

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA

O efeito da relação Carbono-Nitrogênio sobre a comunidade microbiana no cultivo super-intensivo de *Litopenaeus vannamei* sem renovação.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Aqüicultura.

Orientador: Dr. Edemar Roberto Andreatta

Co-orientador: Dr. Paulo César Abreu

Rafael da Fonseca Arantes

Florianópolis

2007

Arantes, Rafael da Fonseca

O efeito da relação Carbono-Nitrogênio sobre a comunidade microbiana no cultivo super-intensivo de *Litopenaeus vannamei* sem renovação. / Rafael da Fonseca Arantes - Florianópolis, 2007. 39p.: il.

Dissertação (Mestrado) – Prof. Orientador: Dr. Edegar Roberto Andreatta - -Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

Bibliografia.

1. Razão C/N 2.Cultivo super-intensivo 3. *Litopenaeus vannamei* 4. Dinâmica microbiana.

O efeito da relação Carbono-Nitrogênio sobre a comunidade microbiana no cultivo super-intensivo de *Litopenaeus vannamei* sem renovação.

Por

RAFAEL DA FONSECA ARANTES

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQÜICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura.

Prof. Cláudio Manoel Rodrigues de Melo, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Dr. Edemar Roberto Andreatta - *Orientador*

Dr. Elpidio Beltrame

Dr. Wilson Francisco Britto Wasielesky Junior

**Para
Maria Luiza**

AGRADECIMENTOS

Agradeço

À Capes pela bolsa de fomento.

Ao Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura da UFSC pelo apoio financeiro na compra de reagentes para análises químicas.

Ao Laboratório de Camarões Marinhos (LCM) pelo fornecimento de toda a estrutura de cultivo e principalmente pelo fornecimento dos juvenis de camarão utilizados neste trabalho.

Ao programa de Pós-graduação em Oceanografia Biológica da FURG pela oportunidade de cursar disciplinas e ampliar o entendimento sobre o tema desta pesquisa.

Ao Laboratório de Fitoplâncton e Microorganismos Marinhos pelo empréstimo de equipamentos e pela permissão no uso dos microscópios e pela acolhedora esta em rio grande.

Ao Laboratório de Peixes de Água Doce da UFSC (Lapad) pelo fornecimento de reagentes para análises químicas e pelo uso da autoclave.

Ao laboratório de tecnologia de alimentos da UFSC pelo apoio nas análises físico-químicas.

Este trabalho jamais seria realizado sem o apoio de diversas pessoas, dentre todas elas agradeço

Professor Paulo César Abreu pela orientação em toda a etapa de análise dos microorganismos e pelo tempo dispensado ensinando e discutindo a ecologia de microorganismos.

Professora Valéria Reginatto Spiller pelas enormes contribuições na confecção deste projeto de pesquisa por ceder o espaço de seu laboratório e pela ajuda nas análises químicas.

Professor Edemar Roberto Andreatta pela orientação ao longo do mestrado e pelas correções no manuscrito.

Um agradecimento especial ao Professor Walter Seiffert por acreditar no meu trabalho sempre Indicando o caminho profissional mais correto. Valeu Walter.

Professor Eupídio Beltrame, pela oportunidade de trabalhar com os flocos em uma nova etapa.

Professor Alex Pires de Oliveira Nuñez e Claudinha pelo apoio no fornecimento de reagentes e ajuda com a metodologia das análises.

Professora Clarisse Odebrescht pela ajuda no manuseio do microscópio e pela força na observação das algas.

Ao setor de microbiologia do LCM na figura de Zé Luiz Moriño por me acolher e abrir espaço no laboratório e Celso pela paciência em ensinar as técnicas do setor. Valeu vocês mostraram que o caminho trabalho duro e surf no pé podem andar juntos.

Todo o pessoal do LCM principalmente Ancelmo da logística, Carlos da Manutenção e Fabiano do setor de reprodutores. Obrigado pela enorme força e por aturar com paciência em todos os pedidos de ajuda.

Maria Luiza por todas as contribuições para o trabalho tanto com as análises químicas quanto nos fundamentos teóricos envolvidos nos processos geoquímicos. Este trabalho é seu também.

Rodrigo Schweitzer pela amizade e ainda pela intensa série de discussões, críticas e ajuda incondicional. Sem elas este trabalho não teria se realizado. Obrigado pelas correções no trabalho e pelos ensinamentos sobre manejo de cultivo.

Carlos Rezende, figura principal na elaboração execução e sorte deste projeto. Obrigado por me incluir neste projeto de pesquisa, e por fazer do meu trabalho um desafio. Valeu Baiano.

Ao pessoal do Laboratório de Ecologia do fitoplâncton e microorganismos marinhos obrigado pela amizade. Márcio pelas discussões sobre estatística e na identificação das algas, Carlos pela força com a captura das imagens, Arnaldo pelas extensas discussões sobre pesquisa e ética, pelas identificações das algas e ajuda nas contagens, Loureiro e Grazi por estarem sempre procurando os amigos. Bianca, Lucélia e Valnei pelo apoio com o material no laboratório úmido.

Ao pessoal do mestrado, Ricardo, Delano, Crislei, Hadja, Roberto Hoppe obrigado por tornarem esta etapa de vida mais uma experiência ainda mais rica.

Família Arantes por todo apoio ao longo de da vida e em especial no período de mestrado.

Família Fontes Arantes, Maria Luiza, Luana e Jasmim pelo carinho, amor, amizade e alegria dia após dia.

À todos os outros que aqui não cito, mas que contribuíram e sempre serão lembrados.

SUMÁRIO

Dedicatória

Agradecimentos

Resumo

Abstract

1- Introdução geral.....	10
2- Artigo científico.....	13
2.1. – Resumo.....	14
2.2. - Introdução.....	15
2.3. - Material e Métodos.....	17
2.4. - Resultados.....	20
2.5.- Discussão.....	26
2.6.- Conclusões.....	32
2.7.- Referências Bibliográficas.....	33
3.- Referências Bibliográficas da introdução.....	38

RESUMO

Uma das formas de controle da amônia ocorre através das bactérias heterotróficas, estimuladas pela elevação da relação C/N com carboidratos. Um ensaio foi conduzido em nove unidades experimentais para testar o efeito de diferentes razões C/N sobre os parâmetros físico-químicos e microbiológicos na água de cultivo de juvenis de *Litopenaeus vannamei*. Melaço em pó foi adicionado na água junto com a ração, para que relação C/N fosse mantida em 10/1, 20/1 e 30/1. O melaço foi eficiente no controle da amônia, porém relações intermediárias acima de 10/1 devem ser empregadas. Quanto maior a fertilização com melaço, maior a quantidade de sólidos orgânicos na água. Estes aumentaram a demanda de oxigênio e diminuíram a luz disponível para os produtores primários, inibindo a fotossíntese. A conversão alimentar não foi afetada pelas maiores concentrações de sólidos e não houve diferença no crescimento e sobrevivência dos camarões. O tempo elevado de retenção dos sólidos teve maior influência sobre os microorganismos do que as diferentes fertilizações com melaço. Células com formato de vibriões aparecem provavelmente, degradando a biomassa bacteriana gerada no início do cultivo e os dias finais apresentam dominância de formas filamentosas. Estas aparecem, em grande quantidade, aderidas às brânquias dos camarões gerando mortalidade.

