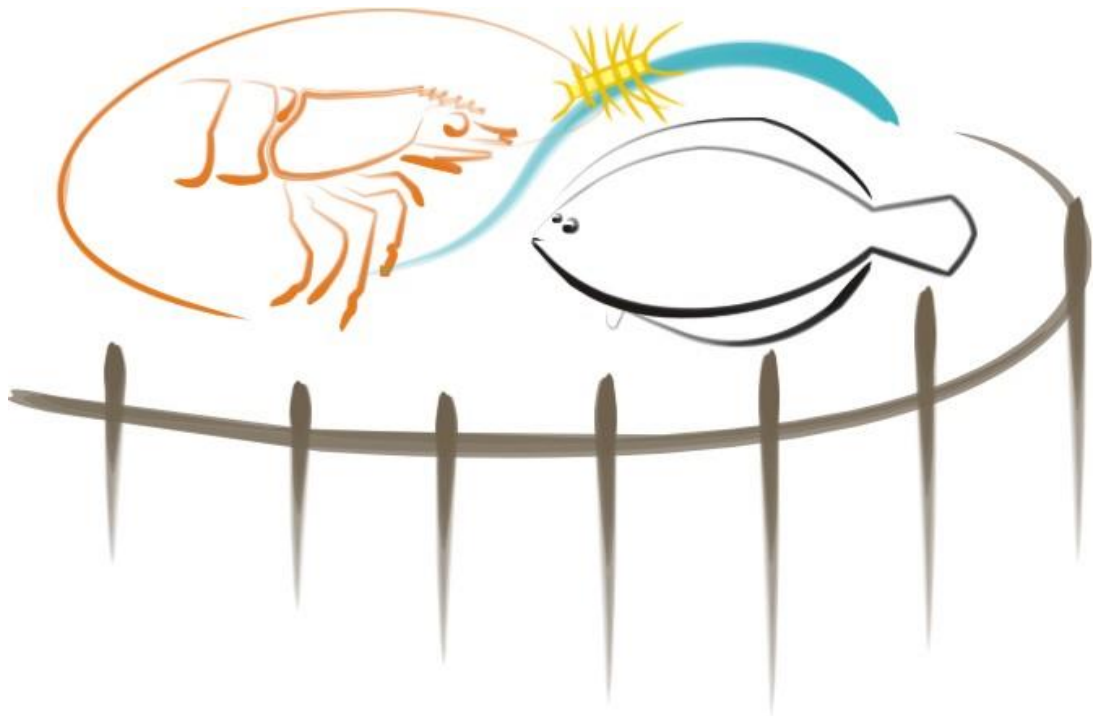


UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA



**EFEITO DA INTENSIDADE DE AERAÇÃO NO PROCESSO DE  
NITRIFICAÇÃO DO BIOFILME NA PRODUÇÃO DE *LITOPENAEUS*  
*VANNAMEI* (BOONE, 1931) EM SISTEMA DE BIOFLOCO E ÁGUA CLARA**

ANA PAULA MARIANE DE MORAIS

RIO GRANDE – RS  
JULHO 2019

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

**EFEITO DA INTENSIDADE DE AERAÇÃO NO PROCESSO DE  
NITRIFICAÇÃO DO BIOFILME NA PRODUÇÃO DE *LITOPENAEUS*  
*VANNAMEI* (BOONE, 1931) EM SISTEMA DE BIOFLOCO E ÁGUA CLARA**

ANA PAULA MARIANE DE MORAIS

Orientador: Prof. Dr. Dariano Krummenauer

Coorientador: Prof. Dr. Paulo César Abreu

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

RIO GRANDE – RS

JULHO 2019

## ATA DE APROVAÇÃO

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	v
LISTA DE FIGURAS .....	vi
DEDICATÓRIA.....	ix
AGRADECIMENTOS .....	x
RESUMO GERAL .....	xi
GENERAL ABSTRACT.....	xii
INTRODUÇÃO.....	14
OBJETIVO GERAL.....	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
MATERIAL E MÉTODOS.....	20
LOCAL E INSTALAÇÕES .....	20
ORIGEM DOS CAMARÕES .....	20
DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	21
EXPERIMENTO 01 - EFICIÊNCIA DAS BACTÉRIAS NITRIFICANTES DO BIOFILME EM ÁGUA CLARA UTILIZANDO DIFERENTES INTENSIDADES DE AERAÇÃO.....	21
MANEJO DE QUALIDADE DE ÁGUA .....	22
EXPERIMENTO 02 – EFICIÊNCIA DAS BACTÉRIAS NITRIFICANTES DO BIOFILME NO SISTEMA DE BIOFLOCO .....	24
MANEJO DE QUALIDADE DE ÁGUA .....	24
COLETA DE MICRO-ORGANISMOS .....	25
CLOROFILA – <i>a</i> .....	25
DESEMPENHO ZOOTÉCNICO .....	25
ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	26
RESULTADOS .....	27
EXPERIMENTO 01 - EFICIÊNCIA DAS BACTÉRIAS NITRIFICANTES DO BIOFILME EM ÁGUA CLARA UTILIZANDO DIFERENTES INTENSIDADES DE AERAÇÃO.....	27
EXPERIMENTO 02 - EFICIÊNCIA DAS BACTÉRIAS NITRIFICANTES DO BIOFILME NO SISTEMA DE BIOFLOCO .....	31

PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DA ÁGUA.....	31
CLOROFILA – <i>a</i> .....	35
MICRO-ORGANISMOS .....	36
DESEMPENHO ZOOTÉCNICO.....	40
DISCUSSÃO .....	41
CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	47

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01.</b> Metodologias para análises.....	23
<b>Tabela 02.</b> Média e desvio padrão dos parâmetros físicos e químicos da água em sistema com diferentes vazões.....	27
<b>Tabela 03.</b> Média e desvio padrão dos parâmetros físicos e químicos da água em sistema BFT e água clara.....	31
<b>Tabela 04.</b> Média e desvio padrão do desempenho zootécnico da produção de <i>L. vannamei</i> dos tratamentos em sistema BFT e água clara com diferentes vazões.....	40
<b>Tabela 05.</b> Total de melação, cal hidratada, horas de assentamento, troca de água e quantidade de água para produzir 1 kg de camarão ao longo do estudo de 47 dias.....	41

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01.</b> Etapas do ciclo do nitrogênio denominados (1) fixação (2) mineralização (3) nitrificação e (4) desnitrificação.....	14
<b>Figura 02.</b> Processo de fixação e formação do biofilme.....	18
<b>Figura 03.</b> Média e desvio padrão dos parâmetros físicos e químicos da água em sistema com diferentes vazões.....	28
<b>Figura 04.</b> Concentrações médias e desvio padrão do nitrito (N-NO <sub>2</sub> -) ao longo do tempo em sistema de água clara.....	28
<b>Figura 05.</b> Concentrações médias e desvio padrão de nitrato (N-NO <sub>3</sub> -) ao longo do tempo em sistema de água clara.....	29
<b>Figura 06.</b> Concentrações médias e desvio padrão de alcalinidade (CaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> ) ao longo do tempo em sistema de água clara.....	30
<b>Figura 07.</b> Concentrações médias e desvio padrão de oxigênio dissolvido ao longo do tempo em sistema de água clara.....	30
<b>Figura 08.</b> Concentrações médias e desvio padrão de amônia ao longo do cultivo superintensivo de <i>Litopenaeus vannamei</i> dos tratamentos <b>BFT</b> : Bioflocos com vazão 20.00 L/min, <b>BFT+BF</b> : Bioflocos e biofilme com vazão 33.75 L/min e <b>BF</b> : Água clara e biofilme com vazão 33.75 L/min em sistemas de bioflocos e biofilme.....	32
<b>Figura 09.</b> Concentrações médias e desvio padrão de nitrito N-NO <sub>2</sub> ao longo do cultivo superintensivo de <i>Litopenaeus vannamei</i> dos tratamentos <b>BFT</b> : Bioflocos com vazão 20.00 L/min, <b>BFT+BF</b> : Bioflocos e biofilme com vazão 33.75 L/min e <b>BF</b> : Água clara e biofilme com vazão 33.75 L/min em sistemas de bioflocos e biofilme.....	33

<b>Figura 10.</b> Concentrações médias e desvio padrão de nitrato N-NO <sub>3</sub> ao longo do cultivo superintensivo de <i>Litopenaeus vannamei</i> dos tratamentos <b>BFT</b> : Bioflocos com vazão 20.00 L/min, <b>BFT+BF</b> : Bioflocos e biofilme com vazão 33.75 L/min e <b>BF</b> : Água clara e biofilme com vazão 33.75 L/min em sistemas de bioflocos e biofilme. Acho que o gráfico de fosfato não é necessário.....	33
<b>Figura 11.</b> Concentrações médias e desvio padrão de oxigênio dissolvido ao longo do cultivo superintensivo de <i>Litopenaeus vannamei</i> dos tratamentos <b>BFT</b> : Bioflocos com vazão 20.00 L/min, <b>BFT+BF</b> : Bioflocos e biofilme com vazão 33.75 L/min e <b>BF</b> : Água clara e biofilme com vazão 33.75 L/min em sistemas de bioflocos e biofilme.....	34
<b>Figura 12.</b> Concentrações médias e desvio padrão de alcalinidade (CaCO <sub>3</sub> ) ao longo do cultivo superintensivo de <i>Litopenaeus vannamei</i> dos tratamentos <b>BFT</b> : Bioflocos com vazão 20.00 L/min, <b>BFT+BF</b> : Bioflocos e biofilme com vazão 33.75 L/min e <b>BF</b> : Água clara e biofilme com vazão 33.75 L/min em sistemas de bioflocos e biofilme.....	35
<b>Figura 13.</b> Concentrações médias e desvio padrão de clorofila - <i>a</i> ao longo do cultivo superintensivo de <i>Litopenaeus vannamei</i> dos tratamentos <b>BFT</b> : Bioflocos com vazão 20.00 L/min, <b>BFT+BF</b> : Bioflocos e biofilme com vazão 33.75 L/min e <b>BF</b> : Água clara e biofilme com vazão 33.75 L/min em sistemas de bioflocos e biofilme.....	36
<b>Figura 14.</b> Abundância de bactérias livres nos tratamentos Bioflocos e Bioflocos + Biofilme.....	37
<b>Figura 15.</b> Abundância de cocos nos tratamentos Bioflocos e Bioflocos + Biofilme.....	37
<b>Figura 16.</b> Abundância de bacilos nos tratamentos Bioflocos + Biofilme.....	38
<b>Figura 17.</b> Abundância de filamentosas nos tratamentos Bioflocos + Biofilme.....	38
<b>Figura 18.</b> Abundância de ameba nos tratamentos Bioflocos + Biofilme.....	39



**Figura 19.** Abundância de bactérias da produção de camarão marinho *L. vannamei* no tratamento Biofloco (BFT).....39

**Figura 20.** Abundância de bactérias da produção de camarão marinho *L. vannamei* no tratamento Biofloco + biofilme (BFT+BF).....40

## DEDICATÓRIA

*Meus pais João Bosco e Dione*  
*A meu irmão Philippe*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmão pelo amor e apoio em todas as minhas decisões e aos amigos feitos ao longo do tempo que foram indispensáveis nesse período.

Ao meu orientador Prof. Dr. Dariano Krummenauer pela orientação, sugestões e dedicação ao longo de todo mestrado.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Paulo César Abreu pelas orientações, ensinamentos e exemplo de pesquisador.

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq, FAPERGS e FINEP pela concessão das bolsas e pelos recursos concedidos que possibilitam a execução da ciência no Brasil. Um especial agradecimento aos nossos apoiadores Guabi, Trevisan, AllAqua, Inve e Aquatec pelo suporte e apoio irrestrito em todas as etapas deste trabalho, que são indispensáveis para realização das nossas pesquisas.

Ao programa de Pós-graduação em Aquicultura, principalmente aos professores que contribuíram para minha formação e a todos que compõem o Projeto Camarão pela ajuda durante todo o trabalho.

## RESUMO GERAL

Estudos mostram a efetividade na utilização de substratos artificiais para o estabelecimento do biofilme, e a importância da sua utilização no sistema de cultivo como fonte complementar de alimento, incremento de espaço para os animais e auxílio no metabolismo dos compostos nitrogenados. Bactérias nitrificantes presentes no biofilme exercem um papel importante na manutenção da qualidade da água e, diversos fatores como pH, temperatura, salinidade e oxigênio dissolvido podem interferir no estabelecimento e eficiência das comunidades bacterianas. No entanto, não existe na literatura dados referentes à influência da intensidade de aeração na comunidade bacteriana presentes no biofilme. Assim, o objetivo desse estudo foi determinar a resposta de bactérias nitrificantes presentes do biofilme de substrato artificial submetidas a diferentes intensidades de aeração na produção de *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) em sistema de água clara e bioflocos. O trabalho foi dividido em dois experimentos, onde o primeiro experimento foi realizado sem camarões e consistiu de quatro tratamentos com três repetições, em tanques de 800L distribuídos em: 1) S/Ar (controle sem aporte de aeração); 2) V7.5 (vazão de 7.5 L/min); 3) V33.75 (vazão de 33.75 L/min) e V75 (vazão de 75 L/min), onde todos tinham substrato artificial, na proporção de 200% da área lateral do tanque. O experimento dois foi estabelecido a partir dos resultados do experimento anterior, constituindo de três tratamentos com três repetições: 1) BFT (bioflocos, com vazão de 20.00 L/min); 2) BFT+BF (bioflocos e biofilme com vazão de 33.75 L/min) e 3) BF (Biofilme com vazão de 33.75 L/min), no qual os camarões ( $7.89 \pm 0.24$ g) foram estocados em nove tanques de 800L com densidade de 500 indivíduos  $m^{-3}$ . O primeiro experimento mostrou que não houve diferença entre as concentrações de compostos nitrogenados entre as intensidades de aeração testada, sendo assim optou-se pela intensidade 33.75 L/min para o experimento 2. Neste, o processo de nitrificação foi mais eficiente nos tratamentos onde haviam biofilme, bem como melhor desempenho zootécnico na presença do biofilme.

**Palavras-Chave:** Bactérias nitrificantes, compostos nitrogenados, Amônia, Nitrito,

## GENERAL ABSTRACT

Artificial substrates have great importance for the establishment of the biofilm, and their use in the culture systems represents a complementary source of food, increase space for animals and aid in the metabolism of nitrogen compounds. Nitrifying bacteria present in biofilm play an important role in the maintenance of water quality, and several factors such as pH, temperature, salinity and dissolved oxygen can interfere in the establishment and efficiency of these bacterial communities. However, there is not much information in the literature on the influence of aeration intensity on the bacterial community present in the biofilm. Thus, the objective of this study was to determine the response of nitrifying bacteria present in the biofilm submitted to different aeration intensities during the production of *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in a clear water system and also with bioflocs. The study was composed of two experiments, where the first experiment was carried out without shrimp and consisted of four treatments with three replicates, in 800L tanks distributed in: 1) W/Air (control - without aeration); 2) V7.5 (flow rate 7.5 L/min); 3) V33.75 (flow rate of 33.75 L/min) and V75 (flow rate of 75 L/min). All treatments as artificial substrate, in the proportion of 200% of the lateral area of the tank. Experiment two was established after the results of the previous experiment, with three treatments and three replicates each: 1) BFT (biofloc, with flow rate of 20.00 L/min); 2) BFT+BF (biofloc and biofilm with flow rate of 33.75 L/min) and 3) BF (biofilm with flow rate of 33.75 L/min), in which the shrimp ( $7.89 \pm 0.24\text{g}$ ) were stored in nine tanks (800 L) with a density of 500 shrimps  $\text{m}^{-3}$ . In both experiments Ammonia, nitrite were measured daily, while nitrate was analyzed weekly. The first experiment showed no difference in the ammonia concentrations of the different treatments, whereas nitrite showed higher concentrations in the treatment without aeration. The 33.75 L/min flow rate was chosen for experiment 2 to be compared with the aeration normally employed in our systems (20.00 L/min). In this last experiment, the nitrification process was more efficient in the treatments with biofilm and bigger air flow rate, with smaller concentrations of ammonia and nitrite in comparison to the BFT treatment. Similarly, treatments with biofilm and stronger flow rate showed better zootechnical performance of the shrimp.

