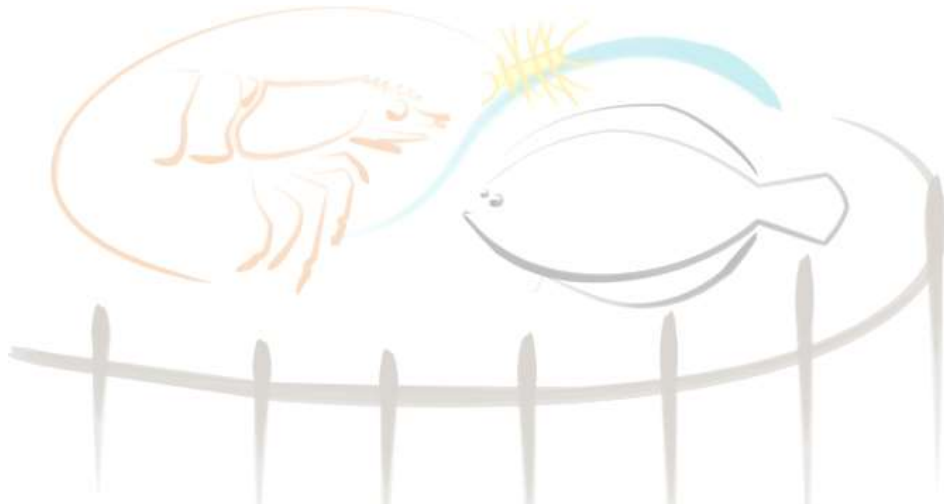




UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA



**EFEITO DA FERTILIZAÇÃO ORGÂNICA NA NITRIFICAÇÃO, PRODUÇÃO
DE SÓLIDOS E USO DE ÁGUA EM SISTEMA BFT**

Hellyjúnyor Brandão Pereira

Rio Grande – RS

2018

Universidade Federal do Rio Grande
Instituto de Oceanografia

**EFEITO DA FERTILIZAÇÃO ORGÂNICA NA NITRIFICAÇÃO, PRODUÇÃO
DE SÓLIDOS E USO DE ÁGUA EM SISTEMA BFT**

Aluno: Hellyúnyor Brandão Pereira
Orientador: Prof. Dr. Wilson Wasielesky Jr.
Co-orientador: Prof. Dr. Dariano Krummenauer

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Aquicultura do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande.

Rio Grande, RS
Fevereiro de 2018

Índice

| | |
|--|------------|
| Dedicatória..... | IV |
| Agradecimentos..... | V |
| RESUMO GERAL | VI |
| GENERAL ABSTRACT | VII |
| | |
| INTRODUÇÃO GERAL..... | 8 |
| OBJETIVOS..... | 12 |
| Objetivo geral..... | 12 |
| Objetivos Específicos..... | 12 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 13 |
| | |
| CAPÍTULO I: Sistema de bioflocos heterotrófico versus misto: impactos no uso de água, produção de sólidos suspensos e desempenho zootécnico do <i>Litopenaeus vannamei</i>..... | 17 |
| Resumo..... | 18 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 27 |
| | |
| CAPÍTULO II: Effects of C/N ratio on nitrifying and heterotrophic bacteria composition and zootechnical performance of <i>Litopenaeus vannamei</i> reared in BFT system..... | 30 |
| Abstract | 31 |
| Introduction | 34 |
| <i>Material and Methods</i> | 35 |
| <i>Water quality</i> | 36 |
| <i>Feeding and monitoring</i> | 36 |
| <i>Fluorescent in situ Hybridization</i> | 37 |
| <i>Statistical Analysis</i> | 39 |
| Results | 39 |
| Discussion | 43 |
| References | 46 |
| | |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS | 51 |

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha mãe, pilar da minha vida.

Agradecimentos

A Deus, palavra nenhuma é suficiente para agradecer o que tem feito na minha vida. Só me resta sempre agradecer.

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

Ao meu orientador, professor Dr. Wilson Wasielesky, por aceitar a função de orientação, por toda a orientação, conhecimento e suporte concedidos durante o mestrado, e principalmente, pela paciência e disponibilidade. Muito obrigado!

À professora Dr. Dionéia Cesar pela recepção em Juiz de Fora, todo o conhecimento, disponibilidade e esforços oferecidos. Muito obrigado!

Ao meu co-orientador, prof. Dr. Dariano Krummenauer.

À minha família, por sempre me apoiar as minhas decisões, mesmo quando essas me levam a milhares de quilômetros de distância de casa. Ivone, Hélio, Brunyelly, Hanany e Júlio, amo vocês.

Ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da FURG e a todo o corpo docente.

Aos integrantes do Projeto Camarão e a todos os colegas e amigos do PPGAq, que compartilharam comigo essa caminhada.

Obrigado.

RESUMO GERAL

O sistema de bioflocos caracteriza-se pela utilização de bactérias para a remoção de compostos nitrogenados da água: bactérias heterotróficas e quimioautotróficas. Dessa maneira, diferentes técnicas podem ser utilizadas para a formação e manutenção dos bioflocos. O primeiro experimento teve o objetivo de analisar técnicas de formação dos bioflocos e seus efeitos no uso de água, na produção de sólidos e no desempenho zootécnico do *Litopenaeus vannamei*. Três tratamentos foram testados: sem fertilização orgânica suplementar, fertilização de acordo com a leitura nominal de amônia (quimioautotrófico) e fertilização de acordo com a produção estimada de amônia (heterotrófico). Os parâmetros de qualidade de água foram afetados pelos tratamentos. Houve diferenças significativas nos parâmetros zootécnicos, com melhores valores encontrados no tratamento misto. O volume total de água utilizado apresentou valores mais baixos no tratamento misto, enquanto os sólidos removidos foram quase quatro vezes maiores no tratamento heterotrófico em comparação com os demais. Estes resultados mostraram a importância de adotar um sistema de bioflocos misto heterotrófico / quimioautotrófico para otimizar o uso da água e diminuir a produção de sólidos. Porém, sabe-se que a relação carbono/nitrogênio pode influenciar no estabelecimento do processo de nitrificação e influenciar na produção de sólidos. Um segundo experimento foi realizado com o objetivo de verificar o efeito da relação C/N na composição de bactérias heterotróficas e nitrificantes e no desempenho zootécnico *L. vannamei*. Quatro tratamentos (n = 3) foram testados usando as seguintes relações C/N: 7,5/1, 10/1, 12,5/1 e 15/1. Parâmetros de água foram monitorados. Amostras de água foram coletadas para detectar o crescimento populacional de bactérias pela técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH). Apenas a amônia se diferenciou entre os tratamentos. A nitrificação foi afetada na maior relação, embora não houve diferenças na composição bacteriana. Os volumes totais de água utilizados e os sólidos removidos (estimados) apresentaram valores mais baixos nos tratamentos 10/1 e 12,5/1. Os resultados mostraram a importância de reduzir a quantidade de carbono para diminuir os sólidos suspensos totais no sistema BFT.

Palavras-chave: nitrificação; fertilização orgânica; hibridização fluorescente *in situ*; bactéria

GENERAL ABSTRACT

The Biofloc Technology System is characterized by the use of bacteria to remove nitrogenous compounds from water: heterotrophic and quimioautotrophic bacteria. In this way, different techniques can be used to form and maintain the bioflocs, depending on which group of microorganisms the predominance is desired. The first experiment aimed to analyze the effect of bioflocs formation techniques on the zootechnical performance of *Litopenaeus vannamei*, water use and solids production. A trial was carried out using different floc formation techniques: without supplemental organic fertilization, fertilization according to the nominal ammonia level (chemoautotrophic) and fertilization according to the estimated ammonia production (heterotrophic). The water quality parameters were affected by the treatments. There were significant differences in the zootechnical parameters with better values found in the mixed treatment. The total volume of water used presented lower values in the mixed treatment, while the solids removed were almost four times higher in the heterotrophic treatment in comparison with the others. These results showed the importance of adopting a heterotrophic / chemoautotrophic mixed biofloc system to optimize water use and decrease solids production. However, it is known that Carbon/Nitrogen ratio can influence the establishment of the nitrification process and influence the production of solids in a mixed system. A second experiment was then carried out, adopting a mixed system testing different carbon / nitrogen ratios. The aim of the study was to verify the effect of the C/N ratio on composition of heterotrophic and nitrifying bacteria and on the zootechnical performance of *L. vannamei*. Four treatments (n = 3) were tested using the following C/N ratios: 7.5/1, 10/1, 12.5/1 and 15/1. Water parameters were monitored. Water samples were collected to detect the bacterial population growth by *in situ* fluorescence (FISH) technique. Only ammonia differed between treatments. Nitrification was affected in the highest ratio, although there were no differences in bacterial composition. The total volumes of water used and the solids removed (estimated) presented lower values in the treatments with intermediate fertilization. The results showed the importance of reducing the amount of carbon to decrease total suspended solids in the BFT system.

Key words: nitrification; organic fertilization; fluorescent *in situ* hybridization; bacteria

INTRODUÇÃO GERAL

O sistema de bioflocos (BFT - em inglês, Biofloc Technology System) é considerado uma das tecnologias mais promissoras na produção superintensiva de organismos aquáticos, apresentando diversas vantagens em relação aos sistemas convencionais. Dentre essas vantagens destacam-se o uso de densidades de estocagem elevadas, alta produtividade, redução do consumo de água devido à ausência ou pouca renovação de água, reutilização de água, além de promover um aumento da biossegurança do cultivo e a presença de grande comunidade microbiana, atuando como fonte adicional de alimentos e na saúde dos organismos (Avnimelech 2007; Ballester et al. 2010; Crab et al. 2010; De Schryver et al. 2008; Moss et al. 2012; Wasielesky et al. 2006).

Devido às altas densidades de estocagem utilizadas no BFT e à exigência de alta concentração de proteína na dieta dos camarões, há um aumento na quantidade de amônia excretada pelos animais e pela degradação de alimentos e matéria orgânica, o que poderia levar à deterioração da qualidade da água. Segundo Ebeling et al. (2006), A metabolização do nitrogênio presente na água em cultivos pode ocorrer através de três caminhos:

- Via fotoautotrófica: organismos fotossintetizantes removem o nitrogênio da água transformando-o em biomassa de algas; essa via costuma ser predominante em sistemas convencionais, porém apresenta desvantagens como altas flutuações de parâmetros como pH, oxigênio dissolvido e densidade algal. Além disso, *die-offs* das microalgas podem ocorrer influenciado por fatores externos como luminosidade e temperatura, o que levaria a um aumento repentino das concentrações de amônia e matéria orgânica;
- Via quimioautotrófica: grupos quimioautotróficos realizam o processo de nitrificação além de incorporá-lo em sua biomassa; nesses casos, a demanda por alcalinidade (carbono inorgânico) é maior, e, dependendo do tipo de sistema, como em sistema de recirculação de água (RAS), esses microrganismos podem ser removidos facilmente da água;
- E a via heterotrófica, onde as bactérias utilizam o carbono orgânico como fonte de energia para incorporar o nitrogênio na biomassa em forma de proteína. Em sistemas onde se predomina essa via, observa-se elevada biomassa bacteriana, demanda por oxigênio e produção de gás carbônico.

A partir dessas vias, o BFT se caracteriza por promover o desenvolvimento de uma comunidade de microrganismos que visa controlar compostos de nitrogênio na água. Na maioria dos casos, o desenvolvimento de uma comunidade bacteriana predominantemente heterotrófica é promovido ajustando a relação carbono / nitrogênio da água e incorporando carbono orgânico suplementar a partir de fertilizantes ricos em carbono orgânicos, como por exemplo, o melaço de cana. Esta incorporação de carbono orgânico é geralmente feita para ajustar a relação C/N a valores entre 15 e 20/1 (Avnimelech, 1999), mas o BFT também pode ser desenvolvido utilizando-se as vias fotoautotróficas e quimioautotróficas.

A predominância da via heterotrófica no sistema de bioflocos pode gerar excesso de biomassa bacteriana e causar vários problemas, como aumentar a demanda de oxigênio, produção de CO₂ e a concentração de sólidos suspensos totais (Ebeling et al., 2006; Gaona et al., 2011), levando a alterações da qualidade da água que poderiam afetar o desempenho zootécnico dos camarões. Dessa maneira, a nitrificação vem se tornando um importante processo dentro do estabelecimento do sistema de bioflocos para realizar o controle dos compostos nitrogenados e reduzir a quantidade de sólidos suspensos produzidos.