ABSTRACT

One of the mechanisms to control ammonia nitrogen levels is carried out by heterotrophic bacteria, which are stimulated by an increase in carbohydrate C/N ratio. The trial was conducted in nine experimental units to evaluate the effect of different C/N ratios over physical, chemical, and microbiological properties of *Litopenaeus vannamei* juveniles rearing water. Powder molasses was added, in association with feed, to perform C/N ratios of 10/1, 20/1, and 30/1. The results show that molasses was effective to control ammonia nitrogen, although intermediate ratios, over 10/1, should be used. The more the molasses was added, the higher the organic solids load in water. These solids increase, improve oxygen demand and reduce light levels for primary producers, inhibiting photosynthesis. The feed conversion ratio was unaffected by higher solid concentrations and there was no difference in shrimp growth and survival between treatments. The high solids retention time had a more significant influence over microorganisms than did different molasses inputs. Vibrio-like forms appeared, probably, decomposing bacterial biomass initially produced, while filamentous bacteria dominated the final rearing dates. The late forms appeared attached to shrimp gills in high amounts, leading to shrimp mortality.

1. INTRODUÇÃO

O cultivo de camarão é uma importante indústria nas regiões tropical e subtropical ao redor do mundo, com uma produção estimada em 2.108.175 TM/ ano (FAO, 2005). Nos sistemas de cultivo tradicionalmente adotados, a manutenção da qualidade da água é realizada com o emprego de intensa renovação de água. Para produzir um quilo de camarão em viveiros de engorda, utiliza-se uma quantidade que varia de 39 a 199 toneladas de água (HOPKINS & VILLALÓN, 1992). Normalmente esta água é rica em nutrientes, e despejada no ambiente natural sem tratamento prévio, causando alterações nos ecossistemas adjacentes às áreas de cultivo (HOPKINS *et al*, 1995; BAIRD, *et al*, 1993).

Com o advento das doenças de origem viral, o controle do volume de organismos vetores para dentro dos viveiros passou a ser priorizado nas estratégias contra a disseminação de doenças (HOROWITZ & HOROWITZ, 2001). O controle destas doenças é um motivo para o desenvolvimento, e para a aplicação, de diversas tecnologias de cultivo, que reduzem ou eliminam a introdução de água potencialmente contaminada para as fazendas de cultivo (FAST & MANASVETA, 2000). Sistemas de produção com troca zero de água buscam eliminar a introdução de água contaminada, sendo apropriados na melhoria da biossegurança nas fazendas (BRATVOLD & BROWDY, 1998) e na forma de lidar com o uso da água e com a descarga de efluentes dos cultivos intensivos (McNEIL, 2000).

Apesar destas vantagens, a redução ou eliminação das taxas de renovação de água podem aumentar os problemas de qualidade de água nos cultivos. Estes, normalmente gerados por redução nos níveis de oxigênio dissolvido (BROWDY *et al*, 1993), e pelo acúmulo de compostos nitrogenados como a amônia (NH_3) e o nitrito (NO_2^-) (WICKINS, 1976).

As principais fontes de amônia são as excretas dos camarões e a decomposição dos detritos, que, em sistemas de aquicultura, são formados por partículas de ração não consumidas e por fezes dos animais que, quando decompostos por bactérias heterotróficas no processo de mineralização, podem produzir amônia (NH_3) (MORIARTY, 1997). A quantidade de NH_3 na água é dependente do pH sendo que em um pH estável ao redor de oito, encontra-se 95 % do nitrogênio amoniacal total (TAN) na forma de amônio (NH_4^+) e o restante na forma de NH_3 .

Em sistemas de cultivo fechado, a absorção de nitrogênio pelas microalgas e a nitrificação são os principais processos da ciclagem do nitrogênio na água dos viveiros de cultivo (HARGREAVES, 1998). Entretanto, as bactérias heterotróficas podem atuar como importantes agentes na retirada deste nitrogênio presente na água. Tanto as formas orgânicas (aminoácidos livres e combinados) (KROER *et al*, 1994), quanto nas formas inorgânicas (amônia e nitrato) (GOLDMANN, *et al* 1987; 1991; HOCH & KIRCHMAN, 1995; MONTOYA, 2002) podem ser absorvidas. A mineralização não é, portanto, o único processo no qual as bactérias heterotróficas estão envolvidas. O nitrogênio amoniacal também pode ser utilizado como fonte de nitrogênio para a incorporação de biomassa nestes organismos através de um processo de imobilização (WHEELER & KIRCHMAN, 1986; FUHRMAN *et al*. 1988).

GOLDMAN, *et al.* (1987) mostraram uma redução na taxa de mineralização (ou excreção) da amônia pelas bactérias e um conseqüente aumento na incorporação deste composto, na forma de biomassa bacteriana, quando a relação C/N do substrato disponível é maior do que 10. Em viveiros de tilápia a adição de substratos carbonáceos, para elevar a razão C/N, tem demonstrado um aumento na absorção de nitrogênio para a síntese protéica por parte das bactérias heterotróficas, reduzindo os níveis da amônia. Esta proteína microbiana pode ser então, ingerida pela espécie cultivada aumentando a taxa de crescimento (AVNIMELECH, *et al.* 1994).

Estes conceitos de elevação da relação C/N são aplicados em sistemas de troca zero de água onde a biodegradação microbiana dos resíduos orgânicos controlam, em grande parte, a qualidade da água (BURFORD *et al.*, 2003; BROWDY *et al.*, 2001). Nesses sistemas a comunidade planctônica dominada pelo fitoplâncton no início do cultivo passa para uma comunidade mais estável dominada por bactérias heterotróficas à medida que os viveiros ficam maduros (BROWDY *et al.*, 2001). A mudança do sistema de autotrófico para um sistema heterotrófico ocorre quando a quantidade de carbono de origem alóctone ultrapassa a quantidade de carbono fornecida pelo fitoplâncton para suportar o crescimento bacteriano (Del GIORGIO, *et al.* 1997).