**Keywords:** Nitrifying bacteria, nitrogen compounds, ammonia, nitrite

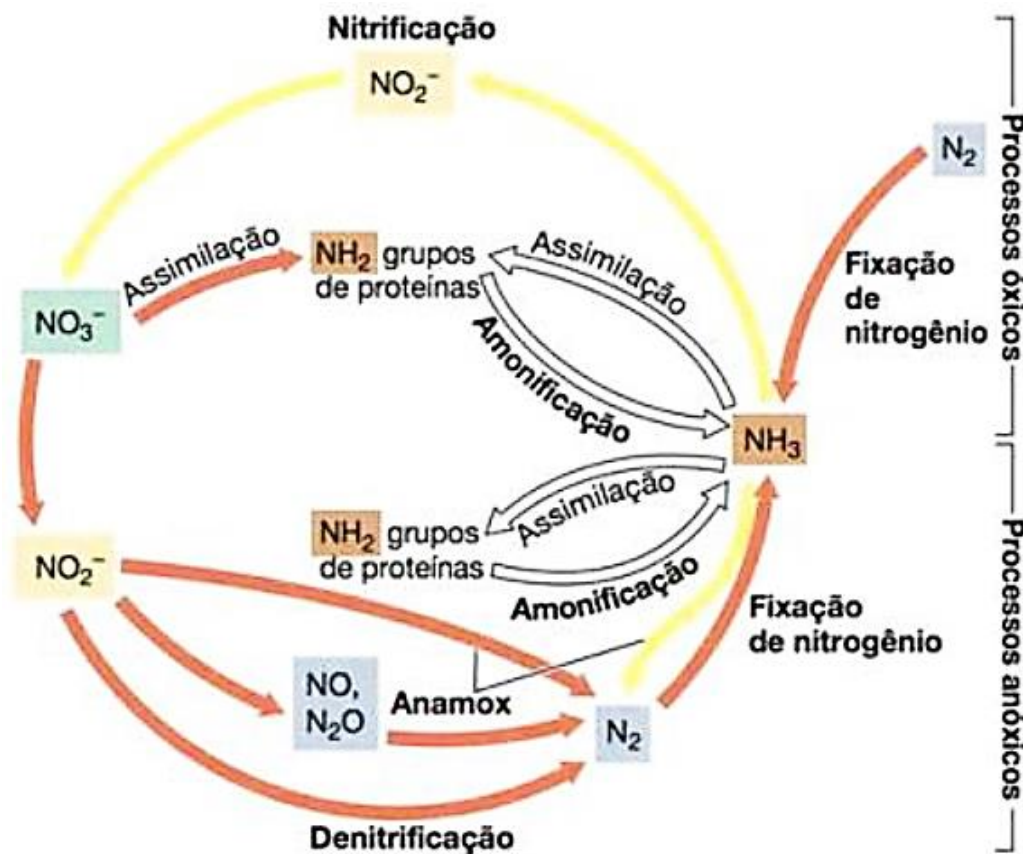
# 1 INTRODUÇÃO

2

3 O nitrogênio é um nutriente indispensável para os organismos vivos, e um dos  
4 elementos mais importantes nos ecossistemas aquáticos, pois é um componente essencial  
5 para constituição de proteínas e ácidos nucleicos. Podendo ser limitante da produção  
6 primária nesses ecossistemas ou tóxicos em determinadas condições para os organismos  
7 aquáticos (Vieira, 2017).

8 O processo de transformação do nitrogênio realizado pelos micro-organismos é  
9 denominado ciclo do nitrogênio (Figura 01), sendo composto por quatro principais  
10 processos denominados: fixação, mineralização, nitrificação e desnitrificação (Jiménez-  
11 Ojeda et al., 2018).

12



13

14 Figura 01: Etapas do ciclo do nitrogênio denominados (1) fixação (2) mineralização (3)  
15 nitrificação e (4) desnitrificação. Fonte: (Madigan et al., 2016).

16

17

18 No processo de nitrificação ocorre a oxidação sucessiva da amônia para nitrito e  
19 posteriormente deste para nitrato, realizada principalmente por micro-organismos  
20 autoquimiolitotróficos (Ebeling et al., 2006) pertencentes a dois grupos de bactérias, o  
21 primeiro é responsável pela nitrificação, isto é, a oxidação da amônia a nitrito, realizada  
22 pelas bactérias amônia-oxidantes (BAO) que em sua maioria pertencem aos gêneros  
23 *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus* e *Nitrosovibrio*, sendo o  
24 gênero *Nitrosomonas* o mais conhecido. Já o segundo grupo, realiza a conversão do nitrito  
25 em nitrato, etapa designada como nitratação. As bactérias pertencentes a este grupo são  
26 denominadas bactérias nitrito-oxidantes (BNO) que, em sua maioria, pertencem aos  
27 gêneros *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira* e *Nitrospina*, destacando-se o grupo  
28 *Nitrobacter* (Ebeling et al., 2006; Madigan et al., 2016).

29 Na produção do *Litopenaeus vannamei* como em outros sistemas de cultivo de  
30 organismos aquáticos, altas concentrações de nitrogênio podem ser tornar um problema,  
31 uma vez que acumula-se no ambiente aquático devido as excretas dos organismos  
32 produzidos, restos de alimentos não consumidos e detritos orgânicos (Timmons &  
33 Ebeling, 2010). Sendo assim, o controle dentro do ambiente de produção é importante já  
34 que compostos como amônia e nitrito são tóxicos e podem causar danos aos organismos  
35 produzidos.

36 A amônia está presente em duas formas, a ionizada ( $\text{NH}_4^+$ ) que apresenta  
37 característica lipofóbica, ou seja, não tem afinidade por gorduras, assim ocorre uma  
38 menor penetração pelas membranas. E a forma não ionizada ( $\text{NH}_3$ ), sendo esta a forma  
39 tóxica para os organismos produzidos, que apresenta característica lipofílica, com  
40 afinidade pelas gorduras, o que facilita a penetração através das membranas respiratórias.  
41 Estes dois elementos constituem o nitrogênio amoniacal total ( $\text{NH}_4^+ + \text{NH}_3 = \text{N-AT}$ )  
42 (Timmons & Ebeling, 2010).

43 A toxicidade de N-AT no meio aumenta com a elevação do pH e temperatura da  
44 água, e reduz com o aumento da salinidade (Boyd & Tucker, 2012) afetando os processos  
45 metabólicos dos camarões bem como alterações no pH das células e no funcionamento  
46 da bomba sódio/potássio que faz parte do processo de osmorregulação (Fromm &  
47 Gillette, 1968). A exposição a concentrações inadequadas desses compostos podem  
48 causar o estresse, desencadeando diversas alterações fisiológicas, comprometer o  
49 desempenho, o sistema imune aumentando a susceptibilidade a doenças e causar até a  
50 morte, dessa forma prejudicando a produção. Giroto, (2010) avaliou a histopatologia das

51 brânquias de juvenis de *L. vannamei* expostos a elevadas concentrações de amônia, onde  
52 foi possível observar que a amônia reduziu a capacidade de proteção das brânquias contra  
53 a amônia, provocando uma maior aderência da cutícula no epitélio, podendo causar lesões  
54 e perda da função das brânquias.

55 O nitrito é o composto intermediário no processo de nitrificação, bem como o  
56 segundo composto nitrogenado mais tóxico para os organismos. Seu principal mecanismo  
57 de toxicidade ocorre quando este se liga à hemocianina, transformando-a em  
58 metahemocianina, impedindo o transporte de oxigênio para os tecidos e reduzindo a  
59 quantidade de oxigênio disponível para o metabolismo (Tahon et al., 1988). Este processo  
60 pode levar à hipóxia e conseqüentemente, mortalidade dos organismos produzidos (Chen  
61 et al., 1986). Avaliando a toxicidade do nitrito sobre o crescimento e sobrevivência do *L.*  
62 *vannamei* de Melo et al. (2016) relacionaram as altas concentrações de nitrito com baixas  
63 sobrevivências nos sistemas de água clara e biofloco.

64 O nitrato é o produto final do processo de nitrificação, e é considerado menos  
65 tóxico para os organismos aquáticos. Todavia, em elevadas concentrações, pode causar  
66 toxidez, principalmente em sistemas fechados com reutilização de água. Sua toxidez é  
67 devida a seu efeito sobre a osmorregulação e, possivelmente, sobre o transporte de  
68 oxigênio, de maneira similar ao que acontece com o nitrito formando a hemocianina  
69 (Arana, 2002), assim elevadas concentrações de nitrato podem afetar o crescimento e  
70 sobrevivência dos camarões, como observado por Kuhn et al., (2010) que evidenciaram  
71 que o nitrato afetou mais a taxa de sobrevivência do que a taxa de crescimento. A  
72 determinação dos limites aceitáveis para os animais é crucial nos sistemas de  
73 produção diminuindo as trocas de água e minimizando os impactos ambientais.

74 As bactérias nitrificantes, BAO e BNO apresentam uma demanda por oxigênio  
75 para atividade celular, crescimento, reprodução e respiração endógena. Para realizar o  
76 processo de nitrificação e manter os níveis adequados dos compostos nitrogenados é  
77 fundamental que estes microorganismos se estabeleçam no ambiente de cultivo. Um  
78 sistema de aeração eficiente é importante para o fornecimento de oxigênio para animais  
79 produzidos e para manter os flocos em suspensão no sistema. Este sistema também  
80 fornece a oxigenação necessária às bactérias nitrificantes. Concentrações baixas de  
81 oxigênio dissolvido limitam ou suprimem a nitrificação (Zhu et al., 2008; Avnimelech,  
82 2009).



83 Em sistemas de produção de organismos aquáticos os compostos nitrogenados  
84 como a amônia tendem a acumular devido a intensificação. Para a conversão completa de  
85 1mg de amônia a nitrato, é necessário aproximadamente 4,18g oxigênio dissolvido  
86 (Timmons & Ebeling, 2010). Devido à menor afinidade das bactérias oxidantes de nitrito  
87 pelo oxigênio, a oxidação desse composto é mais sensível a baixas concentrações de  
88 oxigênio dissolvido, provocando acúmulos de nitrito em ambientes onde ocorre hipóxia  
89 ou anoxia (Campos et al., 2007).

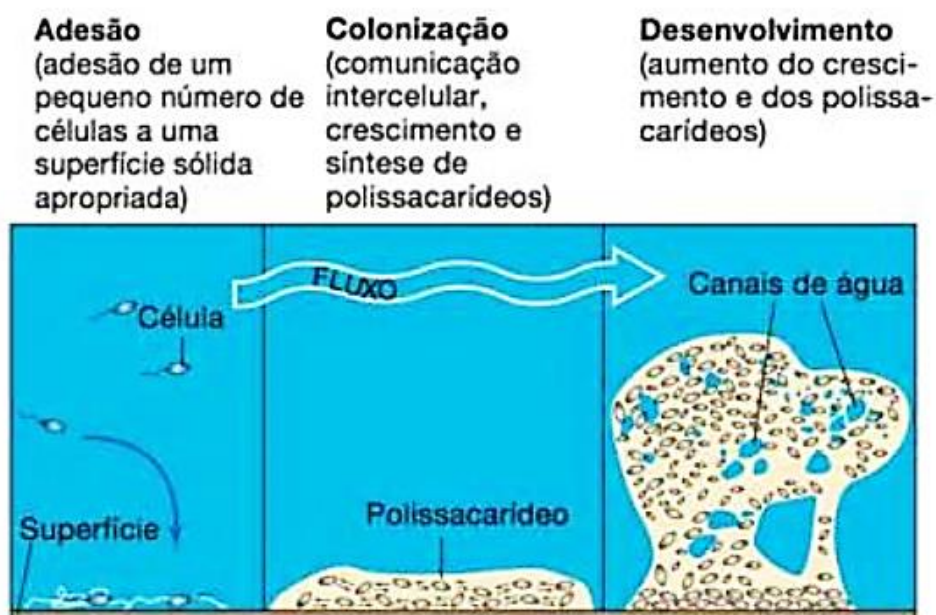
90 Sistemas intensivos de aquicultura como o sistema de tecnologia de biofloc  
91 (*Biofloc Technology System* – BFT) apresentam aumento da produtividade  
92 concomitantemente com a diminuição dos impactos ambientais, gerando uma melhor  
93 relação custo-benefício em virtude da reutilização da água por diversos ciclos, altas  
94 densidades de estocagem, redução dos efluentes gerados e presença de uma comunidade  
95 microbiana que atua na manutenção da qualidade de água, com a remoção dos compostos  
96 nitrogenados, e também como fonte complementar de alimentos para peixes e crustáceos  
97 produzidos (Avnimelech, 1999; Wasielesky et al., 2006; Ballester et al., 2010).

98 No sistema BFT, a biota aeróbica e heterotrófica presente nos bioflocos realiza a  
99 remoção de amônia da água, após a adição de uma fonte de carbono (açúcar). Neste caso,  
100 as bactérias heterotróficas absorvem amônia e açúcar para produzir nova biomassa, mas  
101 a amônia pode retornar rapidamente ao sistema devido a predação destas bactérias por  
102 protozoários, que as digerem e excretam (De Schryver et al., 2008). No intuito de  
103 estimular as bactérias heterotróficas para a redução das concentrações de amônia em  
104 sistemas BFT, Serra et al., 2015 verificaram que a adição de fontes de carbono orgânico  
105 foram eficientes transformando a amônia em biomassa bacteriana, e posteriormente o  
106 aparecimento do nitrito indica que processo de nitrificação está sendo realizado pelas  
107 bactérias nitrificantes.

108 O biofilme pode ser definido como uma matriz orgânica aderida a qualquer  
109 substrato submerso, que é colonizado por uma comunidade microbiana composta por  
110 bactérias, protozoários, fungos e algas associada (Ramesh et al., 1999). Onde esses  
111 organismos atuam prevenindo contra as bactérias patogênicas, isso ocorre devido a  
112 predação das bactérias por protozoários, diminuindo o risco de disseminação de doenças  
113 no cultivo e aumentando a disponibilidade de alimento natural (Thompson et al., 2002).  
114 Após a adesão de matéria orgânica dissolvida ao substrato, ocorre a formação de um filme  
115 orgânico. Este é colonizado em etapas. As células bacterianas se aderem ao filme por

116 colisão entre as células e o filme orgânico quando ocorre a fixação inicial. Essa primeira  
117 etapa é denominada adesão. Após a adesão, células bacterianas perdem seus flagelos  
118 tornando-se imóveis, daí em diante começa a colonização e crescimento do biofilme por  
119 adição de muco (polissacarídeo) e incorporação de novos microorganismos. Caso o  
120 ambiente apresente características indesejáveis para o desenvolvimento do biofilme como  
121 pouco nutrientes, acontece o processo de dispersão ativa para outro ambiente (Figura 02)  
122 (Madigan et al., 2016). Diversos trabalhos reportam a importância da comunidade  
123 microbiana existente no biofilme para a qualidade de água e aporte nutricional.

124



125

126 Figura 02: Processo de fixação e formação do biofilme. Fonte (Madigan et al., 2016)

127

128 Foi demonstrado que o biofilme é responsável por remover os compostos  
129 nitrogenados da água, especialmente amônia e nitrito, que são altamente tóxicos para os  
130 organismos produzidos. Thompson et al. (2002), avaliaram a eficiência do biofilme na  
131 manutenção da qualidade de água através da absorção dos nutrientes inorgânicos  
132 dissolvidos (amônia e fosfato), relacionando a diminuição na concentração de amônia a  
133 absorção do mesmo pelas microalgas e cianobactérias presentes no biofilme. Avaliando  
134 a influência do biofilme no cultivo de *Farfantepenaeus paulensis*, Ballester et al. (2003)  
135 concluíram que o biofilme influenciou positivamente no crescimento do camarão e  
136 também como fonte alternativa de alimentação. Para descrever a sucessão microbiana

137 durante a formação do biofilme e a importância das bactérias nitrificantes na ciclagem de  
138 nutrientes nitrogenados, Oliveira et al. (2006) caracterizaram as bactérias nitrificantes  
139 através do método de fluorescent in situ hybridization (FISH) na larvicultura do camarão-  
140 rosa *F. paulensis*.

