformados matematicamente antes de serem analisados e

328 valores percentuais (ex.: sobrevivência) foram transformados em arco-seno da raiz  
 329 quadrada (Zar, 2010). Dados de compostos nitrogenados foram analisados por ANOVA  
 330 de uma via, entre os tratamentos para cada semana de cultivo.

#### 331 4. RESULTADOS

332 Os valores de temperatura (°C), oxigênio dissolvido (mg/L), pH, alcalinidade  
 333 (mg CaCO<sub>3</sub>/L) e salinidade (g/L) não diferiram significativamente (P>0,05). Enquanto  
 334 os valores de amônia (mg/L), nitrito (mg/L) e nitrato (mg/L), foram significativamente  
 335 diferentes (P<0,05), sendo os valores da amônia e nitrito menores (P<0,05) no  
 336 tratamento IN (10%) e o valor de nitrato maior em relação aos outros tratamentos. Foi  
 337 observado um aumento de sólidos suspensos totais (mg/L) em todos os tratamentos ao  
 338 longo do experimento, onde IN (10%) foi significativamente diferente (P<0,05) dos  
 339 demais, como pode ser observado na Tabela 3 abaixo.

340 **Tabela 3:** Média ± desvio padrão dos parâmetros de qualidade da água dos diferentes  
 341 tratamentos **Controle:** Água clara onde foram formados os bioflocos; **IN (10%):** Água  
 342 clara com inóculo de bioflocos (10%); **BI:** Água clara com substrato (“bioballs”  
 343 imaturos); **BM:** Água clara com inóculo de “bioballs” maduros, ao longo dos 28 dias de  
 344 experimento com *L.vannamei*.

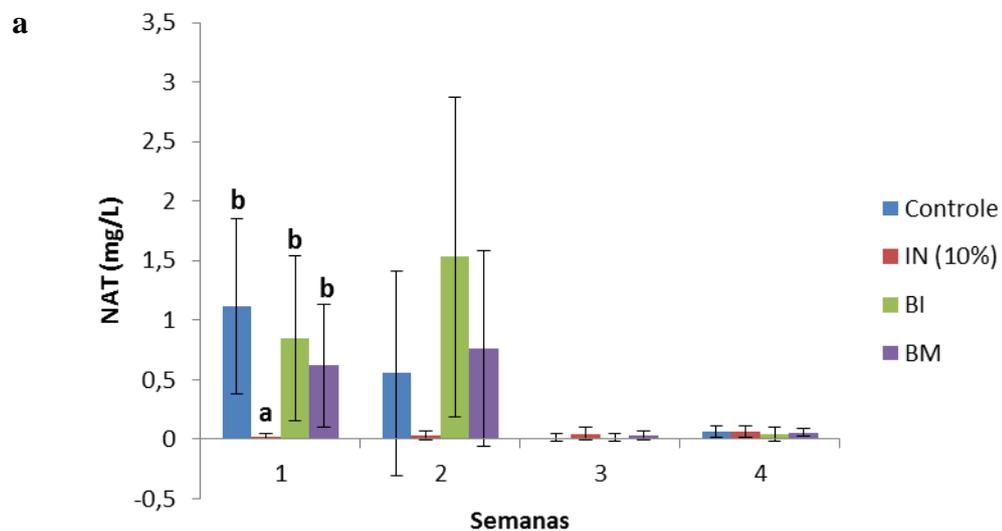
Parâmetros	Controle	IN (10%)	BI	BM
Temperatura (°C)	28,79 ± 0,56	28,95 ± 0,51	29,24 ± 0,48	28,39 ± 0,65
Oxigênio dissolvido (mg/L)	5,76 ± 0,15	5,77 ± 0,17	5,66 ± 0,14	5,79 ± 0,15
pH	8,02 ± 0,16	7,97 ± 0,12	8,09 ± 0,12	8,01 ± 0,16
Alcalinidade (mg CaCO <sub>3</sub> /L)	124,07 ± 27,01	117,41 ± 23,61	137,41 ± 17,50	131,30 ± 24,08
Salinidade (g/L)	32,31 ± 0,53	33,21 ± 0,56	32,51 ± 0,57	32,37 ± 0,47
Sólidos Suspensos Totais (mg/L)	236,67 ± 225,37 <sup>b</sup>	424,0 ± 278,80 <sup>a</sup>	213,0 ± 198,16 <sup>b</sup>	199,0 ± 215,92 <sup>b</sup>
Amônia (mg/L)	0,44 ± 0,42 <sup>b</sup>	0,04 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,61 ± 0,53 <sup>b</sup>	0,37 ± 0,35 <sup>b</sup>
Nitrito (mg/L)	4,34 ± 2,82 <sup>c</sup>	0,14 ± 0,06 <sup>a</sup>	5,65 ± 3,18 <sup>d</sup>	1,82 ± 1,21 <sup>b</sup>
Nitrato (mg/L)	11,92 ± 1,99 <sup>b</sup>	25,06 ± 3,95 <sup>a</sup>	6,92 ± 2,81 <sup>b</sup>	10,83 ± 2,97 <sup>b</sup>

345 Letras diferentes sobrescritas na mesma linha indicam  
346 médias significativas diferentes ( $P < 0,05$ ).

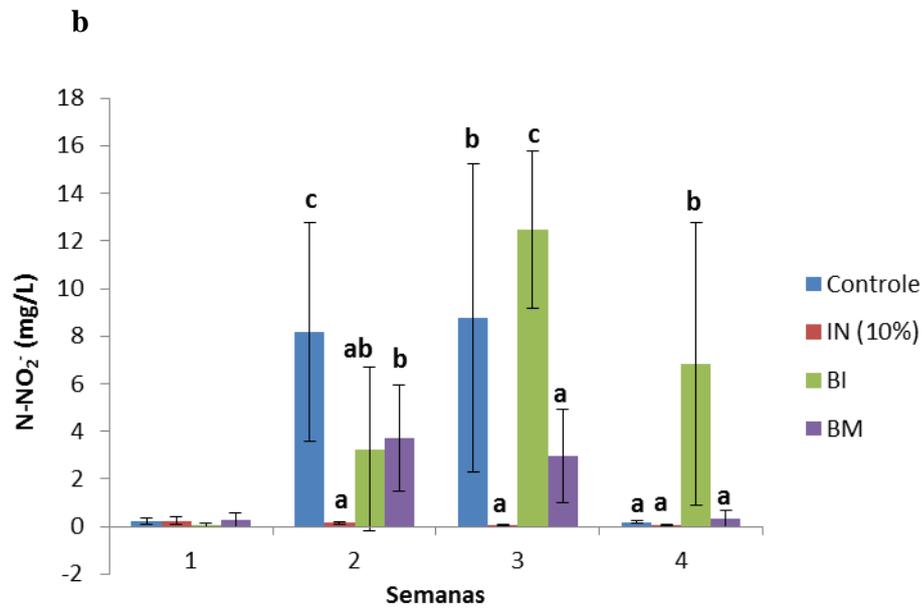
347 A amônia (mg/L) foi significativamente diferente ( $P < 0,05$ ) entre o tratamento IN  
348 (10%) e os demais tratamentos na primeira semana de experimento, estando em menor  
349 concentração no tratamento com 10% inóculo (IN (10%)) (Figura 4a).

350 O nitrito (mg/L) foi significativamente diferente ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos  
351 na segunda semana, sendo encontrado em maior concentração no Controle e menor no  
352 IN (10%). Na semana seguinte, IN (10%) continuou com menor valor seguido de BM  
353 ( $P > 0,05$ ), enquanto Controle e BI ( $P < 0,05$ ) atingiram os valores mais altos, continuando  
354 elevado no BI ( $P < 0,05$ ) em relação aos demais tratamentos durante a quarta semana de  
355 experimento (Figura 4b).

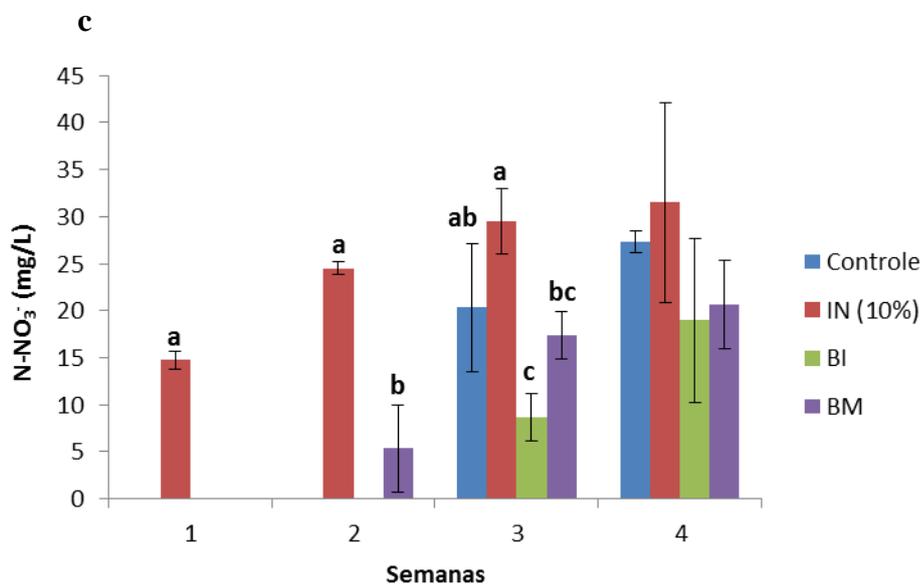
356 A concentração de nitrato (mg/L) foi significativamente diferente ( $P < 0,05$ ) na  
357 primeira semana de experimento para o tratamento IN (10%). Foram observados valores  
358 elevados ( $P < 0,05$ ) em IN (10%) e BM a partir da segunda semana. Na semana seguinte  
359 todos os tratamentos apresentaram valores significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ),  
360 tornando-se iguais na última semana de experimento ( $P > 0,05$ ) como demonstrado na  
361 Figura 4c.



362



363

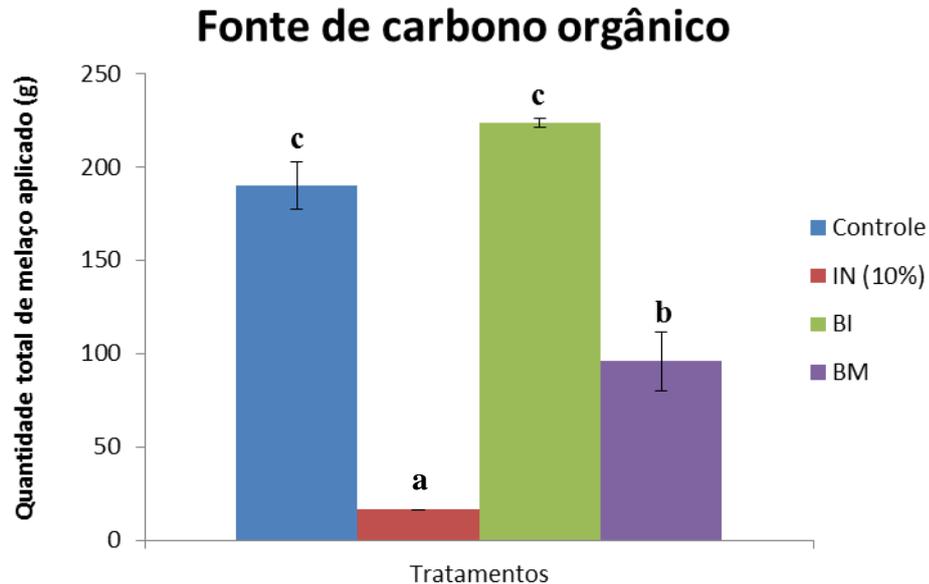


364

365 **Figura 4:** Média  $\pm$  desvio padrão dos valores de Nitrogênio Amoniacal Total (NAT –  
 366 mg/L (a)), nitrito (N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> – mg/L (b)) e nitrato (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> – mg/L (c)) na água de cultivo  
 367 dos tratamentos **Controle:** Água clara onde foram formados os bioflocos; **IN (10%):**  
 368 Água clara com inóculo de bioflocos (10%); **BI:** Água clara com substrato (“bioballs”  
 369 imaturos); **BM:** Água clara com inóculo de “bioballs” maduros, ao longo dos 28 dias de  
 370 experimento com *L.vannamei*. Letras diferentes indicam médias significativas  
 371 diferentes (P < 0,05).

372 Foi adicionada uma maior quantidade de carbono orgânico na água de cultivo  
373 dos tratamentos Controle e BI ( $P < 0,05$ ), sendo adicionados 8,68% de carbono a menos  
374 no tratamento IN (10%), 117,9% de carbono a mais em BI e 50,5% a menos de carbono  
375 no BM em relação à quantidade adicionada no tratamento Controle (Figura 5).

376



377

378 **Figura 5:** Média  $\pm$  desvio padrão da quantidade total de melão aplicado na água de  
379 cultivo dos tratamentos **Controle:** Água clara onde foram formados os bioflocos; **IN**  
380 **(10%):** Água clara com inóculo de bioflocos (10%); **BI:** Água clara com substrato  
381 (“bioballs” imaturos); **BM:** Água clara com inóculo de “bioballs” maduros, ao longo dos  
382 28 dias de experimento com *L.vannamei*. Letras diferentes indicam médias  
383 significativas diferentes ( $P < 0,05$ ).

384 Não foram encontradas diferenças significativas para as bactérias nitrificantes no  
385 bioflocos em todos os tratamentos para as sondas específicas utilizadas (Tabela 5),  
386 sendo encontrada diferença apenas no número total de microrganismos (corados com  
387 DAPI) ( $P < 0,05$ ) na coleta do dia 23/06/2015, como pode ser observado na Tabela 4  
388 abaixo.

389 **Tabela 4:** Médias  $\pm$  desvio padrão da densidade total de microrganismos (DAPI) e  
 390 bactérias ( $10^5$  cel./ml) detectadas pelas sondas NTSPA 712 – *Phylum Nitrospira*, NIT 3-  
 391 *Nitrobacter spp*, NSO 190-1225 – *Nitrosomonadales*, NTSPA 685 – *Nitrospira*  
 392 *mascoviensis*, *N. marina*, NSMR 76 – *Nitrosomonas marina like*, PAE 997 –  
 393 *Pseudomonas spp* e NITCOC – *Nitrococcus mobilis* na água dos diferentes tratamentos  
 394 **Controle:** Água clara onde foram formados os bioflocos; **IN (10%):** Água clara com  
 395 inóculo de bioflocos (10%); **BI:** Água clara com substrato (“bioballs” imaturos); **BM:**  
 396 Água clara com inóculo de “bioballs” maduros, ao longo dos 28 dias de experimento  
 397 com *Litopenaeus vannamei*. Sondas organizadas em ordem decrescente taxonômica das  
 398 bactérias (da esquerda para direita).