Desta forma o princípio dos sistemas heterotróficos sem renovação de água é aumentar a incorporação dos compostos tóxicos na biomassa bacteriana estimulando o crescimento bacteriano com o aumento das relações C/N, promovido pela fertilização da água com compostos ricos em carbono. O sistema reduz os compostos nitrogenados tóxicos favorecendo a produção de alimento natural que na forma de material floculado, serve de alimento diretamente para os camarões (AVNIMELECH *et al.*, 1994; AVNIMELECH, 1999; BROWDY *et al.*, 2001). Estes sistemas são caracterizados por altas concentrações de nutrientes, altas concentrações de bactérias, fitoplâncton e protozoários (BURFORD, *et al.*, 2003).

No cultivo de camarões apenas cerca de 15 a 30% do alimento fornecido na forma de ração se converte em biomassa nos organismos cultivados, o restante acaba sendo perdido para a água na forma de matéria orgânica (OSTRENSKY & BARBIERI, 2002; HOROWITZ & HOROWITZ, 2001). Entretanto, em sistemas de engorda tem se estimado que entre 53 a 77% do incremento de peso dos camarões é devido ao pastoreio sobre a biota natural dos viveiros (ANDERSON, *et al.* 1987).

THOMPSON, *et al.* (1999), destacaram a importância das bactérias como fonte alimentar devido às maiores concentrações de nitrogênio e fósforo por volume celular. Entretanto, seu tamanho reduzido (0,5 – 1,5 μm de comprimento) dificulta sua captura pelos camarões. Por outro lado, CONOVER (1982) descreve que para serem melhor consumidas as bactérias devem formar agregados ou se fixarem em outras partículas. BIANCHI *et al.* (1990) atribuíram 70-80% do ganho de peso de *Litopenaeus vannamei* cultivado sob condições de laboratório à ingestão de flocos bacterianos.

Segundo DECAMP *et al.*, (2002) os flocos formados durante o processo de produção em sistemas com troca zero de água possuem uma composição (diatomáceas, partículas fecais, exoesqueletos, restos de organismos mortos, bactérias protozoários e invertebrados) semelhante à descrita para os macro-agregados ou neve marinha (ARTOLOGAZA, 2000; KIORBE, 2000). A riqueza de microorganismos presentes nestes agregados pode aumentar o valor nutritivo do detrito para a espécie consumidora (LEHTO, *et al.*, 1998).

Os protozoários atuam na predação de algas, bactérias e fungos servindo de alimento para outros metazoários. A relação C:N de protozoários heterotróficos marinhos geralmente é menor do que a encontrada em algas e outros mixotróficos, além disso os protozoários sintetizam ácidos graxos poliinsaturados (STOECKER & CAPUZZO, 1990). Por este motivo, eles podem ser uma fonte de aminoácidos, esteróis, proteínas e ácidos graxos poliinsaturados que são essenciais para o crescimento dos camarões penaeídeos (THOMPSON *et al* , 1999). Em cadeias alimentares dominadas por detritos, os protozoários podem ser uma fonte de nutrientes essenciais que facilitam o uso das bactérias e do carbono presente no detrito pelos metazoários planctônicos (STOECKER & CAPUZZO, 1990).

A importância dos protozoários como alimento foi demonstrada com larvas de *Farfantepenaeus paulensis* que cresceram melhor quando alimentadas com flagelados e ciliados do que quando se alimentaram apenas de bactérias (THOMPSON *et al*, 1999). Um estudo realizado por BRATVOLD, *et al* (1999) em viveiros biosseguros de cultivo de camarões mostra que o zooplâncton foi dominado por ciliados durante os primeiros 20 dias de cultivo. DECAMP, *et al*, (2002) estudando a sucessão de protozoários ciliados em tanques com renovação zero de água mostrou que o número de protozoários ciliados variou com o tempo e chegou a alcançar o número de 6000 células por ml de água.

Ciliados livres foram abundantes nos estágios iniciais de produção e um grande número de ciliados associados a partículas apareceu após duas semanas de produção, aonde houve uma forte correlação entre a quantidade de ciliados e o material em suspensão. A sucessão da comunidade microbiológica terminou, a partir da segunda metade do experimento, com o aparecimento de nematóides nos tanques de cultivo (DECAMP *et al*, 2002). Os nematódeos, juntamente com as bactérias, ciliados e diatomáceas fazem parte da dieta preferencial de algumas espécies de camarões penaeídeos (NUNES *et al* 1997).

Pouca informação tem sido gerada sobre as comunidades de microorganismos planctônicos em sistemas de cultivo de camarão. Sua potencial importância na nutrição dos camarões cultivados, na reciclagem da matéria orgânica e na manutenção da qualidade da água merece especial atenção principalmente em cultivos aonde se busca a eliminação das renovações periódicas de água.

2. Artigo científico.

O efeito da relação C/N no cultivo super-intensivo de *Litopenaeus vannamei* sobre a comunidade microbiana em sistema de bioflocos com renovação zero.

Rafael da Fonseca Arantes

Laboratório de Camarões Marinhos – LCM

Endereço: Beco dos Coroas, (fundos) – Cep: 88062-601.

Barra da Lagoa / Florianópolis / Santa Catarina / Brasil.

Autor correspondente: Tel.: +55-48-32268499; Fax.: +55-48-32268499;

e-mail: arantesr75@yahoo.com.br

2.1. RESUMO

Uma das formas de controle da amônia ocorre através das bactérias heterotróficas, estimuladas pela elevação da relação C/N com carboidratos. Um ensaio foi conduzido em nove unidades experimentais para testar o efeito de diferentes razões C/N sobre os parâmetros físico-químicos e microbiológicos na água de cultivo de juvenis de *Litopenaeus vannamei*. Melaço em pó foi adicionado na água junto com a ração, para que relação C/N fosse mantida em 10/1, 20/1 e 30/1. O melaço foi eficiente no controle da amônia, porém relações intermediárias acima de 10/1 devem ser empregadas. Quanto maior a fertilização com melaço, maior a quantidade de sólidos orgânicos na água. Estes aumentaram a demanda de oxigênio e diminuíram a luz disponível para os produtores primários, inibindo a fotossíntese. A conversão alimentar não foi afetada pelas maiores concentrações de sólidos e não houve diferença no crescimento e sobrevivência dos camarões. O tempo elevado de retenção dos sólidos teve maior influência sobre os microorganismos do que as diferentes fertilizações com melaço. Células com formato de vibriões aparecem provavelmente, degradando a biomassa bacteriana gerada no início do cultivo e os dias finais apresentam dominância de formas filamentosas. Estas aparecem, em grande quantidade, aderidas às brânquias dos camarões promovendo mortalidade.