A nitrificação ocorre pela atividade de bactérias que oxidam a amônia, proveniente da excreção dos animais e decomposição da matéria orgânica, em nitrito e depois em nitrato, a forma do nitrogênio mais oxidada (Prosser, 1990). A primeira etapa desse processo, chamada de nitritificação, é a oxidação da amônia a nitrito, realizada por bactérias oxidadoras de amônia (AOB – ammonia oxidizing bacteria), sendo os gêneros *Nitrospira*, *Nitrococcus* e *Nitrosomonas* os mais conhecidos (Hagopian & Riley, 1998). A oxidação da amônia também é realizada por outro grupo de microrganismos, as arqueias, do grupo de arqueias oxidadoras de amônia (Francis et al., 2005).

A segunda etapa do processo de nitrificação, chamada de nitratação, é a oxidação do nitrito em nitrato, sendo este o produto final. Essa etapa é realizada por bactérias conhecidas como bactérias oxidadoras de nitrito (NOB – nitrite oxidizing bacteria). O nitrato é o produto nitrogenado menos tóxico, e se acumula no sistema, sendo necessário realizar processo de remoção desse composto através de biofiltros denitrificantes, renovação de água ou recuperação de nutriente por organismos

fotossintetizantes. Sabe-se que que microrganismos heterotróficos também podem realizar a nitrificação e desnitrificação (Prosser, 1990; Rijn, 2006). Kim et al (2000; 2005) relataram a presença de nitrificação realizada por cepas de bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Vibrio*.

O processo de nitrificação é dependente de diversos fatores, como as concentrações de amônia e nitrito, oxigênio dissolvido, temperatura, pH, alcalinidade, carbono orgânico e inorgânico. Ademais, a relação carbono/nitrogênio é um fator muito importante nas taxas de nitrificação (Ebeling et al, 2006).

Dessa forma, alguns estudos sugerem que um sistema de bioflocos misto dominado por microalgas e bactérias autotróficas pode gerar mais benefícios para o desempenho dos camarões, além de reduzir os custos de fertilização orgânica (Xu et al., 2016). Godoy et al., (2012) mostraram que a presença de diatomáceas em sistema de BFT pode ser benéfico para o desenvolvimento dos animais cultivados. Outros pesquisadores apontam que o sistema misto heterotrófico / quimioautotrófico é a melhor alternativa em detrimento de um sistema predominantemente heterotrófico (Arantes et al., 2017). Apesar disso, todas as rotas de remoção estão presentes em um sistema de cultivo e atuam em diferentes níveis e períodos (Ebeling, 2006), mas as vias quimioautotróficas e heterotróficas parecem ter mais importância no BFT.

De uma forma geral, se estabelecem dois tipos de sistema de bioflocos: predominantemente heterotrófico, onde o controle de nitrogenados é realizado principalmente por bactérias heterotróficas durante todo o ciclo; e sistema misto (heterotrófico/quimioautotrófico), onde o controle de nitrogenados é realizado, a longo prazo, principalmente por bactérias nitrificantes, enquanto as bactérias heterotróficas têm função importante no início do ciclo. Assim, são necessários estudos que esclarecem qual tipo de sistema BFT é mais eficiente quanto ao uso de água, produção de sólidos e desempenho dos camarões.

Outro fator importante na produção de sólidos é a relação carbono/nitrogênio do sistema que pode afetar a disponibilidade de carbono orgânico e conseqüentemente a geração de biomassa bacteriana. É necessário realizar mais estudos sobre a formação, composição, desenvolvimento e funcionamento de comunidades bacterianas em sistemas de bioflocos e sua conexão concreta com a manipulação da relação C/N, sendo estes essenciais para caracterizar as comunidades bacterianas. É necessário avaliar a relação entre taxas de fertilização orgânica e o desenvolvimento de comunidades

microbianas, bem como caracterizá-las a fim de promover o uso mais eficiente e reduzir o volume de sólidos suspensos totais produzidos.

Diferentes técnicas são usadas para descrever uma comunidade bacteriana, como técnicas de coloração, método de filtração de membrana ou cultura de colônias bacterianas (Gregersen, 1978; Busse, 1996). Embora amplamente utilizadas, essas podem não ser muito eficientes, porque se baseiam no cultivo de bactérias e nem todas são cultiváveis. Técnicas moleculares, como eletroforese, PCR, metagenômica, entre outras, vêm ganhando destaque nos últimos tempos (Hovda, 2007; Martins, 2013), devido ao alto desempenho, precisão e velocidade, embora algumas delas ainda sejam muito caras. Esses procedimentos tornam possível detalhar as comunidades bacterianas presentes na água de cultivo, nos organismos cultivados e até mesmo detectar a presença de microrganismos patogênicos ou probióticos (Alavandi and Poornima, 2012; Xiong et al., 2015).

A FISH (Hibridização fluorescente *in situ*) é uma técnica molecular que utiliza sondas fluorescentes ligadas a oligonucleótidos complementares ao RNA ribossômico de bactérias. As sondas fluorescentes podem ser projetadas para serem específicas e reconhecer apenas uma espécie ou grandes grupos bacterianos (Del’Duca et al., 2013). As células marcadas com as sondas são diferenciadas pelo uso de filtros ópticos específicos no citômetro de fluxo ou microscópios de epifluorescência ou confocal (Zwirgmaier, 2005).

Em geral, a FISH permite a visualização direta, identificação e computação de células bacterianas especificamente marcadas, com vantagens adicionais de ser uma técnica de cultura bacteriana independente, usando controle negativo para garantir a eficiência da hibridação e fornecendo informações sobre morfologia e número de células em uma amostra.

Este trabalho está dividido em dois capítulos. O primeiro capítulo trata de esclarecer qual tipo de sistema de bioflocos (entre sistema predominantemente heterotrófico e sistemas mistos – heterotrófico/quimioautotrófico) apresentar maior vantagem em relação ao uso de água, produção de sólidos e desempenho zootécnico dos camarões. De acordo com a resposta encontrada, o segundo capítulo trata de verificar se a relação Carbono/Nitrogênio afeta a composição bacteriana, produção de sólidos e água quando se estabelece um sistema BFT misto.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar o efeito da fertilização orgânica e da relação C/N na produção de sólidos, nitrificação e uso da água em sistema BFT.

Objetivos Específicos

- Comparar os efeitos de diferentes tipos de sistema BFT na formação dos bioflocos, no processo de nitrificação, na produção de sólidos e no uso de água;
- Verificar os efeitos de diferentes relações C/N na formação dos bioflocos e no processo de nitrificação em sistema BFT;
- Aferir o desempenho zootécnico dos camarões;
- Avaliar a qualidade da água;
- Quantificar os grupos de bactérias nitrificantes (amônia-oxidantes e nitrito-oxidantes) e heterotróficas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alavandi, S. V., Poornima, M., 2012. Viral metagenomics: A tool for virus discovery and diversity in aquaculture. *Indian J. Virol.* 23, 88–98.
<https://doi.org/10.1007/s13337-012-0075-2>
- Arantes, R., Schweitzer, R., Quadros Seiffert, W., Lapa, K.R., Vinatea, L., 2017. Nutrient discharge, sludge quantity and characteristics in biofloc shrimp culture using two methods of carbohydrate fertilization. *Aquac. Eng.* 76, 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2016.11.002>
- Avnimelech, Y., 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. *Aquaculture* 264, 140–147.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.11.025>
- Avnimelech, Y., 1999. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture* 176, 227–235. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00085-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00085-X)
- Ballester, E.L.C., Abreu, P.C., Cavalli, R.O., Emerenciano, M., de Abreu, L., Wasielesky, W., 2010. Effect of practical diets with different protein levels on the performance of *Farfantepenaeus paulensis* juveniles nursed in a zero exchange suspended microbial flocs intensive system. *Aquac. Nutr.* 16, 163–172.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00648.x>
- Busse, H.J., Denner, E.B.M., Lubitz, W., 1996. Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. *Journal of Biotechnology* 47 (1): 3-38.
- Crab, R., Lambert, A., Defoirdt, T., Bossier, P., Verstraete, W., 2010. The application of bioflocs technology to protect brine shrimp (*Artemia franciscana*) from pathogenic *Vibrio harveyi*. *J. Appl. Microbiol.* 109, 1643–1649.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04791.x>
- De Schryver, P., Crab, R., Defoirdt, T., Boon, N., Verstraete, W., 2008. The basics of bio-flocs technology: The added value for aquaculture. *Aquaculture* 277, 125–137.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.02.019>

Del'Duca, A., Cesar, D.E., Diniz, C.G., Abreu, P.C., 2013. Evaluation of the presence and efficiency of potential probiotic bacteria in the gut of tilapia (*Oreochromis niloticus*) using the fluorescent in situ hybridization technique. *Aquaculture* 388–391, 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.01.019>

Ebeling, J.M., Timmons, M.B., Bisogni, J.J., 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture* 257, 346–358. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.03.019>

Francis, C.A., Roberts, K.J., Beman, J.M., Santoro, A.E., Oakley, B.B., 2005. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 14683–14688. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506625102>

Gaona, C.A.P., Poersch, L.H., Krummenauer, D., Foes, G.K., Wasielesky, W.J., 2011. The Effect of Solids Removal on Water Quality, Growth and Survival of *Litopenaeus vannamei* in a Biofloc Technology Culture System. *Int. J. Recirc. Aquac.* 12, 54–73. <https://doi.org/10.21061/ijra.v12i1.1354>

Godoy, L.C., Odebrecht, C., Ballester, E., Martins, T.G., Wasielesky, W., 2012. Effect of diatom supplementation during the nursery rearing of *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in a heterotrophic culture system. *Aquac. Int.* 20, 559–569. <https://doi.org/10.1007/s10499-011-9485-1>

Gregersen, T. 1978. Rapid method for distinction of gram-negative from gram positive bacteria. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 5(2): 123-127.

Hagopian, D.S., Riley, J.G., 1998. A closer look at the bacteriology of nitrification. *Aquacult. Eng.* 18(4): 223-244.

Hovda, M.B; Lunestad, B.T., Fontanillas, R., Rosnes, J.T., 2007. Molecular characterisation of the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 272 (1-4): 581-588.

- Kim, N-J., Sugano, Y., Hirai, M., Shoda, M., 2000. Removal of a high load of ammonia gas by a marine bacterium, *Vibrio alginolyticus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90(4): 410-415.
- Kim, J.K., Park, K.J., Cho, K.S., Nam, S.W., Park, T.J., Bajpai, R., 2005. Aerobic nitrification-denitrification by heterotrophic *Bacillus* strains. *Bioresource Technology*, 96(17): 1897-1906.
- Martins, P., Cleary, D.F.R., Pires, A.C.C, Rodrigues, A.M., Quintino, V., Calado, R., Gomes, N.C.M., 2013. Molecular analysis of bacterial communities and detection of potencial pathogens in a recirculating aquaculture system for *Scophthalmus maximus* and *Solea senegalensis*. *PLoS ONE* 8(11).
- Moss, S.M., Moss, D.R., Arce, S.M., Lightner, D. V., Lotz, J.M., 2012. The role of selective breeding and biosecurity in the prevention of disease in penaeid shrimp aquaculture. *J. Invertebr. Pathol.* 110, 247–250.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.01.013>
- Prosser, J.I., 1990. Autotrophic Nitrification in Bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, 30: 125-177.
- Rijn, J.V., Tal, Y., Schreier, H.J., 2006. Denitrification in recirculating systems: Theory and applications. *Aquacul. Eng.*, 34(3): 364-376.
- Wasielky, W., Atwood, H., Stokes, A., Browdy, C.L., 2006. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 258, 396–403. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.030>
- Xiong, W., Sun, Y., Zhang, T., Ding, X., Li, Y., Wang, M., Zeng, Z., 2015. Antibiotics, Antibiotic Resistance Genes, and Bacterial Community Composition in Fresh Water Aquaculture Environment in China. *Microb. Ecol.* 70, 425–432.
<https://doi.org/10.1007/s00248-015-0583-x>
- Xu, W.J., Morris, T.C., Samocha, T.M., 2016. Effects of C/N ratio on biofloc development, water quality, and performance of *Litopenaeus vannamei* juveniles in a biofloc-based, high-density, zero-exchange, outdoor tank system. *Aquaculture*

453, 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.11.021>

Zwirgmaier, K., 2005. Fluorescence in situ hybridisation (FISH) - The next generation. *FEMS Microbiol. Lett.* 246, 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.04.015>

CAPÍTULO I

Sistema de bioflocos heterotrófico versus misto: impactos no uso da água, produção de sólidos suspensos e desempenho zootécnico do *Litopenaeus vannamei*

AUTORES: Hellyjúnyor Brandão, Dariano Krummenauer, Íris Xavier, Gabriel Santana, Henrique Santana e Wilson Wasielesky

Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande (PPGAq-IO-FURG)

Rua do Hotel, nº2, Cassino, Rio Grande, RS, Brasil. CEP: 96210-030

Artigo redigido no formato short communication a ser submetido à Aquacultural Engineering.