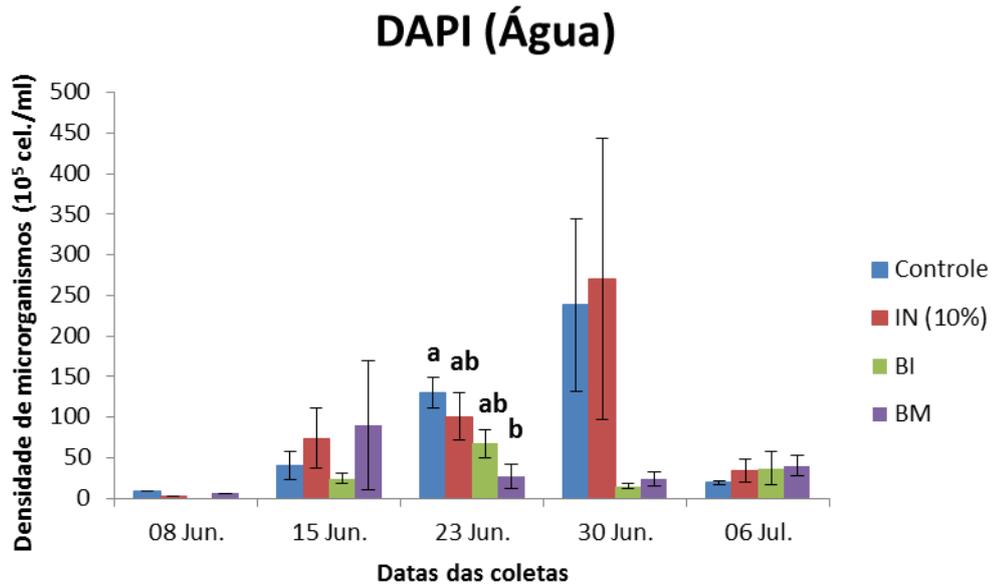
Trat./Data da coleta	DAPI	NTSPA 712	NIT 3	NSO 190 - 1225	NTSPA 685	NSMR 76	PAE 997	NITCOC
<b>Controle</b>								
08/06/2015	0,83	0	0	0	0	0	0	0,23
15/06/2015	3,99 $\pm$ 2,98	0	0	0	0	0	0	0
23/06/2015	13,01 $\pm$ 3,30 <sup>a</sup>	0,10 $\pm$ 0,18	0	0	0	0	0	0
30/06/2015	23,82 $\pm$ 18,48	0	0	0,03 $\pm$ 0,05	0	0	0	0
06/07/2015	1,93 $\pm$ 0,31	0	0	0	0,07 $\pm$ 0,11	0	0,13 $\pm$ 0,23	0
<b>IN (10%)</b>								
08/06/2015	0,24	0	0	0	0	0	0	0
15/06/2015	7,41 $\pm$ 6,44	0	0	0	0	0,28 $\pm$ 0,48	1,05 $\pm$ 1,83	0
23/06/2015	10,1 $\pm$ 5,09 <sup>ab</sup>	0	0	0	0	0	0	0
30/06/2015	27,02 $\pm$ 29,95	0	0	0	0	0	0,7 $\pm$ 1,21	0
06/07/2015	3,40 $\pm$ 2,46	0	0,31 $\pm$ 0,54	0	0	0	0	0
<b>BI</b>								
08/06/2015	*	*	*	*	*	*	*	*
15/06/2015	2,40 $\pm$ 1,08	0	0	0,16 $\pm$ 0,28	0	0	0	0
23/06/2015	6,76 $\pm$ 2,95 <sup>ab</sup>	0	0	0	0	0	0	0
30/06/2015	1,51 $\pm$ 0,55	0	0	0	0	0	0	0
06/07/2015	3,71 $\pm$ 3,53	0	0	0	0	0	0,50 $\pm$ 0,86	0
<b>BM</b>								
08/06/2015	0,61	0	0	0	0	0	0	0
15/06/2015	8,97 $\pm$ 13,83	3,80 $\pm$ 6,57	0	0,19 $\pm$ 0,33	0,24 $\pm$ 0,42	0	4,94 $\pm$ 8,56	0
23/06/2015	2,68 $\pm$ 2,59 <sup>b</sup>	0	0,63 $\pm$ 1,10	0	0	0	0	0
30/06/2015	2,37 $\pm$ 1,5	0,72 $\pm$ 1,24	0	0,07 $\pm$ 0,07	0,11 $\pm$ 0,18	0,07 $\pm$ 0,11	0,11 $\pm$ 0,18	0,39 $\pm$ 0,30
06/07/2015	4,04 $\pm$ 2,19	0	0	0	0	0,51 $\pm$ 0,09	0	0

399 Letras diferentes sobrescritas na mesma coluna indicam médias significativas diferentes (P<0,05).

400 **Tabela 5:** Médias  $\pm$  desvio padrão da porcentagem da densidade de bactérias ( $10^5$   
 401 cel./ml) detectadas pelas sondas NTSPA 712 – *Phylum Nitrospira*, NIT 3- *Nitrobacter*  
 402 *spp*, NSO 190-1225 – *Nitrosomonadales*, NTSPA 685 – *Nitrospira mascoviensis*, *N.*  
 403 *marina*, NSMR 76 – *Nitrosomonas marina like*, PAE 997 – *Pseudomonas spp* e  
 404 NITCOC – *Nitrococcus mobilis* em relação ao DAPI (total de microrganismos) na água  
 405 dos diferentes tratamentos **Controle:** Água clara onde foram formados os bioflocos; **IN**  
 406 **(10%):** Água clara com inóculo de bioflocos (10%); **BI:** Água clara com substrato  
 407 (“bioballs” imaturos); **BM:** Água clara com inóculo de “bioballs” maduros, ao longo dos  
 408 28 dias de experimento com *Litopenaeus vannamei*. Sondas organizadas em ordem  
 409 decrescente taxonômica das bactérias (da esquerda para direita).

Trat./Data da coleta	DAPI	NTSPA 712	NIT 3	NSO 190 - 1225	NTSPA 685	NSMR 76	PAE 997	NITCOC
<b>Controle</b>								
08/06/2015	100 $\pm$ 0,0	0	0	0	0	0	0	27,71 $\pm$ 0,0
15/06/2015	100 $\pm$ 0,03	0	0	0	0	0	0	0
23/06/2015	100 $\pm$ 0,03	0,77 $\pm$ 0,0	0	0	0	0	0	0
30/06/2015	100 $\pm$ 0,18	0	0	0,13 $\pm$ 0,0	0	0	0	0
06/07/2015	100 $\pm$ 0,0	0	0	0	3,63 $\pm$ 0,0	0	6,74 $\pm$ 0,0	0
<b>IN (10%)</b>								
08/06/2015	100 $\pm$ 0,0	0	0	0	0	0	0	0
15/06/2015	100 $\pm$ 0,06	0	0	0	0	3,78 $\pm$ 0,0	14,17 $\pm$ 0,02	0
23/06/2015	100 $\pm$ 0,05	0	0	0	0	0	0	0
30/06/2015	100 $\pm$ 0,30	0	0	0	0	0	2,59 $\pm$ 0,01	0
06/07/2015	100 $\pm$ 0,02	0	9,12 $\pm$ 0,01	0	0	0	0	0
<b>BI</b>								
08/06/2015	*	*	*	*	*	*	*	*
15/06/2015	100 $\pm$ 0,01	0	0	6,67 $\pm$ 0,0	0	0	0	0
23/06/2015	100 $\pm$ 0,03	0	0	0	0	0	0	0
30/06/2015	100 $\pm$ 0,01	0	0	0	0	0	0	0
06/07/2015	100 $\pm$ 0,04	0	0	0	0	0	13,48 $\pm$ 0,01	0
<b>BM</b>								
08/06/2015	100 $\pm$ 0,0	0	0	0	0	0	0	0
15/06/2015	100 $\pm$ 0,14	42,36 $\pm$ 0,07	0	2,12 $\pm$ 0,0	2,68 $\pm$ 0,0	0	55,07 $\pm$ 0,09	0
23/06/2015	100 $\pm$ 0,03	0	23,51 $\pm$ 0,01	0	0	0	0	0
30/06/2015	100 $\pm$ 0,02	30,38 $\pm$ 0,01	0	2,95 $\pm$ 0,0	4,64 $\pm$ 0,0	2,95 $\pm$ 0,0	4,64 $\pm$ 0,0	16,46 $\pm$ 0,0
06/07/2015	100 $\pm$ 0,02	0	0	0	0	12,62 $\pm$ 0,0	0	0

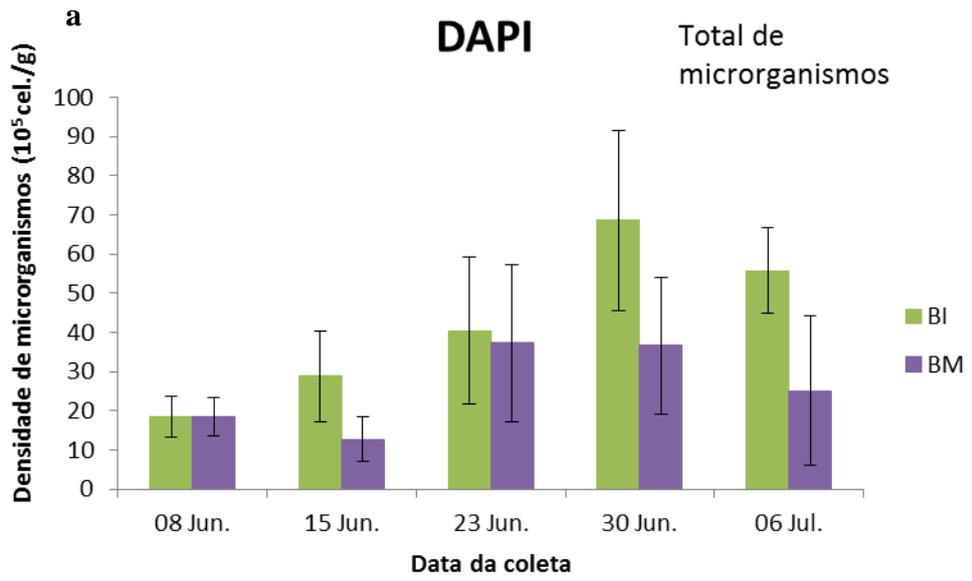
410 Foi observada diferença estatística ( $P < 0,05$ ) na terceira semana de coleta do  
 411 bioflocos (23 de junho) para o DAPI entre os tratamentos Controle e BM, em uma  
 412 densidade de  $10^5$  cel./ml, como demonstrado na Figura 6.



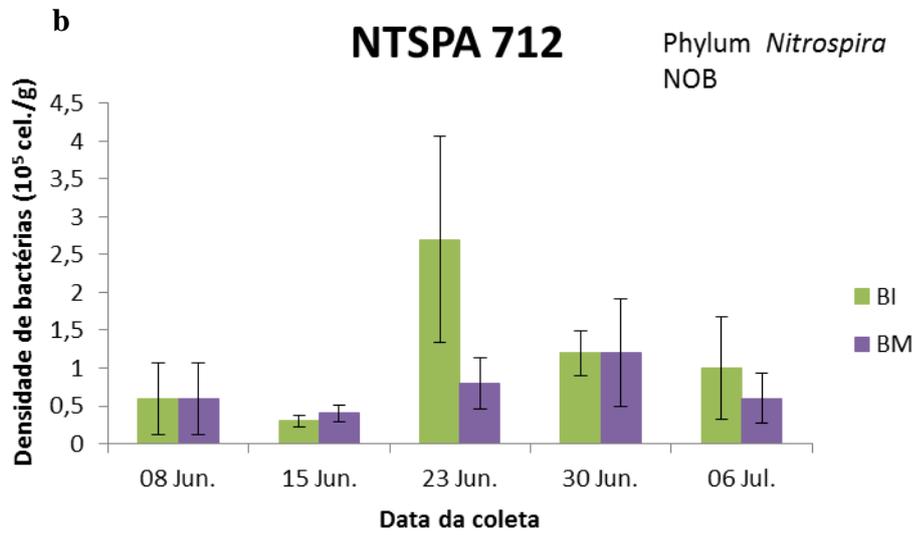
413

414 **Figura 6:** Média  $\pm$  erro padrão (n=3) da densidade de microrganismos ( $10^5$  cel./ml)  
 415 detectadas pelo DAPI (total de microrganismos) na água dos diferentes tratamentos  
 416 **Controle:** Água clara onde foram formados os bioflocos; **IN (10%):** Água clara com  
 417 inóculo de bioflocos (10%); **BI:** Água clara com substrato (“bioballs” imaturos); **BM:**  
 418 Água clara com inóculo de “bioballs” maduros, ao longo dos 28 dias de experimento  
 419 com *Litopenaeus vannamei*. Letras diferentes indicam médias significativas diferentes  
 420 (P < 0,05).

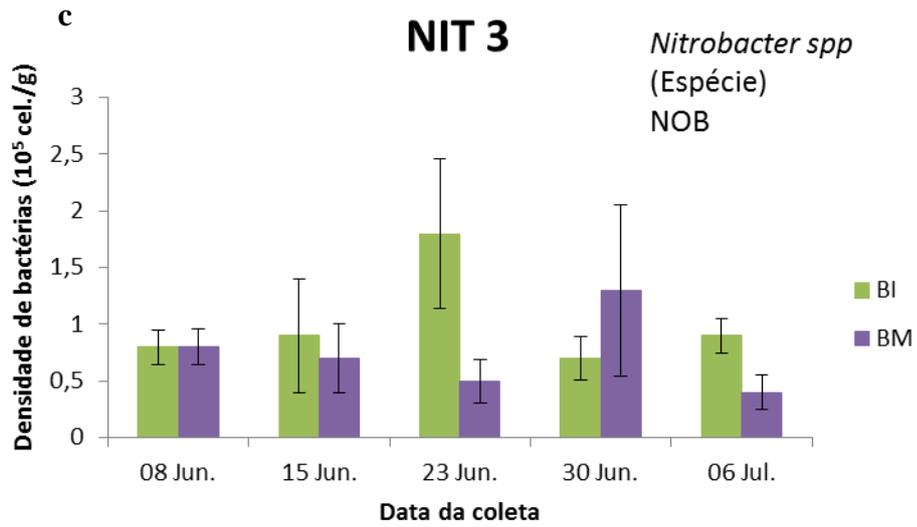
421 Houve diferença estatística (P < 0,05) no número de indivíduos de bactérias  
 422 *Nitrococcus mobilis* e da ordem *Nitrossomonadales*, nas amostras de “bioballs”, nos  
 423 dias 30 de junho e 6 de julho de 2015, respectivamente, onde BI apresentou uma maior  
 424 quantidade de bactérias que BM. Para todas as outras sondas, ao longo do experimento,  
 425 as densidades de bactérias ( $10^5$  cel./g) foram estatisticamente iguais (P > 0,05) quando  
 426 comparadas entre os tratamentos, como observado na Figura 7 a seguir.