2.2. INTRODUÇÃO

Apesar do intenso crescimento da aquicultura mundial desde o ano de 1970 (8,9 % ao ano), a crescente demanda por proteína de pescado aliada à estagnação da pesca de captura gera estimativas de que a aquicultura necessite crescer aproximadamente cinco vezes mais nas próximas duas décadas (FAO 2005). O cultivo de camarões responde por aproximadamente 4,6 % de toda a produção mundial proveniente da aquicultura (FAO 2005). Um dos grandes problemas relacionados ao crescimento e intensificação dos cultivos de camarões está associado à degradação de ecossistemas adjacentes ao cultivo pela descarga de efluentes (Hopkings et al 1995; Baird et al 1993) e a presença de doenças de origem viral, que afetam de forma negativa a indústria camaroneira. Sistemas de produção em troca zero de água são bastante apropriados na melhoria da biossegurança nas fazendas (Bratvold et al 1999) e na forma de lidar com o uso da água e com a descarga de efluentes dos cultivos intensivos (McNeil 2000). Sistemas intensivos convencionais utilizam entre 9000 e 64000 litros de água por kg de camarões produzido (Hopkings et al 1993), enquanto que os sistemas de troca zero ou heterotróficos como são mais comumente chamados (Browdy et al 2001) chegam a utilizar apenas 160 litros por Kg de camarão (Otoshi et al 2006).

Um dos problemas relacionados com a eliminação das renovações periódicas de água nos cultivos tradicionais é a deterioração de sua qualidade. Esta geralmente ocorre devido ao incremento nos níveis de compostos nitrogenados tóxicos para os organismos de cultivo, principalmente a amônia e o nitrito (Wickins 1976) e também pelo consumo excessivo de oxigênio (Browdy et al 1993). Nos tanques de troca zero, o oxigênio é mantido através da intensa taxa de aeração e completa mistura da coluna d'água (Hargreaves 2006). A amônia por sua vez, pode ser controlada pela imobilização na biomassa das bactérias heterotróficas através da elevação da relação C/N do substrato orgânico disponível para a degradação (Avnimelech 1999; Crab et al 2007). Como a relação C/N das rações com 35% de proteína bruta, normalmente utilizadas no cultivo de camarões, está em torno de 8,0 (Ebeling et al 2006a), o aumento da relação C/N do material orgânico dentro do sistema de cultivo pode ser realizada através da adição de carboidrato na água (Avnimelech 1999). Uma das maneiras de fornecer carboidratos para incrementar a relação C/N é através do uso de melado de cana de açúcar (Hari et al 2004; Schneider et al 2006; Samocha et al 2007) que possui aproximadamente 42% de carbono.

Além do reduzido uso de água, algumas vantagens adicionais são atribuídas a estes sistemas. Por exemplo, o estímulo da comunidade bacteriana através de fertilizações com carbono permitem um maior aproveitamento dos nutrientes provenientes da ração não consumida devido à reutilização microbiana dos resíduos orgânicos e inorgânicos dentro do próprio tanque de cultivo (Avnimelech 1994; Browdy et al 2001; Burford 2003). Quando não se renova a água, os microorganismos acabam consumindo os metabólitos e os restos de ração e são mantidos em suspensão na água na forma de material particulado chamado bio-floco (McIntosh et al 1999; Browdy et al 2001; Avnimelech 2007; Crab et al 2007). Sua presença é uma fonte adicional de nutrientes na alimentação dos camarões (Moss 1995; Moss et al 2001; Hopkings et al 1995; McIntosh & Avnimelech 2001; Burford et al 2003; 2004).

Maiores quantidades de material particulado na água de viveiros de cultivo resultam em maiores taxas de crescimento de *L. vannamei*, quando comparados com uma baixa quantidade de material em suspensão na água (Leber & Pruder 1988; Moss & Pruder 1995). No cultivo intensivo, Burford et al (2004) demonstraram que a biota natural contribui substancialmente no fornecimento de nitrogênio para os camarões. Desta forma, espera-se que o estímulo da comunidade microbiana através do aumento da relação C/N, reduza os níveis de compostos nitrogenados tóxicos na água, e permita um aumento na disponibilidade de alimento natural, melhorando as taxas de crescimento e a conversão alimentar relativa dos camarões cultivados junto com a melhora da qualidade da água do cultivo.

Segundo Hargreaves (2006) uma limitação de nitrogênio para o crescimento bacteriano pode ser promovida através do fornecimento de substratos com relação C/N 10/1 ou maiores. Estudos realizados com tratamento biológico de efluentes comprovam que as relações C/N de 20/1 e 30/1 suportam comunidades microbiológicas mais úteis e eficientes no tratamento da água (Boopathy et al 2005). Entretanto, Fontenot et al (2007), demonstraram que a maior eficiência da comunidade microbiana no tratamento da água de cultivo de camarões marinhos ocorre na presença de uma relação C/N = 10/1.

O comportamento das comunidades microbianas estimuladas sob diferentes razões de C/N e seus efeitos sobre a qualidade de água e o desempenho dos camarões, ainda são pouco conhecidos. O presente estudo pretende avaliar o efeito de diferentes razões C/N, obtidas através da fertilização com melaço de cana, sobre a dinâmica e a composição de microorganismos presentes na água, visando à melhoria dos índices produtivos do camarão *Litopenaeus vannamei*, cultivado em sistema super-intensivo sem renovação de água.

2.3. MATERIAIS E MÉTODOS

O efeito de diferentes fertilizações com melaço de cana sobre a água do cultivo super-intensivo de *Litopenaeus vannamei* sem troca de água, foi estudado durante 36 dias em nove unidades experimentais que operaram como microcosmo. As unidades experimentais eram constituídas por tanques circulares de fibra de vidro com volume útil de 900 litros.