Resumo:

O sistema de bioflocos caracteriza-se pela utilização de bactérias para a remoção de compostos nitrogenados da água. Dois grupos principais de bactérias estão envolvidos na remoção de nitrogênio nesse sistema: bactérias heterotróficas e bactérias autotróficas nitrificantes presentes no biofoco. Diferentes técnicas podem ser utilizadas para a formação e manutenção dos bioflocos, dependendo de qual grupo de bactérias se deseja a predominância. O objetivo deste estudo foi analisar o efeito de técnicas formação dos bioflocos no desempenho zootécnico do *Litopenaeus vannamei*, no uso de água e na produção de sólidos. Juvenis de camarão foram estocados em tanques de 150 litros na densidade de estocagem de 300/m³. Três tratamentos (em triplicata) foram testados usando diferentes técnicas de formação do floco: 1) sem fertilização orgânica suplementar; 2) fertilização de acordo com a leitura nominal de amônia (heterotrófico/quimioautotrófico = “misto”) e 3) fertilização de acordo com a produção estimada de amônia (heterotrófico). A temperatura, salinidade, oxigênio dissolvido, pH, amônia, nitrito, nitrato, alcalinidade e sólidos suspensos totais (SST) da água foram monitorados. Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA) e teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). Os parâmetros de qualidade da água foram influenciados pelos tratamentos ($P < 0,05$), havendo diferenças nas concentrações de amônia, nitrito, nitrato, oxigênio dissolvido, pH, alcalinidade e SST. Houve diferenças significativas nos parâmetros zootécnicos, sendo o maior peso final e produtividade, bem como menor FCA, encontrado no tratamento misto. Não houve diferenças significativas na sobrevivência. O volume total de água utilizado apresentou valores mais baixos no tratamento misto, enquanto o volume de sólidos removido foi quase quatro vezes maior no tratamento heterotrófico em comparação com os demais. Estes resultados mostram a importância de adotar um sistema de bioflocos misto heterotrófico/quimioautotrófico para otimizar o uso da água e diminuir a produção de sólidos.

Palavras-chave: sistema quimioautotrófico; nitrificação; fertilização orgânica;

Introdução

O Sistema de Bioflocos (Biofloc Technology System) é caracterizado pelo uso de bactérias para remover compostos nitrogenados da água e assim garantir uma melhor qualidade e menor utilização de água além de benefícios como maior produtividade (Avnimelech, 2007; Azim et al., 2008; Wasielesky et al., 2006). Dois grupos principais de bactérias podem estar envolvidas na remoção de nitrogênio neste sistema: bactérias heterotróficas, através da incorporação de nitrogênio inorgânico e carbono orgânico em sua biomassa, e bactérias autotróficas, que realizam nitrificação através da oxidação de amônia para nitrito e este para depois nitrato (Ebeling et al., 2006).

Existem diferentes técnicas que podem ser empregadas para a formação e manutenção dos bioflocos, dependendo do grupo de bactérias que se deseja dominante na remoção dos nitrogenados, resultando em um sistema que pode ser predominantemente heterotrófico, ou misto, isto é, heterotrófico/quimioautotrófico.

No primeiro, o sistema é fertilizado diariamente com alguma fonte de carbono orgânico para imobilizar a amônia produzida. Para este sistema emprega-se uma alta relação C/N, geralmente variando de 15 a 20 gramas de carbono para cada grama de nitrogênio (Avnimelech, 1999; Samocha et al., 2007). O favorecimento da via heterotrófica pode gerar excesso de biomassa bacteriana, visto que bactérias heterotróficas produzem 40 vezes mais biomassa que bactérias quimioautotróficas, e provocar problemas como aumento da demanda de oxigênio, alteração na qualidade de água e, conseqüentemente, afetar o desenvolvimento zootécnico dos camarões (Ebeling et al. 2006; Gaona et al. 2011; Schweitzer et al. 2013).

Por outro lado, no sistema misto heterotrófico/quimioautotrófico o controle dos compostos nitrogenados a longo prazo é realizado por bactérias nitrificantes que garantem boa qualidade de água durante o cultivo. A fertilização orgânica com carbono é realizada apenas nas primeiras semanas de cultivo com o intuito de evitar que a amônia atinja níveis elevados e prejudique o desempenho do camarão, enquanto as bactérias nitrificantes se estabelecem no sistema, como pode ser vistos em trabalhos realizados por Krummenauer, (2014) e

Alguns estudos sugerem que um sistema de bioflocos misto dominado por microalgas e bactérias autotróficas pode gerar mais benefícios para o desempenho dos camarões, além de reduzir os custos de fertilização orgânica (Xu et al., 2016). Godoy et al., (2012) mostraram que a presença de diatomáceas em sistema de BFT pode ser benéfico para o desenvolvimento dos animais cultivados. Outros pesquisadores apontam que o sistema misto heterotrófico / quimioautotrófico é a melhor alternativa em detrimento de um sistema predominantemente heterotrófico (Arantes et al., 2017). Apesar disso, todas as rotas de remoção estão presentes em um sistema de cultivo e atuam em diferentes níveis e períodos (Ebeling, 2006), mas as vias quimioautotróficas e heterotróficas parecem ter mais importância no BFT. Assim, são necessários estudos que esclarecem qual tipo de sistema BFT é mais eficiente quanto ao uso de água, produção de sólidos e desempenho dos camarões.

O objetivo deste estudo foi analisar o efeito das técnicas de formação de bioflocos sobre o desempenho zootécnico de *Litopenaeus vannamei*, sobre o uso da água e sobre a produção de sólidos em suspensão.

Material e métodos

Um experimento de 60 dias foi conduzido no Laboratório de Carcinocultura da Estação Marinha de Aquicultura pertencente à Universidade Federal do Rio Grande – FURG. Juvenis do camarão branco do Pacífico *L. vannamei* ($7,05 \pm 1,37$ g) foram estocados em uma densidade de 300 indivíduos/m³ em tanques de 150 litros dispostos com aeração constante provida por um sistema de *blower* e mangueiras microperfuradas. Foram testados 3 tratamentos, com três repetições cada, utilizando diferentes técnicas de formação de flocos: 1) Controle, onde não houve fertilização orgânica suplementar; 2) Fertilização orgânica realizada de acordo com a leitura nominal diária de amônia total (sistema misto = heterotrófico/quimioautotrófico) e 3) Fertilização diária de acordo com a produção estimada de amônia (sistema predominantemente heterotrófico). Para o sistema misto, a adição de carbono orgânico foi realizada sempre que os níveis de amônia ultrapassavam 1,0 mg/L. Para cálculos da estimativa de amônia diária produzida, utilizou-se a fórmula descrita por Ebeling (2006) que leva em consideração a concentração de proteína na ração, a taxa de alimentação diária e uma constante de geração de amônia. Em ambos os tratamentos com fertilização

a relação C/N foi mantida em 15/1, levando em consideração a C/N já presente na ração (7,5/1).

Diariamente, foram monitorados os parâmetros de temperatura, oxigênio dissolvido e pH com o auxílio de sonda multiparamétrica (Hanna HI 98194). Também diariamente, foram coletadas amostras de água para determinação da concentração de amônia total e nitrito (UNESCO, 1983; Strickland & Parsons, 1972), enquanto o nitrato foi mensurado semanalmente segundo metodologia de Aminot and Chaussepied, (1983). A alcalinidade e sólidos suspensos totais (SST) da água foram monitorados duas vezes por semana (APHA, 1998; AOAC, 1999). Quando os níveis de alcalinidade ou pH alcançavam valores menores que 150 mg/L ou 7,3, respectivamente, correções eram realizadas utilizando alcalinizantes (bicarbonato de sódio ou hidróxido de cálcio) em doses recomendadas por Furtado et al (2014). Renovação da água (20%) foi feita sempre que os níveis de amônia excediam 7,0 mg/L (aproximadamente o dobro do nível seguro, Lin and Chen, 2001), e quando o nitrito excedia 20 mg/L (aproximadamente o nível seguro por Lin and Chen, 2003). Quando os SST excederam 500 mg/L (Gaona et al., 2011) renovações de água foram feitas para retornar os valores a 400 mg/L.

Os animais foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial contendo 38% de proteína bruta (Guabi Aqua). Semanalmente, eram realizadas biometrias para avaliação do ganho de peso semanal e ajuste da quantidade de ração ofertada. A sobrevivência foi determinada através da divisão do número de animais no final do experimento com o número de animais estocados multiplicados por 100. A taxa de conversão alimentar aparente foi calculada dividindo-se o total de ração fornecido pela diferença entre a biomassa final e inicial. O ganho de peso semanal foi calculado pela diferença entre o peso final e peso inicial dividida pelo número de semanas. E por fim, a produtividade foi calculada pela diferença da biomassa final e biomassa inicial dividida pelo volume do tanque.

Os dados coletados foram submetidos a testes de normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (teste de Levene) e após a verificação desses pressupostos, foi realizada uma Análise de Variância Simples. Quando detectadas diferenças significativas ($p < 0,05$), aplicou-se o teste pós-hoc Tukey a um nível de segurança de 95% ($p < 0,05$). Os valores percentuais foram transformados (arccosseno da raiz quadrada) antes de serem analisados (Zar 2010).

Resultados e discussão

Os valores dos parâmetros de qualidade de água estão apresentados na tabela 1. Os resultados demonstram que alguns parâmetros foram diretamente influenciados pelo manejo de fertilização e sistema adotados.

Tabela 1 - Parâmetros de qualidade da água (média \pm desvio padrão) de cultivo de juvenis de *L. vannamei* em diferentes sistemas BFT.

| | Heterotrófico | Misto | Sem fertilização |
|--|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Temperatura (°C) | 27,75 \pm 1,45 | 28,15 \pm 1,17 | 28,73 \pm 1,65 |
| Oxigênio (mg/L) | 6,15 \pm 0,55 | 6,18 \pm 0,25 | 6,21 \pm 0,34 |
| pH | 7,96 \pm 0,14 ^a | 7,65 \pm 0,20 ^b | 7,64 \pm 0,18 ^b |
| Amônia total (mg/L) | 1,10 \pm 1,09 ^a | 1,53 \pm 1,12 ^a | 4,88 \pm 2,11 ^b |
| NO ₂ ⁻ N (mg/L) | 2,38 \pm 3,22 ^a | 6,46 \pm 8,08 ^b | 9,44 \pm 9,27 ^b |
| NO ₃ ⁻ N (mg/L) | 20,13 \pm 3,56 ^a | 87,77 \pm 3,22 ^b | 79,21 \pm 2,88 ^b |
| Alcalinidade (CaCO ₃ mg/L) | 321 \pm 22 ^b | 135 \pm 11 ^a | 144 \pm 17 ^a |
| SST (mg/L) | 355 \pm 102 ^b | 199 \pm 85 ^a | 119 \pm 66 ^a |

Médias na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Não foram encontradas diferenças para temperatura e oxigênio dissolvido, estando os valores dentro da faixa recomendada para o bom crescimento da espécie (Jiang and Pan, 2005; Ponce-palafox et al., 1997).

O pH foi mais elevado no tratamento heterotrófico, assim como a alcalinidade. Esse comportamento pode ser atribuído ao menor consumo de carbono inorgânico pelas bactérias heterotróficas, em comparação às quimioautotróficas (Ebeling et al., 2006) além de maior quantidade de renovação de água, que possibilitou reposição da alcalinidade naturalmente presente na água do mar. De qualquer forma, os níveis de pH e alcalinidade também estiveram dentro da faixa recomendada (Furtado et al., 2014).

Os níveis de amônia foram mais elevados no tratamento sem fertilização orgânica, visto que não houve incentivo do crescimento de bactérias heterotróficas, que podem realizar uma rápida imobilização desse composto (Hargreaves, 2006). Além disso, esse tratamento ultrapassou os níveis de segurança estipulados para a amônia,

resultando numa maior renovação de água. Entretanto, esses níveis mais elevados de amônia não afetaram o desempenho zootécnico dos camarões quando comparado ao tratamento misto.