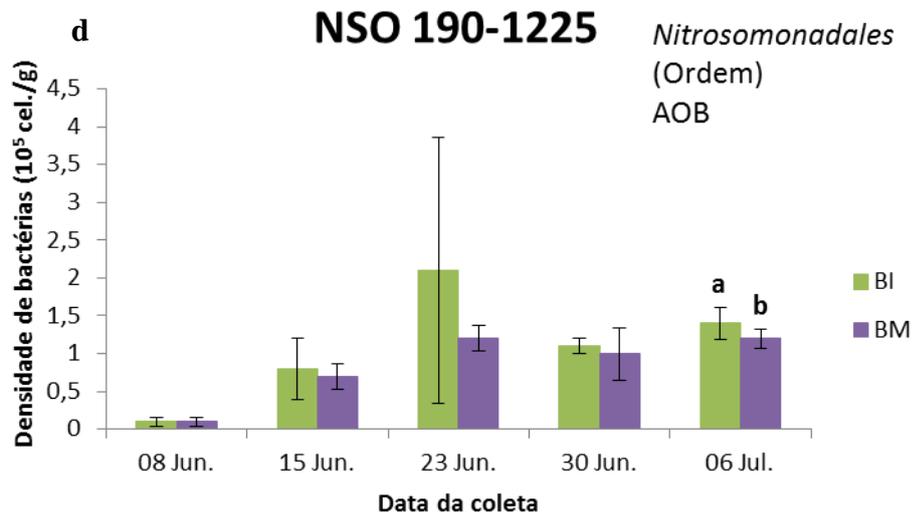
427



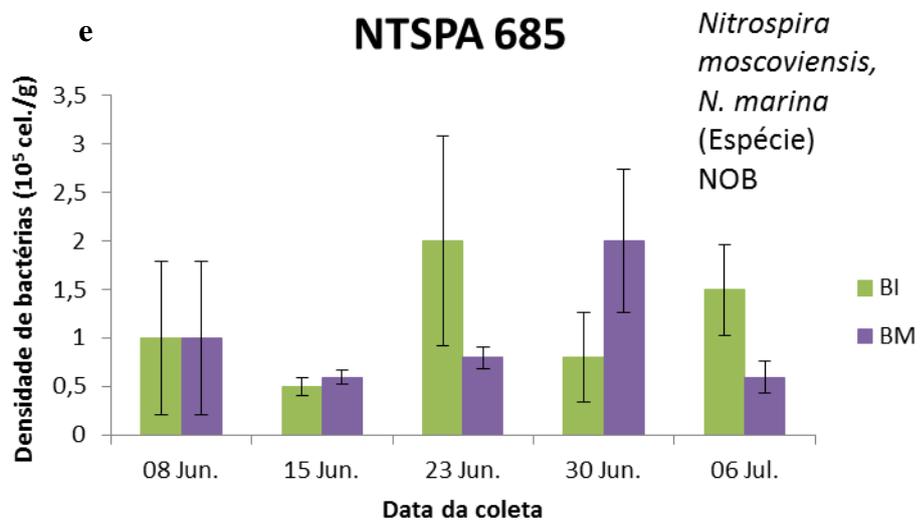
428



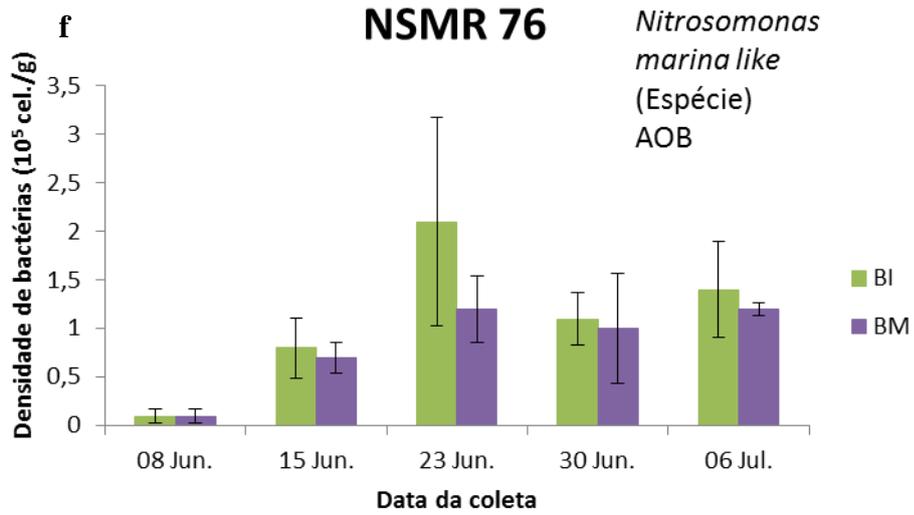
429



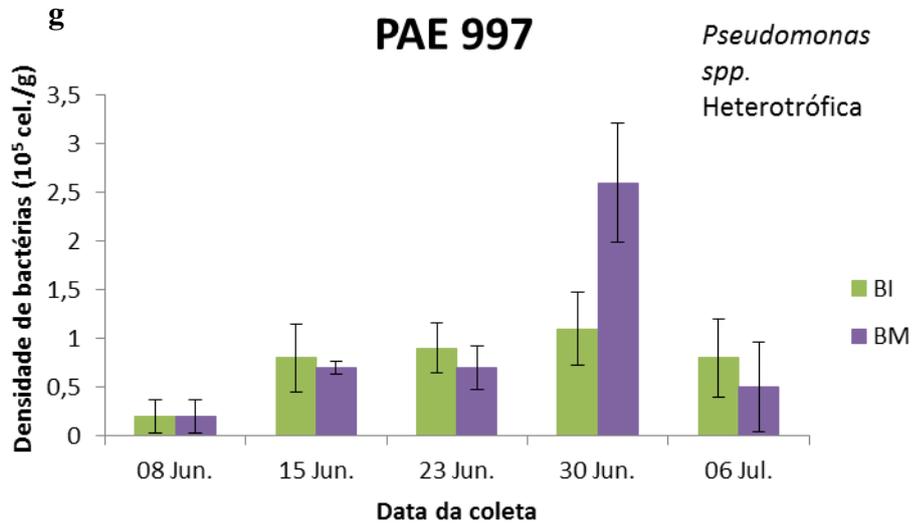
430



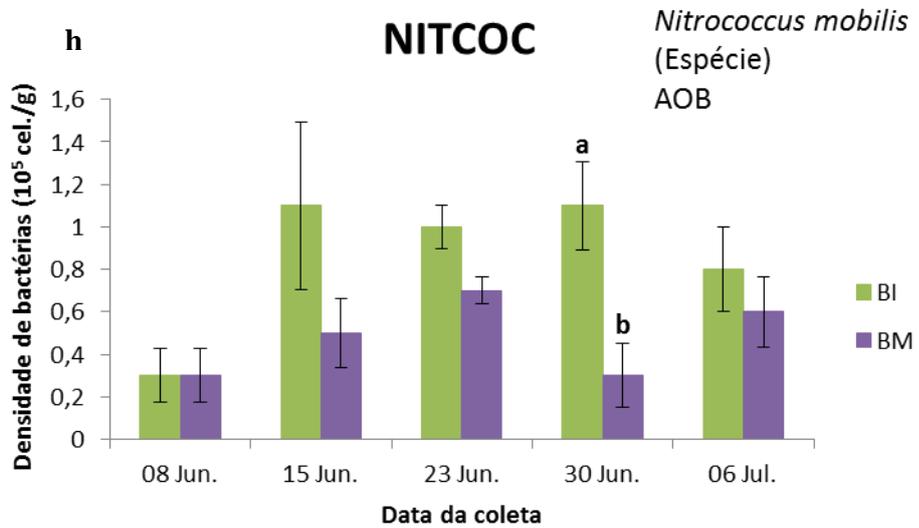
431



432



433



434

435 **Figura 7:** Densidade de microrganismos (DAPI – todos os microrganismos (a)) e  
436 bactérias ( $10^5$  cel./g) detectadas pelas sondas, NTSPA 712 – *Phylum Nitrospira* (b), NIT  
437 3- *Nitrobacter spp* (c), NSO 190-1225 – *Nitrosomonadales* (d), NTSPA 685 –  
438 *Nitrospira mascoviensis*, *N. marina* (e), NSMR 76 – *Nitrosomonas marina like* (f), PAE  
439 997 – *Pseudomonas spp* (h) e NITCOC – *Nitrococcus mobilis* (g) na parte externa dos  
440 “bioballs” dos tratamentos **BI:** Água clara com substrato (“bioballs” imaturos) e **BM:**  
441 Água clara com inóculo de “bioballs” maduros, ao longo dos 28 dias de experimento  
442 com o *Litopenaeus vannamei*. Resultados apresentados em média  $\pm$  erro padrão (n=3).  
443 Letras diferentes indicam médias significativas diferentes (P <0,05). Gráficos  
444 organizados em ordem decrescente taxonômica das bactérias.

445 Foram observadas diferenças significativas (P<0,05) nas porcentagens dos  
446 números de indivíduos de bactérias *Nitrococcus mobilis* e da ordem *Nitrosomonadales*  
447 em relação ao total de microrganismos presentes nas amostras da parte externa dos  
448 substratos entre os tratamentos BI e BM na terceira e quarta semana de experimento,  
449 respectivamente. Sendo observada uma maior quantidade de bactérias ( $10^5$  cel./g) em  
450 BI, como mostra a Tabelas 6 abaixo.

451 **Tabela 6:** Porcentagem da densidade de bactérias detectadas pelas sondas NTSPA 712  
452 – *Phylum Nitrospira*, NIT 3- *Nitrobacter spp*, NSO 190-1225 – *Nitrosomonadales*,  
453 NTSPA 685 – *Nitrospira mascoviensis*, *N. marina*, NSMR 76 – *Nitrosomonas marina*  
454 *like*, PAE 997 – *Pseudomonas spp* e NITCOC – *Nitrococcus mobilis* em relação ao  
455 DAPI (total de microrganismos) na parte externa dos “bioballs” dos tratamentos **BI:**  
456 Água clara com substrato (“bioballs” imaturos) - a e **BM:** Água clara com inóculo de  
457 “bioballs” maduros - b, ao longo dos 28 dias de experimento com o *Litopenaeus*  
458 *vannamei*. Valores entre parênteses são médias  $\pm$  desvio padrão da densidade de  
459 bactérias em  $10^5$  cel./g. Sondas organizadas em ordem decrescente taxonômica das  
460 bactérias (da esquerda para direita).

BI (%) – a								
Data da coleta	Total (DAPI)	NTSPA 712	NIT 3	NSO 190 – 1225	NTSPA 685	NSMR 76	PAE 997	NITCOC
08/06/2015	100 ± 0,09 (18,4 ± 9,0)	3,26 ± 0,01 (0,6 ± 0,8)	4,35 ± 0,0 (0,8 ± 0,3)	3,8 ± 0,0 (0,7 ± 0,1)	5,43 ± 0,01 (1,0 ± 1,4)	0,54 ± 0,0 (0,1 ± 0,1)	1,09 ± 0,0 (0,2 ± 0,3)	1,63 ± 0,0 (0,3 ± 0,2)
15/06/2015	100 ± 0,20 (28,8 ± 20,0)	1,04 ± 0,0 (0,3 ± 0,1)	3,13 ± 0,01 (1,0 ± 0,9)	2,78 ± 0,01 (0,8 ± 0,7)	1,74 ± 0,0 (0,5 ± 0,2)	2,78 ± 0,01 (0,8 ± 0,5)	2,78 ± 0,01 (0,8 ± 0,6)	3,82 ± 0,01 (1,1 ± 0,7)
23/06/2015	100 ± 0,33 (40,4 ± 32,5)	6,68 ± 0,02 (2,7 ± 2,4)	4,46 ± 0,01 (1,8 ± 1,1)	8,42 ± 0,03 (3,4 ± 3,1)	4,95 ± 0,02 (2,0 ± 1,9)	5,2 ± 0,02 (2,1 ± 1,9)	2,23 ± 0,0 (0,9 ± 0,4)	2,48 ± 0,0 (1,0 ± 0,2)
30/06/2015	100 ± 0,40 (68,6 ± 39,7)	1,75 ± 0,01 (1,2 ± 0,5)	1,02 ± 0,0 (0,7 ± 0,3)	0,44 ± 0,0 (0,3 ± 0,2)	1,17 ± 0,0 (0,8 ± 0,1)	1,6 ± 0,01 (1,1 ± 0,5)	1,6 ± 0,01 (1,1 ± 0,7)	1,60 ± 0,0 <sup>a</sup> (1,1 ± 0,4) <sup>a</sup>
06/07/2015	100 ± 0,19 (55,8 ± 19,0)	1,79 ± 0,01 (1,0 ± 1,2)	1,61 ± 0,0 (0,9 ± 0,3)	2,51 ± 0,0 <sup>a</sup> (1,4 ± 0,4) <sup>a</sup>	2,69 ± 0,01 (1,5 ± 0,8)	2,51 ± 0,01 (1,4 ± 0,9)	1,43 ± 0,01 (0,8 ± 0,7)	1,43 ± 0,0 (0,8 ± 0,4)
BM (%) – b								
Data da coleta	Total (DAPI)	NTSPA 712	NIT 3	NSO 190 - 1225	NTSPA 685	NSMR 76	PAE 997	NITCOC
08/06/2015	100 ± 0,09 (18,4 ± 8,5)	3,26 ± 0,01 (0,6 ± 0,8)	1,63 ± 0,0 (0,8 ± 0,3)	3,8 ± 0,0 (0,7 ± 0,1)	5,43 ± 0,01 (1,0 ± 1,4)	0,54 ± 0,0 (0,1 ± 0,1)	1,09 ± 0,0 (0,2 ± 0,3)	1,63 ± 0,0 (0,3 ± 0,2)
15/06/2015	100 ± 0,10 (12,8 ± 9,8)	3,13 ± 0,0 (0,4 ± 0,0)	3,91 ± 0,01 (0,7 ± 0,5)	6,25 ± 0,0 (0,8 ± 0,3)	4,69 ± 0,0 (0,6 ± 0,1)	5,47 ± 0,0 (0,7 ± 0,3)	5,47 ± 0,0 (0,7 ± 0,1)	3,91 ± 0,0 (0,5 ± 0,3)
23/06/2015	100 ± 0,35 (37,3 ± 34,7)	2,14 ± 0,01 (0,8 ± 0,6)	1,88 ± 0,0 (0,5 ± 0,3)	1,88 ± 0,0 (0,7 ± 0,3)	2,14 ± 0,0 (0,8 ± 0,2)	3,22 ± 0,01 (1,2 ± 0,6)	1,88 ± 0,0 (0,7 ± 0,4)	1,88 ± 0,0 (0,7 ± 0,1)
30/06/2015	100 ± 0,30 (36,7 ± 30,2)	3,27 ± 0,01 (1,2 ± 1,2)	0,82 ± 0,01 (1,3 ± 1,3)	1,09 ± 0,01 (0,4 ± 0,6)	5,45 ± 0,01 (2,0 ± 1,3)	2,72 ± 0,01 (1,0 ± 1,0)	7,08 ± 0,01 (2,6 ± 1,1)	0,82 ± 0,0 <sup>b</sup> (0,3 ± 0,3) <sup>b</sup>
06/07/2015	100 ± 0,33 (25,1 ± 32,9)	2,39 ± 0,01 (0,6 ± 0,6)	2,39 ± 0,0 (0,4 ± 0,30)	1,59 ± 0,0 <sup>b</sup> (0,4 ± 0,2) <sup>b</sup>	2,39 ± 0,0 (0,6 ± 0,3)	4,78 ± 0,0 (1,2 ± 0,1)	1,99 ± 0,0 (0,5 ± 0,1)	2,39 ± 0,0 (0,6 ± 0,3)

461 Letras diferentes, entre as tabelas, indicam médias significativas diferentes (P < 0,05).

462 Foi observada uma concentração significativa (P < 0,05) de bactérias nitrificantes  
463 e heterotróficas (*pseudomonas spp.*) no tratamento BM. Tendo IN (10%) uma maior  
464 concentração de NOB e BI de AOB (P < 0,05), como observado na Tabela 7 a seguir.

465 **Tabela 7:** Concentração (%) de bactérias nitrificantes (AOB e NOB) e heterotróficas  
466 (*pseudomonas spp.*) em relação ao total de microrganismos presentes nos bioflocos dos  
467 tratamentos **Controle:** Água clara onde foram formados os bioflocos; **IN (10%):** Água  
468 clara com inóculo de bioflocos (10%); **BI:** Água clara com substrato (“bioballs”  
469 imaturos); **BM:** Água clara com inóculo de “bioballs” maduros, ao longo dos 28 dias de  
470 experimento com o *Litopenaeus vannamei*. Valores entre parênteses são médias ±  
471 desvio padrão da densidade de bactérias em 10<sup>5</sup> cel./ml.

<b>Bioflocos</b>				
<b>Conc. Bactérias (%)</b>	<b>Controle</b>	<b>IN (10%)</b>	<b>BI</b>	<b>BM</b>
<b>Nitrificantes</b>	$0,48 \pm 0,0^c$	$0,65 \pm 0,01^c$	$1,11 \pm 0,01^b$	$31,53 \pm 0,15^a$
	$(6,16 \pm 0,50)$	$(9,33 \pm 1,20)$	$(4,78 \pm 0,62)$	$(172,65 \pm 15,07)$
<b>AOB</b>	$50,49 \pm 0,0^b$	$0 \pm 0,0^d$	$100 \pm 0,01^a$	$10,52 \pm 0,02^c$
	$(3,11 \pm 0,44)$	$0 \pm 0,0$	$(4,78 \pm 0,87)$	$(18,17 \pm 1,66)$
<b>NOB</b>	$49,51 \pm 0,01^c$	$100 \pm 0,02^a$	$0 \pm 0,0^d$	$89,48 \pm 0,21^b$
	$(3,05 \pm 0,56)$	$(9,33 \pm 1,70)$	$0 \pm 0,0$	$(154,48 \pm 21,18)$
<b>Heterotróficas (<i>Pseudomonas spp.</i>)</b>	$0,03 \pm 0,0^c$	$3,66 \pm 0,09^b$	$3,45 \pm 0,04^b$	$27,64 \pm 0,38^a$
	$(0,39 \pm 0,10)$	$(52,63 \pm 9,47)$	$(14,85 \pm 3,83)$	$(151,38 \pm 38,22)$
<b>Total</b>	$100 \pm 0,16$	$100 \pm 1,52$	$100 \pm 0,30$	$100 \pm 0,62$
	$(1292,86 \pm 116,0)$	$(1439,29 \pm 152,43)$	$(430,22 \pm 29,74)$	$(547,65 \pm 62,06)$

472 Letras diferentes sobrescritos na mesma linha indicam médias significativas diferentes (P <0,05).

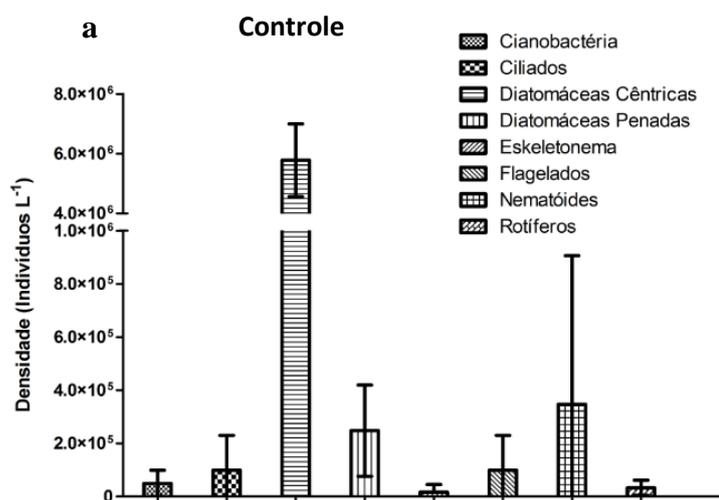
473 Os tratamentos BI e BM obtiveram concentrações semelhantes (P >0,05) de  
 474 bactérias nitrificantes no sistema, apresentando BI maior quantidade de AOB (P <0,05)  
 475 e BM de NOB e bactérias heterotróficas (*pseudomonas spp.*) (P <0,05) (Tabela 8).

476 **Tabela 8:** Concentração (%) de bactérias nitrificantes (AOB e NOB) e heterotróficas  
 477 (*pseudomonas spp.*) em relação ao total de microrganismos presentes na parte externa  
 478 dos “bioballs” dos tratamentos **BI:** Água clara com substrato (“bioballs” imaturos) e  
 479 **BM:** Água clara com inóculo de “bioballs” maduros, ao longo dos 28 dias de  
 480 experimento com o *Litopenaeus vannamei*. Valores entre parênteses são médias  $\pm$   
 481 desvio padrão da densidade de bactérias em  $10^5$  cel./g.