A preparação da água utilizada no experimento teve início 15 dias antes em um tanque de 50 toneladas (instalado dentro de uma estufa), com um volume inicial de 25 m³ de água do mar (salinidade 35 ‰) bombeado da praia. Este tanque recebeu 15 m³ de água de cultivo mono-específico de *Chaetoceros muelleri* a uma densidade de 1,0 x 10⁵ células/ml completando um volume de 40 m³ de água com densidade final de 3,7 x 10⁴ céls/ml. A cada dois dias a água recebeu fertilização mista, inorgânica com 200g de nitrato de sódio, 25g de fosfato de sódio e 125g silicato de sódio, mais 6,25 ml/m³ de uma solução de cloreto férrico (3,3 g/l de ferro) e uma fertilização orgânica com 12,5 g/m³ de melaço de cana (5,4 g/m³ de carbono), adicionados conforme o procedimento de rotina adotado no laboratório para estimular o crescimento planctônico na preparação de um sistema rico em alimentos naturais (Schweitzer, comm. pess.)

Ao final de 15 dias esta água foi transferida para nove unidades experimentais confeccionadas em fibra de vidro, cada uma com 1,1 m² de área de fundo. Os tanques foram preparados com anel de aeração central composto por seis pedras de ar e um air-lift lateral, posicionado para promover um fluxo circular da água. O sistema de aeração foi desenhado para que as fezes, restos e os restos de ração fossem mantidos em suspensão na água e para que o oxigênio dissolvido fosse distribuído de forma homogênea por todo o tanque.

O delineamento experimental foi definido por três tratamentos com três repetições. Em cada tanque foram colocados 300 juvenis de *Litopenaeus vannamei* 265 camarões/m² com peso médio de 1 (± 0,1) grama, alimentados com ração comercial 35% proteína bruta (PB) a uma taxa diária de 6% da biomassa, distribuída em 4 períodos de alimentação. A ração com 35% PB possui razão C/N igual a 7,2 e sua quantidade foi ajustada semanalmente após a biometria. Junto com a ração, em cada horário de alimentação, uma quantidade de melaço em pó (43,1% de carbono) foi adicionada na água para que a entrada de carbono e nitrogênio nos tanques fosse mantida nas distintas relações C/N que determinaram os três tratamentos (tab. 1). O teor de carbono e nitrogênio da ração foi determinado após maceração utilizando um analisador Carlo Erba EA1110 CHNS-O segundo a metodologia descrita por Zwirtes (2003). Para o melaço, apenas o teor de carbono foi determinado através da redução do carbono orgânico total em aparelho Shimadzu TOC 5000 A, conforme metodologia proposta por ISO (1987).

Tabela 1. Entrada de melaço em relação à entrada de ração para três diferentes relações C/N

Tanques	C/N	% de ração sobre a biomassa de camarão	Kg de melaço/ Kg de ração
3, 8, 10	10/1	6	0,32
1, 4, 9	20/1	6	1,66
5, 6, 7	30/1	6	3,45

Diversas variáveis físico-químicas e biológicas, foram acompanhadas ao longo do experimento. O oxigênio dissolvido na água dos tanques foi monitorado duas vezes ao dia com auxílio de um medidor de oxigênio YSI modelo 9000. A transparência da água, salinidade e o pH, foram medidas diariamente, sempre às 8 hs da manhã, com auxílio de um disco de Secchi e um refratômetro ótico e um pH metro pHmaster; Gulton do Brasil respectivamente. O coeficiente de atenuação da luz **K** foi calculado através dos valores da transparência do disco de Secchi utilizando a relação empírica proposta por Poole e Atkins (1929) (apud Parsons et al 1989):

$$\mathbf{K = 1,7/ Secchi_m}$$

A porcentagem de luz que incide nos primeiro 10 cm da água dos tanques (Luz %) foi calculada através da lei de Lambert-Beer:

$$I_d = I_0 e^{-kd}$$

onde, I_0 é a luz que chega à superfície, I_d é a quantidade de luz que atravessa a distância d , K é o coeficiente de atenuação da luz (Parsons et al 1989). O valor da luz que incide na superfície da água (I_0) foi considerado como sendo 100%.

Amostras semanais de 100 ml de água eram filtradas em filtro Whatman GF/C (vácuo < 10mm Hg) para a determinação colorimétrica em espectrofotômetro, das concentrações de amônia segundo a metodologia descrita por Koroleff (1976), nitrito segundo Bendschneider & Robinson (1952) e ortofosfato (APHA, 1998). Avaliações do total de sólidos voláteis (SVT) nos tanques foi determinado diretamente pelo método gravimétrico APHA 2540 com um volume de 50 ml de água B (APHA 1998).

Medidas de atividade metabólica foram realizadas através obtenção das taxas de produção primária líquida e de respiração da água, determinadas semanalmente, para cada unidade experimental por meio da incubação de duas de garrafas DBO 300 ml transparentes (produção) e duas garrafas DBO 300 ml escuras (respiração) durante um período de quatro horas. As garrafas foram colocadas em um cabide e mantidas semi-submersas nos primeiros 10 cm de água assegurando-se que a luz incidisse sobre as garrafas e a temperatura não se elevasse. As taxas de produção primária líquida (PPL), produção primária bruta (PPB) e respiração (R) foram expressas em oxigênio e determinadas através das seguintes equações:

$$\text{Produção (PPL) mg O}_2\text{/L/h} = (\text{Cfc} - \text{Ci}) / \text{T}$$

$$\text{Produção (PPB) mg O}_2\text{/L/h} = [(\text{Cfc} - \text{Ci}) + (\text{Ci} - \text{Cfe})] / \text{T}$$

$$\text{Respiração (R) mg O}_2\text{/L/h} = (\text{Ci} - \text{Cfe}) / \text{T}$$

onde, C_i é a concentração de oxigênio dissolvido no início da incubação, C_{fc} é a concentração de oxigênio dissolvido na garrafa clara no final da incubação C_{fe} é a concentração de oxigênio dissolvido na garrafa escura no final da incubação e T é o tempo da incubação em horas (Soeder & Talling 1969). As medidas de oxigênio foram realizadas com eletrodo YSI 5000. Com estas determinações, a condição trófica dos tanques pôde ser determinada através do cálculo do metabolismo líquido do sistema (NEP), obtido dividindo-se a produção primária bruta pela respiração PPB / R (Smith & Hollibaugh 2000; Atwood et al 2004). Valores maiores do que 1 caracterizam um ambiente autotrófico dominado por algas e menor do que 1 caracteriza um ambiente heterotrófico dominado por bactérias (Burford et al 2003). Os valores de produção Primária foram plotados contra os valores acumulados

de carbono na água dos tanques (somatório da entrada diária de carbono) com intuito de avaliar o efeito da entrada de carbono sobre a taxa de produção primária.