141 A fim de aumentar a eficiência na produção de camarões, o uso de substratos  
142 artificiais para fixação do biofilme em sistema BFT já vem sendo realizado. Entretanto,  
143 Ferreira et al. (2016) avaliando a adição de substratos artificiais neste sistema, concluíram  
144 que estes serviram apenas como fonte de alimento complementar e relatam que os  
145 substratos promoveram o controle de sólidos suspensos, no entanto, não observaram  
146 diferença na metabolização dos compostos nitrogenados. Assim como Ferreira et al.  
147 (2016), outros estudo indicam que em sistemas BFT a colocação de substratos para o  
148 desenvolvimento de biofilme seria dispensável, já que as bactérias presentes no biofoco  
149 seriam suficientes para a manutenção da qualidade da água, reduzindo os níveis de  
150 amônia e nitrito e também como fonte de alimento.

151 Entretanto, informações sobre o real efeito da utilização do biofilme no sistema  
152 com biofoco ainda são deficientes. Especificamente, é possível que a menor eficiência  
153 das bactéria nitrificantes no biofilme em sistemas BFT se deva a uma limitação de  
154 oxigênio devido à baixa aeração necessária para manter os flocos em suspensão sem  
155 causar a sua ruptura e garantir a nitrificação pelas bactérias presentes no biofoco (Lara  
156 et al., 2017; Souza et al., 2019). Por outro lado a baixa intensidade de aeração pode afetar  
157 negativamente o processo de nitrificação no biofilme. Assim, a hipótese do presente  
158 trabalho é que uma aeração mais intensa resultaria numa maior eficiência do biofilme  
159 para a manutenção da qualidade da água.

160

## 161 OBJETIVO GERAL

162

163 Avaliar a eficiência das bactérias nitrificantes no biofilme presente no substrato  
164 artificial submetidas a diferentes intensidades de aeração na produção de *Litopenaeus*  
165 *vannamei* (Boone, 1931) em sistema de biofoco e água clara.

166

## 167 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

168

- 169 • Avaliar a influência das diferentes intensidades de aeração no processo de
- 170 nitrificação, sem a presença de camarões;
- 171 • Analisar a qualidade da água com ênfase nos compostos nitrogenados ao longo da
- 172 produção de *L. vannamei* em água clara e sistema de biofloco;
- 173 • Avaliar o crescimento, biomassa final e sobrevivência a fim de determinar quais
- 174 das diferentes intensidades de aeração apresentam melhores resultados de desempenho
- 175 zootécnico para a espécie de *L. vannamei*;
- 176 • Caracterizar a comunidade de microrganismos nos diferentes tratamentos.

177

178

179

## 180 MATERIAL E MÉTODOS

181

### 182 LOCAL E INSTALAÇÕES

183

184 Os experimentos foram realizados no Laboratório de Carcinocultura da Estação  
185 Marinha de Aquacultura - (EMA) pertencente ao Instituto de Oceanografia da  
186 Universidade Federal do Rio Grande – FURG, localizado na cidade do Rio Grande,  
187 Cassino - RS, Brasil (32° 19' S, 52° 15' W).

188

### 189 ORIGEM DOS CAMARÕES

190

191 Os camarões da espécie *L. vannamei* (Boone, 1931) utilizados no experimento  
192 foram adquiridos do laboratório comercial Aquatec Ltda. - RN, na fase de naúplios,  
193 chegando a fase de pós-larvas no setor de larvicultura. Posteriormente, os animais foram  
194 estocados em berçário em sistema BFT até atingirem aproximadamente 1,00g, quando  
195 então foram transferidos para o setor de engorda até atingirem o peso médio de 7,81 ±  
196 0,24 g.

197

## 198 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

199

200 Foram utilizados tanques de 800 litros de volume útil, preenchidos com água  
201 marinha, clorada a uma proporção de 10ppm de hipoclorito de sódio, posteriormente  
202 declorada com ácido ascórbico na proporção de 1ppm. O sistema de aeração foi composto  
203 por um soprador de 4Hp e mangueiras microperfuradas Aerotubes® mantendo a aeração  
204 constante. A temperatura foi mantida com aquecedores elétricos submersos (Hydor Theo  
205 200W). Devido a evaporação, foi utilizado água doce declorada para repor a perda de  
206 água e manter a salinidade em 30.

207 Os substratos artificiais utilizados para colonização do biofilme foi do tipo não  
208 flutuantes Needlona® composto 100% de fibra de poliéster, peso de 250g / m<sup>2</sup>, 1,4 mm  
209 de espessura, densidade 0,18 g / cm<sup>3</sup> a uma proporção de 200% da área lateral do tanque.  
210 Antes do início dos experimentos, os substratos ficaram por 30 dias em sistema de  
211 bioflocos. Para mensurar a vazão de ar, foram utilizados rotâmetros que são medidores de  
212 vazão de líquidos, gás ou ar, seu funcionamento dar-se através do deslocamento do cone  
213 de medição interno partido de sua base até o topo e conseqüentemente, aumentando a  
214 passagem do fluido. Foram acoplados individualmente (TRP-255-H-7 1 POL NPT-  
215 Tecnofluid®) na entrada da aeração de cada unidade experimental e regulado na vazão de  
216 acordo com o tratamento.

217

### 218 EXPERIMENTO 01 - EFICIÊNCIA DAS BACTÉRIAS NITRIFICANTES DO 219 BIOFILME EM ÁGUA CLARA UTILIZANDO DIFERENTES INTENSIDADES DE 220 AERAÇÃO

221

222 O delineamento experimental consistiu de quatro tratamentos com três repetições  
223 cada, denominados: 1) **S/AR**: sem aporte de aeração; 2) **V7.5**: vazão 7.5 L min<sup>-1</sup>; 3)  
224 **V33.75**: vazão 33.75 L/min e 4) **V75**: vazão 75 L/min em sistema de água clara, sem  
225 camarão. Para determinar a eficiência das bactérias nitrificantes, foi adicionado cloreto  
226 de amônio para atingir a concentração de 7,0 mg L<sup>-1</sup> representando o limite de segurança  
227 para a espécie *L. vannamei* na salinidade 35 (Lin and Chen, 2001). O estudo teve duração  
228 de 10 dias.

229 MANEJO DE QUALIDADE DE ÁGUA

230

231 Foram coletadas amostras a cada quatro horas para análises de amônia (N-AT),  
232 nitrito (N-NO<sub>2</sub>), alcalinidade (CaCO<sub>3</sub>), pH e oxigênio dissolvido seguindo metodologias  
233 descritas na tabela 01.

234

235

236

237

238

239

240

241

242

243

244

245

246

247

248

249

250

251

252

253

254

Análise	Unidade	Metodologia	Equipamento
Alcalinidade	mg L <sup>-1</sup>	APHA (1999)	Bureta e erlenmeyer
Amônia (N-AT)	mg L <sup>-1</sup>	UNESCO (1983)	Espectrofotômetro
Clorofila - <i>a</i>	µg L	Welschmeyer (1994).	Fluorímetro Turner TD700
Fosfato (PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> )	mg L <sup>-1</sup>	Aminot e Chaussepied (1983)	Espectrofotômetro
Microorganismos	Bactéria mL	Utermöhl (1958)	Microscópio de epifluorescência
Nitrato (N-NO <sub>3</sub> )	mg L <sup>-1</sup>	Aminot e Chaussepied (1983)	Espectrofotômetro
Nitrito (N-NO <sub>2</sub> )	mg L <sup>-1</sup>	Strickland & Parsons (1972)	Espectrofotômetro
Oxigênio dissolvido	mg L <sup>-1</sup>	-	Multiparâmetros HANNA®
pH	-	-	pHmetro digital Mettler Toledo/ FEP20
Salinidade	-	-	Multiparâmetros HANNA®
Sólidos sedimentáveis	mg L <sup>-1</sup>	Eaton et al. (1995) adaptada por Avnimelech (2007)	Cone Imhoff
Sólidos suspensos totais (SST)	mg L <sup>-1</sup>	Adaptada de AOAC (1999)	Filtros de fibra-de- vidro GF50-A e bomba de vácuo Primatec®
Temperatura	°C	-	Multiparâmetros HANNA® HI98194
Turbidez	NTU	-	Turbidímetro (Hach® modelo 2100P)

257 EXPERIMENTO 02 – EFICIÊNCIA DAS BACTÉRIAS NITRIFICANTES DO  
258 BIOFILME NO SISTEMA DE BIOFLOCO

259

260 O experimento foi realizado baseado na melhor intensidade de aeração  
261 determinada no experimento 01 (33.75 L/min), totalizando 47 dias. O delineamento  
262 experimental consistiu três tratamentos em triplicatas, sendo eles: 1) **BFT** – Biofoco com  
263 vazão 20.00 L/min; 2) **BFT+BF** – Biofoco e biofilme com vazão 33.75 L/min e 3) **BF** –  
264 biofilme com vazão 33,75 L/min. Os camarões de  $7,81 \pm 0,24$  g foram estocados a uma  
265 densidade de 500 camarões  $m^{-3}$  e alimentados com ração comercial Guabi® 1.6mm com  
266 40% de proteína bruta fornecida duas vezes ao dia (08:00h e 16:00h) ajustadas  
267 semanalmente após as biometrias de acordo com a metodologia de (de Yta et al., 2004).

268 Para iniciar a formação do biofoco foram realizadas fertilizações orgânicas com a  
269 adição de melão de cana líquido (37% de carbono) quando as concentrações de N-AT  
270 atingiram  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  para manter a relação C:N 15:1.

271

272 MANEJO DE QUALIDADE DE ÁGUA

273

274 Durante o período experimental, foram monitorados duas vezes ao dia o oxigênio  
275 dissolvido, temperatura utilizando o multiparâmetros e pH. A alcalinidade foi analisada  
276 três vezes por semana, quando os valores de pH e alcalinidade estavam respectivamente  
277 abaixo de 7,3 e  $150 \text{ mg L}^{-1}$  foram corrigidos com a adição de cal hidratada (Furtado et al.,  
278 2011). Semanalmente foram mensurados a salinidade, sólidos sedimentáveis, turbidez e  
279 sólidos suspensos totais (SST). Quando as concentrações de SST ultrapassaram  $500 \text{ mg/L}$ ,  
280 foram utilizados clarificadores no intuito de remover os sólidos excedentes (Gaona et al.  
281 2011).

282 Os compostos nitrogenados como nitrogênio amoniacal total (N-AT) e nitrito (N-  
283  $\text{NO}_2^-$ ) foram analisados diariamente, já o nitrato (N- $\text{NO}_3^-$ ) e fosfato ( $\text{PO}_4^{-3}$ )  
284 semanalmente. Ao atingir a concentração de  $26 \text{ mg L}^{-1}$  de nitrito, nível de segurança para  
285 salinidade trabalhada seria realizado renovações a fim de diminuir a concentração.

286



## 287 COLETA DE MICRO-ORGANISMOS

288

289 Para caracterização da comunidade microbiana, semanalmente foram coletadas  
290 amostras de 18 ml de água de cada unidade experimental e fixadas em formalina na  
291 concentração final 4% para posterior identificação dos microorganismos no Laboratório  
292 de Fitoplâncton e de Microorganismos Marinhos da FURG. As amostras fixadas foram  
293 filtradas em filtros de membrana Nucleopore (0,2µm) escurecidos e as bactérias coradas  
294 com Laranja de Acridina. As lâminas foram fotografadas com uso de câmera fotográfica  
295 acoplada ao microscópio de epifluorescência, Zeiss Axioplan com aumento de 1000X  
296 para posterior contagem de 30 campos escolhidos de forma aleatória dos tratamentos BFT  
297 e BFT+ BF para comparar a abundância de bactérias com o auxílio do programa Zeiss  
298 Blue versão 2.5, entre os tratamentos com e sem substrato, assim o tratamento BF não foi  
299 analisado.

300

## 301 CLOROFILA – *a*

302

303 A análise de clorofila - *a* foi realizada semanalmente, coletando amostras de água  
304 de cada unidade experimental, filtrando e armazenando em frascos com solução de  
305 acetona 90% e mantidas à -12°C. Após 24 horas a concentração de clorofila – *a*.

306

## 307 DESEMPENHO ZOOTÉCNICO

308

309 Para acompanhar o desempenho zootécnico dos animais, foram realizadas  
310 biometrias semanais com N de 30 animais, utilizando de balança digital com precisão de  
311 0,01 g. Foi considerado: ganho de peso semanal (GPS), sobrevivência e taxa de  
312 crescimento específico (TCE) utilizando as respectivas formulas.

313

$$314 \text{ GPS} = \frac{\text{Ganho de peso}}{\text{Número de semanas de cultivo}}$$

315

316

317

318 
$$\text{SOBREVIVÊNCIA} = \frac{\text{NfC}}{\text{NiC}} \times 100$$

319 Onde: **NfC**= número final de camarões e **NiC**= número inicial de camarões.

320

321 
$$\text{TCE}(\%) = \frac{\text{LnWf} - \text{LnWi}}{t} \times 100$$

322 Onde: **Wf**= Peso final médio, **Wi**= Peso inicial médio e **t**= tempo em dias.

323

324

## 325 ANÁLISE ESTATÍSTICA

326

327 Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Submetidos a testes de  
328 normalidade (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Levene), com a comprovação dessas  
329 premissas, foi utilizada a Análise de Variância Simples (ANOVA One-way) e teste de  
330 Tukey foram realizados para verificar as diferenças entre os tratamentos. Os dados de  
331 compostos nitrogenados e bactérias não satisfizeram os pressupostos para ANOVA e,  
332 portanto foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskall-Wallis seguido de um teste de  
333 comparações múltiplas (Zar 2010). O nível de significância adotado foi de 5% em todos  
334 os casos ( $p < 0,05$ ). Todas as análises foram realizadas utilizando o software  
335 STATISTICA<sup>®</sup> versão 7.0.