<b>“Bioballs”</b>		
<b>Conc. Bactérias (%)</b>	<b>BI</b>	<b>BM</b>
<b>Nitrificantes</b>	10,5 ± 0,01 (66,8 ± 1,16)	10,0 ± 0,01 (37,3 ± 0,52)
<b>AOB</b>	50,0 ± 0,01 <sup>a</sup> (33,4 ± 1,26)	38,9 ± 0,0 <sup>b</sup> (14,5 ± 0,31)
<b>NOB</b>	50,0 ± 0,01 <sup>b</sup> (33,4 ± 1,08)	61,1 ± 0,01 <sup>a</sup> (22,8 ± 0,64)
<b>Heterotróficas</b> <i>(Pseudomonas spp.)</i>	2,2 ± 0,01 <sup>b</sup> (14 ± 0,68)	3,7 ± 0,01 <sup>a</sup> (13,8 ± 0,99)
<b>Total</b>	100 ± 0,31 (635,4 ± 31,1)	100 ± 0,25 (372,7 ± 24,93)

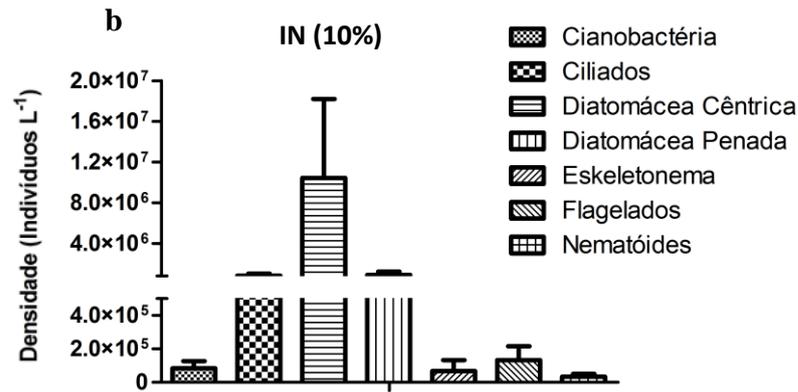
482 Letras diferentes sobrescritos na mesma linha indicam médias significativas diferentes (P <0,05).

483 Uma maior densidade ( $\geq 10^6$  indivíduos/L) de diatomáceas cêntricas foi  
 484 observada em todos os tratamentos em relação aos outros microrganismos presentes nas  
 485 lâminas. Sendo mais encontradas nos tratamentos IN (10%) e BM ( $10^7$  indivíduos/L),  
 486 onde em IN (10%) também foi observada uma grande quantidade ( $10^6$  indivíduos/L) de  
 487 diatomáceas penadas e ciliados, podendo ser observado na Figura 8 abaixo.

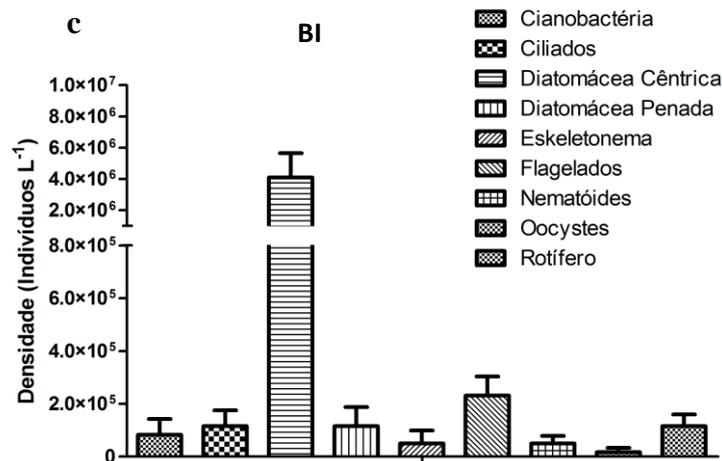


488

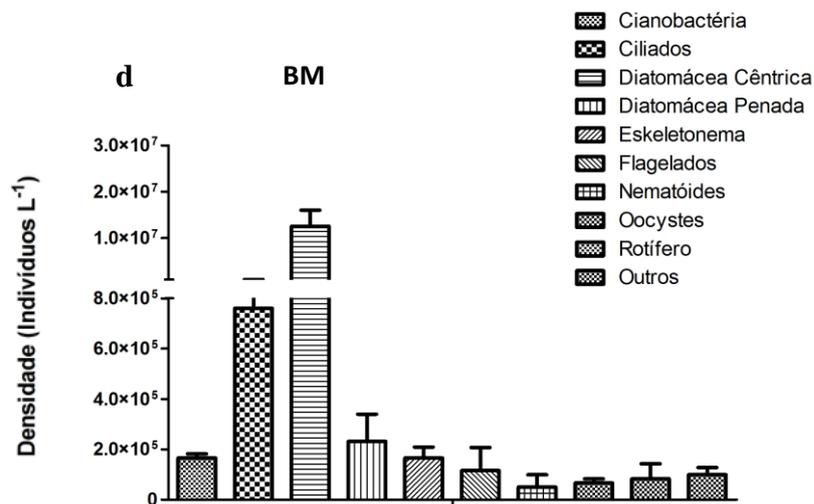
489



490



491



492 **Figura 8:** Comunidades de microrganismos presentes na água de cultivo nos diferentes  
493 tratamentos **Controle:** Água clara onde foram formados os bioflocos - a; **IN (10%):**  
494 Água clara com inóculo de bioflocos (10%) - b; **BI:** Água clara com substrato  
495 (“bioballs” imaturos) - c; **BM:** Água clara com inóculo de “bioballs” maduros - d, ao

496 longo dos 28 dias de experimento com *Litopenaeus vannamei*. Resultados apresentados  
 497 em média  $\pm$  erro padrão (n=3).

498 Os principais resultados referentes ao desempenho zootécnico dos camarões ao  
 499 final do experimento nos diferentes tratamentos estão apresentados na Tabela 9. Não  
 500 houve diferença estatística ( $P>0,05$ ) na sobrevivência (%) entre os tratamentos, assim  
 501 como para peso e biomassa inicial (g), peso final (g) e ganho de peso semanal (g) dos  
 502 mesmos.

503 A biomassa final (g) e produtividade ( $\text{kg/m}^3$ ) foram maiores no tratamento BM  
 504 ( $P<0,05$ ) em relação a IN (10%). Não houve diferença estatística ( $P>0,05$ ) para  
 505 biomassa final (g) e produtividade ( $\text{kg/m}^3$ ) obtida em Controle e BI em relação aos  
 506 demais tratamentos. A CAA em IN (10%) foi maior e estatisticamente semelhante  
 507 ( $P<0,05$ ) ao Controle sendo diferente das demais. CAA no Controle foi igual ( $P>0,05$ ) a  
 508 todos os outros tratamentos.

509 **Tabela 9:** Médias  $\pm$  desvio padrão dos principais parâmetros de desempenho zootécnico  
 510 nos diferentes tratamentos **Controle:** Água clara onde foram formados os bioflocos; **IN**  
 511 **(10%):** Água clara com inóculo de bioflocos (10%); **BI:** Água clara com substrato  
 512 (“bioballs” imaturos); **BM:** Água clara com inóculo de “bioballs” maduros, ao longo dos  
 513 28 dias de experimento com *L. vannamei*.

<b>Desempenho zootécnico</b>	<b>Controle</b>	<b>IN (10%)</b>	<b>BI</b>	<b>BM</b>
<b>Sobrevivência (%)</b>	90,0 $\pm$ 9,0	88,8 $\pm$ 1,8	99,2 $\pm$ 1,4	98,0 $\pm$ 2,5
<b>Peso Inicial (g)</b>	4,92 $\pm$ 0,19	4,92 $\pm$ 0,42	4,92 $\pm$ 0,16	4,92 $\pm$ 0,23
<b>Peso Final (g)</b>	10,5 $\pm$ 0,6	9,7 $\pm$ 0,8	10,2 $\pm$ 0,9	10,7 $\pm$ 0,7
<b>Biomassa Inicial (g)</b>	196 $\pm$ 7,34	196 $\pm$ 7,28	196 $\pm$ 19,71	196 $\pm$ 5,71
<b>Biomassa Final (g)</b>	375,6 $\pm$ 24,9 <sup>ab</sup>	357,9 $\pm$ 3,6 <sup>b</sup>	406,4 $\pm$ 32,9 <sup>ab</sup>	418,9 $\pm$ 25,6 <sup>a</sup>
<b>Produtividade (<math>\text{kg/m}^3</math>)</b>	0,90 $\pm$ 0,12 <sup>ab</sup>	0,81 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	1,05 $\pm$ 0,16 <sup>ab</sup>	1,11 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>
<b>Ganho de Peso Semanal (g)</b>	1,39 $\pm$ 0,16	1,20 $\pm$ 0,21	1,33 $\pm$ 0,21	1,46 $\pm$ 0,18
<b>CAA</b>	1,8 $\pm$ 0,20 <sup>ab</sup>	2,0 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	1,4 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>	1,4 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>

514 Letras diferentes sobrescritos na mesma linha indicam médias significativas diferentes ( $P < 0,05$ ).

## 5. DISCUSSÃO

515  
516  
517  
518  
519  
520  
521  
522  
523  
524  
525  
526  
527  
528  
529  
530  
531  
532  
533  
534  
535  
536  
537  
538  
539  
540  
541  
542  
543  
544  
545  
546  
547  
548

Os parâmetros de qualidade da água foram adequados para a produção de *L. vannamei* sendo mantidos dentro dos padrões recomendados por Van Wyk & Scarpa (1999) ao longo do experimento, onde as concentrações ótimas de oxigênio dissolvido para a espécie são maior ou igual a 5,5 mg/L (Jiang *et al.*, 2005), temperatura ótima 27°C (Souza *et al.*, 2016) e intervalo de pH entre 7,6 - 8,1 (Zhang *et al.*, 2015).

Observou-se um aumento nas concentrações de sólidos em todos os tratamentos, o que era esperado, devido à indução da formação do bioflocos, ficando o tratamento IN BM abaixo dos limites recomendados por Gaona *et al.* (2011) de 500-600 mg/L e dentro das concentrações de sólidos suspensos totais, cerca de 100- 300 mg/L, recomendada durante a formação do bioflocos, como nos tratamentos Controle e BI, para manter a qualidade da água, particularmente quando o processo de nitrificação não está bem estabelecido (Gaona *et al.*, 2015). Exceto no tratamento IN (10%) que iniciou com um maior aporte de sólidos devido ao inóculo de 10% de BFT, menores valores de amônia e nitrito e maiores valores para nitrato pelo fato de já estar colonizado com bactérias autotróficas e heterotróficas. Enquanto BM foi o tratamento em que os camarões tiveram maior biomassa final e menor CAA.

Os valores de NAT e  $N-NO_2^-$  observados ao longo do experimento foram inferiores aos valores máximos recomendados para espécie (3,95 mg/L e 25,7 mg/L), respectivamente (Lin & Chen 2001, 2003). Assim, como os valores do nitrato, que se mantiveram inferiores a faixa letal de 300 mg/L ao longo de todo o cultivo, como reportado por Furtado *et al.* (2015a) e Kuhn *et al.* (2010), não afetando o crescimento, a biomassa e a sobrevivência (> 88%) dos camarões. Sendo adicionado uma menor concentração de carbono (melaço) no tratamento IN (10%) em relação aos demais tratamentos, por esse ter apresentado menores picos de amônia durante todo o período experimental, devido a maior colonização de bactérias, seguido do tratamento BM.

No presente trabalho verificou-se que inocular bactérias nitrificantes pode ser uma alternativa viável para promover o desenvolvimento destas no sistema. Isso significa que ao longo do experimento as bactérias foram colonizando o meio e oxidando a amônia em nitrito em todos os tratamentos, sendo menores valores desses compostos encontrados nos tratamentos IN (10%) e BM, onde foram inoculadas bactérias no início do experimento, provando que as mesmas mantiveram-se vivas e ativas, apresentando concentrações de nitrato mais rapidamente do que nos tratamentos Controle e BI, como também observado por Krummenauer *et al.* (2014).

549 O mesmo foi observado por Kuhn *et al.* (2010), nos sistemas de produção que  
550 receberam caldo com bactérias nitrificantes. Causou uma oxidação mais rápida do  
551 nitrito após dois dias da adição do produto, onde o nível de nitrito começou a diminuir e  
552 depois de uma diminuição constante manteve-se dentro dos limites de segurança para  
553 todo o período de cultivo do camarão. Assim como o melaço, que ao ser adicionado no  
554 sistema contribuiu para o processo de nitrificação. Também sendo observado por  
555 Samocha *et al.* (2007) que demonstraram que o melaço pode ser utilizado  
556 como uma ferramenta para evitar aumento da amônia e do nitrito durante  
557 a fase de berçário e engorda do *L. vannamei*, em um sistema BFT.

558 De acordo com Baldwin *et al.* (2003), “bioballs” são substratos ideais para  
559 estudos em que são necessárias replicações e reprodutibilidade”, uma vez que,  
560 “bioballs” expostos a baixas concentrações de carbono orgânico dissolvido (DOC)  
561 tiveram significativamente mais biomassa do que biofilmes, enquanto “bioballs”  
562 expostos a altas concentrações de DOC tiveram um crescimento significativo de  
563 biofilmes. No presente estudo foi encontrada uma maior quantidade de bactérias  
564 aderidas nos “bioballs” do que na água de cultivo, como também observado por Ramesh  
565 *et al.* (1999) e Umesh *et al.* (1999), onde houve uma maior concentração de bactérias no  
566 biofilme em relação à água.

567 Como descrito por Lara (2012), as bactérias nitrificantes se desenvolvem melhor  
568 fixadas em substratos, o mesmo foi observado por Gieseke *et al.* (2003) e Michaud *et al.*  
569 (2006). De acordo com eles a atividade das bactérias nitrificantes aderidas ao substrato  
570 é mais intensa do que das bactérias livres na água, devido à variação da composição da  
571 comunidade bacteriana no biofilme junto com a adição dos compostos nitrogenados  
572 (ração, excreção, etc.).

573 Também foi mostrado por Holl *et al.* (2011) que a comunidade nitrificante  
574 fixada no substrato é capaz de realizar completamente a nitrificação do sistema, sem que  
575 haja a atividade das bactérias presentes na água. Já Oliveira *et al.* (2006) encontraram  
576 uma interação direta entre as bactérias da água e do biofilme, mostrando que o  
577 incremento de alguns grupos de bactérias nitrificantes no substrato acontece após a  
578 diminuição da abundância destes grupos na água sendo a água um veículo disseminador  
579 das bactérias até o substrato, mas não o principal ambiente de nitrificação.

580 Foi observado por Bassin *et al.* (2012) que o aumento das bactérias nitrificantes  
581 (AOB e NOB) no substrato ocorreu simultaneamente com o aumento das concentrações  
582 dos compostos nitrogenados no sistema. Indicando maior atividade nitrificante no

583 biofilme, não sendo observada diferença na água ao longo do tempo. Isso tudo prova  
584 que existem diferentes comunidade e espécies de AOB e NOB no sistema de cultivo.  
585 Atuando em conjunto, eliminando os compostos nitrogenados do meio (Gieseke *et al.*,  
586 2003).

587 No presente estudo, diferentes tipos de bactérias estavam presentes no sistema,  
588 como as *Pseudomonas* que são bactérias heterotróficas, responsáveis pela redução do  
589 nitrato e fosfato, sendo o nitrato removido por microrganismos denitrificantes. Libera  
590 fósforo (P) em condições anaeróbicas e assimila em condições aeróbicas, são anaeróbicas  
591 facultativas. Estas bactérias utilizam nitratos alternativamente ao oxigênio como forma  
592 de respiração e libertam nitrogênio em estado gasoso (N<sub>2</sub>) (Tundisi & Tundisi, 2008).  
593 Sendo mais encontradas nos tratamentos IN (10%) e BM, por terem recebido um  
594 inóculo de bactérias no início do experimento, onde IN (10%) possuía maiores  
595 concentrações de SST e BM maior volume de biofilmes, que já estavam aderidos nos  
596 “bioballs” maduros, acarretando em um maior aporte de fósforo e nitrato nesses sistemas  
597 em relação aos outros.

598 A espécie amônia-oxidante (AOB) *Nitrococcus mobilis*, encontrada apenas em  
599 ambientes marinhos e é uma halófila obrigatória. É coccus na forma e tem um flagelo  
600 para auxiliar na circulação. Esta bactéria oxida nitrito em nitrato (HNO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O para  
601 HNO<sub>3</sub>) e tem sido encontrada em concentrações mais baixas que de outras bactérias de  
602 nitrificação (ex.: *Nitrosomonas sp.*), como pode ser observado no presente estudo, sendo  
603 encontrada apenas nos tratamentos Controle e BM em baixas quantidades. Também  
604 desempenha um pequeno papel no ciclo de carbono marinho em que fixa o carbono  
605 inorgânico que pode então ser utilizada por hereterotróficas (Watson & Waterbury, 1971;  
606 Bartosch *et al.*, 1999).

607 Já espécies *Nitrospira mascoviensis* e *N. Marina* são quimioautotróficas  
608 obrigatórias, nitrito-oxidantes (NOB) do filo *Nitrospirae*, importantes em habitats  
609 marinhos, geralmente encontrada em água doce ou salgada. Sob condições aeróbicas,  
610 consomem carbono inorgânico (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> e CO<sub>2</sub>) e piruvato. Seu tempo de duplicação é a  
611 cada 12 - 32 horas (Ehrich *et al.*, 1995). O melhor crescimento da *N. marina* é obtido  
612 em um meio mixotrófico e podem ser uma das NOB mais prevalentes em alguns  
613 ambientes oceânicos (Watson *et al.*, 1986), sendo encontrada nos tratamento Controle e  
614 BM do experimento.