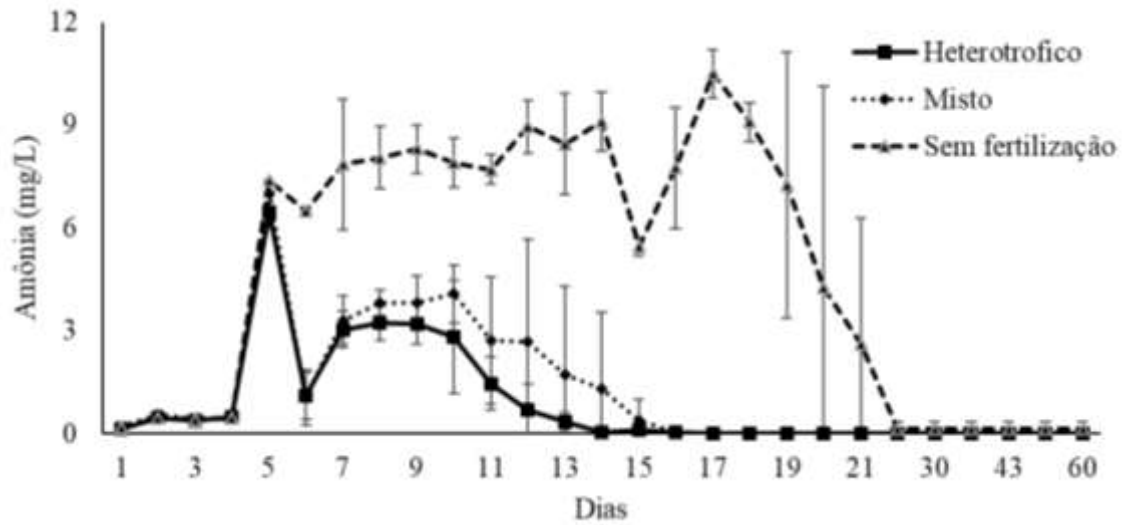


Figura 1: Concentração de amônia total durante o cultivo de *L. vannamei* em diferentes sistemas BFT.

Os níveis de nitrito diferiram entre o tratamento heterotrófico e os demais. Uma vez que houve o favorecimento da via heterotrófica, o processo de nitrificação acabou sendo afetado no tratamento heterotrófico, provavelmente devido a competição por nutrientes e espaço entre os grupos bacterianos (Michaud et al., 2006). A fertilização orgânica nesse tratamento era realizada diariamente, de acordo com a produção estimada de amônia, dessa maneira, o carbono orgânico estava disponível para bactérias heterotróficas antes mesmo de a amônia diária ser produzida (antes da incorporação de alimento), dando vantagens de nutrientes à essas bactérias.

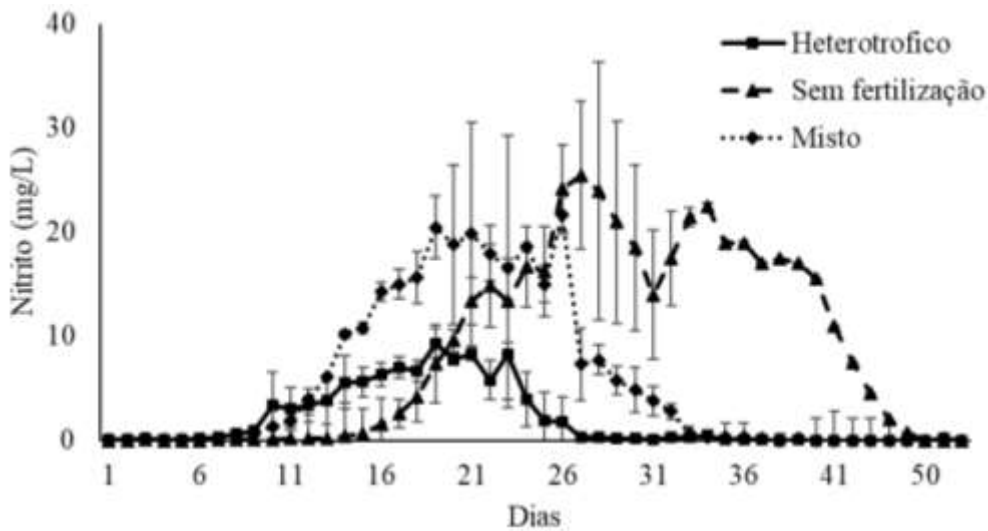


Figura 2: Concentração de nitrito durante o cultivo de *L. vannamei* em diferentes sistemas BFT.

Além disso, a atividade das bactérias nitrificantes parece ter sido suprimida ou extremamente reduzida no tratamento heterotrófico. É possível observar (figura 2) que os níveis de nitrito no sistema heterotrófico foram inferiores aos níveis produzidos nos outros tratamentos e passaram a ser indetectáveis a partir do vigésimo sétimo dia. O nitrato, produto final do processo de nitrificação, se acumula no sistema e pode ser um indicio da atividade de bactérias nitrificantes. Nesse tratamento, o nitrato resultante foi muito baixo (Tabela1; Figura 3) em relação a entrada de nitrogênio no sistema e aos outros tratamentos, indicando a redução do processo de nitrificação.

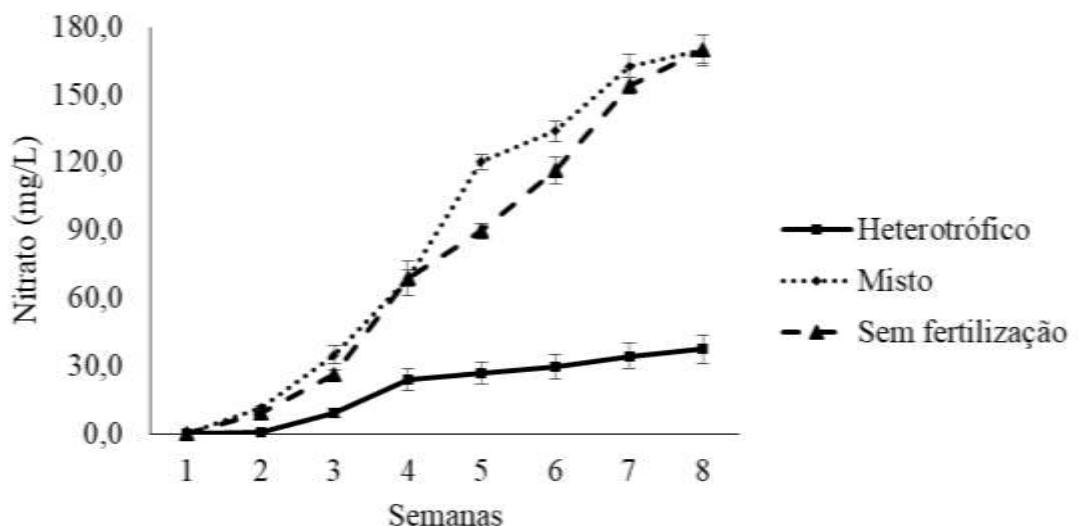


Figura 3: Concentração de amônia total durante o cultivo de *L. vannamei* em diferentes sistemas BFT.

O favorecimento da via heterotrófica também resultou em diferenças significativas em relação aos sólidos suspensos totais, tanto em média final (Tabela 1) quanto na quantidade de sólidos removidos do sistema (Figura 1). O tratamento heterotrófico atingiu a maior média de sólidos suspensos totais e a quantidade de sólidos removidos foi quase quatro vezes maior no tratamento heterotrófico em comparação com os demais. Esse dado demonstra que o favorecimento da via heterotrófica eleva consideravelmente a produção de sólidos suspensos devido, principalmente, ao aumento da biomassa bacteriana heterotrófica, visto que as bactérias heterotróficas chegam a crescer 10 vezes mais rápido que as bactérias nitrificantes (Hargreaves, 2006). Apesar disso, o volume total de água utilizado apresentou valores mais baixos nos tratamentos misto e heterotrófico quando em comparação ao tratamento sem fertilização (figura 4), devido à maior quantidade de renovação de água realizada para remoção o excesso de amônia e nitrito.

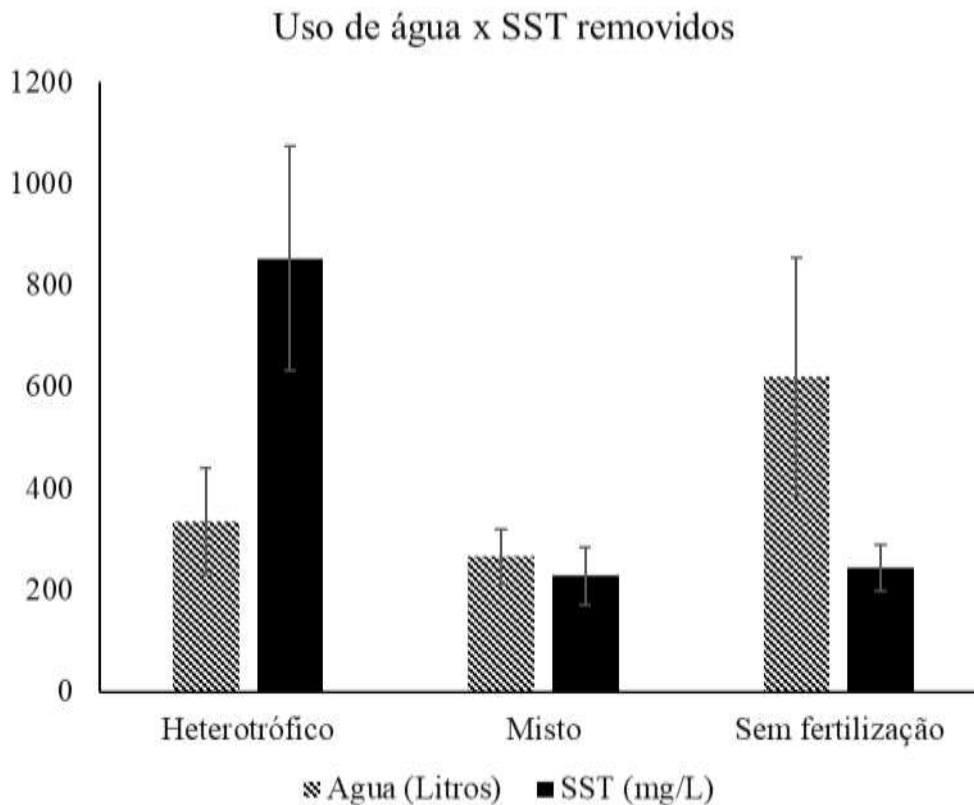


Figura 4 – Quantidade total de litros utilizados e sólidos removidos de cada tratamento.

Os parâmetros de desempenho zootécnico estão apresentados na tabela 2. Houve diferenças significativas ($p < 0,05$) nos parâmetros zootécnicos apenas no tratamento heterotrófico em relação aos demais, sendo o maior peso final e produtividade, bem como menor FCA, encontrados nos tratamentos misto e sem fertilização. O fator de conversão alimentar foi maior no tratamento heterotrófico, resultado direto do menor crescimento obtido em relação a quantidade de ração ofertada.

Tabela 2 - Parâmetros de desempenho zootécnico (média \pm desvio padrão) de juvenis de *L. vannamei* cultivados em diferentes sistemas BFT. As médias na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

| | Heterotrófico | Misto | Sem Fertilização |
|---|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| Peso inicial (g) | 7,0 \pm 1,37 | 7,0 \pm 1,37 | 7,0 \pm 1,37 |
| Peso final (g) | 12,6 \pm 0,28 ^b | 13,8 \pm 0,68 ^a | 13,3 \pm 0,06 ^{ab} |
| Sobrevivência (%) | 87,4 \pm 5,13 | 93,3 \pm 3,85 | 94,07 \pm 3,39 |
| Crescimento (g/sem) | 0,69 \pm 0,03 ^b | 0,84 \pm 0,08 ^a | 0,79 \pm 0,00 ^{ab} |
| Produtividade final (kg.m ⁻³) | 3,29 \pm 0,23 | 3,85 \pm 0,31 | 3,76 \pm 0,12 |
| FCA | 2,24 \pm 0,41 ^b | 1,52 \pm 0,27 ^a | 1,58 \pm 0,11 ^a |

Não houve diferenças significativas na sobrevivência, o que indica que os níveis de amônia e nitrito resultantes nos tratamentos não foram suficientes para causar mortalidade, seja por concentração ou por tempo de exposição.

Estes resultados mostraram que um sistema misto heterotrófico/quimioautotrófico pode otimizar o uso de água, diminuir a produção de sólidos e, conseqüentemente, reduzir os esforços com manejo em relação a fertilização e remoção de sólidos, sendo recomendado para o estabelecimento de um sistema de bioflocos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aminot, A. E Chaussepied, M., 1983. Manuel des analyses chimiques en milieu marin. Brest, CNEXO, 395p.
- AOAC 1999. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Arlington. v. 2, cap.35, 1-30.
- APHA AWWA WEF. 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington, DC.
- Arantes, R., Schweitzer, R., Quadros Seiffert, W., Lapa, K.R., Vinatea, L., 2017. Nutrient discharge, sludge quantity and characteristics in biofloc shrimp culture using two methods of carbohydrate fertilization. *Aquac. Eng.* 76, 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2016.11.002>
- Avnimelech, Y., 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. *Aquaculture* 264, 140–147.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.11.025>
- Avnimelech, Y., 1999. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture* 176, 227–235. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00085-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00085-X)
- Azim, M.E., Little, D.C., Bron, J.E., 2008. Microbial protein production in activated suspension tanks manipulating C : N ratio in feed and the implications for fish culture 99, 3590–3599. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.07.063>
- Ebeling, J.M., Timmons, M.B., Bisogni, J.J., 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture* 257, 346–358.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.03.019>
- Furtado, S., Poersch, L.H., Wasielesky, W., 2014. The effect of different alkalinity levels on *Litopenaeus vannamei* reared with biofloc technology (BFT).
<https://doi.org/10.1007/s10499-014-9819-x>
- Gaona, C.A.P., Poersch, L.H., Krummenauer, D., Foes, G.K., Wasielesky, W.J., 2011.