336

337

338

339

340

341

342

343

344

345

346 RESULTADOS

347

348 EXPERIMENTO 01 - EFICIÊNCIA DAS BACTÉRIAS NITRIFICANTES DO  
349 BIOFILME EM ÁGUA CLARA UTILIZANDO DIFERENTES INTENSIDADES DE  
350 AERAÇÃO

351

352 Tabela 02 – Média e desvio padrão dos parâmetros físicos e químicos ao longo do estudo  
353 de 10 dias de diferentes intensidades de aeração com diferentes taxas de fluxo (três  
354 réplicas)

Tratamento	S/AR	V7.5	V33.75	V75
N-AT (mg L <sup>-1</sup> )	3.07 ± 0.49	2.60 ± 0.57	2.52 ± 1.03	2.65 ± 0.37
N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	0.17 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.05 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.08 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.05 ± 0.03 <sup>b</sup>
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	2.21 ± 0.04	2.85 ± 0.61	3.32 ± 0.96	3.55 ± 0.97
pH	8.12 ± 0.18 <sup>a</sup>	8.07 ± 0.19 <sup>a</sup>	8.21 ± 0.17 <sup>b</sup>	8.16 ± 0.19 <sup>a</sup>
CaCO <sub>3</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	153 ± 27	149 ± 25	145 ± 25	155 ± 24
Oxigênio Dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	6.23 ± 0.03 <sup>a</sup>	6.33 ± 0.03 <sup>b</sup>	6.34 ± 0.04 <sup>b</sup>	6.40 ± 0.02 <sup>b</sup>

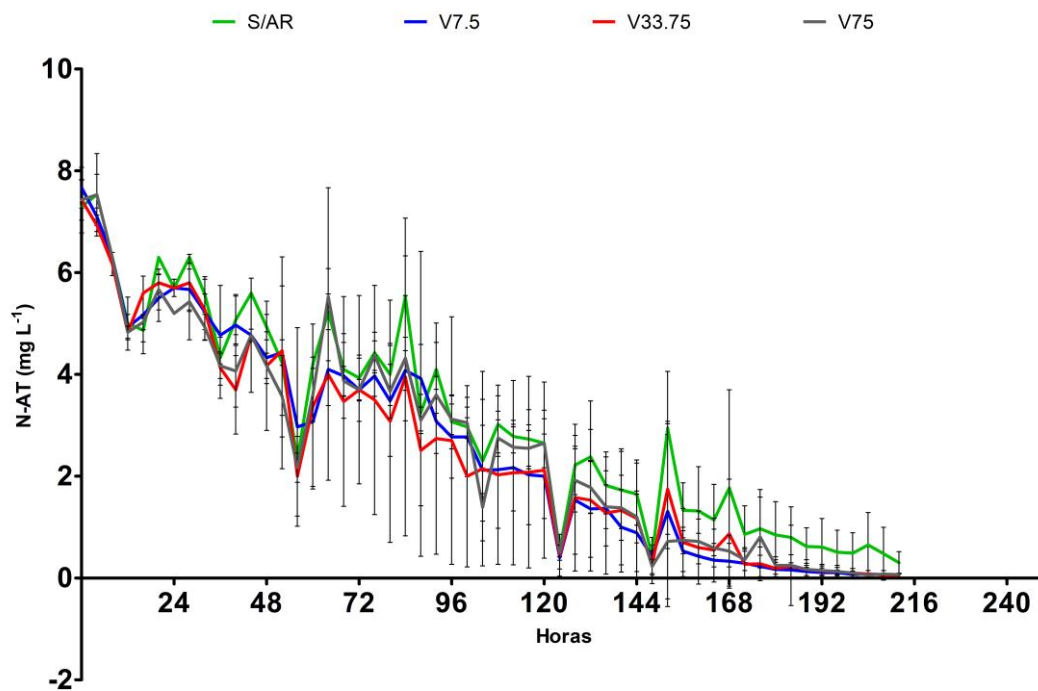
355 Letras diferentes na mesma linha representa diferença estatística p<0.05.

356 **S/AR:** sem aporte de aeração, **V7.5:** vazão 7.5 L/min, **V33.75:** vazão 33.75 L/min e **V75:**  
357 vazão 75 L/min em sistema de água clara. **N-AT=** Nitrogênio na forma de amônia total,  
358 **N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>=** Nitrito, **N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>=** Nitrato e **CaCO<sub>3</sub>=** Alcalinidade.

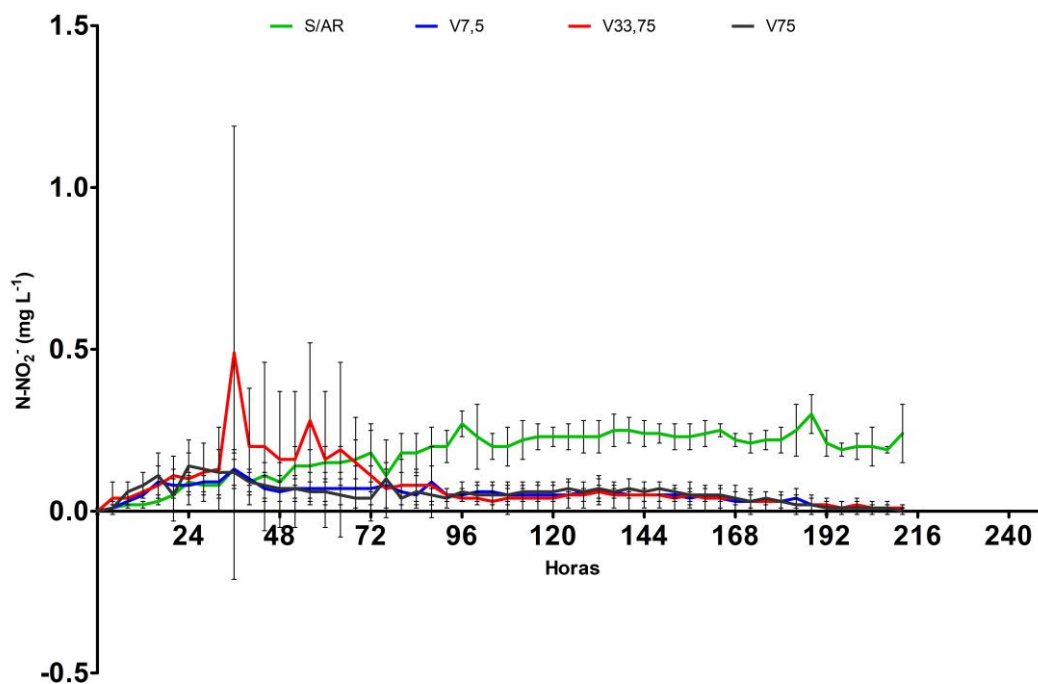
359

360 As concentrações de amônia de todos os tratamentos foram semelhantes  
361 estatisticamente, com 3,07 mg L<sup>-1</sup> valor máximo e 2,52 mg L<sup>-1</sup> valor mínimo nos  
362 tratamentos S/ar e V33.75 respectivamente conforme mostra a Tabela 02 e a Fig. 3. O  
363 nitrito dos tratamentos V7.5, V33.75 e V75 apresentaram valores semelhantes durante  
364 todo o estudo, onde o S/AR apresentou valores superiores de nitrito 0,17 mg L<sup>-1</sup>, levando  
365 mais tempo para transformar em nitrato (Tabela 02; Fig. 4). Para nitrato os tratamentos  
366 não apresentaram diferenças significativas (Tabela 02; Fig. 5).

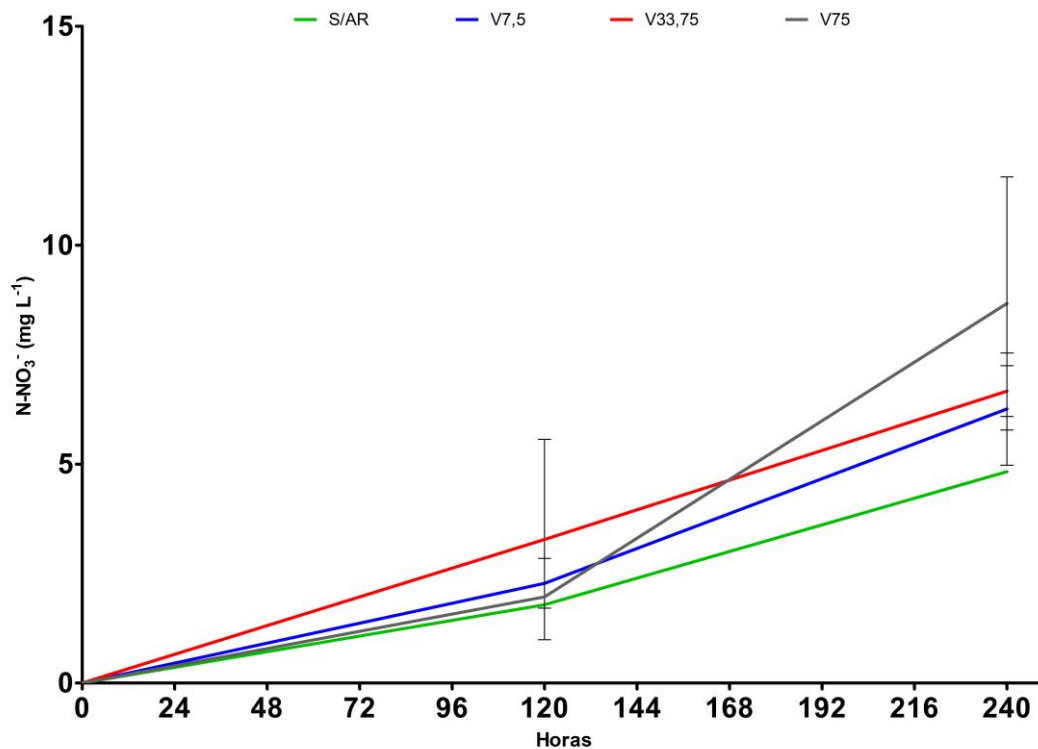
367



369 Figura 03: Concentrações médias e desvio padrão de nitrogênio amoniacal total N-AT ao  
 370 longo do tempo em sistema de água clara.



372 Figura 04: Concentrações médias e desvio padrão do nitrito ( $N-NO_2^-$ ) ao longo do tempo  
 373 em sistema de água clara.



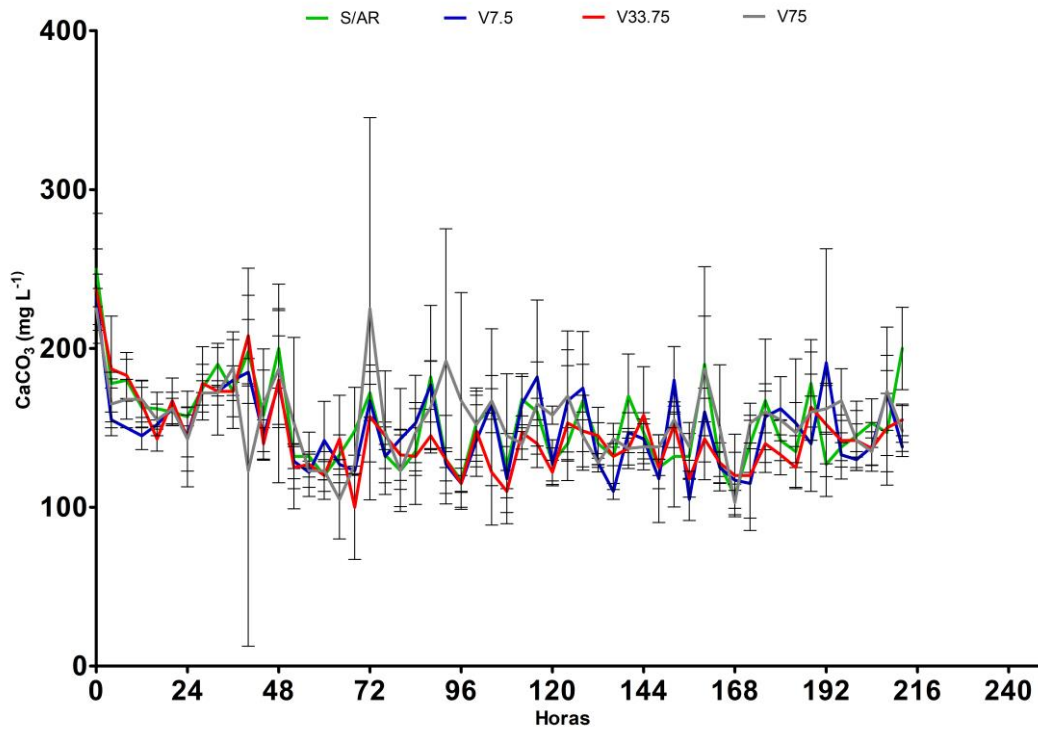
374

375 Figura 05: Concentrações médias e desvio padrão de nitrato (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) ao longo do tempo  
 376 em sistema de água clara.

377

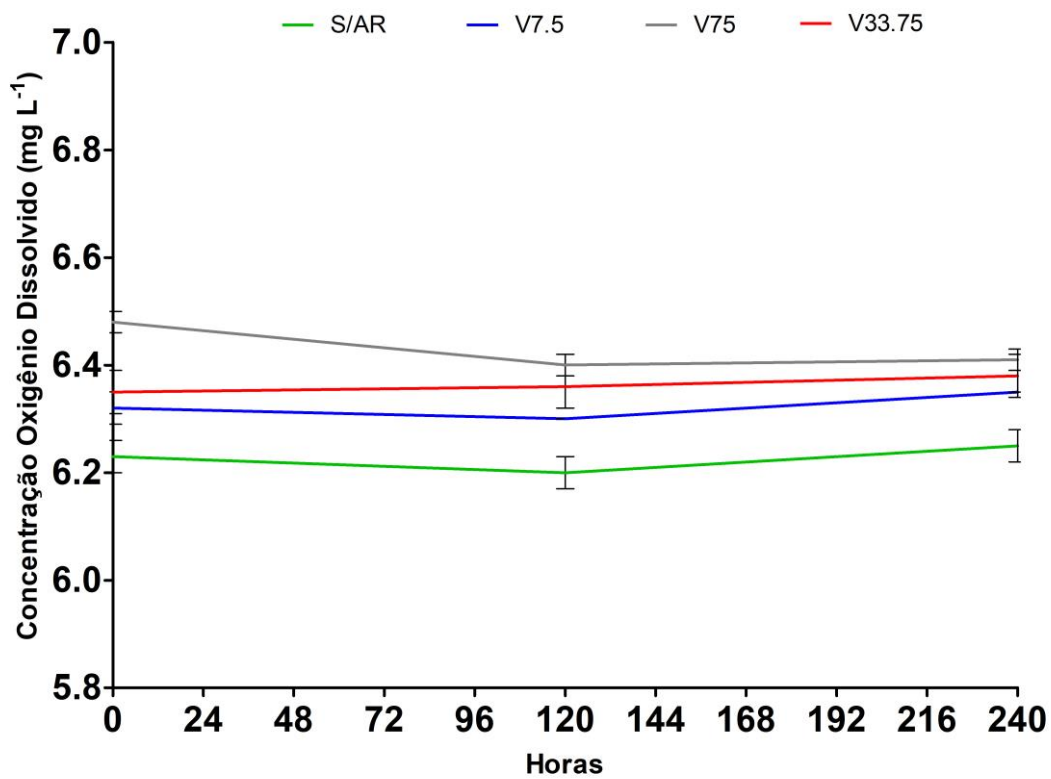
378 Os valores de pH dos tratamentos S/AR, V7.5 e V75 foram estatisticamente iguais  
 379 e diferindo do tratamento V33.75 que apresentou valor médio maior que os demais  
 380 tratamentos (Tabela 02).

381 Para os valores de alcalinidade (Tabela 02) os tratamentos não apresentaram  
 382 diferença estatística (Fig. 06). Os valores de oxigênio dissolvido foram semelhantes entre  
 383 as três intensidades de aeração testadas, diferindo-se estatisticamente do tratamento S/AR  
 384 que apresentou média inferior 6,23 mg L<sup>-1</sup> (Fig. 07).



385

386 Figura 06: Concentrações médias e desvio padrão de alcalinidade ( $\text{CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ ) ao longo  
 387 do tempo em sistema de água clara.



388

389 Figura 07: Concentrações médias e desvio padrão de oxigênio dissolvido ao longo do  
 390 tempo em sistema de água clara.

391 EXPERIMENTO 02 - EFICIÊNCIA DAS BACTÉRIAS NITRIFICANTES DO  
 392 BIOFILME NO SISTEMA DE BIOFLOCO

393

394 PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DA ÁGUA

395

396 Tabela 3 - Média geral e desvio-padrão dos parâmetros físico-químicos da água ao longo  
 397 do estudo de 47 dias de 500 m<sup>-3</sup> *Litopenaeus vannamei* (7,81 ± 0,24 g) em BFT com  
 398 diferentes intensidades de aeração (Bioflocos com vazão de 20,00 L/min, BFT+BF:  
 399 Bioflocos e biofilme com vazão de 33,75 L/min e BF: biofilme com vazão de 33,75 L/min)  
 400 com três réplicas.