615 A proteobactéria AOB *Nitrosomonas marina* é halofílica obrigatória, aeróbica,  
616 gram-negativa do gênero *Nitrosomonas* (Burrell *et al.*, 2001). Foram observadas apenas  
617 nos tratamento IN (10%) e BM, por serem sistemas estabilizados, com maior tempo de  
618 colonização, devido ao inóculo de bactérias que receberam no início do experimento.

619 Espécies do gênero *Nitrobacter* são quimioautotróficas facultativas. Podem  
620 crescer em condições aeróbias tendo nitrito como doador de elétrons ou por oxidação de  
621 compostos orgânicos simples (Smith & Hoare, 1968; Bock, 1976; Kalthoff *et al.*, 1979).  
622 Em condições anóxicas, piruvato pode ser utilizado como doador de elétrons tendo  
623 nitrato como receptor (Freitag *et al.*, 1987). São encontrados em ambientes terrestres e  
624 aquáticos (Ehrich *et al.*, 1995) estando presente somente nos tratamentos IN (10%) e  
625 BM devido a maior concentração de nitrato nesses sistemas.

626 Diversos trabalhos na literatura com sistemas nitrificantes, mencionam uma  
627 porcentagem de nitrificantes em torno de 10% da população total de bactérias (Harms *et*  
628 *al.*, 2003; Geets *et al.*, 2007; Nielsen *et al.* 2010; Yapsakli *et al.*, 2011) como também  
629 pode ser observado no presente estudo para a concentração de AOB e NOB na parte  
630 externa dos “bioballs” dos tratamentos BI e BM. Além de ter sido observada uma maior  
631 quantidade de bactérias nitrificantes do que heterotróficas (*pseudomonas spp.*) nos  
632 substratos.

633 Altas concentrações de NOB em relação à AOB têm sido encontradas em vários  
634 trabalhos na literatura. Harms *et al.* (2003) encontraram 5 vezes mais células de  
635 *Nitrospira sp.* que de AOB em sistemas em escala plena tratando esgoto municipal.  
636 Elevadas concentrações também foram observadas neste estudo para os tratamentos IN  
637 (10%) e BM nas amostras de bioflocos, que receberam inóculo no início do  
638 experimento.

639 Em geral, membro do grupo *Nitrospira spp.* e/ou *Nitrosomonas oligotropha*  
640 são AOB dominantes em ambientes com baixa concentração de  $N-NH_4^+$ , enquanto  
641 grupos de *Nitrosomonas europaea* e *Nitrosococcus mobilis* predominam em ambientes  
642 ricos em íon amônio, conforme visto em diversos trabalhos (Limpiyakorn *et al.*, 2005).  
643 O que deve ter acarretado em uma maior concentração de AOB no tratamento Controle  
644 devido a elevada taxas de amônia no sistema em relação aos outros tratamentos.

645 De uma forma geral, nas amostras de bioflocos, foi observada uma maior  
646 concentração de bactérias nitrificantes para o tratamento BM, sendo uma maior  
647 quantidade de NOB observado no IN (10%), mostrando que estes sistemas estão mais

648 estabilizados que os outros tratamentos. BI apresentou uma maior concentração de AOB  
649 seguido de Controle, provando a ocorrência da colonização dos sistemas.

650 Para as amostras de substrato, foi observada uma maior concentração de AOB  
651 para o tratamento BI, mostrando uma colonização do sistema mais jovem. Enquanto  
652 BM obteve maior quantidade de bactérias NOB e heterotróficas (*pseudomonas spp.*)  
653 provando ser um sistema mais velho e estabilizado, com mais bactérias aderidas.

654 Sobre os microrganismos presentes no BFT, foi observada uma maior  
655 concentração de diatomáceas cêntricas em todos os tratamentos, estando em maior  
656 quantidade no BM e IN (10%), onde também foi observada uma grande quantidade de  
657 diatomáceas penadas e ciliados, devido ao inóculo de biofloco maduro (10%)  
658 proveniente de um cultivo de camarão de 80 dias. Quanto mais maturo for o floco maior  
659 a concentração de microrganismos presentes no mesmo.

660 De acordo com Martins *et al.* (2016), altas densidades de células de diatomáceas  
661 contribuiu para um melhor desempenho no crescimento de camarão, proporcionando  
662 elevadas taxas de sobrevivência (%), ganho de peso (g), biomassa média final (g) e  
663 eficiente conversão alimentar, independente de estarem apenas na coluna d'água ou  
664 fixas ao substrato artificial, provando que o bioflocos serve como um nutritivo  
665 complemento alimentar. Destaca o grande potencial das diatomáceas *Amphora*  
666 *coffeaeformis* e *Conticribra weissflogii* como suplemento alimentar para a dieta do  
667 camarão em viveiros com sistema BFT, principalmente a espécie *A. coffeaeformis* que  
668 apresentou uma maior concentração de lipídios, principalmente EPA, dos flocos.  
669 Apresentando significativamente maior taxa de sobrevivência (%), melhor ganho de  
670 peso (g), biomassa média final (g) e CAA para juvenis de *L. vannamei* cultivados com  
671 as duas espécies de diatomáceas citadas acima.

672 Comparando o tratamento BM ao trabalho de Ferreira *et al.* (2015) realizado  
673 com a mesma espécie (*L. vannamei*) a uma densidade de 300 camarões/m<sup>2</sup> (168,75  
674 cam./m<sup>3</sup>) e 400% de adição de substrato artificial (redes de nylon com um tamanho de  
675 malha de 1,0 mm), o valor da sobrevivência (98,0 ± 2,5%) obtido no presente estudo foi  
676 similar ao encontrado por Ferreira *et al.* (2015) (85,6 ± 6,9%), porém o fator de  
677 conversão alimentar (0,96) obtido pelos autores foi melhor do que o obtido no presente  
678 experimento (1,4 ± 0,15).

679 Estudos também foram realizados por Schweitzer *et al.* (2013) testando  
680 densidade, e a presença ou ausência de substrato para o cultivo de juvenis *L. vannamei*  
681 com peso médio 2,7 ± 0,1 g em bioflocos, durante 34 dias. Os valores de sobrevivência

682 (70,6 ± 17,1%), CAA (4,1 ± 1,8) e ganho de peso semanal (0,73 ± 0,04g) obtido por  
683 eles no tratamento D238: 238 camarões/m<sup>3</sup> foram inferiores aos encontrados no  
684 Controle no presente trabalho. O mesmo pode ser dito do tratamento D238 + S: 238  
685 camarões/m<sup>3</sup> + substrato (telas de polietileno com uma malha de 1,0 mm - tela de  
686 mosquito net) em relação ao tratamento BI, onde o valor da sobrevivência (95,2 ±  
687 2,9%), ganho de peso semanal (1,40 ± 0,05g) e CAA (1,6 ± 0,0) foram semelhantes aos  
688 encontrados no presente estudo 99,2 ± 1,4%, 1,33 ± 0,21g e 1,4 ± 0,19,  
689 respectivamente.

690 Assim como no tratamento IN (10%) do presente trabalho, Lara (2012) também  
691 obteve um desempenho zootécnico abaixo do esperado no tratamento com reuso de  
692 bioflocos, obtendo melhores parâmetros zootécnicos nos tratamentos com biofilme  
693 como observado no tratamento BM, confirmando que o biofilme é uma importante fonte  
694 de alimento para os camarões, reduzindo as taxas de conversão alimentar, aumentando a  
695 biomassa final (g) e produtividade (kg/m<sup>3</sup>) dos mesmos.

## 696 **6. CONCLUSÃO**

697 Foi observado que o uso de inóculos e “bioballs” são opções eficazes para uma  
698 melhor nitrificação no sistema, sendo o “bioball” um substrato eficiente para uma maior  
699 fixação de bactérias aumentando a assimilação dos compostos nitrogenados e  
700 consequentemente uma maior produção de biofilme microbiano, ajudando na  
701 estabilização desses compostos no sistema.

702 Futuros estudos podem ser realizados com tratamentos semelhantes utilizando  
703 needlona além do “bioball”, em diferentes tratamentos, para verificar qual substrato será  
704 melhor para o desenvolvimento da comunidade de bactérias nitrificantes e viável  
705 economicamente para os produtores.

- 707 Amann R, Snaidr J, Wagner M, Ludwig W, Schleifer KH. 1996. In Situ Visualization of  
708 High Genetic Diversity in a Natural Microbial Community. *Journal of*  
709 *Bacteriology*. 178(12): 3496–3500.
- 710 Aminot A, Chaussepied M. 1983. Baumgarten MGZ, Niencheski LFH, Wallner-  
711 Kersanach M, Ribeiro ARL, Machado EC. Análise Instrumental. In: Baumgarten  
712 MGZ, Wallner-Kersanach M, Niencheski LFH. 2010. Manual de Análises em  
713 Oceanografia Química. Rio Grande: Editora da FURG, 114-118p.
- 714 American Public Health Association (APHA). 1989. Standard methods for the  
715 examination of water and waste water, sixteenth edn. American Public Health  
716 Association, AWWA, WPCF, New York.
- 717 AOAC.1999.Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical  
718 Chemists. Arlington. 2(35):1-30.
- 719 Avnimelech Y. 1999. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems.  
720 *Aquaculture*. 176: 227-235.
- 721 Azim ME, Little DC, Bron JE. 2008. Microbial protein production in activated  
722 suspension tanks manipulating C: N ratio in feed and the implications for fish  
723 culture. *Bioresource Technology*. 99(9): 3590-3599.
- 724 Baldwin DS, Rees GN, Edward SM, Robertson AI. 2003. A simple, reproducible  
725 substrate for studying biofilms in aquatic environments. *Environmental*  
726 *Technology*. 24(6): 11-717.
- 727 Ballester ELC, Wasielesky Jr. W, Cavalli RO, Abreu PC. 2007. Nursery of the pink  
728 shrimp *Farfantepenaeus paulensis* in cages with artificial substrates: Biofilm  
729 composition and shrimp performance. *Aquaculture*. 269: 355-362.
- 730 Barbieri Júnior RC, Ostrensky Neto A. 2002. Aspectos Biológicos. In:\_\_\_\_\_. (Org.)  
731 Camarões Marinhos – Engorda. Viçosa – MG: Aprenda Fácil. 2:34-35.
- 732 Bartosch S, Wolgast I, Spieck E, Bock E. 1999. Identification of nitrite-oxidizing  
733 bacteria with monoclonal antibodies recognizing the nitrite oxidoreductase.  
734 *Applied and Environmental Microbiology*. 65(9): 4126-4133.
- 735 Bassin J, Kleerebezem R, Rosado A, Van Loosdrecht M, Dezotti M. 2012. Effect of  
736 different operational conditions on biofilm development, nitrification, and  
737 nitrifying microbial population in moving-bed biofilm reactors. *Environmental*  
738 *Science & Technology*. 46: 1546-1555.

- 739 Bendschneider K, Robinson RJ. 1952. A new spectrophotometric method for the  
740 determination of nitrite in sea water. *Journal of Marine Research*. 11:87-96.
- 741 Bock E. 1976. Growth of *Nitrobacter* in the presence of organic matter. II.  
742 Chemoorganotrophic growth of *Nitrobacter agilis*. *Arch Microbiol*. 108:305–  
743 312.
- 744 Brownell CL. 1980. Water quality requirements for first-feeding in marine fish larvae:  
745 ammonia, nitrite and nitrate. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol*. 44: 269-283.
- 746 Burrell PC, Phalen CM, Hovanec TA. 2001. Identification of Bacteria Responsible for  
747 Ammonia Oxidation in Freshwater Aquaria. *Applied and Environmental*  
748 *Microbiology*. 67(12): 5791–5800.
- 749 Chen JC, Chin CK, Lee CK. 1986. Effects of ammonia and nitrite on larval  
750 development of the shrimp *Penaeus monodon*. *The First Asian Fisheries Forum*.  
751 *Asian Fisheries Society, Manila, Philippines*. 657-662.
- 752 Colt, J. 2006. Water quality requirements for reuse systems. *Aquacult. Eng*. 34: 143–  
753 156.
- 754 Conell EFAM. 2014. Caracterização da comunidade bacteriana de filtros biológicos  
755 percoladores tratando efluente anaeróbio. Dissertação (Doutorado em  
756 Saneamento). Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e  
757 Recursos Hídricos. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.  
758 159p. Disponível em:  
759 <<http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/handle/1843/BUOS-9P4FJ7> >
- 760 Cottrell MT, Kirchman DL. 2003. Contribution of major bacterial groups to bacterial  
761 biomass production (thymidine and leucine incorporation) in the Delaware  
762 estuary. *Limnol Oceanogr*. 48(1): 168-178.
- 763 Daims H, Nielsen JL, Nielsen PH, Schleifer K-H, Wagner M. 2001. In Situ  
764 Characterization of *Nitrospira*-Like Nitrite Oxidizing Bacteria Active in  
765 Wastewater Treatment Plants. 67(11): 5273–5284.
- 766 Ebeling JM, Timmons MB, Bisogni JJ. 2006. Engineering analysis of the stoichiometry  
767 of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic control of ammonia-nitrogen  
768 in aquaculture in aquaculture production systems. *Aquaculture*. 257: 346-358.
- 769 Emerenciano M, Gaxiola G, Cuzon G. 2013. Biofloc Technology (BFT): A Review for  
770 Aquaculture Application and Animal Food Industry, *Biomass Now - Cultivation*  
771 *and Utilization*, Dr. Miodrag Darko Matovic (Ed.), cap. 12, ISBN: 978-953-51-  
772 1106-1, InTech, DOI: 10.5772/53902. Available from:

773 <http://www.intechopen.com/books/biomass-now-cultivation-and->  
774 [utilization/biofloc-technology-bft-a-review-for-aquaculture-application-and-](http://www.intechopen.com/books/biomass-now-cultivation-and-)  
775 [animal-food-industry.](http://www.intechopen.com/books/biomass-now-cultivation-and-)

776 Ehrich S, Behrens D, Lebedeva E, Ludwig W, Bock E. 1995. A new obligately  
777 chemolithoautotrophic, nitrite-oxidizing bacterium, *Nitrospira moscoviensis* sp.  
778 nov. and its phylogenetic relationship. Arch Microbiol. 164: 16–23.

779 FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Fisheries and  
780 Aquaculture Department Statistics. 2016. Disponível em:<  
781 [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus\\_vannamei/en#tcNA00EA](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus_vannamei/en#tcNA00EA) >.  
782 Acesso em: 31/10/2016.

783 Ferreira LMH, Lara G, Wasielesky Jr. W, Abreu PC. 2015. Biofilm versus biofloc: Are  
784 artificial substrates for biofilm production necessary in the BFT system?  
785 Aquacult Int. DOI: 10.1007/s10499-015-9961-0.

786 Fromm PO, Gillete JR. 1968. Effect of ambient ammonia on blood ammonia and  
787 nitrogen excretion of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Comp. Bioch. And  
788 physiol. 26: 887-896.

789 Freitag A, Rudert M, Bock E. 1987. Growth of *Nitrobacter* by dissimilatory nitrate  
790 reduction. FEMS Microbiol Lett. 48:105–109.

791 Furtado PS, Gaona CAP, Poersch LH, Wasielesky Jr. W. 2014. Application of different  
792 doses of calcium hydroxide in the farming shrimp *Litopenaeus vannamei* with  
793 the biofloc technology (BFT). Aquacult Int. 22:1009–1023.

794 Furtado PS, Campos BR, Serra FP, Klosterhoff M, Romano LA, Wasielesky Jr. W.  
795 2015a. Effects of nitrate toxicity in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus*  
796 *vannamei*, reared with biofloc technology (BFT). Aquacult Int. 23(1): 315-327.

797 Furtado PS, Poersch LH, Wasielesky Jr. W. 2015b. The effect of different alkalinity  
798 levels on *Litopenaeus vannamei* reared with biofloc technology (BFT). Aquacult  
799 Int. 23(1): 345-358.

800 Furtado PS, Valenzuela MAJ, Rodriguez-Fuentes G, Campos V, Wasielesky Jr. W,  
801 Gaxiola G. 2016. Chronic effect of nitrite on the rearing of the white shrimp  
802 *Litopenaeus vannamei* in two salinities. Marine and Freshwater Behaviour and  
803 Physiology. 49(3): 201–211.

804 Gaona CAP, Poersch LH, Krummenauer D, Foes GK, Wasielesky Jr. W. 2011. The  
805 effect of solids removal on water quality, growth and survival of *Litopenaeus*

806 *vannamei* in a biofloc technology culture system. International Journal of  
807 Recirculating Aquaculture.12: 54-73.

808 Gaona CAP, Poersch LH, Krummenauer D, Foes GK, Wasielesky WJ. 2012. The effect  
809 of solids removal on water quality, growth and survival of *Litopenaeus*  
810 *vannamei* in a biofloc technology culture system. International Journal of  
811 Recirculating Aquaculture. 12: 54-73

812 Gaona CAP, Almeida MS, Viau V, Poersch LH, Wasielesky Jr. W. 2015. Effect of  
813 different total suspended solids levels on a *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)  
814 BFT culture system during biofloc formation. Aquaculture Research. 1–10.