- The Effect of Solids Removal on Water Quality, Growth and Survival of *Litopenaeus vannamei* in a Biofloc Technology Culture System. *Int. J. Recirc. Aquac.* 12, 54–73. <https://doi.org/10.21061/ijra.v12i1.1354>
- Godoy, L.C., Odebrecht, C., Ballester, E., Martins, T.G., Wasielesky, W., 2012. Effect of diatom supplementation during the nursery rearing of *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in a heterotrophic culture system. *Aquac. Int.* 20, 559–569. <https://doi.org/10.1007/s10499-011-9485-1>
- Hargreaves, J.A., 2006. Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. *Aquac. Eng.* 34, 344–363. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2005.08.009>
- Jiang, L., Pan, L., 2005. Effect of dissolved oxygen on immune parameters of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* 18, 7–10. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.07.001>
- Krummenauer, D., 2014. The Reuse of Water on the Culture of Pacific White Shrimp , *Litopenaeus vannamei* , in BFT System. *Journal Of The World Aquaculture Society*. Vol.45, 3–14. <https://doi.org/10.1111/jwas.12093>
- Lin, Y., Chen, J., 2003. Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels 224, 193–201. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00220-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00220-5)
- Lin, Y., Chen, J., 2001. Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* Boone juveniles at different salinity levels 109–119.
- Michaud, L., Blancheton, J.P., Bruni, V., Piedrahita, R., 2006. Effect of particulate organic carbon on heterotrophic bacterial populations and nitrification efficiency in biological filters. *Aquac. Eng.* 34, 224–233. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2005.07.005>
- Ponce-palafox, J., Martinez-palacios, C.A., Ross, L.G., 1997. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp , 157, 107–115.
- Samocha, T.M., Patnaik, S., Speed, M., Ali, A.M., Burger, J.M., Almeida, R. V., Ayub, Z., Harisanto, M., Horowitz, A., Brock, D.L., 2007. Use of molasses as carbon source in limited discharge nursery and grow-out systems for *Litopenaeus*

vannamei. *Aquac. Eng.* 36, 184–191.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2006.10.004>

Schweitzer, R., Arantes, R., Costódio, P.F.S., do Espírito Santo, C.M., Arana, L.V., Seiffert, W.Q., Andreatta, E.R., 2013. Effect of different biofloc levels on microbial activity, water quality and performance of *Litopenaeus vannamei* in a tank system operated with no water exchange. *Aquac. Eng.* 56, 59–70.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2013.04.006>

STRICKLAND, JDH, TR PARSONS. 1972. A practical handbook of seawater analysis. Ottawa: Fishery Research Board Canada, 310p.

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

Wasiolesky, W., Atwood, H., Stokes, A., Browdy, C.L., 2006. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 258, 396–403. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.030>

Xu, W.J., Morris, T.C., Samocha, T.M., 2016. Effects of C/N ratio on biofloc development, water quality, and performance of *Litopenaeus vannamei* juveniles in a biofloc-based, high-density, zero-exchange, outdoor tank system. *Aquaculture* 453, 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.11.021>

ZAR, JH. 2010. *Biostatistical Analysis*. Upper Saddle River: Prentice Hall

CAPÍTULO II

Effect of C/N Ratio on nitrifying and heterotrophic bacteria composition and
zootechnical performance of *Litopenaeus vannamei*

AUTORES: Hellyjúnyor Brandão, Dionéia Cesar, Dariano Krummenauer, Carlos
Gaona, Inácio Alves Neto and Wilson Wasielesky

Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Instituto de Oceanografia, Universidade
Federal do Rio Grande (PPGAq-IO-FURG)

Rua do Hotel, nº2, Cassino, Rio Grande, RS, Brasil. CEP: 96210-030

Manuscrito a ser submetido para a revista Aquaculture.

Resumo

O sistema BFT (Biofloc Technology System) é considerado uma das tecnologias mais promissoras na produção superintensiva de organismos aquáticos. A remoção de nitrogênio neste sistema é realizada principalmente pela ação de bactérias heterotróficas e quimioautotróficas. Muitos fatores podem afetar a nitrificação, incluindo a relação carbono/nitrogênio. No entanto, pouco se sabe sobre a formação, composição, desenvolvimento e funcionamento de comunidades bacterianas em bioflocos e sua conexão com a manipulação da relação C/N. O objetivo deste estudo foi verificar o efeito de diferentes relações C/N na composição de bactérias nitrificantes e no desempenho zootécnico do camarão branco *Litopenaeus vannamei*. Um experimento de 43 dias foi realizado na Estação Marinha de Aquicultura (EMA) da Universidade Federal do Rio Grande. Após a fase de berçário, juvenis de camarão branco do Pacífico ($1,17 \pm 0,55$ g) foram armazenados em tanques de 800 litros em uma densidade de $400/m^3$. Quatro tratamentos (com três réplicas cada) foram testados usando diferentes relações C/N: 7,5 / 1, 10/1, 12,5/1 e 15/1. A temperatura, salinidade, oxigênio dissolvido, pH, amônia, nitrito, nitrato, alcalinidade e sólidos suspensos totais na água foram monitorados. Amostras de água foram coletadas para detectar o crescimento da população bacteriana pela técnica de Hibridização Fluorescente *In Situ* (FISH). Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA) e teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). Os parâmetros de qualidade da água não foram influenciados por diferentes relações C/N ($P > 0,05$), apenas as concentrações de amônia e oxigênio dissolvido apresentaram diferenças ($P < 0,05$), mas não foram limitantes para a sobrevivência e crescimento do camarão. Não houve diferenças significativas nos parâmetros zootécnicos, apenas no peso final com menor peso encontrado no tratamento 7,5/1 ($4,62 \pm 1,53$ g). As diferentes relações C/N não influenciaram ($P > 0,05$) a composição e a abundância da comunidade bacteriana nitrificante, embora o processo de nitrificação tenha sido afetado no tratamento com maior relação C/N, iniciando após os outros tratamentos. Os volumes totais de água utilizados e os sólidos removidos (estimados) apresentaram valores mais baixos nos tratamentos com relação intermediária C/N. Os resultados mostraram a importância de reduzir a quantidade de carbono para diminuir os sólidos suspensos totais no sistema BFT.

Palavras-chave: nitrificação; hibridização fluorescente *in situ*; fertilização orgânica.

Abstract

The BFT system (Biofloc Technology System) is considered one of the most promising technologies in the superintensive production of aquatic organisms. The removal of nitrogen in this system is mainly performed by the action of heterotrophic and chemical-autotrophic bacteria. Many parameters can affect the nitrification, including Carbon/Nitrogen ratio. However, little is known about the formation, composition, development and functioning of bacterial communities in bioflocs and their connection with the manipulation of the C/N ratio. The aim of this study was to verify the effect of different C/N ratio on nitrifying bacteria composition and in the zootechnical performance of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. A 43 days experiment was carried out at the Marine Aquaculture Station (EMA) of the Federal University of Rio Grande, after the nursery phase. Pacific white shrimp juveniles (1.17 ± 0.55 g) were stored in 800-liter tanks at a density of 400/m³. Four treatments (with three replica each) were tested using different C/N ratios of 7.5/1, 10/1, 12.5/1 and 15/1. The temperature, salinity, dissolved oxygen, pH, ammonia, nitrite, nitrate, alkalinity and total suspended solids in the water were monitored. Water samples were collected to detect the bacterial population growth by Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) technique. The results were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test ($\alpha = 0.05$). The water quality parameters were not influenced by different C/N ratios ($P > 0.05$), only the concentrations of ammonia and dissolved oxygen presented differences ($P < 0.05$), but were not limiting for shrimp survival and growth. There were no significant differences in zootechnical parameters, only in the final weight with lower weight found in 7.5/1 treatment (4.62 ± 1.53 g). The different C/N fertilization ratios did not influence ($P > 0.05$) the composition and abundance of the bacterial community even though the nitrification process was affected in treatment with higher C/N ratio, starting out after the others treatments. The total volumes of water used and solids removed (estimated) presented lower values in the treatments with intermediate C/N ratio. The results showed the importance of reducing the amount of carbon to decrease total suspended solids in the BFT system.

Key words: nitrification; fluorescent *in situ* hybridization; organic fertilization.

Introduction

The BFT (Biofloc Technology) system is considered one of the most promising technologies in the superintensive production of aquatic organisms since it has advantages such as high productivity, use of small areas, use of high stocking densities, reduction of water consumption with minimal or none water exchange and increased biosafety. Moreover, BFT has the participation of a diverse microbial community acting on the removal of nitrogenous compounds from water, as well as supplementary source of food and on the health of reared organisms (Avnimelech, 2007; Ballester et al., 2010; Moss et al., 2012; Wasielesky et al., 2006).

Due to the high stocking densities used in BFT and the requirement of high protein concentration in the shrimp diet, there is an increase in the amount of ammonia excreted by the animals and decomposition of the remaining feed and organic matter, causing deterioration of water quality (Shahkar et al., 2014). Therefore, it is necessary to adopt some management to keep a good water quality. In the BFT system, the control of nitrogen compounds mainly relies on stimulating and developing a microbial community that can act in the removal of these nutrients from water.

It is known that the metabolization of nitrogen compounds present in water can occur in three pathways: photoautotrophic, where autotrophic organisms remove nitrogen by converting it into algal biomass; nitrifying autotrophic bacteria, when autotrophic bacteria oxidizes ammoniacal nitrogen into nitrate besides incorporating it to their biomass; and heterotrophic, where bacteria incorporate the nitrogen into biomass in the form of protein (Ebeling et al. 2006; Hargreaves 2006). However, all the routes of removal are present in the system acting at varying levels, but the autotrophic and heterotrophic pathways seem to have a greater predominance in BFT system (Ebeling et al., 2006).

BFT system can be both a predominantly heterotrophic system as well as a mixed autotrophic-heterotrophic (Avnimelech, 1999; Azim et al., 2008; Samocha et al., 2007). In the first, ammonia control is mainly performed by heterotrophic bacteria during all the cycle, but a high amount of suspended solids is produced. In a mixed system, nitrifying bacteria assumes the role of converting ammonia into a less toxic compound, the nitrate, also generating less bacterial biomass. This way, the nitrification

process performed by autotrophic bacteria has been gaining an important role in maintaining water quality in BFT (Ferreira et al., 2016; Krummenauer, 2014), but factors such as dissolved oxygen (DO), temperature, alkalinity, pH and C/N ratio can directly influence this process.

Little is known about the formation, composition, development and functioning of bacterial communities in bioflocs and their connection with the manipulation of the C: N ratio. In this way, it is necessary to evaluate the relationship between organic fertilization rates and the development of microbial communities as well as to characterize them in order to promote a more efficient use of these communities and to reduce the volume of suspended solids produced.

The aim of this study was to verify the effect of different Carbon/Nitrogen ratio on heterotrophic- and nitrifying bacteria composition, in the pathways of removal of nitrogen compounds from the water and zootechnical performance of white shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in BFT system.

Material and Methods

A 42 day-trial was conducted at the Marine Station of Aquaculture, Federal University of Rio Grande, Rio Grande do Sul State, Brazil (32° 19' S, 52° 15' W). Twelve-800 L rectangular tanks were stocked with 320 juveniles of Pacific white shrimp (1.17g ±0.55) at stocking density of 400/m³. The tanks were filled with natural seawater (salinity = 33) filtered and treated with chlorine solution and dechlorinated by aeration. The aeration was provided by blower and distributed by a microperforated hoses system allocated in each tank. Water exchange was made every time total ammonia levels exceed 7,0 mg/L (approximately twice the safe level, Lin and Chen, 2001) and nitrite exceed 20 mg/L (approximately the safe level by Lin and Chen, 2003). Prior to the experiment, the percentage of Carbon, Nitrogen and Hydrogen in feed and molasses were determined using a CNHS Elemental Analyzer (2400 CHNS/O Series II PerkinElmer). T

Four treatments (three replicates) were tested using four different C/N ratios: 7.5/1, where no supplemental carbon was added, 10/1, 12.5/1 and 15/1, in accordance with nominal C/N rate proposed by Ebeling et al (2006). Organic fertilization was

performed every time total ammonia nitrogen (TAN) level exceed 1.0 mg/L, by adding molasses powder.