A caracterização do número de microorganismos presentes na água dos tanques foi realizada semanalmente através da coleta de amostras em frascos de 100 ml. Estas foram retiradas a uma profundidade de 10 cm abaixo da superfície e preservadas em formol 4% neutralizado com tetraborato de sódio. Posteriormente em laboratório, sub-amostras de 500 µl foram filtradas em filtro escurecido Nuclepore (0,22 µm de poro, 25 mm de diâmetro) e coradas com Laranja de Acridina (Hobbie et al 1977). Este filtro foi colocado em lâmina, na presença de óleo mineral e coberto por lamínula para posterior observação, em aumento de 1000 X, com microscópio de epifluorescência ZEISS-Axioplan equipado com conjunto de filtros (BP 450-490; FT 510; LP 520) e câmara fotográfica CCD Watec (sensibilidade luminosa 0,0003 lux).

Os microorganismos foram classificados e quantificados por grupos: bactérias, cianobactérias e protozoários. As bactérias foram classificadas de acordo com sua forma em cocos, bastonetes, vibriões e filamentosas que foram quantificadas em no mínimo 30 campos aleatórios ou até que o coeficiente de variação entre os campos alcançasse 30% (Porter & Feig 1980). Trinta bactérias de cada forma foram medidas no comprimento e na largura para a obtenção do biovolume bacteriano, que foi utilizado como indicativo do tamanho celular. O biovolume foi calculado através do algoritmo proposto por Massana et al (1997) e então convertido em valores de biomassa bacteriana através do fator de conversão de $0,35 \times 10^{-12}$ g de Carbono/ μm^3 (Riemann et al. 1990). As cianofíceas localizadas através da observação em filtro verde (BP 576 FT580 LP 590) foram então contadas da mesma forma que as bactérias. O número de ciliados e flagelados presentes na amostra foi determinado segundo sedimentando-se 2,0 ml de amostra em câmara de sedimentação segundo a metodologia proposta por Utermöl (1958), utilizando microscópio invertido ZEISS-Axiovert 135 equipado com contraste de fase.

Os índices produtivos do cultivo foram monitorados através de biometrias semanais onde 30 camarões de cada tanque eram retirados e pesados individualmente para a obtenção do valor de peso médio. Ao final do experimento os camarões foram despescados e contados, seu número total foi multiplicado pelo valor de peso médio na última semana para obtenção do valor de biomassa final em cada tanque. O desempenho zootécnico dos camarões entre os tratamentos foi avaliado através Análise de Variância ANOVA-unifatorial (Tratamento) com nível de significância de 5%, utilizando posteriormente o teste Tukey, quando constatadas diferenças. Os parâmetros físico-químicos e as contagens de microorganismos foram submetidos à Análise de Variância ANOVA-bifatorial (tratamento X tempo) e teste de Tukey (Underwood 1981). Valores de sólidos voláteis totais (SVT) foram analisados através do modelo de regressão linear simples, para a determinação das taxas de acúmulo de sólidos e então, submetidos à Análise de Covariância ANCOVA e teste de Tukey, com nível de significância de 5% para a comparação dessas taxas nos diferentes tratamentos (Zar 1999). As relações existentes entre variáveis físico-químicas no decorrer do cultivo foram avaliadas através do método de ordenação multivariada de análise dos componentes principais (PCA) baseado numa matriz de correlação (Clarke & Warwick 1994). As relações entre as variáveis físicas e biológicas foram estudadas através de análise de correlação simples de Pearson e aplicações de modelos de regressão linear testados por ANOVA com nível de significância de 5%.

2.4. RESULTADOS

Nenhum dos índices produtivos apresentou diferença ao longo dos 36 dias de cultivo para os camarões cultivados nos três tratamentos. Os valores de sobrevivência e a taxa de conversão alimentar não variaram assim como o peso final, biomassa total e o ganho em peso por semana (tab.2).

Tabela 2. Índices produtivos de *L. vannamei* nas três relações C/N: 10/1, 20/1, 30/1 durante 36 dias de cultivo. Densidade 300 camarões/m² alimentados com 6% da biomassa por dia. Letras sobrescrita distintas indicam diferenças significativas ANOVA uni-fatorial ($p < 0,05$).

Variável	Tratamento		
	10/1	20/1	30/1
Ganho de peso (g/semana)	0,78 ($\pm 0,06$) ^a	0,73 ($\pm 0,03$) ^a	0,80 ($\pm 0,01$) ^a
Peso final (g)	4,92 ($\pm 0,25$) ^a	4,68 ($\pm 0,16$) ^a	5,00 ($\pm 0,04$) ^a
Sobrevivência (%) *	60,2 ($\pm 4,2$) ^a	65,2 ($\pm 7,1$) ^a	58,5 ($\pm 3,5$) ^a
Biomassa final (Kg/m ³)	0,97 ($\pm 0,03$) ^a	0,97 ($\pm 0,12$) ^a	0,95 ($\pm 0,06$) ^a
C.A. (ração/biomassa)	2,35 ($\pm 0,18$) ^a	2,19 ($\pm 0,19$) ^a	2,23 ($\pm 0,15$) ^a

Valores apresentados pela média (\pm desvio padrão).

* dados transformados (Arcosseno \sqrt{x}) anteriormente à análise.

As variáveis físicas analisadas não foram influenciadas pelas diferentes taxas de fertilização com melaço, exceto os valores de transparência. A salinidade foi mantida dentro da faixa de 35 e 36 ‰ em todos os tanques e os valores de pH e temperatura não foram diferentes Anova ($p < 0,05$) (tab. 3). Todos os tanques exibiram comportamento semelhante ao longo do tempo. A temperatura mínima de 26,5 ($\pm 0,69$)°C e máxima de 28,6 ($\pm 0,85$)°C ocorreram nos dias 3 e 31 respectivamente e o pH apresentou os valores mais baixos (8,45 $\pm 0,06$) no dia 1 e mais altos (8,94 $\pm 0,14$) no dia 23.