815 Geets J, Cooman M, Wittebolle L, Heylen K, Vanparys B, Vos P, Verstraete W, Boon  
816 N. 2007. Real-time PCR assay for the simultaneous quantification of nitrifying  
817 and denitrifying bacteria in activated sludge. Applied and Environmental  
818 Microbiology. 75: 211-221.

819 Gieseke A, Bjerrum L, Wagner M, Amann R. 2003. Structure and activity of multiple  
820 nitrifying bacterial populations co-existing in a biofilm. Environmental  
821 Microbiology. 5(5): 355-369.

822 Golz, WJ. 1995. Biological Treatment in Recirculating Aquaculture Systems. In  
823 Recirculating Aquaculture in the Classroom: A Training Workshop for  
824 Agricultural Science Teachers, 6-7 December, Louisiana State University, Baton  
825 Rouge, 4p.

826 Gross A. 2004. Acute and chronic effects of nitrite on white shrimp, *Litopenaeus*  
827 *vannamei*, cultured in low-salinity brackish water. Journal of the aquaculture  
828 society. 35(3): 315-321.

829 Hargreaves JA, 2006. Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture.  
830 Aquacult. Eng. 34: 344–363.

831 Harms G, Layton AC, Dionisi HM, Gregory IR, Garrett VM, Hawkins SA, Robinson  
832 KG, Saylor GS. 2003. Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a  
833 municipal wastewater treatment plant. Environmental Science & Technology.  
834 37: 343-351.

835 Holl C, Ootshi C, Unabia C. 2011. Nitrifying biofilms critical for water quality in  
836 intensive shrimp RAS. Global Aquaculture Advocate. 14(1): 38-39.

837 Jiang LX, Pan LQ, Fang-Bo. 2005. Effect of dissolved oxygen on immune parameters  
838 of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish & Shellfish Immunology.  
839 18:185-188.

840 Jory EJ, Cabrera TR, Dugger DM, Fegan D, Lee PG, Lawrence AL , Jackson CJ,  
841 Mcintosh RP, Castañeda J. 2001. A global review of shrimp feed management:  
842 Status and perspectives. *Aquaculture*. 104-152.

843 Juretschko S. 2000. Mikrobielle Populations struktur und -dynamik in einer  
844 nitrifizierenden/denitrifizierenden. Belebtschlammanlage [Ph.D. thesis],  
845 Technische Universität München.

846 Kalthoff H, Fehr S, Sundermeyer H, Renwranz L, Bock E. 1979. A comparison by  
847 means of antisera and lectins of surface structures of *Nitrobacter winogradskyi*  
848 and *N. agilis*. *Current Microbiology*. 2:375–380.

849 Kinne O. 1976. Cultivation of marine organisms: water quality management and  
850 technology. *Marine ecology*. 3(1): 79-300.

851 Krummenauer D, Seifert CA, Poersch LH, Foes GK, Lara GR, Wasielesky Jr. W. 2012.  
852 Cultivo de camarões marinhos em sistema de bioflocos: análise do reuso de  
853 água. *Atlântica*. 34(2): 103-111.

854 Krummenauer D, Samocha T, Poersch L, Lara G, Wasielesky Jr. W. 2014. The Reuse  
855 of Water on the Culture of Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in BFT  
856 System. *Journal of the World Aquaculture Society*. 45(1): DOI:  
857 10.1111/jwas.12093.

858 Kuhn DD, Drahos DD, Marsh L, Flick Jr. GJ 2010. Evaluation of nitrifying bacteria  
859 product to improve nitrification efficacy in recirculating aquaculture systems.  
860 *Aquacultural Engineering*. 43: 78–82.

861 Lara GR. 2012. Técnicas de manejo aplicadas à redução das concentrações de nitrito na  
862 água de cultivo de *Litopenaeus vannamei* em sistema de bioflocos. Dissertação  
863 (Mestrado em Aquicultura). Programa de Pós-graduação em Aquicultura.  
864 Universidade Federal do Rio Grande (PPGAq-FURG). Rio Grande. 71p.  
865 Disponível em:  
866 <[http://www.aquicultura.furg.br/index.php/pt/producao/dissertacao/42-](http://www.aquicultura.furg.br/index.php/pt/producao/dissertacao/42-2012/232-gabriele-rodrigues-de-lara.html)  
867 [2012/232-gabriele-rodrigues-de-lara.html](http://www.aquicultura.furg.br/index.php/pt/producao/dissertacao/42-2012/232-gabriele-rodrigues-de-lara.html)>.

868 Lara G, Krummenauer D, Abreu PC, Poersch LH, Wasielesky Jr. W 2016. The use of  
869 different aerators on *Litopenaeus vannamei* biofloc culture system: effects on  
870 water quality, shrimp growth and biofloc composition. *Aquacult Int*. 24(3):18p.

871 Legarda EC. 2015. Berçário de camarão em sistema de bioflocos: Densidade de  
872 estocagem e substrato artificial. Dissertação (Mestrado em Aquicultura).  
873 Programa de Pós-graduação em Aquicultura. Universidade Federal de Santa

874 Catarina. Florianópolis. 61p. Disponível em: <  
875 <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/159863>>.

876 Limpiyakorn T, Shinohara Y, Kurisu F, Yagi O. 2005. Communities of ammonia-  
877 oxidizing bacteria in activated sludge of various sewage treatment plants in  
878 Tokyo. FEMS Microbiology Ecology. 54: 205-217.

879 Lin Y, Chen J. 2001. Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* (Boone)  
880 juveniles at different salinity levels. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 259: 109-119.

881 Lin YC, Chen JC. 2003. Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone)  
882 juveniles at different salinity levels. Aquaculture, 224: 193-201.

883 Madigan MT, Martinko J, Dunlap PV, Clark DP. 2010. Microbiologia de Brock. 12a  
884 edição. Porto Alegre: Artmed. 1160p.

885 Malone RF, Pfeiffer TJ. 2006. Rating fixed film nitrifying biofilters used in  
886 recirculating aquaculture systems. Aquacultural Engineering. 34: 389-402.

887 Martins TG, Clarisse O, Luciano VJ, Marcelo GMD, Wasielesky Jr. W. 2016. The  
888 contribution of diatoms to bioflocs lipid content and the performance of  
889 juvenile *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in a BFT culture system.  
890 Aquaculture Research. 47: 1315–1326.

891 Michaud L, Blancheton JP, Bruni V, Piedrahita R. 2006. Effect of particulate organic  
892 carbon on heterotrophic bacterial populations and nitrification efficiency in  
893 biological filters. Aquacultural Engineering. 34: 224-233.

894 Mobarry BK, Wagner M, Urbain V, Rittmann BE, Stahl DA. 1996. Phylogenetic probes  
895 for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. Applied  
896 and Environmental Microbiology. 62(6): 2156–2162.

897 Nielsen PH, Mielczarek AT, Kragelund C, Nielsen JL, Saunders AM, Kong Y, Hansen  
898 AA, Vollertsen J. 2010. A conceptual ecosystem model of microbial  
899 communities in enhanced biological phosphorus removal plants. Water  
900 Research. 44: 5070-5088.

901 Oliveira S, Wasielesky Jr. W, Ballester E, Abreu P. 2006. Caracterização da assembleia  
902 de nitrificantes pelo método “fluorescent *in situ* hybridization” (FISH) no  
903 biofilme e na água de larvicultura do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis*.  
904 Atlântica 28: 33-45.

905 Poersch LH, Santos MHS, Miranda KF, Wasielesky Jr W. 2007. Efeito agudo do  
906 nitrato sobre alevinos da tainha *Mugil platanus* (Pisces: Mugilidae). B. Inst.  
907 Pesca. 33(2): 247 – 252.

- 908 Ramesh M, Shankar K, Mohan C, Varghese T. 1999. Comparison of three plant  
909 substrate for enhancing carp growth through bacterial biofilm. *Aquacultural*  
910 *Engineering*. 19: 119-131.
- 911 Regnault M. 1987. Nitrogen excretion in marine and fresh-water Crustacea. *Biol. Rev.*  
912 62: 1-24.
- 913 Rodrigues CG. 2013. Cultivo multitrófico e multiespacial do camarão-da-amazônia e  
914 tilápia-do-nilo, com e sem o uso de substratos. Dissertação (Mestrado em  
915 Aquicultura). Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura.  
916 Jaboticabal. 71p. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/96670>>.
- 917 Rodrigues PCR. 2015. Pré-berçário de camarão branco do Pacífico: avaliação de  
918 substratos artificiais e densidades de estocagem. Dissertação (Mestrado em  
919 Aquicultura). Programa de Pós-graduação em Aquicultura. Universidade Federal  
920 de Santa Catarina - UFSC. Florianópolis. 79p. Disponível em:  
921 <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/158422>>.
- 922 Samocha TM, Patnaik S, Speed M, Ali AM, Burger JM, Almeida RV, Ayub Z,  
923 Harisanto M, Horowitz A, Brock DL. 2007. Use of molasses as carbon source in  
924 limited discharge nursery and grow-out systems for *Litopenaeus vannamei*.  
925 *Aquacultural Engineering*. 36: 184–191.
- 926 Schryver PD, Crab R, Defoirdt T, Boon N, Verstraete W. 2008. The basics of bioflocs  
927 technology: The added value for aquaculture. *Aquaculture*. 277: 125–137.
- 928 Schweitzer R, Arantes R, Baloi MF, Costódio PFS, Vinatea L, Seiffert WQ, Andreatta  
929 ER. 2013. Use of artificial substrates in the culture of *Litopenaeus vannamei*  
930 (Biofloc System) at different stocking densities: Effects on microbial activity,  
931 water quality and production rates. *Aquacultural Engineering*. 54: 93– 103.
- 932 Serra FP, Gaona CAP, Furtado PS, Poersch LH, Wasielesky Jr. W. 2015. Use of  
933 different carbon sources for the biofloc system adopted during the nursery and  
934 grow-out culture of *Litopenaeus vannamei*. *Aquacult. Int.* 23(6): 1325–1339.
- 935 Silva KR, Wasielesky Jr. W, Abreu PC. 2013. Nitrogen and phosphorus dynamics in the  
936 biofloc production of the pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of*  
937 *the World Aquaculture Society*. 44(1): 30–41.
- 938 Smith AJ, Hoare DS. 1968. Acetate Assimilation by *Nitrobacter agilis* in Relation to Its  
939 “Obligate Autotrophy.” *Journal of Bacteriology*. 95(3): 844–855.
- 940 Souza DM, Borges VD, Furtado P, Romano LA, Wasielesky Jr. W, Monserrat JM,  
941 Garcia LO. 2016. Antioxidant enzyme activities and immunological system

942 analysis of *Litopenaeus vannamei* reared in biofloc technology (BFT) at  
943 different water temperatures. Aquaculture. Doi:  
944 10.1016/j.aquaculture.2015.10.006.

945 Sokal RR, Rohlf FJ. 1969. Biometry. Principle and practices of statistics in biological  
946 research. W. H. Freeman & Co. 776p.

947 Strickland JDH, Parsons TR. 1972. A practical handbook of seawater analysis. 2a  
948 edição. Fisheries research board of Canada: Bulletin 167.

949 Tahon JP, Van Hoof D, Vinckier C, Witters R, Ley M, Lonhe R. 1988. The reaction of  
950 nitrite with the haemocyanin of *Astacus leptodactylus*. Biochem. J. 249: 891-  
951 896.

952 Tundisi JG, Tundisi TM. 2008. Limnologia. Oficina de Textos. 632p.

953 Umesh N, Shankar K, Mohan C. 1999. Enhancing growth of common carp, rohu and  
954 Mozambique tilapia through plant substrate: the role of bacterial biofilm.  
955 Aquaculture International. 7: 251-260.

956 UNESCO 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring.  
957 Manual and Guides 12, Intergovernmental Oceanographic Commission. Paris,  
958 France.

959 Utermöhl H. 1958. Zur vervollkommung der quantitativen phytoplankton metthodik. Int.  
960 Ver. Theor. Angew. Limnology. 9: 1-38.

961 Van Wyk P, Scarpa J. 1999. Water Quality and Management. In: Van WYK, P *et al.*  
962 (Eds.), Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems. Florida  
963 Department of Agriculture and Consumer Services, Tallahassee, cap 8: 141-161.

964 Vinatea L, Gálvez AO, Browdy CL, Stokes A, Venero J, Veman JHA, Lewis BL,  
965 Lawson A, Schuler A, Leffler JW. 2010. Photosynthesis, water respiration and  
966 growth performance of *Litopenaeus vannamei* in a super-intensive raceway  
967 culture with zero water exchange: Interaction of water quality variables.  
968 Aquacult. Eng. 42: 17-24.

969 Yapsakli K, Aliyazicioglu C, Mertoglu B. 2011. Identification and quantitative  
970 evaluation of nitrogen-converting organisms in a full-scale leachate treatment  
971 plan. Journal of Environmental Management. 92: 714-723.

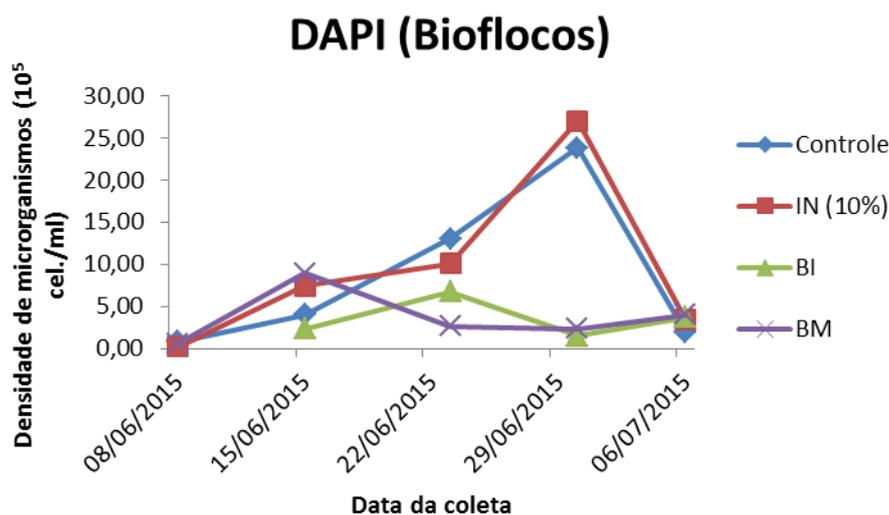
972 Yokokawa T, Nagata T. 2005. Growth and Grazing Mortality Rates of Phylogenetic  
973 Groups of Bacterioplankton in Coastal Marine Environments. Applied and  
974 Environmental Microbiology. 71(11): 6799–6807.

- 975 Wagner M, Rath G, Koops HP, Flood J, Amann R. 1996. *In situ* analysis of nitrifying  
976 bacteria in sewage treatment plants. *Water Sci. Tech.* 34(1-2): 237–244.
- 977 Watson SW, Bock E, Valois FW, Waterbury JB, Schlosser U. 1986. *Nitrospira marina*  
978 gen. nov. sp. nov.: a chemolitho- trophic nitrite-oxidizing bacterium. *Arch*  
979 *Microbiol.* 144 (1): 1–7.
- 980 Watson SW, Waterbury JB. 1971. Characteristics of two marine nitrite oxidizing  
981 bacteria *Nitrospina gracilis* nov. ten. nov. sp. and *Nitrococcus mobilis* nov. ten.  
982 nov. sp.\**Arch Mikrobiol.* 77: 203-230.
- 983 Zar JH. 2010. *Biostatistical Analysis*. Upper Saddle River: Prentice Hall.
- 984 Zhang K, Pan L, Chen W, Wang C. 2015. Effect of using sodium bicarbonate to adjust  
985 the pH to different levels on water quality, the growth and the immune response  
986 of shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in zero-water exchange biofloc-based  
987 culture tanks. *Aquaculture Research*. 1–15.
- 988 Zhu S, Chen S. 2001. Effects of organic carbon on nitrification rate in fixed film  
989 biofilters. *Aquacultural Engineering*. 25: 1–11.
- 990 Zwirgmaier K. 2005. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) – The next generation.  
991 *FEMS Microbiology Letters*. 246: 151-158.