Water quality

Temperature, dissolved oxygen and pH were monitored twice a day using a digital multiparameter. Water samples were collected daily to determine total ammonia nitrogen ($\text{TAN} = \text{NH}_4^+ + \text{NH}_3$) and nitrite (N-NO_2^-) according to UNESCO (1983) and Strickland & Parsons (1972), respectively. Nitrate (N-NO_3^-) concentrations were quantified once a week (Aminot and Chaussepied, 1983). Salinity was measured weekly using a portable refractometer. When necessary, disinfected fresh water was added to adjust salinity or restore water losses by evaporation. Alkalinity was measured each three days following the methodology recommended by APHA (1998). Every time pH reached values below 7.3 and/or alkalinity reached values below 150 mg/L, adjustments were made to correct them in accordance with Furtado et al. (2014). Total suspended solids were measured twice a week (AOAC, 1999). Water turbidity was measured once a week using a digital turbidimeter (Hach® 2100P). Measures of chlorophyll a was performed weekly. Water samples (10 ml) were collected from each unit, filtered in glass fiber microfilter in a dark room and then stored in 90% acetone in dark bottles at -12 ° C. After 24 hours the concentration of chlorophyll a was determined with the aid of fluorimeter, according to the methodology described in Welschmeyer (1994).

Shrimp feeding and monitoring

Shrimp were fed twice a day with a commercial diet (Guabi Potimar/38 Active) spread in the tank and in feeding trays (one per tank) to check consumption. Initial feed rate was adjusted by recommendations of Jory et al. (2001) and then adjusted based on feed consumption and shrimp growth. Weekly, 30 animals were randomly collected from each unit, individually weighed and then returned to tanks. At the end of the study, all animals of each tank were sampled and weighed for final weight. Survival was obtained by counting the total survival individuals in each tank. Feed conversion rate was calculated by dividing total feed offered by biomass increase. Yield was calculated by total biomass/tank volume.

Fluorescent in situ Hybridization

In order to describe a bacterial community, different techniques are widely used such as staining techniques and culture of bacterial colonies, for example. Also, molecular techniques have been gaining prominence in recent times due to high performance, precision and speed.

One of those techniques is the Fluorescent in situ Hybridization (FISH), a technique that uses fluorescent probes, attached to oligonucleotides complementary to the ribosomal RNA of bacteria, designed to be specific and recognize only one species or large bacterial groups (Zwirgmaier, 2005). In general, the FISH allows direct visualization, identification and computation of specifically labeled bacterial cells with additional advantages of being an independent bacterial culture technique, using negative control to ensure the efficiency of hybridization and providing information about morphology and number of cells in a sample.

Each two days, a 4.5 ml sample of BFT water was collected from each tank and then fixed with 0.5ml of 20% paraformaldehyde solution (final concentration: 2%) in order to detect the growth of the population of nitrifying and heterotrophic bacteria by Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH) methodology (Del'Duca et al., 2013) with RNA probes selected to identify the groups of bacteria. In order to evaluate the efficiency of the hybridization, a negative control was used with no specificity for any bacterial group. All probes were marked with Cy3 fluorochrome (Table 1). Abundance of bacteria was determined by direct counting under epifluorescence microscopy (Olympus® BX-60) at 1000 x final magnification.

1 Table 1. : rRNA-targeted oligonucleotide probes of different bacterial species and groups used in this study. All probes were labelled
 2 with fluorochrome Cy3.

| Probe | Sequence of probe (5' - 3') | Specificity | *%FA | **NaCl (mM) | Reference |
|------------|-------------------------------|---|------|-------------|--------------------------|
| NON | TAGTGACGCCGTCGA | Negative Control | 30 | 112 | Yokokawa & Nagata (2005) |
| NITCOC 206 | CGGTGCGAGCTTGCAAGC | Nitrococcus mobilis – AOB | 20 | 225 | Juretschko et al. (2000) |
| NSO 190 | CGATCCCCTGCTTTTCTCC | Nitrosomonadales – AOB | 35 | 80 | Mobarry et al. (1996) |
| NSO 1225 | CGCCATTGTATTACGTGTGA | Nitrosomonadales – AOB | 35 | 80 | Mobarry et al. (1996) |
| NSMR 76 | CCC CCC TCT TCT GGA TAC | Nitrosomonas marina-like – AOB | 20 | 225 | Burrell et al. (2001) |
| NIT3 | CCTGTGCTCCATGCTCCG | Nitrobacter spp. – NOB | 40 | 56 | Wagner et al. (1996) |
| NTSPA 685 | CAC CGG GAA TTC CGC GCT CCT C | Nitrospira moscoviensis, Nitrospira marina – NOB | 20 | 225 | Burrell et al. (2001) |
| NTSPA 712 | CGCCTTCGCCACCCGGCCTTCC | Phylum Nitrospira – NOB | 50 | 28 | Daims et al. (2001) |
| PAE 997 | TCTGGAAAGTTCTCAGCA | Pseudomonas spp. – Heterotrophic | 35 | 80 | Amann et al. (1996) |

3 *Concentration of formaldehyde in wash solution.

4 ** Concentration of sodium chloride (NaCl) in wash solution.

5

6

Statistical Analysis

The data were submitted to tests of normality (Shapiro-Wilk's test) and homoscedasticity (Levene's test). After verifying these premises, ANOVA One-way was performed. If significant differences were detected ($p < 0.05$), the post-hoc Tukey test with a safety level of 95% ($p < 0.05$) was applied. The percent values were transformed (arcsine-square root) before being analyzed (Zar, 2010).

Results

The overall mean and standard values of water quality parameters are presented in Table 2. There were no significant differences in most of the parameters except for DO and TAN concentrations. The mean dissolved oxygen ranged from 5.69 to 5.86 mg/L, differing only in the 12.5 C/N treatment.

Figure 1 shows the temporal variation of ammonia in all treatments. Significant differences were found only in the mean value for the treatment with the lowest C/N ratio, where there was no carbon organic fertilization and higher peaks of ammonia were observed. The treatments 12.5/1 and 15/1 showed similar pattern in ammonia levels throughout the experiment.

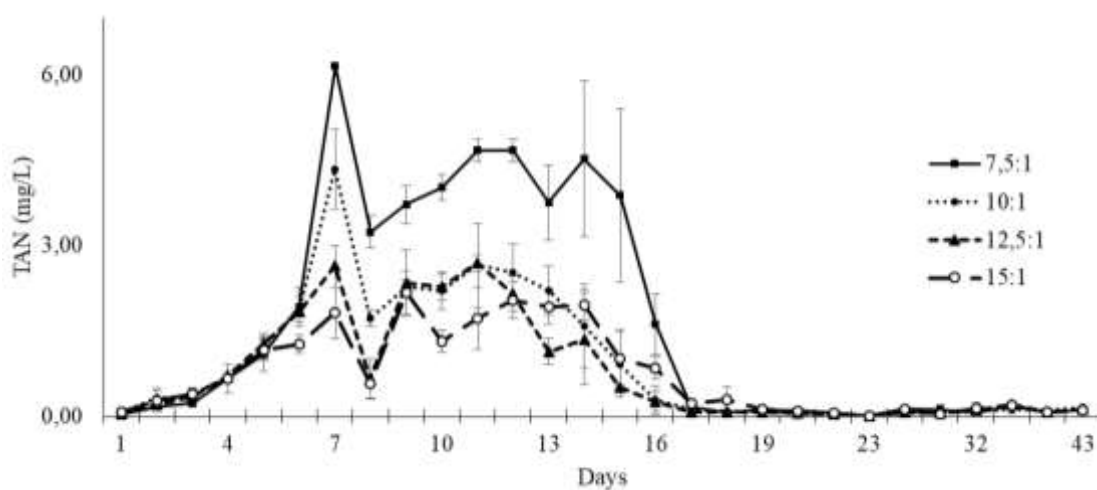


Figure 1: Total ammonia nitrogen (TAN) concentration throughout the 43-days trial with different levels of C/N in BFT culture system.

There was no difference in nitrite and nitrate final means. Figure 2 shows the temporal variation of nitrite in all treatments, showing that the nitrification process was affected by the treatments. In intermediary rates (10 and 12.5/1), the process took approximately 22 days to complete its cycle, beginning at day 10 and ending in 32th day. When there was no supplementation carbon added, the nitrification started at the same day than intermediary treatments but took 30 days to fully establish the process. In high CN ratio, the nitrification started after intermediary levels and took 21 days to establish, but reached higher peaks of nitrite than intermediary treatments.

Table 2 – Water quality parameters (mean \pm standard deviation) of *L. vannamei* juveniles reared in BFT systems with different C/N ratio fertilizations. Means in the same line with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

| | Treatments | | | |
|--------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | 7.5/1 | 10/1 | 12.5/1 | 15/1 |
| Dissolved Oxygen (mg/L) | 5.79 \pm 0.41 ^{ab} | 5.86 \pm 0.44 ^a | 5.69 \pm 0.26 ^b | 5.82 \pm 0.20 ^a |
| pH | 7.79 \pm 0.23 | 7.80 \pm 0.22 | 7.79 \pm 0.26 | 7.83 \pm 0.20 |
| Temperature (°C) | 29.17 \pm 1.21 | 29.14 \pm 1.20 | 29.17 \pm 1.25 | 29.03 \pm 1.20 |
| Total Ammonia Nitrogen (mg/L) | 1.68 \pm 0.25 ^b | 0.97 \pm 0.20 ^a | 0.78 \pm 0.15 ^a | 0.76 \pm 0.17 ^a |
| NO ₂ -N (mg/L) | 8.02 \pm 3.57 | 6.44 \pm 1.09 | 6.17 \pm 1.54 | 6.21 \pm 1.07 |
| NO ₃ -N (mg/L) | 10.51 \pm 3.42 | 9.39 \pm 2.13 | 11.37 \pm 3.84 | 8.97 \pm 3.48 |
| Alkalinity (mg CaCO ₃ /L) | 135.18 \pm 16 | 141.21 \pm 14 | 149.10 \pm 21 | 155.33 \pm 14 |
| TSS (mg/L) | 233.96 \pm 42 | 241.86 \pm 55 | 273.33 \pm 42 | 287.36 \pm 63 |
| Turbidity (NTU) | 112.85 \pm 36 | 109.03 \pm 22 | 121.74 \pm 42 | 112.85 \pm 31 |
| Chlorophyll (mg/L) | 490.37 \pm 339.29 ^a | 352.76 \pm 204.13 | 392.22 \pm 215.18 | 373.08 \pm 228.15 |
| Molasses use (g) | - | 136.52 \pm 19.50 ^a | 205.70 \pm 20.02 ^a | 292.64 \pm 41.28 ^b |
| Water use (L) | 1813.33 \pm 514.32 | 1546.67 \pm 92.37 | 1440.00 \pm 277.12 | 1600.00 \pm 160.00 |
| Estimated SST removed | 341,31 \pm 141,49 | 219,93 \pm 17,52 | 204,87 \pm 75,57 | 289,53 \pm 66,05 |

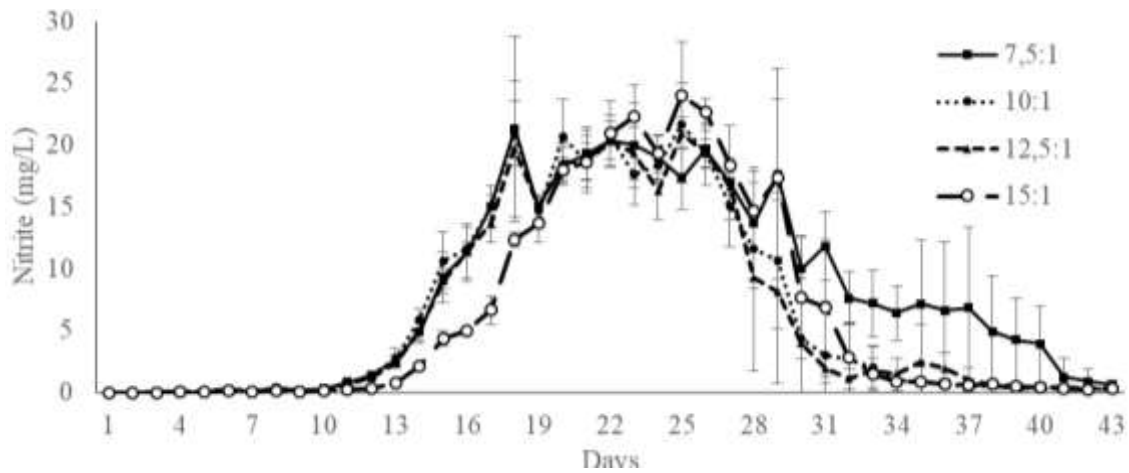


Figure 2: Nitrite ($\text{NO}_2^- \text{N}$) concentration throughout the 43-days trial with different levels of C/N in BFT culture system.