Tabela 3. Valores médios (\pm DP) dos parâmetros físicos, químicos e do metabolismo da água de cultivo intensivo de *L. vannamei* sujeitos a três diferentes fertilizações com melaço: C/N 10/1, 20/1 e 30/1. Valores de significância correspondem a comparações por ANOVA bi-fatorial avaliando tratamento (Tr), dias (D) e a interação tratamento x dias (Tr x D)

Variável	Tratamento			Significância		
	10/1	20/1	30/1	(Tr)	(D)	(Tr x D)
Salinidade	35,5 ($\pm 0,5$)	35,5 ($\pm 0,5$)	35,5 ($\pm 0,5$)	NS	NS	NS
Temperatura (°C)	27,8 ($\pm 1,26$)	27,7 ($\pm 1,26$)	27,6 ($\pm 1,25$)	NS	*	*
pH	8,74 ($\pm 0,13$)	8,74 ($\pm 0,14$)	8,76 ($\pm 0,16$)	NS	*	NS
Transparência (cm)	18,6 ($\pm 5,4$)	16,9 ($\pm 6,9$)	14,5 ($\pm 8,2$)	*	*	*

* Tukey HSD ($p < 0,05$).

Os valores de transparência iniciaram em 40 cm e passaram a cair sendo significativamente diferentes a partir do 13° dia de cultivo ($p < 0,05$) onde o tratamento 30/1 apresentou menor transparência. Os valores caíram até alcançar, no último dia, 10, 5 e 0 cm para os tratamentos 10/1, 20/1 e 30/1 respectivamente (fig. 1). A transparência apresentou correlação negativa ($p < 0,05$) com o teor de matéria orgânica ($r = -0,69$ $n = 45$), representado por valores de SVT.

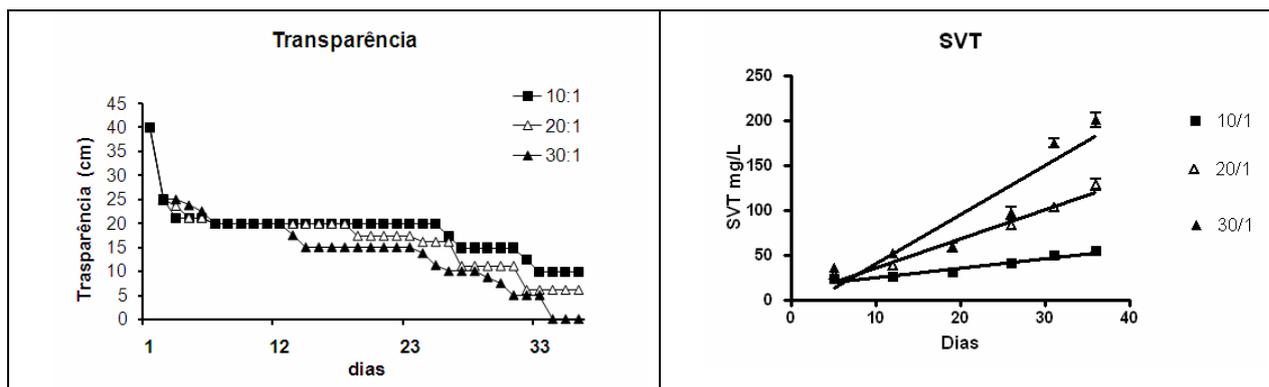


Figura 1. Transparência do disco de Secchi e Sólidos voláteis totais (SVT) no cultivo intensivo de *L. vannamei* sujeito a três diferentes fertilizações com melaço: C/N 10/1, 20/1 e 30/1. STV 10/1: $Y=1,05 x + 14,36$ ($r^2=0,85$)^c, STV 20/1: $Y=3,22 x - 4,03$ ($r^2=0,94$)^b, STV 30/1: $Y=5,46 x - 14,36$ ($r^2=0,85$)^a para descrição da comparação entre os modelos veja o texto.

Entre todos os tratamentos foi possível observar uma relação linear ($b \neq 0$ $p < 0,05$) do incremento no teor de sólidos voláteis totais (SVT) e os dias de cultivo. Este aumento foi maior quanto mais elevada a entrada de carbono via melaço ($F= 40.9$ $p < 0,0001$) sendo mais acentuado no tratamento 30/1, que alcançou valores acima de 200 mg/l de SVT no final do cultivo (5,4 mg de SVT/L/dia). Níveis intermediários de 3,2 mg de SVT/L/dia foram obtidos no tratamento 20/1 ($q = 4.81$ $p < 0,05$) seguidos de acúmulos menores (1,1 mg de SVT/L/dia) no tratamento 10/1 ($q = 6.46$ $p < 0,05$) conforme equações apresentadas na figura 1.

O aumento da fertilização com melaço esteve diretamente relacionada com a demanda de oxigênio na água. Os valores de respiração foram maiores ($p < 0,05$) nos tratamentos C/N: 30/1 e 20/1 quando comparados com o tratamento 10/1 (tab. 4), porém não foram significativamente diferentes entre si. Medidas diretas do oxigênio dissolvido nos tanques mostraram que o tratamento 30/1 alcançou valores médios de oxigênio mais baixos ($p < 0,05$) do que os demais tratamentos mínimo 5,5mg/L e máximo 7,1 mg/L principalmente após o 20° dia de cultivo (tab. 4).

As concentrações de amônia foram influenciadas pela razão C/N. Ocorreu efeito significativo somente entre os tratamentos 10/1 e 30/1. Houve uma tendência de aumento na concentração de amônia no tratamento 10/1 até o dia 30, onde o valor máximo 3,9 mg/L foi maior ($p < 0,05$) do que em todos os demais tratamentos (tab. 4). No tratamento 30/1 o valor máximo foi 1,04 mg/L no dia 15 e em seguida este valor cai mantendo-se estável abaixo de 0,3 mg/L .

Tabela 4. Média (\pm DP) dos parâmetros de qualidade da água sujeitos as três diferentes relações C/N: 10/1, 20/1 e 30/1. (OD) Oxigênio dissolvido, (NH_4^+) Amônia, (Respiração), (PPL) produção primária líquida. Coluna da significância corresponde à comparações por ANOVA bi-fatorial tratamento (Tr), dias (D) e interação tratamento x dias (Tr x D).

Variável	Tratamento			Significância		
	10/1	20/1	30/1	(Tr)	(D)	(Tr x D)
(mg/L)						
OD	6,40 (0,30)	6,29 (0,41)	5,97 (0,41)	*	*	*
NH_4^+	1,47 (1,45)	0,84 (1,08)	0,51 (0,33)	*	*	*
($mgO_2/L/h^{-1}$)						
Respiração	0,60 (0,20)	0,77 (0,19)	0,83 (0,12)	*	*	NS
PPL	0,85 (0,44)	-0,14 (0,70)	-0,62 (0,29)	*	*	*
(%)						
Luz incidente	37,5 (9,9)	31,1 (14,9)	25,0 (15,2)	*	*	*

*Tuckey HSD ($p < 0,05$).