992

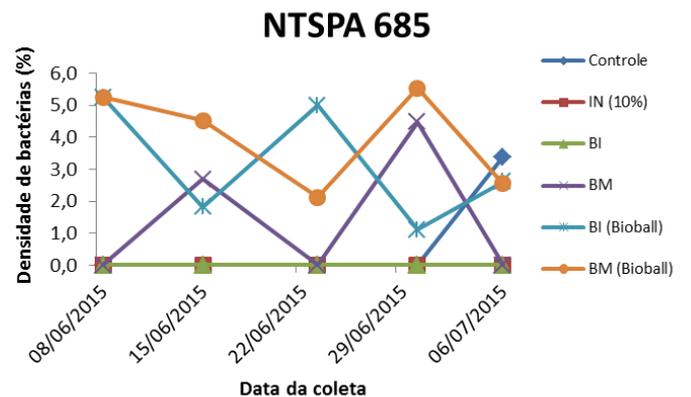
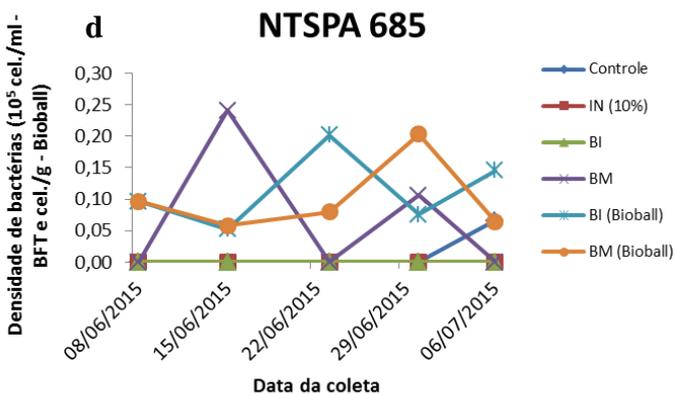
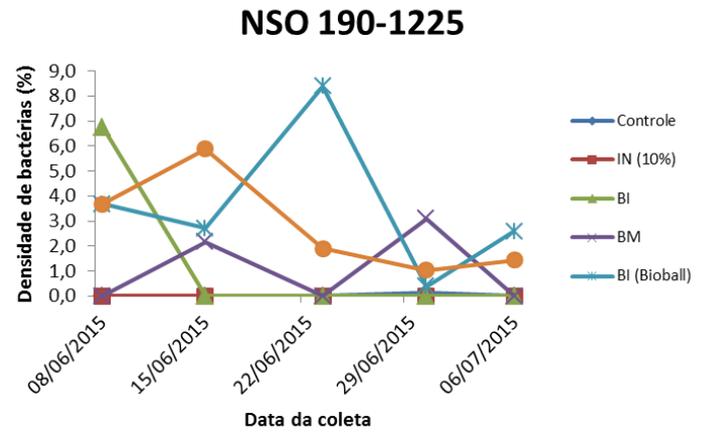
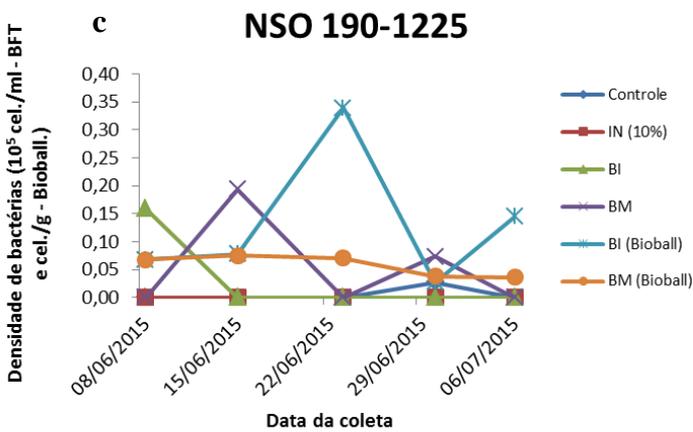
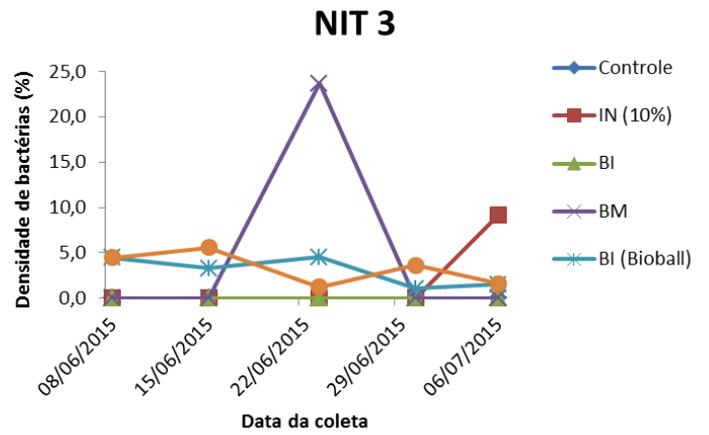
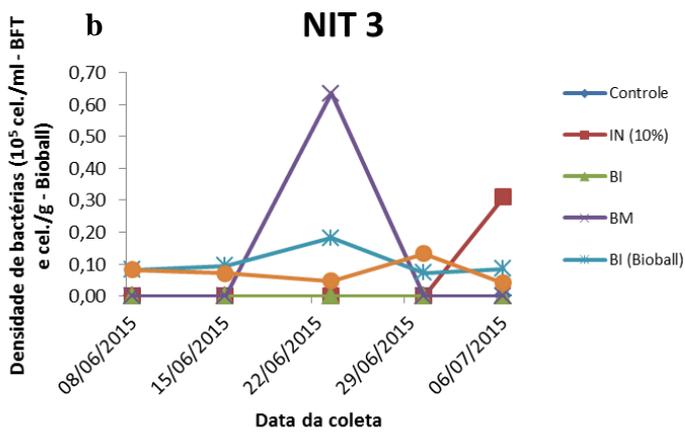
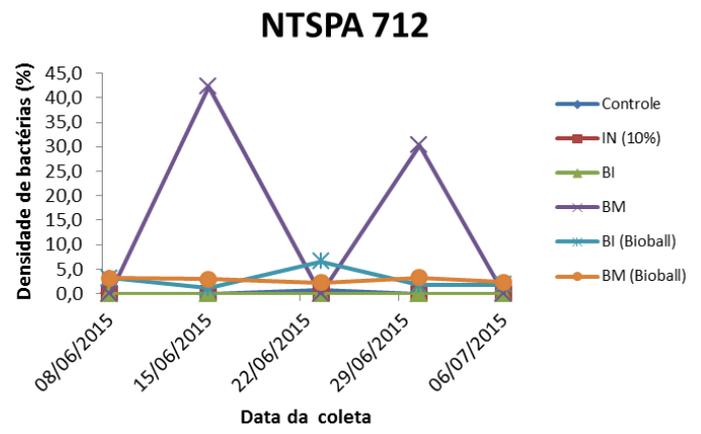
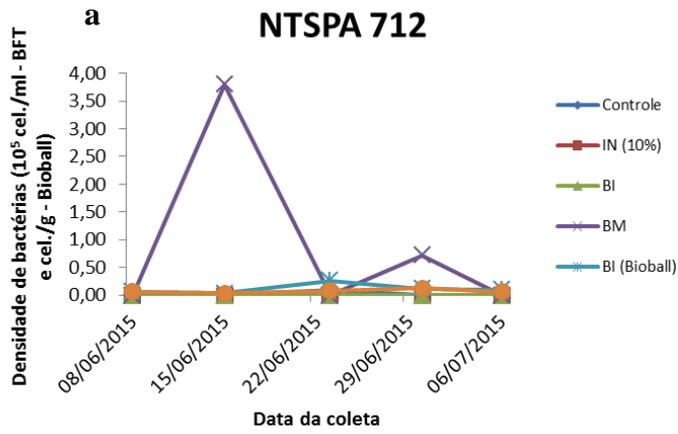
## ANEXOS

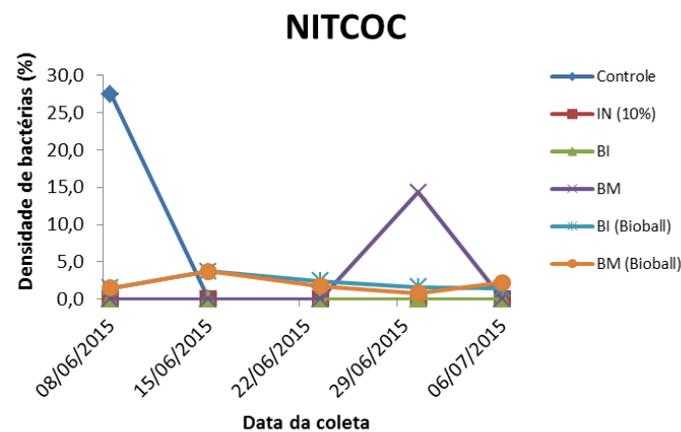
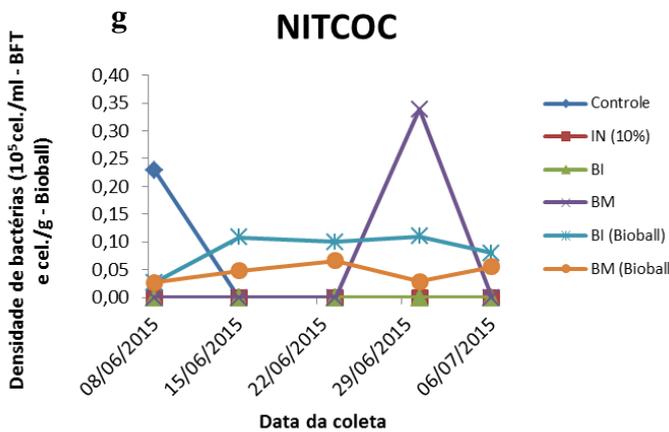
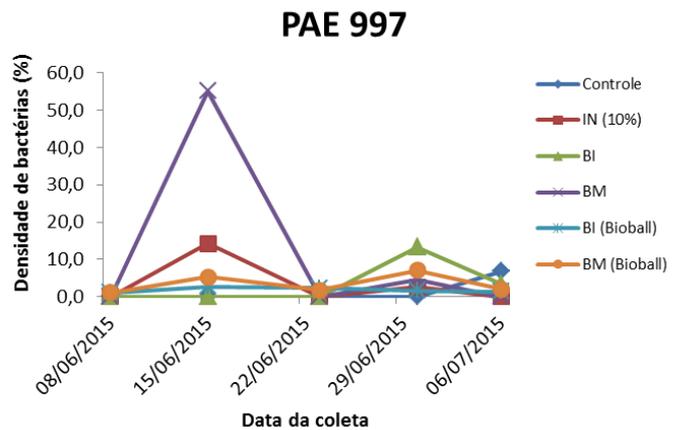
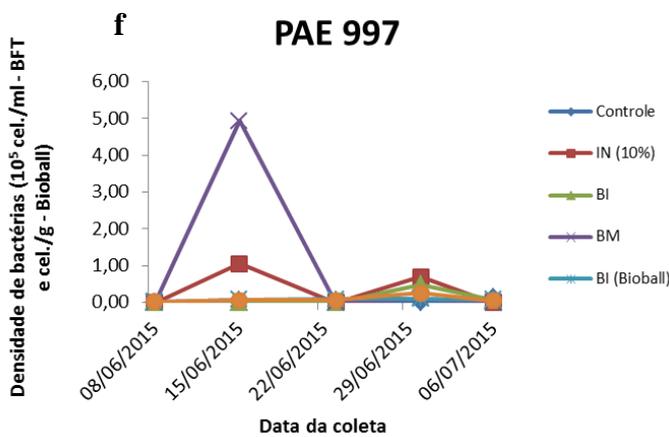
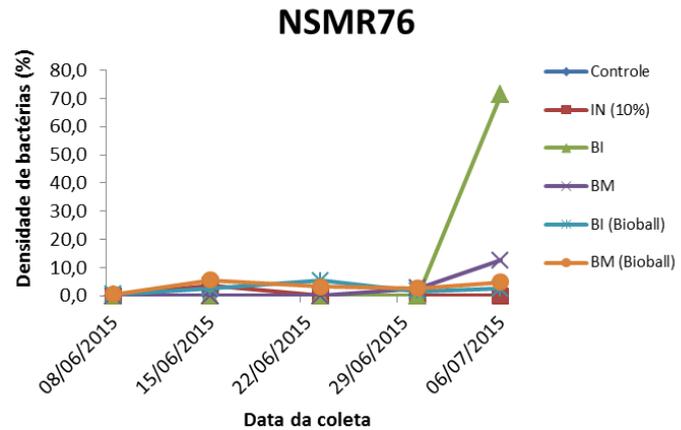
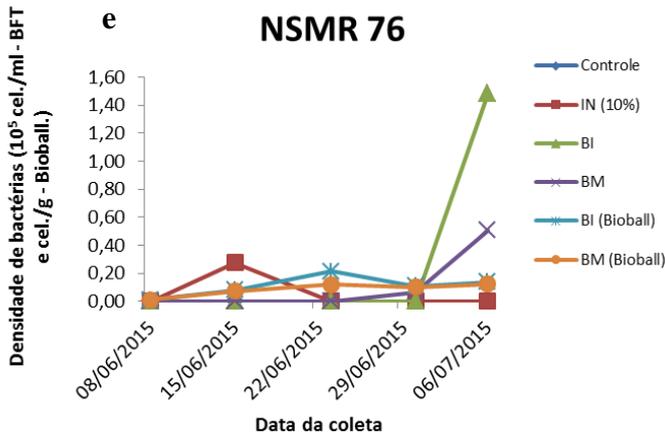
993 ANEXO A – Densidade de microrganismos ( $10^5$  cel./ml) detectados no bioflocos dos  
994 tratamentos **Controle:** Água clara onde foram formados os bioflocos; **IN (10%):** Água  
995 clara com inóculo de bioflocos (10%); **BI:** Água clara com substrato (“bioballs”  
996 imaturos); **BM:** Água clara com inóculo de “bioballs” maduros, ao longo dos 28 dias de  
997 experimento com *L. vannamei*.



998

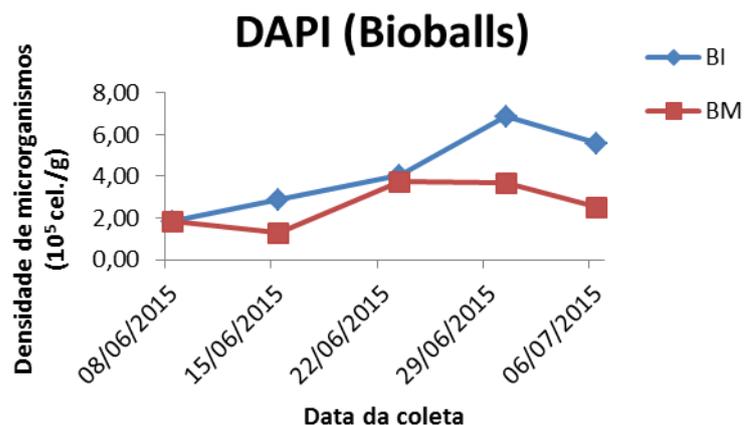
999 ANEXO B – Densidade de bactérias, representadas em  $10^5$  cel./ml – BFT,  $10^5$  cel./g –  
1000 Bioball e porcentagem (%), detectadas pelas sondas NTSPA 712 – *Phylum Nitrospira*  
1001 (a), NIT 3- *Nitrobacter spp* (b), NSO 190-1225 – *Nitrosomonadales* (c), NTSPA 685 –  
1002 *Nitrospira mascoviensis*, *N. marina* (d), NSMR 76 – *Nitrosomonas marina like* (e),  
1003 PAE 997 – *Pseudomonas spp* (f) e NITCOC – *Nitrococcus mobilis* (g) nos tratamentos  
1004 **Controle:** Água clara onde foram formados os bioflocos; **IN (10%):** Água clara com  
1005 inóculo de bioflocos (10%); **BI:** Água clara com substrato (“bioballs” imaturos); **BM:**  
1006 Água clara com inóculo de “bioballs” maduros, ao longo dos 28 dias de experimento  
1007 com *L. vannamei*.