401

Tratamento	BFT	BFT+BF	BF
N-AT (mg L <sup>-1</sup> )	1.73 ± 0.41 <sup>a</sup>	0.51 ± 0.11 <sup>b</sup>	0.70 ± 0.54 <sup>a</sup>
N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	15.36 ± 5.03 <sup>a</sup>	1.13 ± 0.56 <sup>b</sup>	1.11 ± 0.44 <sup>b</sup>
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	43.91 ± 9.02	73.85 ± 8.25	52.61 ± 17.78
P-PO <sub>4</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	0.38 ± 0.04	0.46 ± 0.06	0.50 ± 0.05
Oxigênio Dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	5.02 ± 0.22 <sup>a</sup>	5.18 ± 0.16 <sup>b</sup>	5.22 ± 0.14 <sup>b</sup>
pH	7.55 ± 0.11	7.55 ± 0.09	7.58 ± 0.07
Temperatura (°C)	29.13 ± 0.76	29.44 ± 0.83	29.02 ± 0.31
Salinidade	30.80 ± 0.90	31.41 ± 1.89	30.14 ± 1.30
SST	298.19 ± 88.73	346.30 ± 57.28	332.56 ± 73.18
Turbidez (NTU)	232.09 ± 43.40	234.33 ± 45.22	241.21 ± 51.22
Cone imhoff	26.00 ± 11.75	17.76 ± 8.03	15.98 ± 10.02
CaCO <sub>3</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	154.75 ± 15.10 <sup>a</sup>	135.92 ± 22.11 <sup>b</sup>	136.17 ± 22.14 <sup>b</sup>
Clorofila - <i>a</i>	51.42 ± 34.08	20.40 ± 5.55	30.28 ± 21.21

402 Letras diferentes na mesma linha representa diferença estatística p<0.05.

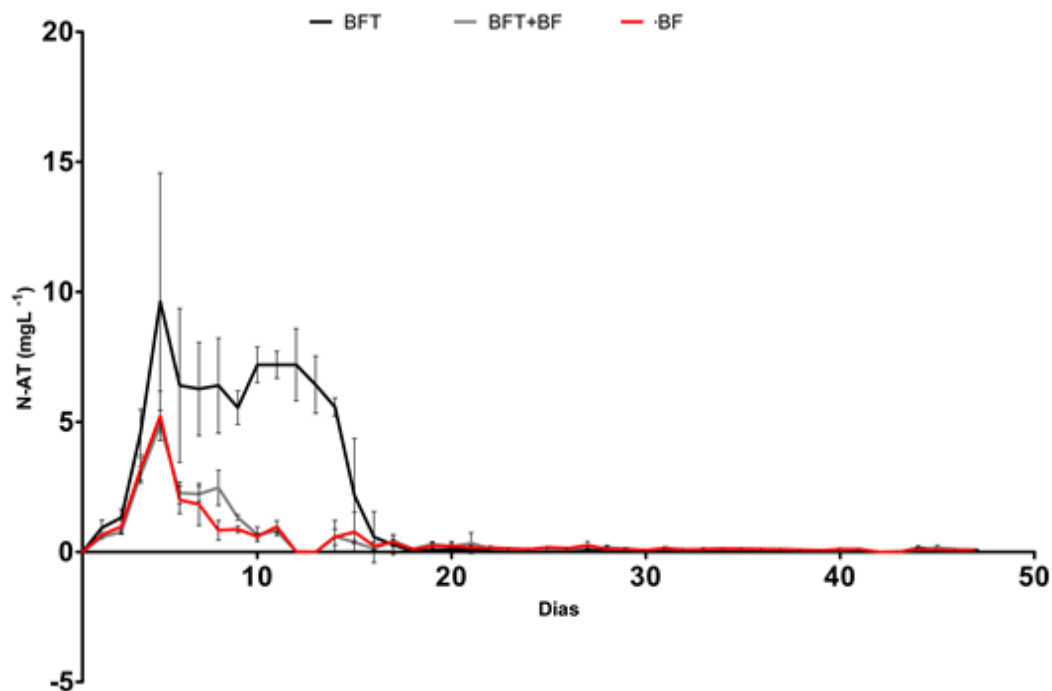
403 **BFT:** Bioflocos com vazão 20.00 L/min, **BFT+BF:** Bioflocos e biofilme com vazão 33.75  
 404 L/min e **BF:** Biofilme com vazão 33.75 L/min. **N-AT=** Nitrogênio na forma de amônia  
 405 total, **N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>=** Nitrito, **N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>=** Nitrato, **P-PO<sub>4</sub>=** Fosfato, **SST=** Sólidos suspensos totais  
 406 e **CaCO<sub>3</sub>=** Alcalinidade.

407

408

409 O N-AT dos tratamentos BFT e BFT+BF apresentaram valores maiores que BF,  
410 já o N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> dos tratamentos BFT+BF e BF foram significativamente inferiores que o  
411 tratamento BFT como mostra a tabela 03. O N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> não apresentou diferença estatística  
412 entre os tratamentos (Figura 10).

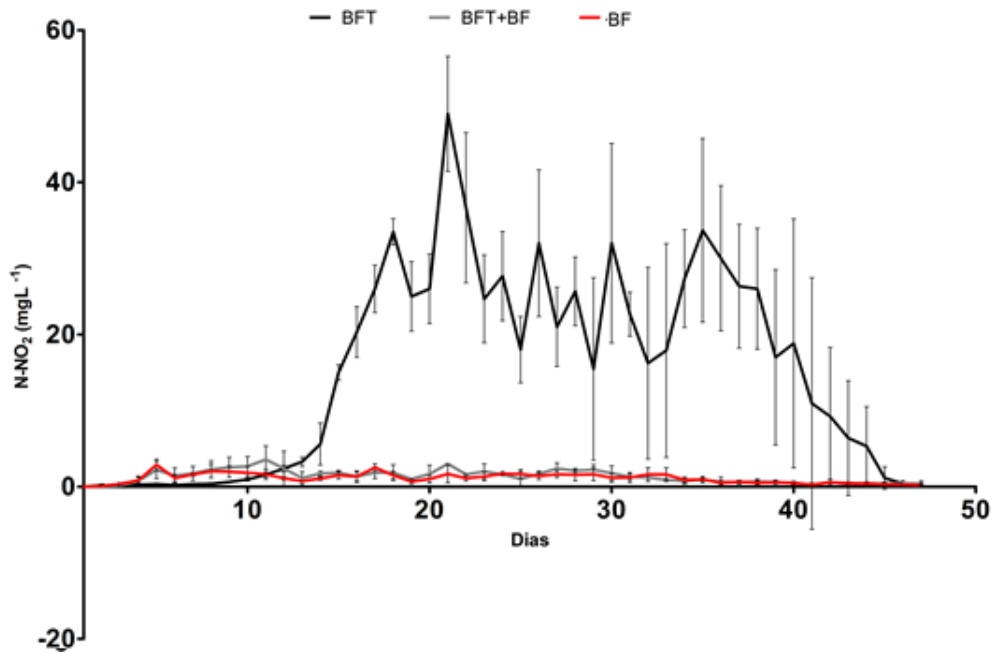
413



414

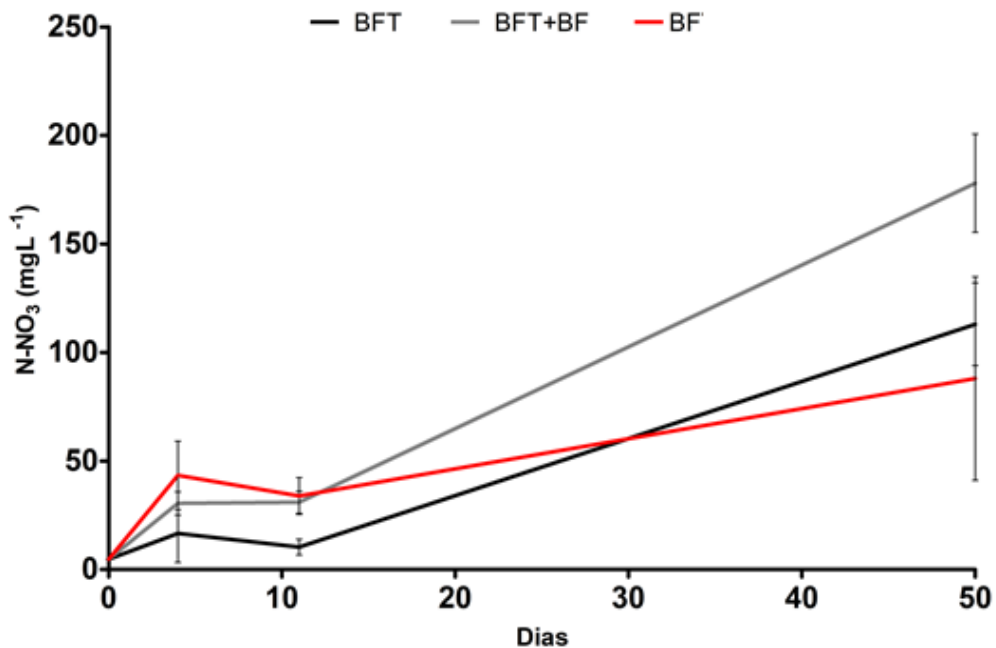
415 Figura 08: Concentrações médias e desvio padrão de amônia ao longo do cultivo  
416 superintensivo de *L. vannamei* dos tratamentos **BFT**: Biofoco com vazão 20.00 L/min,  
417 **BFT+BF**: Biofoco e biofilme com vazão 33.75 L/min e **BF**: Biofilme com vazão 33.75  
418 L/min em sistemas de biofoco e biofilme.





419

420 Figura 09: Concentrações médias e desvio padrão de nitrito  $N\text{-NO}_2^-$  ao longo do cultivo  
 421 superintensivo de *L. vannamei* dos tratamentos **BFT**: Bioflocos com vazão 20.00 L/min,  
 422 **BFT+BF**: Bioflocos e biofilme com vazão 33.75 L/min e **BF**: Biofilme com vazão 33.75  
 423 L/min em sistemas de bioflocos e biofilme.

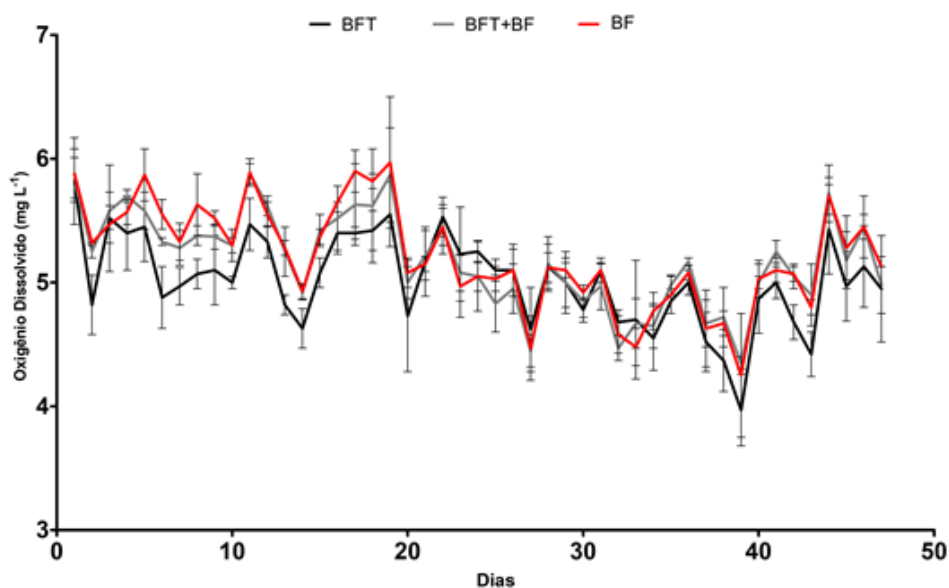


424

425 Figura 10: Concentrações médias e desvio padrão de nitrato  $N\text{-NO}_3^-$  ao longo do cultivo  
 426 superintensivo de *L. vannamei* dos tratamentos **BFT**: Bioflocos com vazão 20.00 L/min,  
 427 **BFT+BF**: Bioflocos e biofilme com vazão 33.75 L/min e **BF**: Biofilme com vazão 33.75  
 428 L/min em sistemas de bioflocos e biofilme.

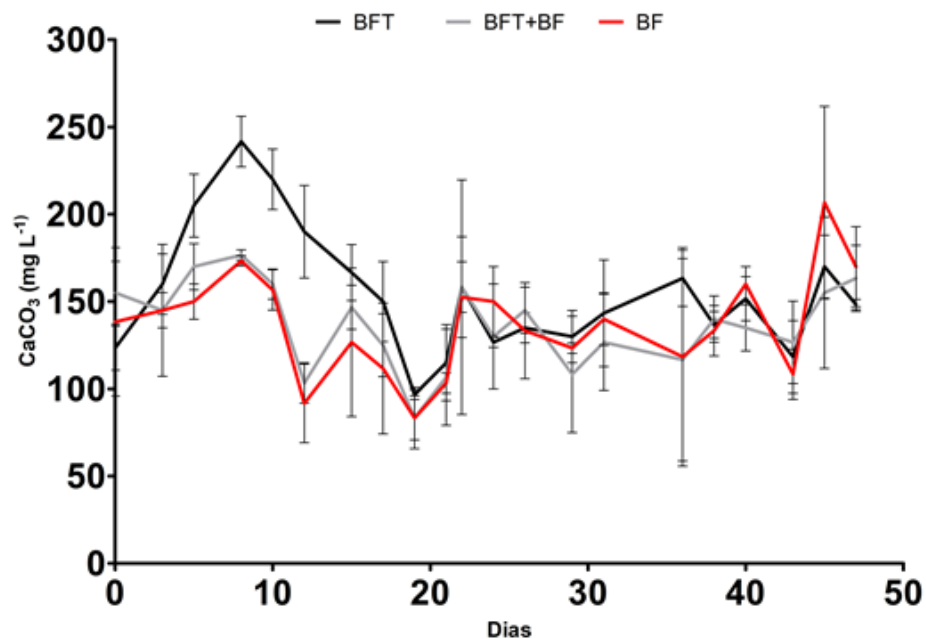
429 Os níveis de oxigênio dissolvido nos tratamentos BFT+BF e BF foram  
430 estatisticamente superiores com relação ao do tratamento BFT (Tabela 3). Este padrão  
431 foi demonstrado ao longo de todo experimento (Figura 11). A alcalinidade apresentou  
432 valores mais baixos nos tratamentos BFT+BF e BF quando comparados ao do tratamento  
433 BFT (Figura 12).

434



435

436 Figura 11: Concentrações médias e desvio padrão de oxigênio dissolvido ao longo do  
437 cultivo superintensivo de *L. vannamei* dos tratamentos **BFT**: Bioflocos com vazão 20.00  
438 L/min, **BFT+BF**: Bioflocos e biofilme com vazão 33.75 L/min e **BF**: Biofilme com vazão  
439 33.75 L/min em sistemas de bioflocos e biofilme.



440

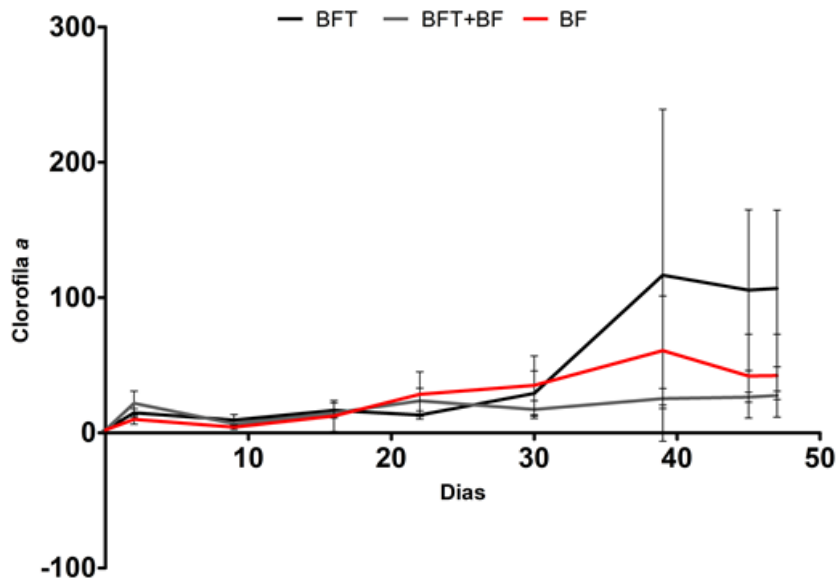
441 Figura 12: Concentrações médias e desvio padrão de alcalinidade ( $\text{CaCO}_3$ ) ao longo do  
 442 cultivo superintensivo de *L. vannamei* dos tratamentos **BFT**: Bioflocos com vazão 20.00  
 443 L/min, **BFT+BF**: Bioflocos e biofilme com vazão 33.75 L/min e **BF**: Biofilme com vazão  
 444 33.75 L/min em sistemas de bioflocos e biofilme.