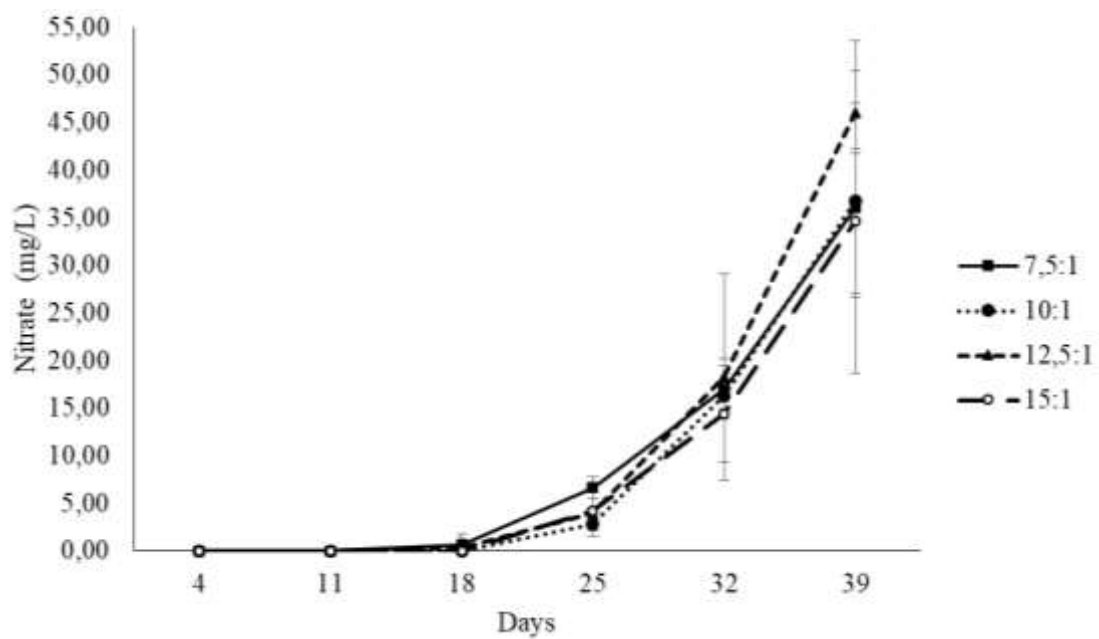


Figure 3: Nitrate ($\text{NO}_3^- \text{N}$) concentration throughout the 43-days trial with different levels of C/N in BFT culture system.

The overall mean and standard values for zootechnical performance are presented in Table 3. Significant differences were found only in final weight in the treatment without fertilization, obtaining the lowest value, but no differences were found in the rates of survival, feed conversion, weekly growth and productivity.

Table 3: Zootechnical performance indexes (mean \pm standard deviation) of *L. vannamei* juveniles grown in tanks fertilized with different C/N ratios. Means in the same line with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

| | 7.5/1 | 10/1 | 12.5/1 | 15/1 |
|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Final weight (g) | 4.62 \pm 1.53 ^b | 5.54 \pm 1.75 ^a | 5.23 \pm 1.81 ^a | 5.45 \pm 1.67 ^a |
| Final biomass (g) | 1283.32 \pm 280 | 1618.49 \pm 262.83 | 1464.40 \pm 124.96 | 1601.52 \pm 121.18 |
| Survival (%) | 86.77 \pm 8.03 | 91.35 \pm 6.21 | 87.5 \pm 8.40 | 91.88 \pm 3.48 |
| Weekly growth rate (g/week) | 0.69 \pm 0.6 | 0.87 \pm 0.5 | 0.81 \pm 0.5 | 0.85 \pm 0.5 |
| Feed conversion rate | 1.92 \pm 0.47 | 1.50 \pm 0.23 | 1.65 \pm 0.14 | 1.52 \pm 0.11 |
| Yield (kg/m ³) | 1.60 \pm 0.35 | 2.02 \pm 0.33 | 1.83 \pm 0.16 | 2.00 \pm 0.15 |

There were no significant differences in bacterial density among treatments in any group. Despite that, the percentage of nitrifying bacteria in 15/1 treatment was slightly lower than in other treatments when comparing to total density of bacteria. Regarding to nitrifying bacteria, the percentage of NOB were higher than AOB in all treatments.

Table 4 – Density of bacteria (10⁶ cells/ml) in each treatment. The values between parentheses are the percentage of each group in relation to total density of bacteria (DAPI). In AOB and NOB lines, the values between parentheses represent the percentage of each group in relation to total of nitrifying bacteria.

| | 7.5/1 | 10/1 | 12.5/1 | 15/1 |
|----------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| AOB | 4.69 \pm 1.39 (45.54 \pm 4.79) | 5.17 \pm 1.60 (45.70 \pm 7.23) | 4.40 \pm 0.55 (43.12 \pm 1.32) | 3.89 \pm 0.72 (39.29 \pm 5.36) |
| NOB | 5.51 \pm 1.03 (54.45 \pm 4.79) | 5.96 \pm 0.60 (54.30 \pm 7.23) | 5.82 \pm 0.89 (56.88 \pm 1.32) | 5.97 \pm 0.38 (60.71 \pm 5.36) |
| Total | | | | |
| Nitrifying (AOB+NOB) | 10.20 \pm 2.27 (2.39 \pm 0.53) | 11.13 \pm 2.05 (3.42 \pm 0.63) | 10.23 \pm 1.43 (3.10 \pm 0.43) | 9.86 \pm 0.65 (2.58 \pm .017) |
| DAPI | 426.85 \pm 65.04 | 325.38 \pm 71.06 | 329.69 \pm 70.20 | 382.19 \pm 97.64 |

AOB = ammonia oxidizing bacteria; NOB = nitrite oxidizing bacteria; DAPI = total density of bacteria.

Discussion

In this study was assessed the effects of Carbon/Nitrogen ratio on water quality, nitrification process and on the shrimp performance. C/N ratio did not seem to affect water quality parameters being only DO and TAN levels affected by treatments. Although there was significant difference in DO concentrations, the lowest mean level found was still higher than the recommended level for the species (Jiang and Pan, 2005). This parameter, altogether with others, such as temperature and pH, must be maintained in recommended levels in order to assure good indexes of growth and survival. The mean values of temperature and pH remained at the range recommended for *L. vannamei* (Ponce-palafox et al., 1997; Wyban et al., 1995, Van Wyk and Scarpa, 1999).

Even though the effects of alkalinity on nitrification in BFT systems is still not clear enough, it is known that the amount and the type of alkalinity can affect the process of nitrification in a reactor and it is strictly linked to neutralization, buffer capacity and inorganic carbon requirement for cellular synthesis and growth (Biesterfeld et al., 1994; Shanahan and Semmens, 2015). In a study with different levels of alkalinity in BFT, Furtado et al. (2014) found high nitrite concentrations for long periods in the treatment of 75 mg/L of alkalinity, while for 150 mg/L or higher, nitrite decreased quickly. Alkalinity remained near to the levels recommend by these authors and seemed not to be the major factor affecting the nitrification process or zootechnical performance in this study.

Turbidity increased during the trial, but there was no significant difference among the treatments. This increase is due to particulate material in suspension and the development of bioflocs. Total suspended solids were monitored and remained below 500 mg/L as recommended by Gaona et al. (2011). In a BFT system, TSS tend to increase with time due to bacterial development and suspended material as feed and feces. Despite not having significant difference in final mean for TSS in all treatments, it is possible to notice a trend of increasing TSS as C/N ratio increases.

A greater amount of solids was removed from both lower and higher C/N ratio treatments. In 7.5 treatment, microalgae were present in higher concentration than in other treatments, as showed in the results for chlorophyll a, establishing a mixed photoautotrophic-autotrophic system. TSS measurement is given by the dried weight of a filtered water sample (AOAC, 1999), taking into account all particles and organisms that once was suspended in the water. As microalgae are bigger than bacteria, the quantification of suspended solids resulted in high values of solids removed. The biomass production of an autotrophic algal can be 2 times greater than heterotrophic bacteria (Ebeling, 2006). On the other hand, high levels of solids were removed in the treatment with higher CN ratio probably due to the availability of organic carbon to heterotrophic bacteria growth. Heterotrophic bacteria can produce 8.06 g of biomass for each gram of ammonia consumed (Ebeling, 2006).

Except 7.5 treatment, the levels of ammonia did not exceed the safe level of 3.95mg/L recommended by Lin and Chen (2001) for salinity and temperature tested on this study. In addition, no treatment exceeded the ammonia limit of 7.0 mg/L predetermined in methodology; therefore, no water exchange was performed due to high ammonia levels. The high peaks and means in the treatment with no organic fertilization can be explained by the amount of organic carbon available to heterotrophic bacteria. On the first weeks, the control of ammonia levels were done by adding carbon organic in order to stimulate heterotrophic bacteria to incorporate the nitrogen into their biomass. Consequently, more organic carbon was available to bacteria as shown in the results. That way, heterotrophic bacteria can remove nitrogen from water almost 10 times faster than nitrifying bacteria and establishes faster in system (Hargreaves, 2006). Although there were less heterotrophic bacteria available in 7.5/1 treatment, the photoautotrophic via seemed had have great importance on controlling the ammonia levels on 7.5 treatment as they did not exceed higher levels (Da Silva et al., 2013).

The nitrification process is divided into two more processes: nitritification and nitratification (Katsogiannis et al., 1994). The first is performed by bacteria known as ammonia oxidizing bacteria, generally from *Nitrospira*, *Nitrococcus* e *Nitrosomonas* genus and have nitrite as final product. The nitratification is the process that oxidizes nitrite into nitrate and is performed by nitrite oxidizing bacteria, and occurs when adequate levels of nitrite are present in the system. These bacteria are characterized for

having low specific growth rates, even taking weeks until becoming well established (Cohen et al., 2005; Vayenas et al., 1997).

In this study, the nitrification process was affected only in the treatment with the highest C/N ratio. ANOVA was performed to compare the levels of nitrite in the beginning of nitrification times (13, 14, 15, 16, 17 and 18 days) and showed that the levels of nitrite in 15/1 treatment was lower than others treatments, demonstrating that the nitrification process was really affect with higher C/N ratio. Also, a lower percentage of AOB bacteria were found in this treatment in comparison with the others, as revealed by FISH results, which may have caused the delay in the beginning of the nitrification, as shown in Figure 2. This delay can be related to the availability of nutrients and competition among groups of bacteria for space and nutrients, mainly between heterotrophic and quimioautotrophic (Luo et al., 2017; Michaud et al., 2006).

The nitrification process was affected in the lowest C/N ratio treatment. According to Keck and Blanc (2002), even moderate stress can cause long term modification in NOB community and induce nitrite to accumulate in the system. The stress in this case may have been caused by the repeated water renovation due to high nitrite levels in this treatment. Although C/N ratio had affected the beginning and ending of nitrification process, the establishment of nitrifying bacteria was not affected as observed in FISH results.

Survival rates were high in all treatments and very close to other studies using similar stocking densities. Krummenauer et al. (2014) found survival rates ranging from 90.93 to 99.06% with a stocking density of 312 juveniles/m³, using different levels of biofloc enrichment water. Ferreira et al., 2016 found survivals ranging from 85.6 to 90% when tested biofilm versus biofloc with high levels of nitrite in all treatments. These results showed that exposure to some levels of nitrogen compounds was not enough to cause any mortality accordingly with the absence of mortality related to ammonia or nitrite during the experiment.

Despite that, this exposure may have caused a decrease in growth of shrimp. The WGR found in this trial was slightly smaller than the one found by Ferreira et al., (2016) and Arantes et al., (2017), but it was similar to the WGR found by Krummenauer et al., (2014) in the treatment where no inoculum of biofloc was used and the biofloc was formed from clear water. The trial was only carried out for enough time

to establish nitrification process. With longer duration, it may be possible to witness the effect of compensatory growth as reported by Foes et al., (2016) and Maciel et al., (2017).

The FCR found in this study is similar to those found by Arantes et al., (2017) and Xu et al., (2016) in studies with similar treatments where biofloc were formed from clear water. While productivity was higher than the ones found by Serra et al., (2015) and similar to those found by Xu et al., (2016).