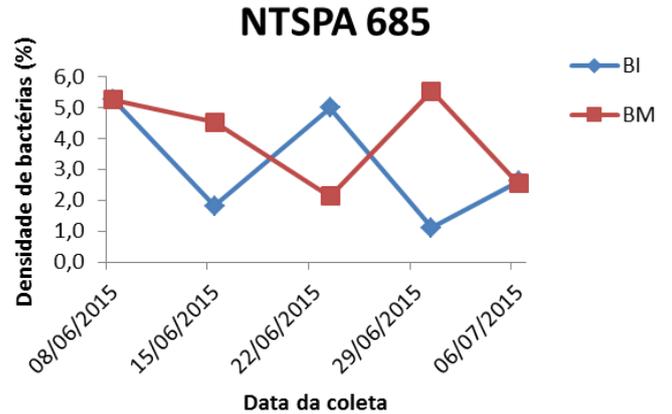
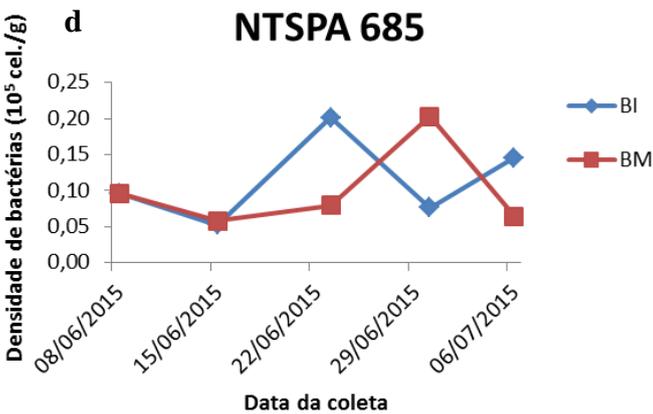
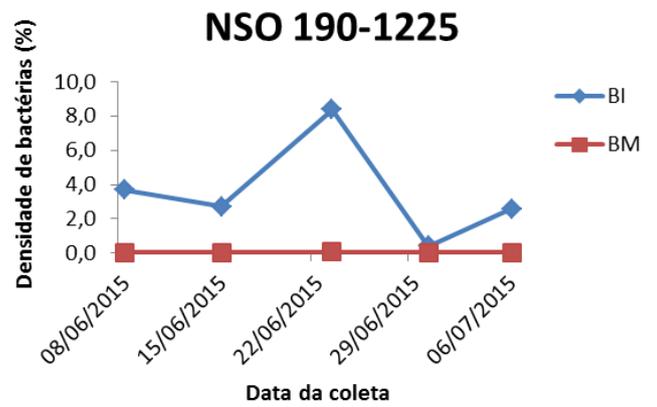
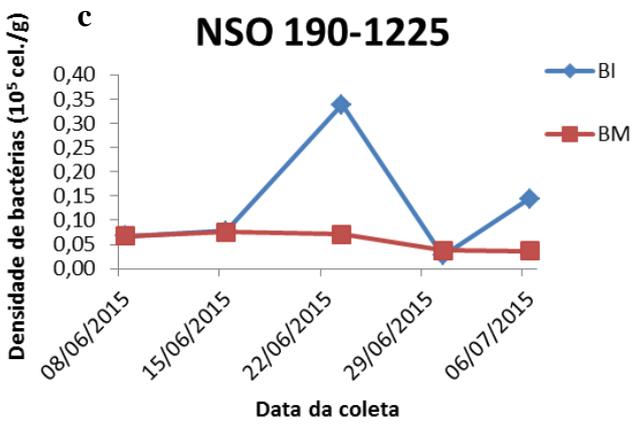
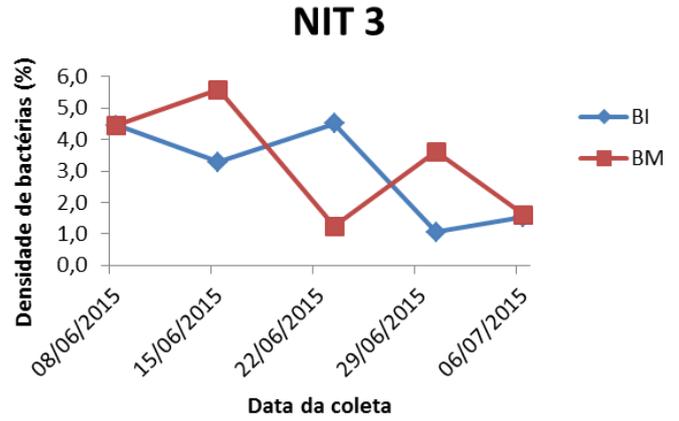
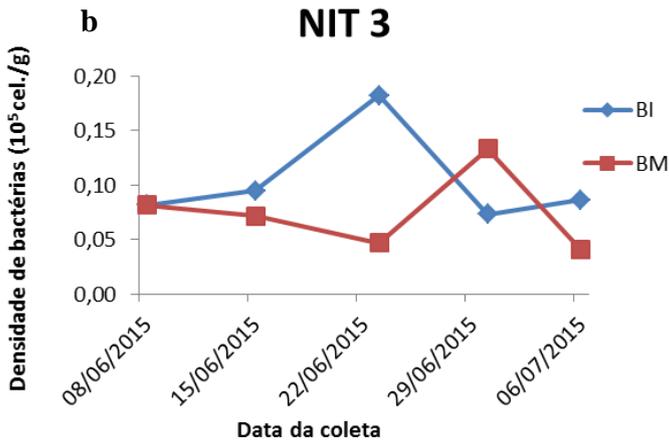
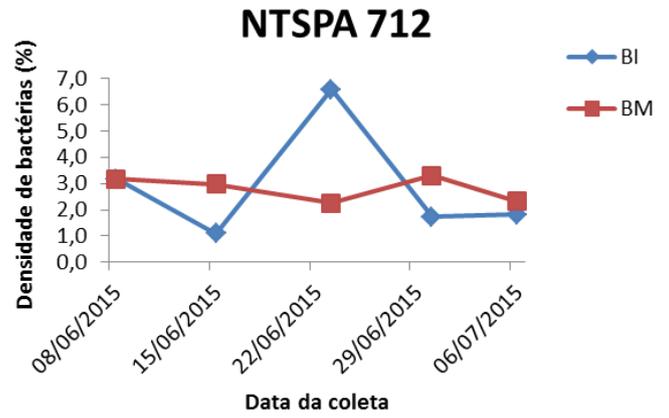
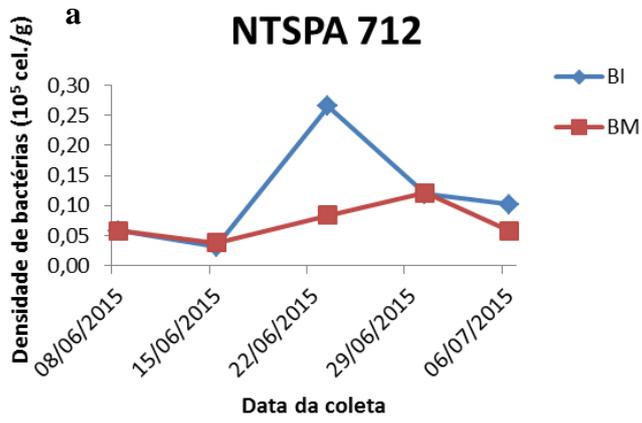
1009

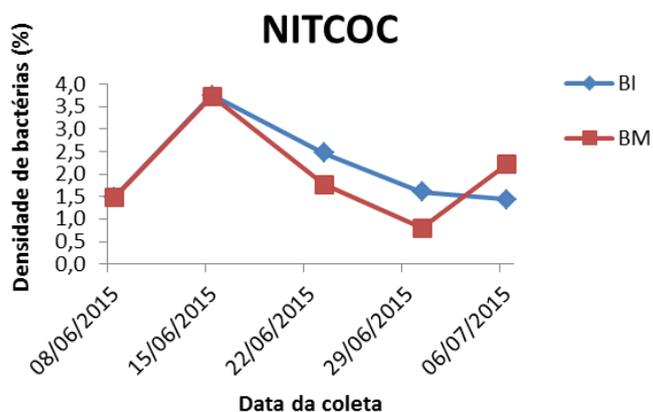
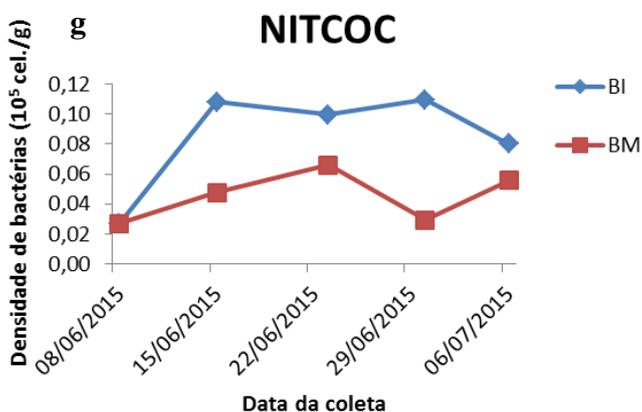
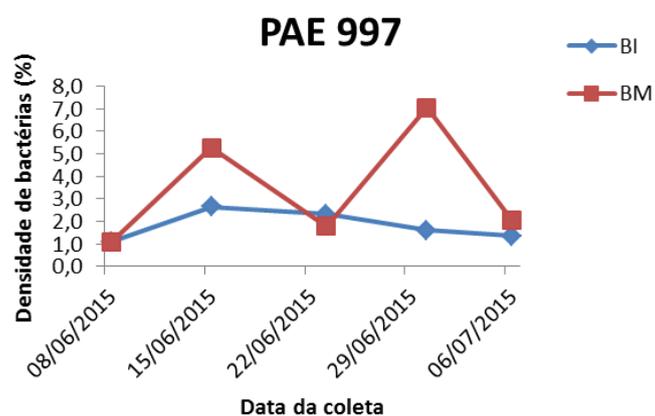
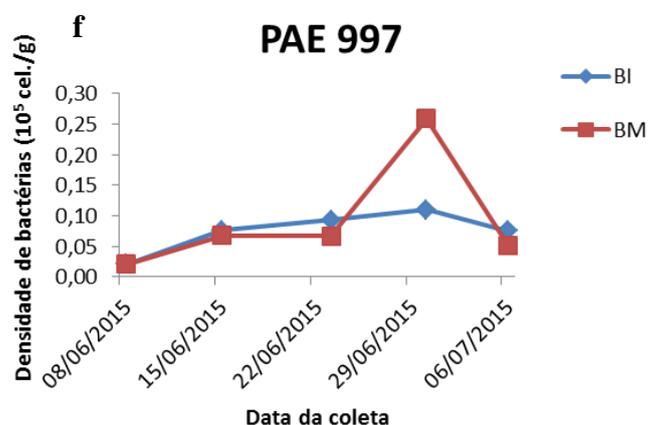
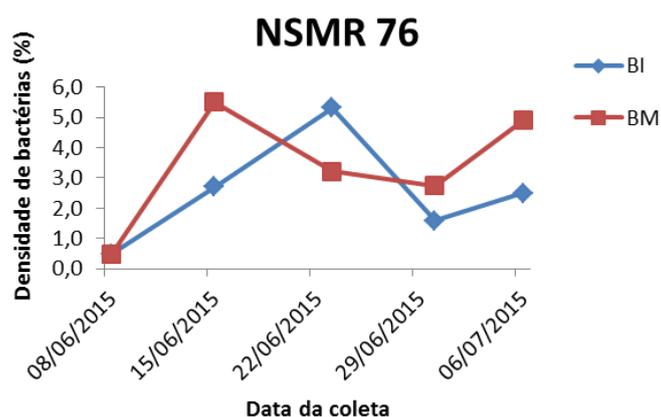
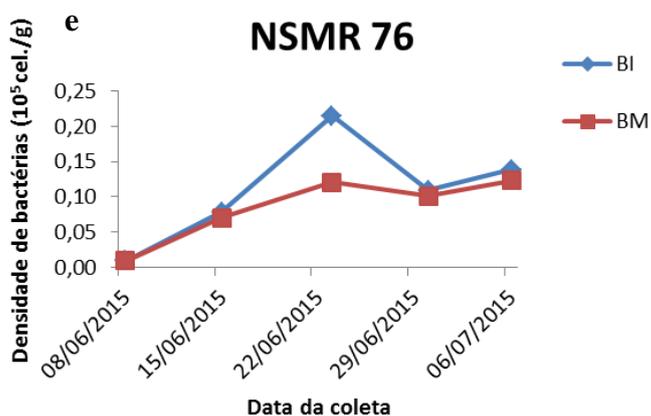
1010 ANEXO C – Densidade de microrganismos ( $10^5$  cel./g) detectados na parte externa dos  
 1011 “bioballs” dos tratamentos **BI**: Água clara com substrato (“bioballs” imaturos) e **BM**:  
 1012 Água clara com inóculo de “bioballs” maduros, ao longo dos 28 dias de experimento  
 1013 com *L.vannamei*.



1014

1015 ANEXO D – Densidade de bactérias, representadas em 10<sup>5</sup> cel./g e porcentagem (%)  
 1016 respectivamente, detectadas pelas sondas NTSPA 712 – *Phylum Nitrospira* (a), NIT 3-  
 1017 *Nitrobacter spp* (b), NSO 190-1225 – *Nitrosomonadales* (c), NTSPA 685 – *Nitrospira*  
 1018 *mascoviensis*, *N. marina* (d), NSMR 76 – *Nitrosomonas marina like* (e), PAE 997 –  
 1019 *Pseudomonas spp* (f) e NITCOC – *Nitrococcus mobilis* (g) na parte externa dos  
 1020 “bioballs” dos tratamentos **BI**: Água clara com substrato (“bioballs” imaturos) e **BM**:  
 1021 Água clara com inóculo de “bioballs” maduros, ao longo dos 28 dias de experimento  
 1022 com o *L. vannamei*.

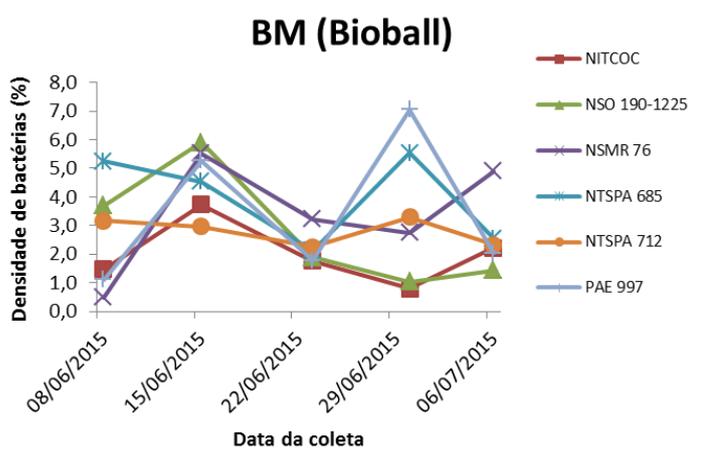
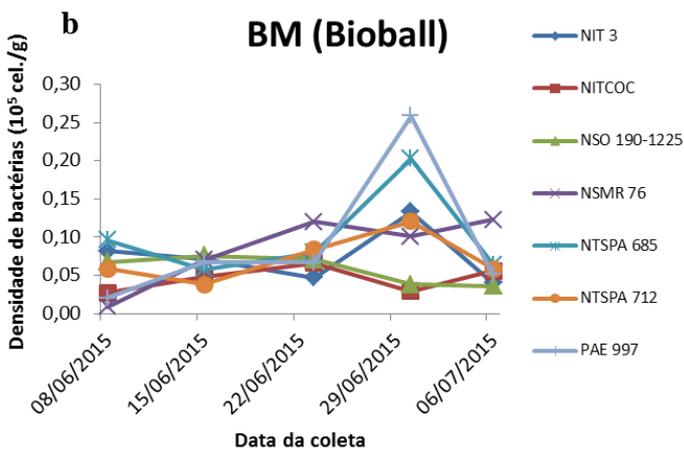
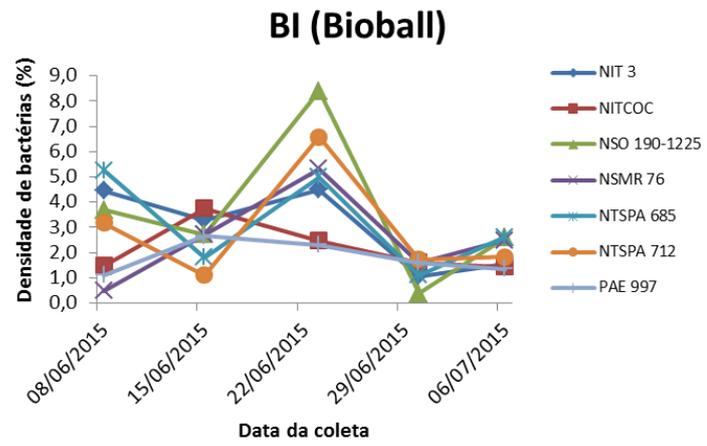
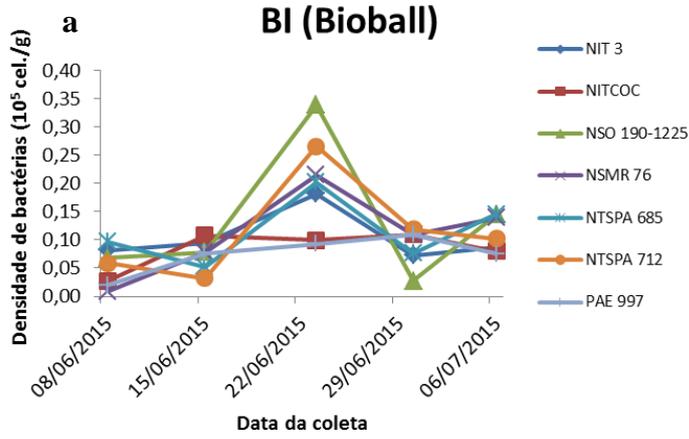




1024

1025 ANEXO E – Total de bactérias, representadas em 10<sup>5</sup> cel./g e porcentagem (%)  
 1026 respectivamente, detectadas pelas sondas NTSPA 712 – *Phylum Nitrospira*, NIT 3-  
 1027 *Nitrobacter spp*, NSO 190-1225 – *Nitrosomonadales*, NTSPA 685 – *Nitrospira*  
 1028 *mascoviensis*, *N. marina*, NSMR 76 – *Nitrosomonas marina like*, PAE 997 –  
 1029 *Pseudomonas spp* e NITCOC – *Nitrococcus mobilis* na parte externa dos “bioballs” dos  
 1030 tratamentos **BI**: Água clara com substrato (“bioballs” imaturos) - a e **BM**: Água clara

1031 com inóculo de “bioballs” maduros - b, ao longo dos 28 dias de experimento com o  
 1032 *L.vannamei*.



1033