445

446 CLOROFILA – *a*

447

448 Não foi observado diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 03), no  
 449 entanto no final do período experimental houve um aumento nos valores de clorofila no  
 450 tratamento BFT (Figura 13).



451

452 Figura 13: Concentrações médias e desvio padrão de clorofila - *a* ao longo do cultivo  
 453 superintensivo de *L. vannamei* dos tratamentos **BFT**: Bioflocos com vazão 20.00 L/min,  
 454 **BFT+BF**: Bioflocos e biofilme com vazão 33.75 L/min e **BF**: Biofilme com vazão 33.75  
 455 L/min em sistemas de bioflocos e biofilme.

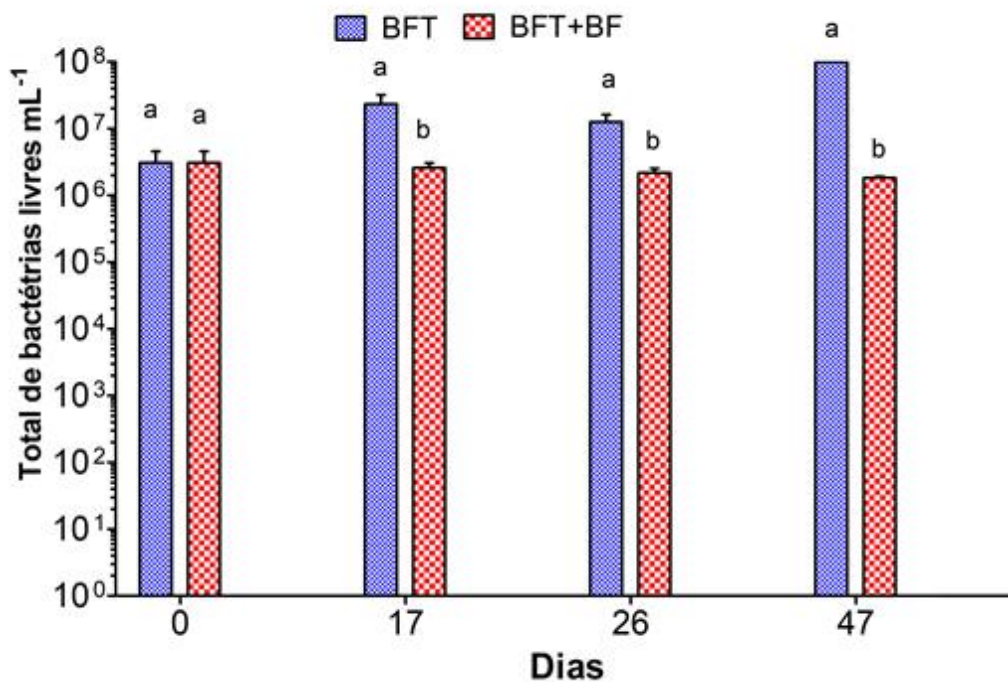
456

#### 457 MICRO-ORGANISMOS

458

459 A análise de abundância de bactérias foram realizadas nos dias 0, 17, 26 e 47 para os  
 460 tratamentos BFT e BFT+BF em decorrência das altas concentrações de amônia e nitrito.  
 461 O total de bactérias livres não diferiu entre os tratamentos, apresentando diferenças  
 462 estatísticas entre os grupos de bactérias. No dia zero para ambos tratamentos a quantidade  
 463 de micro-organismos encontrados foram semelhantes, não diferenciando  
 464 estatisticamente.

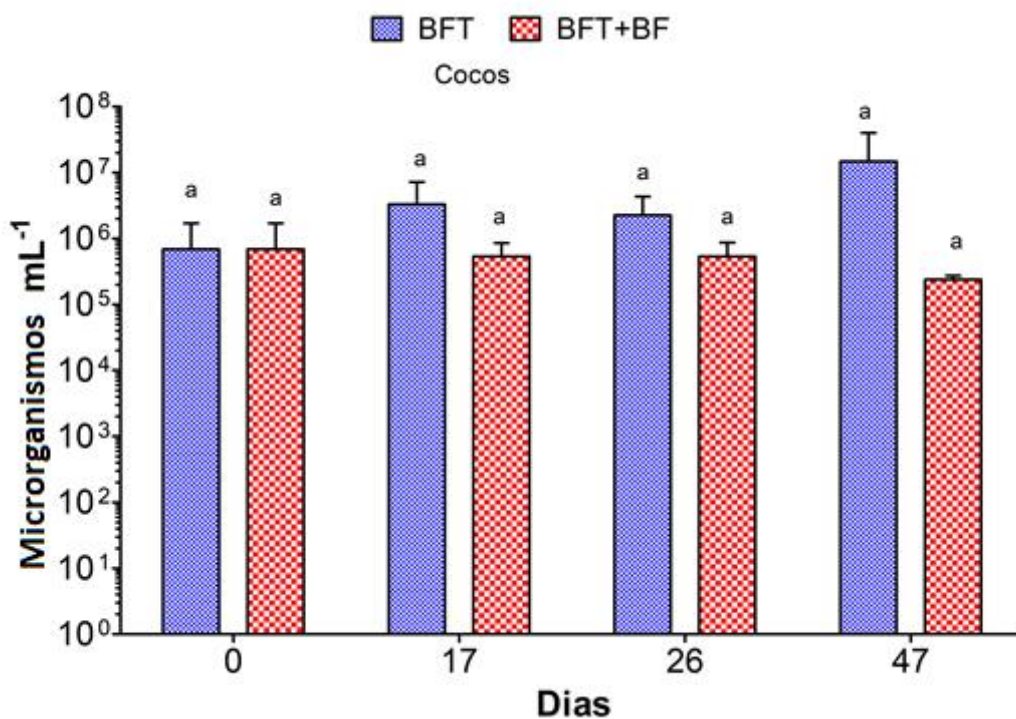
465 O tratamento BFT não apresentou diferença significativa do tratamento BFT+BF em  
 466 relação a cocos, apresentando diferença para bacilos, filamentosas e amebas, (Figuras 15  
 467 – 18) onde o tratamento BFT apresentou concentrações superiores de bactérias, é possível  
 468 observar na (Figura 14) o aumento gradativo dos organismos no sistema à medida que o  
 469 tempo passa, apenas no dia 26 a quantidade de organismos diminui e volta a aumentar  
 470 como mostra o dia 47. O tratamento BFT+BF apresenta uma estabilidade nos organismos  
 471 do início ao fim do experimento tendo um aumento para filamentosas e amebas ao longo  
 472 do tempo.



473

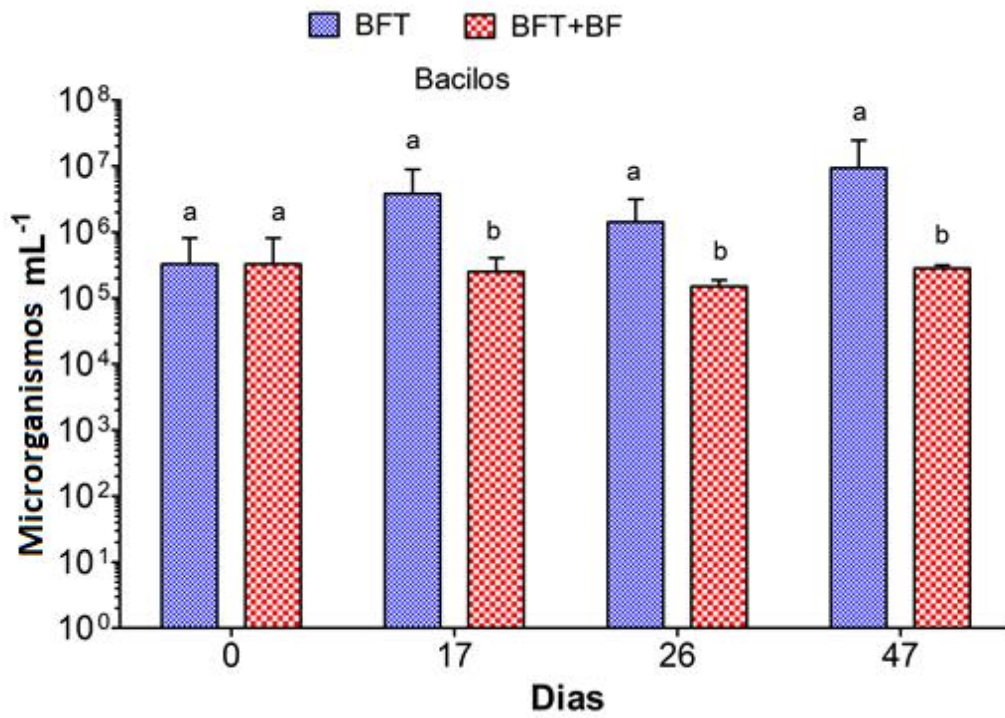
474 Figura 14: Abundância de bactérias livres nos tratamentos Biofloc e Biofloc +  
475 Biofilme.

476



477

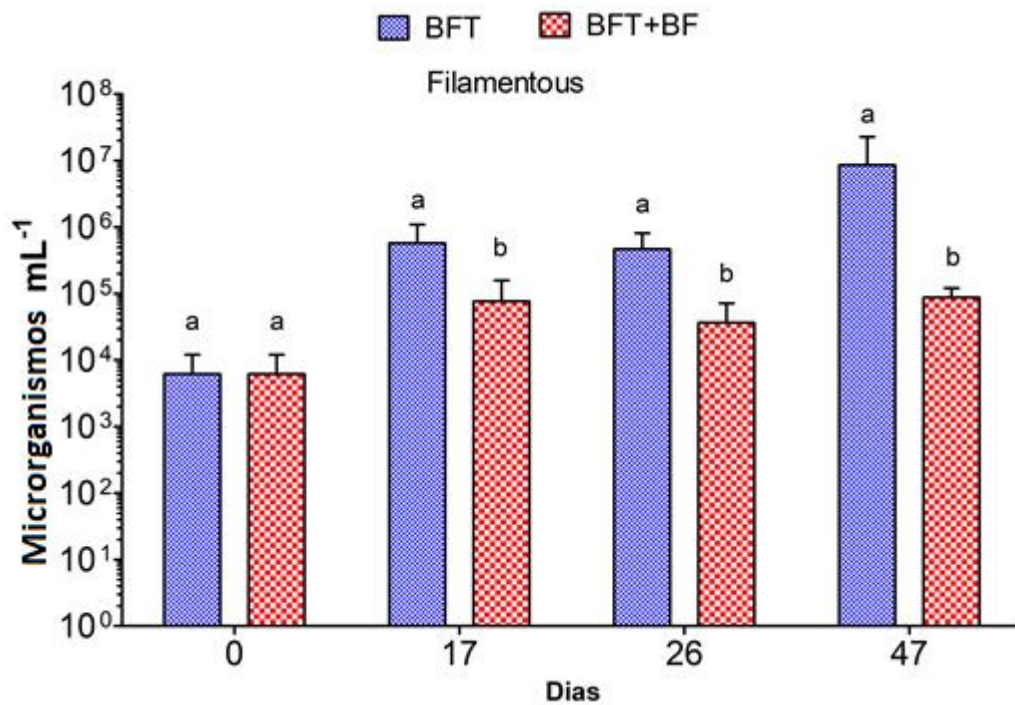
478 Figura 15: Abundância de cocos nos tratamentos Biofloc e Biofloc + Biofilme.



479

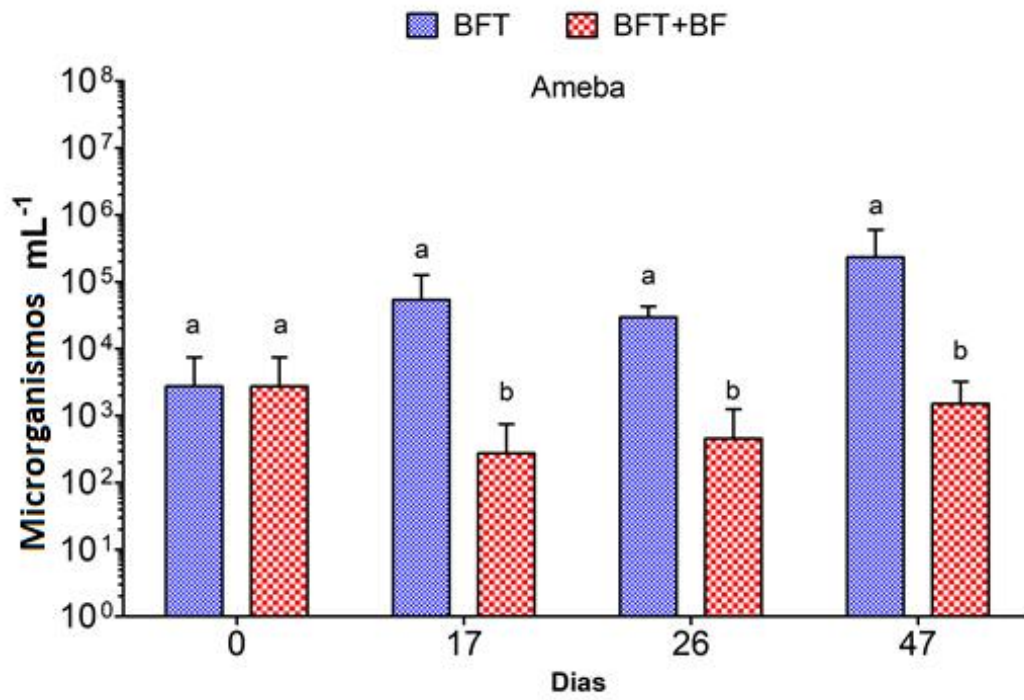
480 Figura 16: Abundância de bacilos nos tratamentos Biofoco + Biofilme.

481



482

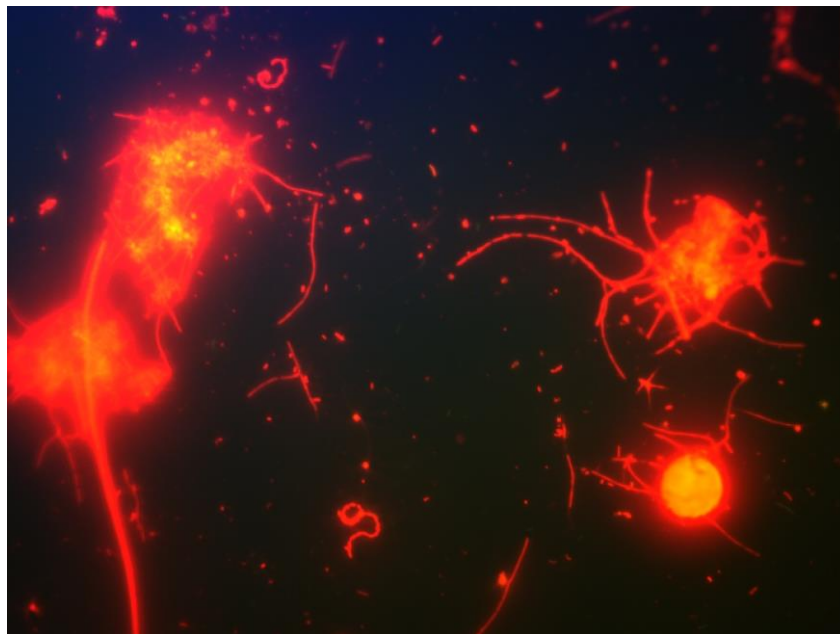
483 Figura 17: Abundância de filamentosas nos tratamentos Biofoco + Biofilme.