The results of this study showed that is possible to use less carbon organic without compromising shrimp performance, as there were no significant differences when comparing the treatments with usual C/N ratio (15/1). In general, the results showed that it is possible to reduce the C/N ratio in biofloc cultures to reduce the amount of water used and total suspended solids produced, thus generating capital and resource savings. The best C/N ratio depends on the type of desirable biofloc system. The 12.5/1 ratio is recommended when considering the establishment of a mixed heterotrophic / autotrophic system.

References

- Aminot, A. E Chaussepied, M., 1983. Manuel des analyses chimiques en milieu marin. Brest, CNEXO, 395p.
- AOAC 1999. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Arlington. v. 2, cap.35, 1-30.
- APHA AWWA WEF. 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington, DC.
- Arantes, R., Schweitzer, R., Quadros Seiffert, W., Lapa, K.R., Vinatea, L., 2017. Nutrient discharge, sludge quantity and characteristics in biofloc shrimp culture using two methods of carbohydrate fertilization. *Aquac. Eng.* 76, 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2016.11.002>
- Avnimelech, Y., 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge

- bio-flocs technology ponds. *Aquaculture* 264, 140–147.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.11.025>
- Avnimelech, Y., 1999. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture* 176, 227–235. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00085-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00085-X)
- Azim, M.E., Little, D.C., Bron, J.E., 2008. Microbial protein production in activated suspension tanks manipulating C : N ratio in feed and the implications for fish culture 99, 3590–3599. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.07.063>
- Ballester, E.L.C., Abreu, P.C., Cavalli, R.O., Emerenciano, M., de Abreu, L., Wasielesky, W., 2010. Effect of practical diets with different protein levels on the performance of *Farfantepenaeus paulensis* juveniles nursed in a zero exchange suspended microbial flocs intensive system. *Aquac. Nutr.* 16, 163–172.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00648.x>
- Biesterfeld, S., Farmer, G., Russell, P., Figueroa, L., 1994. Effect of Alkalinity Type and Concentration on Nitrifying Biofilm Activity 75.
- Chythanya, R., Karunasagar, I., Karunasagar, I., 2002. Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain. *Aquaculture* 208, 1–10.
[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00714-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00714-1)
- Cohen, J.M., Samocha, T.M., Fox, J.M., Gandy, R.L., Lawrence, A.L., 2005. Characterization of water quality factors during intensive raceway production of juvenile *Litopenaeus vannamei* using limited discharge and biosecure management tools. *Aquac. Eng.* 32, 425–442. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2004.09.005>
- Da Silva, K.R., Wasielesky, W., Abreu, P.C., 2013. Nitrogen and Phosphorus Dynamics in the Biofloc Production of the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *J. World Aquac. Soc.* 44, 30–41. <https://doi.org/10.1111/jwas.12009>
- Del’Duca, A., Cesar, D.E., Diniz, C.G., Abreu, P.C., 2013. Evaluation of the presence and efficiency of potential probiotic bacteria in the gut of tilapia (*Oreochromis niloticus*) using the fluorescent in situ hybridization technique. *Aquaculture* 388–391, 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.01.019>

- Ebeling, J.M., Timmons, M.B., Bisogni, J.J., 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture* 257, 346–358.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.03.019>
- Ferreira, L.M.H., Lara, G., Wasielesky, W., Abreu, P.C., 2016. Biofilm versus biofloc: Are artificial substrates for biofilm production necessary in the BFT system? *Aquac. Int.* 24, 921–930. <https://doi.org/10.1007/s10499-015-9961-0>
- Foes, G., Krummenauer, D., Lara, G., Poersch, L., Wasielesky, W., 2016. Long term storage and the compensatory growth of white shrimp *Litopenaeus vannamei* in aquaculture ponds. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 44, 588–594.
<https://doi.org/10.3856/vol44-issue3-fulltext-17>
- Furtado, S., Poersch, L.H., Wasielesky, W., 2014. The effect of different alkalinity levels on *Litopenaeus vannamei* reared with biofloc technology (BFT).
<https://doi.org/10.1007/s10499-014-9819-x>
- Gaona, C.A.P., Poersch, L.H., Krummenauer, D., Foes, G.K., Wasielesky, W.J., 2011. The Effect of Solids Removal on Water Quality, Growth and Survival of *Litopenaeus vannamei* in a Biofloc Technology Culture System. *Int. J. Recirc. Aquac.* 12, 54–73. <https://doi.org/10.21061/ijra.v12i1.1354>
- Hargreaves, J.A., 2006. Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. *Aquac. Eng.* 34, 344–363. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2005.08.009>
- Jiang, L., Pan, L., 2005. Effect of dissolved oxygen on immune parameters of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* 18, 7–10. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.07.001>
- Jory, D.E., Cabrera, T.R., Dugger, D.M., Fegan, D., Lee, P.G., Lawrence, L., Jackson, C.J., McIntosh, R.P., Castañeda, J., International, B., Park, H.A., Hwy, N.O.D., Pierce, F., 2001. a Global Review of Shrimp Feed Management : Status and Perspectives. *Aquaculture* 104–152.
- Katsogiannis, A.N., Kornaros, M., Lyberatos, G., 1994. Enhanced nitrogen removal in SBRs bypassing nitrate generation accomplished by multiple aerobic / anoxic phase pairs 53–59.

- Keck, N., Blanc, G., 2002. Effects of formalin chemotherapeutic treatments on biofilter efficiency in a marine recirculating fish farming system. *Aquat. Living Resour.* 15, 361–370. [https://doi.org/10.1016/S0990-7440\(02\)01198-1](https://doi.org/10.1016/S0990-7440(02)01198-1)
- Krummenauer, D., 2014. The Reuse of Water on the Culture of Pacific White Shrimp. *Journal Of The World Aquaculture Society*. Vol., *Litopenaeus vannamei* , in BFT System 45, 3–14. <https://doi.org/10.1111/jwas.12093>
- Lin, Y., Chen, J., 2003. Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels 224, 193–201. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00220-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00220-5)
- Lin, Y., Chen, J., 2001. Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus* *vannamei* Boone juveniles at different salinity levels 109–119.
- Luo, G., Zhang, N., Cai, S., Tan, H., Liu, Z., 2017. Nitrogen dynamics, bacterial community composition and biofloc quality in biofloc-based systems cultured *Oreochromis niloticus* with poly- β -hydroxybutyric and polycaprolactone as external carbohydrates. *Aquaculture* 479, 732–741. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.07.017>
- Maciel, J.C., Francisco, C.J., Miranda-Filho, K.C., 2017. Compensatory growth and feed restriction in marine shrimp production, with emphasis on biofloc technology. *Aquac. Int.* 1–10. <https://doi.org/10.1007/s10499-017-0209-z>
- Michaud, L., Blancheton, J.P., Bruni, V., Piedrahita, R., 2006. Effect of particulate organic carbon on heterotrophic bacterial populations and nitrification efficiency in biological filters. *Aquac. Eng.* 34, 224–233. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2005.07.005>
- Monroy-Dosta, M. del C., de Lara, R.A., Castro-Mejía, J., Castro-Mejía, G., Coelho-Emerenciano, M.G., 2013. Composición y abundancia de comunidades microbianas asociados al biofloc en un cultivo de tilapia. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 48, 511–520. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572013000300009>
- Moss, S.M., Moss, D.R., Arce, S.M., Lightner, D. V., Lotz, J.M., 2012. The role of selective breeding and biosecurity in the prevention of disease in penaeid shrimp

- aquaculture. *J. Invertebr. Pathol.* 110, 247–250.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.01.013>
- Ponce-palafox, J., Martinez-palacios, C.A., Ross, L.G., 1997. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp , 157, 107–115.
- Samocha, T.M., Patnaik, S., Speed, M., Ali, A.M., Burger, J.M., Almeida, R. V., Ayub, Z., Harisanto, M., Horowitz, A., Brock, D.L., 2007. Use of molasses as carbon source in limited discharge nursery and grow-out systems for *Litopenaeus vannamei*. *Aquac. Eng.* 36, 184–191.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2006.10.004>
- Serra, F.P., Gaona, C.A.P., Furtado, P.S., Poersch, L.H., Wasielesky, W., 2015. Use of different carbon sources for the biofloc system adopted during the nursery and grow-out culture of *Litopenaeus vannamei*. *Aquac. Int.* 23, 1325–1339.
<https://doi.org/10.1007/s10499-015-9887-6>
- Shahkar, E., Jang, I.-K., kyoung Kim, S., Yun, H., Katya, K., Park, G., Bai, S.C., 2014. Evaluation of optimum dietary protein level for juvenile whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *J. Crustac. Biol.* 34, 552–558.
<https://doi.org/10.1163/1937240X-00002267>
- Shanahan, J.W., Semmens, M.J., 2015. ScienceDirect Alkalinity and pH effects on nitrification in a membrane aerated bioreactor : An experimental and model analysis. *Water Res.* 74, 10–22. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.12.055>
- Strickland, Jdh, Tr Parsons. 1972. A practical handbook of seawater analysis. Ottawa: Fishery Research Board Canada, 310p.
- UNESCO 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring. Manual and Guides 12, Intergovernmental Oceanographic Commission. Paris, France.
- Van Wyk P, Scarpa J. 1999. Water quality requirements and management, in: Van Wyk, P., Davis-Hodgkins, M., Laramore, R., Main, K., Mountain, J. and J.

Scarpa. (Eds.) Farming marine shrimp in recirculating freshwater systems. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Tallahassee, Florida, p.128.

Vayenas, D. V., Pavlou, S., Lyberatos, G., 1997. Development of a dynamic model describing nitrification and nitrification in trickling filters. *Water Res.* 31, 1135–1147. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(96\)00355-7](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(96)00355-7)

Wasielesky, W., Atwood, H., Stokes, A., Browdy, C.L., 2006. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 258, 396–403. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.030>

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

Wyban, J., Walsh, W.A., Godin, D.M., 1995. Temperature effects on growth , feeding rate and feed conversion of the Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) 38, 267–279.

Xu, W.J., Morris, T.C., Samocha, T.M., 2016. Effects of C/N ratio on biofloc development, water quality, and performance of *Litopenaeus vannamei* juveniles in a biofloc-based, high-density, zero-exchange, outdoor tank system. *Aquaculture* 453, 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.11.021>

Zar, JH. 2010. *Biostatistical Analysis*. Upper Saddle River: Prentice Hall

ZWIRGLMAIER, K. 2005. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) – The next generation. *FEMS Microbiology Letters* 246: 151-158.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados encontrados em ambos experimentos realizados, observamos que o tipo sistema de bioflocos, assim como a relação Carbono/Nitrogênio pode influenciar diretamente nos parâmetros de qualidade de água e no desempenho dos camarões.

Dessa forma, indica-se o estabelecimento de um sistema misto heterotrófico/quimioautotrófico em detrimento de um sistema predominantemente heterotrófico, visando otimizar o uso de água e diminuir a produção de sólidos suspensos totais. Consequentemente, a adoção desse sistema pode reduzir os esforços com manejo em relação tanto a fertilização orgânica, visto que só é realizada até o estabelecimento da comunidade nitrificante, quanto a remoção de sólidos, visto que a produção é consideravelmente menor que no sistema heterotrófico.

Apesar disso, mesmo no estabelecimento do sistema misto, a adição de uma fonte de carbono orgânico é necessária nas primeiras semanas de cultivo para garantir que os níveis de amônia não ultrapassem os limites recomendados para a espécie e não afetem o desempenho dos camarões cultivados. Essa adição promove o crescimento de bactérias heterotróficas que aumentam a biomassa do sistema, aumentando assim, a concentração de sólidos suspensos.

O segundo experimento mostrou que é possível reduzir a relação carbono/nitrogênio sem comprometer o sistema e reduzindo o consumo de carbono orgânico e água. Apesar da relação 10/1 ter apresentado comportamento semelhante a 12,5/1 nesse estudo, a disponibilidade de carbono orgânico pode não ser suficiente para manter os níveis de amônia baixos quando o sistema inicia com maior biomassa de camarões (consequentemente, maior geração de nitrogenados). Dessa forma, recomenda-se a utilização de uma relação Carbono/Nitrogênio 12,5/1. Essa relação mostrou-se eficiente em manter os níveis de amônia baixos no sistema, apresentando padrão bastante parecido a relação usualmente utilizada (15/1), sem elevar consideravelmente os níveis de sólidos produzidos quando comparados aos outros tratamentos. Além disso, o processo de nitrificação pareceu não ter sido afetado por essa relação C/N quando comparado com os outros tratamentos.

Mais estudos relacionados a influência de outras variáveis sobre o processo de nitrificação devem ser realizados, visto que esse processo é crucial no controle de nitrogenados no sistema BFT.