484

485 Figura 18: Abundância de ameba nos tratamentos Biofloc + Biofilme.

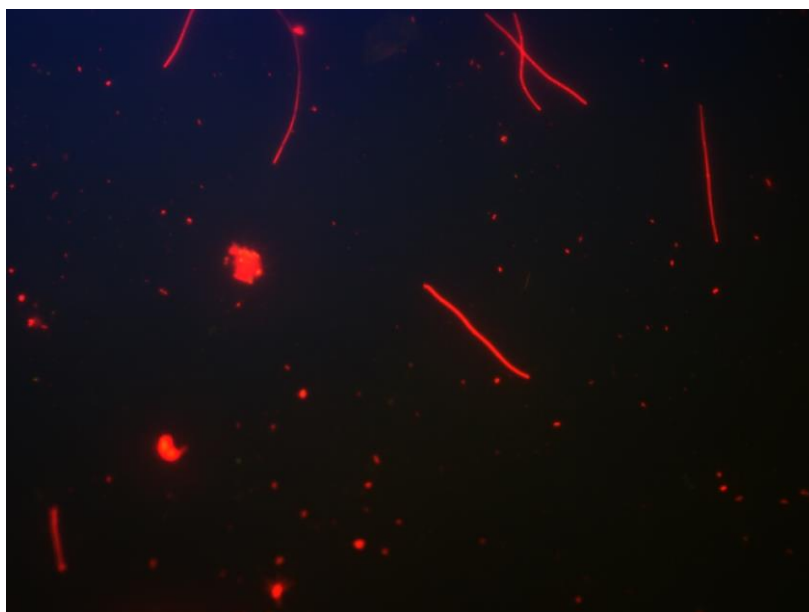
486



487

488 Figura 19 – Abundância de bactérias da produção de camarão marinho *L. vannamei* no  
 489 tratamento Biofloc (BFT).

490



491

492 Figura 20 – Abundância de bactérias da produção de camarão marinho *L. vannamei* no  
 493 tratamento Bioflocos + biofilme (BFT+BF).

494

#### 495 DESEMPENHO ZOOTÉCNICO

496

497 Tabela 04 – Média e desvio padrão do desempenho zootécnico da produção ao longo do  
 498 estudo de 47 dias de 500 m<sup>-3</sup> de *L. vannamei* dos tratamentos em sistema BFT e água  
 499 clara com diferentes vazões com réplicas de árvores.

Tratamento	BFT	BFT+BF	BF
Peso inicial (g)	7.81 ± 0.24	7.81 ± 0.24	7.81 ± 0.24
Peso final (g)	13.50 ± 0.40	13.14 ± 0.19	13.63 ± 0.63
Sobrevivência (%)	62 ± 41.49 <sup>a</sup>	87 ± 9.54 <sup>b</sup>	88 ± 6.93 <sup>b</sup>
Crescimento semanal	0.92 ± 0.07	0.86 ± 0.03	0.94 ± 0.11
Taxa específica de crescimento	1.12 ± 0.06	1.06 ± 0.03	1.14 ± 0.10
Biomassa final (g/m <sup>3</sup> )	3998.40 ± 490 <sup>a</sup>	5732.02 ± 180.13 <sup>b</sup>	5979.47 ± 289.47 <sup>b</sup>

500 Letras diferentes na mesma linha representa diferença estatística p<0.05.

501 **BFT:** Bioflocos com vazão 20.00 L/min, **BFT+BF:** Bioflocos e biofilme com vazão 33.75  
 502 L/min e **BF:** Biofilme com vazão 33.75 L/min para peso inicial (g), peso final (g),  
 503 sobrevivência (%), crescimento semanal (g), taxa de crescimento específico – TCE (%) e  
 504 biomassa final (g).



505 Os valores para peso inicial, peso final, crescimento semanal e taxa de crescimento  
 506 específico não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos. A  
 507 sobrevivência e biomassa final foram significativamente maiores nos tratamentos com  
 508 biofilme (BFT+BF e BF) em relação ao tratamento só com bioflocos (BFT) (Tabela 04).

509

510 Tabela 05 - Total de melaço, cal hidratada, horas de assentamento, troca de água e  
 511 quantidade de água para produzir 1 kg de camarão ao longo do estudo de 47 dias.

Tratamento	BFT	BFT+BF	BF
Total de melaço (g)	2507.34 ± 22.06	380.01 ± 8.50	-
Cal hidratada (g)	1280.07 ± 22.58	1521.59 ± 24.73	1282.46 ± 24.34
Horas de clarificação (h)	10.00 ± 0.58	40.00 ± 1.51	-
Troca de água (L)	4480.001 ± 66.03	-	-
Uso de água (L kg <sup>-1</sup> camarão)	719.69 ± 46.72	174.64 ± 6.93	167.65 ± 10.29

512

513 Os produtos totais (melaço, cal hidratada) usados para controlar a quantidade de  
 514 flocos e o tempo de decantação, a troca de água durante o estudo e a quantidade de água  
 515 para produzir 1 kg de camarão estão representados na tabela 05.

516

## 517 DISCUSSÃO

518

519 O estudo de Ferreira et al. (2016), indicou que em sistemas com bioflocos e  
 520 biofilme, este último não teria maior importância na manutenção da qualidade da água,  
 521 através da nitrificação, mas sim como fonte suplementar de alimento para os camarões  
 522 produzidos. Sabe-se que a intensidade de aeração em sistemas de bioflocos não pode ser  
 523 muito intensa, pois este pode afetar a estrutura e o tamanho dos flocos, prejudicando o  
 524 processo de nitrificação no sistema (Souza et al., 2019). A observação destes fatos nos  
 525 levou a formular a hipótese de que a menor atividade de bactérias nitrificantes no biofilme  
 526 poderia resultar na menor concentração de oxigênio dissolvido, devido a menor aeração,  
 527 que afetaria, principalmente as bactérias nitrificantes presentes nas regiões mais internas  
 528 do biofilme. Para testar esta hipótese é que realizamos os dois experimentos descritos  
 529 anteriormente.

530 O experimento eficiência das bactérias nitrificantes do biofilme em água clara  
531 utilizando diferentes intensidades de aeração demonstrou a importância da presença da  
532 aeração no sistema de produção para uma maior eficiência do processo de nitrificação  
533 pelo biofilme. Isso fica evidenciado pelas concentrações mais elevadas de nitrito no  
534 tratamento sem aeração quando comparado aos demais. A falta de movimentação na água  
535 e a consequente limitação da transferência de massa pode gerar um gradiente na  
536 concentração de oxigênio, com a presença de áreas com menor concentração nas regiões  
537 mais inferiores do biofilme, como observado para o bioflocos (Vlaeminck et al., 2010). De  
538 modo geral, as bactérias BAO encontram-se na parte superior do biofilme enquanto que  
539 as bactérias BNO estão presentes na região inferior (Gieseke et al., 2003). Isso fica  
540 evidente quando relacionamos com os dados dos compostos nitrogenados, pois neste  
541 experimento o nitrito é mais influenciado pela concentração de oxigênio, enquanto a  
542 amônia não é afetada pela concentração de oxigênio, exceto o tratamento S/AR que é  
543 influenciado tornando a conversão de amônia em nitrito mais lento, evidenciando a menor  
544 eficiência das BNO, enquanto que a ação das BAO não foi comprometida, já que os níveis  
545 de amônia não diferiram entre os tratamentos.

546 Por outro lado, o processo de nitrificação não foi afetado pela intensidade da  
547 aeração, já que não foram observadas diferenças nas concentrações de oxigênio entre as  
548 três intensidades testadas. A escolha da intensidade de aeração utilizada no experimento  
549 2 foi baseada na demanda de oxigênio necessária para o sistema de bioflocos juntamente  
550 com a necessidade do biofilme e o menor gasto energético.

551 O sistema BFT requer uma demanda de oxigênio para manter os flocos em  
552 suspensão bem como atender a necessidade do organismo produzido. A respiração em  
553 sistema BFT é em torno de 6,0 mg de O<sub>2</sub> / L por hora, podendo chegar a 8,0 mg de O<sub>2</sub> /  
554 L por hora, considerando a necessidade do camarão, que tende a aumentar devido à alta  
555 densidade de estocagem, aumento da biomassa e aplicação de carbono ( Santa & Vinatea,  
556 2007; Hargreaves, 2013). Desta forma, a menor vazão testada não suportaria a demanda  
557 de oxigênio do sistema. Dentre as vazões de 33.75 e 75 L/min, optou-se pelo uso da mais  
558 baixa, uma vez que a mesma é capaz de atender adequadamente os requisitos exigidos  
559 pelo sistema e com menor demanda energética, minimizando os custos.

560 Os parâmetros de qualidade de água do experimento 02 temperatura, pH, e  
561 salinidade permaneceram dentro do estipulado para o *L. vannamei* ao longo de todo o  
562 experimento (Van Wyk and Scarpa, 1999). O nitrato manteve-se inferior a faixa letal de

563 300 mg L<sup>-1</sup> ao longo de todo o cultivo para todos os tratamentos como reportado por  
564 Furtado et al. (2014) assim como os valores de fosfato e sólidos suspensos totais como  
565 recomendando respectivamente por (Barak et al., 2003; Gaona et al., 2011).

566 Nos tratamentos BFT+BF e BF, nos quais foram utilizados o rotâmetro para  
567 manter a vazão controlada na intensidade recomendada, os níveis de oxigênio foram  
568 maiores que no tratamento BFT. Contudo, todos os tratamentos apresentaram  
569 concentrações médias de oxigênio dissolvido superior a 5,0 mg L<sup>-1</sup> necessário para as  
570 bactérias no processo de nitrificação assim como para as necessidades do camarão (Van  
571 Wyk and Scarpa, 1999; Timmons & Ebeling, 2010).

572 No presente estudo, o processo de nitrificação foi observado em todos os  
573 tratamentos, com a oxidação da amônia a nitrito e posteriormente, do nitrito a nitrato, que  
574 tendeu a se acumular com o decorrer do experimento. Entretanto, os tratamentos com  
575 biofilme (BFT+BF e BF) apresentaram valores de N-AT inferiores demonstrando o efeito  
576 da aeração na comunidade bacteriana presente no biofilme, promovendo uma rápida  
577 remoção da amônia quando comparado com o tratamento BFT, onde a remoção foi  
578 controlada a partir de fertilizações orgânicas para estimular o crescimento de bactérias  
579 heterotróficas e incorporação deste composto nitrogenado em sua biomassa.

580 O processo de nitrificação mais eficiente nas unidades que tinham substrato  
581 artificial colonizado com biofilme e que tinham maior nível de aeração permitiram que  
582 os valores de nitrito nos tratamentos com biofilme (BFT+BF e BF) fossem mantidos em  
583 concentrações inferiores ao tratamento BFT e dentro da faixa de segurança para espécie  
584 26 mg L<sup>-1</sup> (Lin and Chen, 2003). Semelhante ao observado Holl et al. (2011) que  
585 descrevem que a comunidade nitrificante fixada no substrato é capaz de realizar  
586 completamente a nitrificação do sistema, mesmo que não haja a atividade das bactérias  
587 presentes na água. Em nosso estudo, as menores abundâncias de bactérias livres no  
588 tratamento com biofilme (BFT+BF) em comparação com o tratamento apenas com  
589 biofoco (BFT) pode ter resultado de uma transferência de bactérias da coluna de água  
590 para o substrato o que, além de beneficiar a nitrificação, também pode ter aumentado a  
591 disponibilidade de alimento extra fornecido pelos microorganismos.

592 Em sistemas com trocas de água limitadas é aconselhável manter a alcalinidade  
593 em concentrações superiores a 200 mg CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> (Chen et al., 2006), isso se dá, pelo  
594 fato de que nos cultivos em sistemas BFT há uma tendência à diminuição da alcalinidade  
595 e do pH devido ao processo de nitrificação, onde as bactérias utilizam o carbono

596 inorgânico presente na água para assimilação do nitrito. Desta forma, para uma melhor  
597 atividade destas bactérias, indica-se que o valor de alcalinidade seja superior a 150 mg  
598  $\text{CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$  (Furtado et al., 2014). No presente estudo, o tratamento BFT apresentou  
599 valores superiores de alcalinidade comparado aos demais tratamentos, o que pode ser  
600 explicado pela menor atividade das bactérias nitrificantes presentes nos agregados, o que  
601 é corroborado pelos valores mais elevados de amônia e nitrito nesse tratamento. Esse  
602 processo de nitrificação menos ativo é explicado por uma maior abundância de bactérias  
603 heterotróficas que causa competição com os organismos nitrificantes que leva a taxas  
604 relativamente baixas de nitrificação como demonstrado em sistemas de tratamento de  
605 águas residuais. Este efeito inibitório pode estar atrelado aos maiores rendimentos e taxas  
606 de crescimento dos micro-organismos heterotróficos (Wiesmann, 1994). O mesmo  
607 processo é relatado por Michaud et al. (2006), onde o enriquecimento de carbono orgânico  
608 ofertado para as bactérias heterotróficas causam uma competição com as nitrificantes por  
609 oxigênio, nutriente e espaço causando uma redução na taxa de nitrificação.

610 A maior abundância de microorganismos no tratamento BFT em relação ao  
611 tratamento BFT+BF pode estar relacionada primeiramente com a taxa de crescimento,  
612 onde as bactérias heterotróficas apresentam uma taxa cinco vezes maior que as bactérias  
613 nitrificantes (Grady et al., 1980). Altas concentrações de matéria orgânica, como ocorrem  
614 dentro do sistema BFT, proporcionam condições favoráveis ao desenvolvimento de  
615 micro-organismos heterotróficos que competem com os autotróficos nitrificantes pelo  
616 oxigênio e nutrientes (Figueroa & Silverstein, 1992) Assim, o tratamento BFT recebeu  
617 mais fertilizações orgânicas que o tratamento BFT+BF devido a presença do substrato  
618 artificial previamente colonizado.

619 Holl et al. (2011) em seu estudo demonstram que a taxa de nitrificação do biofilme  
620 é semelhante da taxa de nitrificação na água, entretanto eles relacionam a taxa de  
621 nitrificação com a área de cobertura do biofilme, considerando que o biofilme pode ser  
622 colonizado em toda superfície do tanque, logo a oxidação da amônia realizada pelo  
623 biofilme poderia chegar a 60 vezes maior que na água, assim os autores demonstram que  
624 as bactérias nitrificantes presentes no substrato são capazes de realizar toda  
625 metabolização dos compostos nitrogenados do sistema sem que haja presença de bactérias  
626 na água. O mesmo pode ter acontecido nos tratamentos do presente estudo quando  
627 observamos a abundância de bactérias, onde no tratamento BFT+BF a quantidade de  
628 bactérias presentes na água foi inferior, visto que o substrato artificial utilizado já estava  
629 colonizado com biofilme e as bactérias aderidas consomem todos os nitrogenados

630 presentes na água, dificultando o aparecimento das bactérias na água. Nesse sentido,  
631 Oliveira et al. (2006) caracterizando as bactérias nitrificantes do biofilme e da água na  
632 larvicultura de *F. paulensis*, relacionam a diminuição das bactérias na água com  
633 incremento das bactérias no biofilme, sugerindo que a medida que a concentração de  
634 amônia na água diminui ocorre uma limitação de nutriente para as bactérias na água,  
635 assim como encontrado no presente estudo.

636 A formação dos flocos é um processo complexo que envolve processos físicos,  
637 químicos e biológicos, no qual inicialmente as bactérias utilizam a matéria orgânica  
638 dissolvida para seu crescimento e liberando muco que facilita o agregamento das  
639 partículas (Ferreira, 2008). É possível observar (Figura 19) uma maior abundância de  
640 bactérias no tratamento BFT em relação ao tratamento BFT+BF, onde o tratamento  
641 BFT+BF permanece mais estável durante todo o período, essa diferença de bactérias entre  
642 os tratamentos está relacionado a formação da comunidade microbiana. Assim no  
643 tratamento BFT é possível observar o aumento de bacilos, filamentosas e amebas ao longo  
644 do tempo (Figuras 15 - 18) enquanto o tratamento BFT+BF não apresenta o aumento das  
645 bactérias, devido a presença do substrato colonizado. As diferentes quantidades de  
646 bactérias nos tratamentos corroboram com os dados de amônia e nitrito, onde tinha uma  
647 comunidade estabelecida não apresentou picos de amônia e nitrito ao longo do tempo, e no  
648 tratamento que as bactérias estavam se estabelecendo apresentou picos.

649 Não foram observadas diferenças no crescimento entre os camarões submetidos  
650 aos diferentes tratamentos. No entanto, a inclusão do substrato resultou em maior  
651 biomassa final devido às maiores sobrevivências nesses tratamentos. A sobrevivência de  
652 62% no tratamento BFT, foi considerada baixa para o sistema, enquanto que valores de  
653 87% e 88% foram encontrados para os tratamentos BFT+BF BF, respectivamente. Esse  
654 resultado pode ser consequência dos níveis elevados de nitrito, que permaneceu cerca de  
655 24 dias com concentrações acima do nível de segurança proposto por (Lin and Chen,  
656 2003). Entretanto é possível que atrelado as altas concentrações de nitrito, a densidade de  
657 estocagem e o tamanho inicial dos animais tenha influenciado negativamente a  
658 sobrevivência nesse tratamento, visto que os tratamentos que tinha o substrato artificial  
659 com biofilme apresentam um incremento de área diminuindo a densidade relativa. Otoshi  
660 et al. (2006) avaliaram o crescimento e sobrevivência de juvenis de *L. vannamei*  
661 produzidos com e sem substrato artificial observando um aumento no crescimento e maior  
662 sobrevivência nos tratamentos com substrato. Da mesma forma, Schweitzer et al. (2013)  
663 avaliaram o uso de substratos artificiais em sistema de bioflocos com diferentes densidades

664 de estocagem, concluindo que as melhores sobrevivências foram nos tratamentos com a  
665 presença dos substratos.

666 Ferreira et al. (2016) trabalharam com adição de substrato artificial em diferentes  
667 proporções 200% e 400% em sistema BFT e obtiveram uma sobrevivências superiores a  
668 85% nos tratamentos com substrato semelhante ao encontrado no presente estudo. Em  
669 todos esses trabalhos mencionados os autores relacionaram a sobrevivência a presença  
670 dos substratos artificiais que aumentaram a área de superfície e conseqüentemente  
671 diminuindo a densidade relativa resultado em melhores índices de produtividade como o  
672 aumento da biomassa final. Entretanto, sabe-se que a disponibilidade de biofilme  
673 representa uma fonte suplementar de alimento pela presença não só de bactérias, mas  
674 também de protozoários e microalgas que representam importantes fontes de proteína e  
675 lipídeo para os organismos produzidos (Silva et al., 2009).

676

## 677 CONCLUSÃO

678

679 Através dos resultados obtidos neste estudo foi possível comprovar que o processo  
680 de nitrificação foi mais eficiente na vazão 33.75 L/min onde mantem os flocos em  
681 suspensão e estimula a nitrificação. Além disso, no tratamento BF onde tínhamos um  
682 substrato colonizado com bactérias nitrificantes produzimos camarão sem a necessidade  
683 de adição de carbono orgânico extra ao sistema.

684

685

686

687

688

689

690

691

692

693 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

694

695 Aminot, A. e Chaussepied, M. (1983) Manuel des analisa chimiques en milieu  
696 marin. Edições Jouve, CNEXO, Paris, 395 p.

697 AOAC (Association of Official Analytical Chemists), 2000. Official Methods of  
698 Analysis of AOAC, 16th ed. Patricia Cunniff (Ed.), Washington, DC.

699 APHA/AWWA/WEF, 2012. Standard Methods for the Examination of Water and  
700 Wastewater. Stand. Methods 541. [https://doi.org/ISBN 9780875532356](https://doi.org/ISBN%209780875532356)

701 Arana, L.V., 2002. Princípios químicos de qualidade da água em aquicultura: uma  
702 revisão para peixes e camarões. Florianópolis: UFSC, p. 166.

703 Avnimelech, Y., 2009. Biofloc technology - A practical guide book, 2<sup>d</sup> Edition. The  
704 World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United States. p. 272.

705 Avnimelech, Y., 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge  
706 bio-flocs technology ponds. Aquaculture 264 140–147.  
707 doi:10.1016/j.aquaculture.2006.11.025

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

711 Ballester, E.L.C., Abreu, P.C., Cavalli, R.O., M., E., L., A. de, Wasielesky Jr., W.,  
712 2010. Effect of practical diets with different protein levels on the performance of  
713 *Farfantepenaeus paulensis* juveniles nursed in a zero exchange suspended  
714 microbial flocs intensive system. [https://doi.org/10.1111/j.1365-](https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00648.x)  
715 [2095.2009.00648.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00648.x)

716 Ballester, E.L.C., Wasielesky Jr, W., Cavalli, R.O., Silva Santos, M.H., Abreu, P.C.,  
717 2003. Influência do biofilme no crescimento do camarão-rosa *Farfantepenaeus*  
718 *paulensis* em sistemas de berçário. Atlântica, Rio Grande, RS, v.25, n.2, p.37-42,  
719 2003.

720 Barak, Y., Cytryn, E., Gelfand, I., Krom, M., Van Rijn, J., 2003. Phosphorus removal in  
721 a marine prototype, recirculating aquaculture system. Aquaculture 220, 313–326.  
722 [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00342-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00342-3)

- 723 Boyd, C.E., Tucker, C.S., 2012. Pond aquaculture water quality management, 2nd ed. p.  
724 700.
- 725 Campos, J.L., Garrido, J.M., Mosquera-Corral, A., Méndez, R., 2007. Stability of a  
726 nitrifying activated sludge reactor. *Biochem. Eng. J.* 35, 87–92.  
727 <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.01.002>
- 728 Chen, S., Ling, J., Blancheton, J.P., 2006. Nitrification kinetics of biofilm as affected by  
729 water quality factors. *Aquac. Eng.* 34, 179–197.  
730 <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2005.09.004>
- 731 Chen, J., Chin, C., CK, L., 1986. Effects of ammonia and nitrite on larval development  
732 of the shrimp *Penaeus monodon*. *Asian Fish. Soc.* 657–662.
- 733 de Yta, A.G., Rouse, D.B., Davis, Da., 2004. Influence of Nursery Period on the  
734 Growth and Survival of *Litopenaeus vannamei* Under Pond Production Conditions.  
735 *J. World Aquac. Soc.* 35, 357–365. [https://doi.org/10.1111/j.1749-](https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2004.tb00099.x)  
736 [7345.2004.tb00099.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2004.tb00099.x)
- 737 De Schryver, P., Crab, R., Defoirdt, T., Boon, N., Verstraete, W., 2008. The basics of  
738 bio-flocs technology: The added value for aquaculture. *Aquaculture* 277, 125–137.  
739 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.02.019>
- 740 Ebeling, J.M., Timmons, M.B., Bisogni, J.J., 2006. Engineering analysis of the  
741 stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of  
742 ammonia-nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture* 257, 346–358.  
743 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.03.019>
- 744 Ferreira, L., M., 2008. Formação de flocos microbianos em cultivo do camarão-rosa  
745 Farfantepenaeus paulensis e do camarão-branco *Litopenaeus vannamei*. P.P.G.a.
- 746 Ferreira, L.M.H., Lara, G., Wasielesky, W., Abreu, P.C., 2016. Biofilm versus biofloc :  
747 Are artificial substrates for biofilm production necessary in the BFT system ? 921–  
748 930. <https://doi.org/10.1007/s10499-015-9961-0>
- 749 Figueroa, L.A., Silverstein, J., 1992. The effect of paniculate organic matter on biofilm  
750 nitrification 64, 728–733.
- 751 Fromm, P.O., Gillette, J.R., 1968. Effect of ambient ammonia on blood ammonia and  
752 nitrogen excretion of rainbow trout (*salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.*



753 26, 887–896. [https://doi.org/10.1016/0010-406X\(68\)90008-X](https://doi.org/10.1016/0010-406X(68)90008-X)

754 Furtado, P.S., Poersch, L.H., Wasielesky, W., 2014. The effect of different alkalinity  
755 levels on *Litopenaeus vannamei* reared with biofloc technology (BFT). *Aquac. Int.*  
756 23, 345–358. <https://doi.org/10.1007/s10499-014-9819-x>

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

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

765 Gieseke, A., Bjerrum, L., Wagner, M., Amann, R., 2003. Structure and activity of  
766 multiple nitrifying bacterial populations co-existing in a biofilm. *Environmental*  
767 *microbiology.* 5, 355–369. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00423.x>

768 Giroto, M.V.F., 2010. Efeitos da amônia sobre juvenis de *Litopenaeus vannamei*  
769 (Boone , 1931) e *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad , 1936 ): excreção e toxicidade.  
770 Thesis (Thesis in Veterinary Sciences) Universidade Federal do Paraná.

771 Grady, C.P.L., Daigger, G.T., C., H.L., 1980. *Biological wastewater treatment.*

772 Hargreaves, J.A., 2013. *Biofloc production systems for aquaculture.* SRAC Publ. 1–12.

773 Holl, C.M., Otoshi, C., Unabia, C.R., 2011. Production Nitrifying Biofilms Critical For  
774 Water Quality In Intensive Shrimp RAS. *Glob. Aquac. advocate* 38–39.

775 Jiménez-Ojeda, Y.K., Collazos-Lasso, L.F., Arias-Castellanos, J.A., 2018. Dynamics  
776 and use of nitrogen in biofloc technology - BFT. *AACL Bioflux* 11, 1107–1129.

777 Kuhn, D.D., Smith, S.A., Boardman, G.D., Angier, M.W., Marsh, L., Flick, G.J., 2010.  
778 Chronic toxicity of nitrate to Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: Impacts  
779 on survival, growth, antennae length, and pathology. *Aquaculture* 309, 109–114.  
780 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.09.014>

781 Lara1, G., Furtado, P. S., Hostins, B., Poersch, L., Wasielesky, W., 2017. Addition of  
782 sodium nitrite and biofilm in a *Litopenaeus vannamei* biofloc culture system. *Lat.*

783 Am. J. Aquat. Res., 44(4): 760-768, 2016. DOI: 10.3856/vol44-issue4-fulltext-11

784 Lin, Y., Chen, J., 2003. Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone,  
785 1931) juveniles at different salinity levels 224, 193–201.  
786 [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00220-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00220-5)

787 Lin, Y., Chen, J., 2001. Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* Boone  
788 juveniles at different salinity levels 109–119.  
789 [https://doi.org/10.1016/S00220981\(01\)00227-1](https://doi.org/10.1016/S00220981(01)00227-1)

790 Madigan, michael t., Martinko, johm M., Bender, kelly s., Buckley, daniel h., Stahl,  
791 david a., 2016. Microbiologia de brock, 14th ed.

792 Melo, F.P., Ferreira, M.G.P., Braga, Í.F.M., Correia, E. de S., 2016. Toxicidade do  
793 nitrito para o camarão *Litopenaeus vannamei* cultivado em sistemas de água clara e  
794 biofoco. Bol. do Inst. Pesca 42, 861–871. [https://doi.org/10.20950/1678-](https://doi.org/10.20950/1678-2305.2016v42n4p861)  
795 [2305.2016v42n4p861](https://doi.org/10.20950/1678-2305.2016v42n4p861)

796 Michaud, L., Blancheton, J.P., Bruni, V., Piedrahita, R., 2006. Effect of particulate  
797 organic carbon on heterotrophic bacterial populations and nitrification efficiency in  
798 biological filters. Aquac. Eng. 34, 224–233.  
799 <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2005.07.005>

800 Oliveira, S.S., Wasielesky Jr, W., Ballester, E.L.C., Abreu, P.C., 2006. Caracterização  
801 da assembléia de bactérias nitrificantes pelo método “fluorescent in situ  
802 hybridization” (fish) no biofilme e água de larvicultura do Camarão-Rosa  
803 *farfantepenaeus paulensis*. Atlântica 28, 33–45.

804 Otoshi, C., A., Montgomery, A. D., Matsuda, E., M., Moss, S., M. 2006. Effects of  
805 Artificial Substrate and Water Source on Growth of Juvenile Pacific White  
806 Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Journal of the world aquaculture society. Vol. 37,  
807 No. 2

808 Ramesh, M.R., Shankar, K.M., Mohan, C. V, Varghese, T.J., 1999. Comparison of three  
809 plant substrates for enhancing carp growth through bacterial biofilm. Aquacultural  
810 Engineering 19, 119–131. [https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(98\)00046-6](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(98)00046-6)

811 Sá, M.V. do C., 2012. Limnocultura - Limnologia para Aquicultura.

812 Santa, K.D., Vinatea, L., 2007. Evaluation of respiration rates and mechanical aeration

813 requirements in semi-intensive shrimp *Litopenaeus vannamei* culture ponds.  
814 Aquac. Eng. 36, 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2006.07.002>

815 Serra, F. P., Carlos A. P. Gaona, C. A. P., Furtado, P. S., Poersch, L. H., Wasielesky,  
816 W. 2015. Use of different carbon sources for the biofloc system adopted during the  
817 nursery and grow-out culture of *Litopenaeus vannamei* Aquacult Int 23:1325–1339  
818 DOI 10.1007/s10499-015-9887-6

819 Schweitzera, R., Arantes, R., Baloia, M., F., Costódio, P. F. S., Aranaa, V. L., Seiffert,  
820 W. Q., Andreatta, E. R. 2013. Use of artificial substrates in the culture of  
821 *Litopenaeus vannamei* (Biofloc System) at different stocking densities: Effects on  
822 microbial activity, water quality and production rates. Aquacultural Engineering.55  
823 93-103 <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2012.12.003>

824 Strickland, J.D.H., Parsons, T.R., 1972. A Practical Handbook of Seawater Analysis. A  
825 1156 Pract. Handb. seawater Anal. 167, 185.  
826 <https://doi.org/10.1002/iroh.19700550118>

827 Souza, J., Cardozo, A., Wasielesky, W., Abreu, P. C., 2019. Does the biofloc size matter  
828 to the nitrification process in Biofloc Technology (BFT) systems?. Aquaculture  
829 500 443–450. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.051>

830 Tahon, J., Hoof, D.V.A.N., Vinckier, C., Witters, R., Ley, M.D.E., Lontie, R., 1988.  
831 The reaction of nitrite with the haemocyanin of *Astacus leptodactylus*. Biochem. J.  
832 249, 891–896. [https://doi:10.1042/bj2490891](https://doi.org/10.1042/bj2490891)

833 Thompson, F.L., Abreu, P.C., Wasielesky, W., 2002. Importance of biofilm for water  
834 quality and nourishment in intensive shrimp culture. Aquaculture 203, 263–278.  
835 [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00642-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00642-1)

836 Timmons, M.B., Ebeling, J.M., 2010. Recirculating Aquaculture Systems. 2nd Edition  
837 p. 939.

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

839 Utermöhl, H., 1958. Zur Vervollkommung der quantitativen Phytoplankton-Methodik.  
840 Int. Vereinigung für Theor. und Angew. Limnol. Kom. für Limnol. Methoden 9, 1–  
841 39.

842 Van Wyk, P., Scarpa, J., 1999. Farming Marine Shrimp In: Van Wyk, P., et al. (Eds.),

843 Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems. Florida Department  
844 of Agriculture and Consumer Services, Tallahassee, pp. 128–138.

845 Vieira, R. F., 2017. Ciclo do nitrogênio em sistemas agrícolas. Brasília, DF: Embrapa.  
846 p.163.

847 Vlaeminck, S.E., Terada, A., Smets, B.F., De Clippeleir, H., Schaubroeck, T., Bolea, S.,  
848 Demeestere, L., Mast, J., Boon, N., Carballa, M., Verstraete, W., 2010. Aggregate  
849 size and architecture determine microbial activity balance for one-stage partial  
850 nitrification and anammox. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 900–909.  
851 <https://doi.org/10.1128/AEM.02337-09>

852 Ward, B.B., 2013. Nitrification *Encyclopedia of Ecology (Second Edition)* 1–8.  
853 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.00697-7>

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

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

861 Zhu, G., Peng, Y., Li, B., Guo, J., Yang, Q., Wang, S., 2008. Biological Removal of  
862 Nitrogen from Wastewater. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 192, 159–195.  
863 [https://doi.org/10.1007/978-0-387-71724-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-0-387-71724-1_5)

864 ZAR, JH. 2010. *Biostatistical Analysis*. Upper Saddle River: Prentice Hall.  
865  
866  
867