Ao comparar os três tratamentos, pode-se notar que para cada mg de SVT incorporado ao sistema houve queda de 0,28% na disponibilidade de luz ($F = 29.85$ $p < 0,0001$). Quando a luz caiu, a taxa de respiração significativamente ($p < 0,05$) aumentou ($r = -0,68$ $n = 45$) e a produção primária líquida (PPL) diminuiu ($r = 0,61$, $n = 45$). À medida que a entrada de carbono através do melão aumenta, a PPL diminui e alcança valor nulo após uma entrada total de $276,4 \text{ mgC L}^{-1}$ no sistema (fig. 2). O tratamento 10/1 não ultrapassou esta entrada de Carbono e o 20/1 só ultrapassou este valor na semana 3.

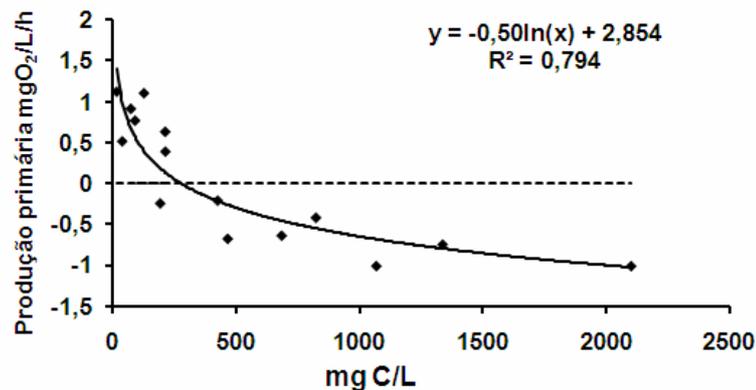


Figura 2. Variação da taxa de produção primária de acordo com a entrada acumulada de carbono do melão na água dos tanques.

Valores maiores de PPL foram encontrados nos tratamentos 10:1 ($0,85 \text{ mg de O}_2 \text{ /L/h}$), seguidos de valores negativos para o tratamento 20/1 ($-0,14 \text{ mg de O}_2 \text{ /L/h}$) e 30/1 ($-0,62 \text{ mg de O}_2 \text{ /L/h}$). Os valores de PPL seguiram o mesmo padrão da relação NEP ($r = 0,94$ $n = 45$) demonstrando a influência da produção primária sobre o metabolismo. A relação NEP variou de $-0,06$ até $2,96$ (fig. 3). O tratamento 10/1 apresentou-se sempre com metabolismo autotrófico ($NEP > 1$), e o tratamento 30/1 sempre heterotrófico ($NEP < 1$). O tratamento 20/1 aumentou o grau de heterotrofia com o passar do tempo de cultivo tornando-se heterotrófico à partir da 3ª semana.

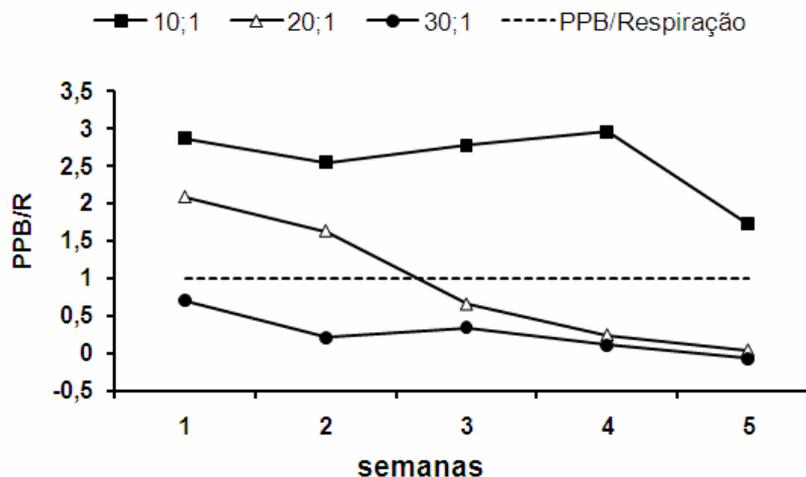


Figura 3. Variações no metabolismo líquido do sistema (NEP) dos tanques sujeitos a três relações C/N: 10/1, 20/1 e 30/1 durante 5 semanas de experimento.

Com relação à densidade dos diferentes grupos de microorganismos, os valores médios encontrados estão apresentados na tabela 5. As bactérias totais apresentaram-se em menor densidade somente no dia 5 tratamento 10/1, apesar disso os valores médios sugerem um incremento no número de bactérias com o aumento na fertilização com melaço. A densidade de cocos e bastonetes foi menor no dia 5 para o tratamento 10/1. As formas filamentosas seguiram o mesmo padrão, menor abundância no dia 5 do tratamento 10/1 e maior nos tratamentos 20/1 e 30/1. A densidade de protozoários não foi diferente entre os tratamentos, mas o número tanto de ciliados como de flagelados aumentou em direção ao final do experimento.

A maioria dos microorganismos analisados apresentou diferenças estatisticamente significativas somente no tempo, o que demonstra um padrão definido de variação independentemente da taxa de fertilização com melaço aplicada.

Tabela 5. Densidade (célis/ml) média (\pm DP) de microorganismos presentes nos tranques experimentais de cultivo de *Litopenaeus vannamei* sujeitos a três diferentes fertilizações com melaço 10/1, 20/1, 30/1 ao longo de 36 dias de cultivo. Valores de significância correspondem a comparações por ANOVA bi-fatorial avaliando tratamento (Tr) e dias (D).

Variável	Tratamento			Significância		
	10/1	20/1	30/1	(Tr)	(D)	(Tr x D)
<i>(x 10⁷ células / ml)</i>						
Bactérias totais	1,2 (0,88)	1,6 (1,0)	2,1 (1,6)	*	*	*
Heterotróficas totais	1,0 (0,71)	1,4 (0,95)	1,7 (1,3)	NS	*	*
<i>(x10⁶ células / ml)</i>						
Cocos + bastonetes ^a	6,1 (4,6)	6,9 (3,4)	9,5 (9,5)	*	*	*
Vibriões ^b	3,5 (9,5)	6,0 (9,5)	6,1 (9,5)	NS	*	NS
Filamentosas ^a	2,6 (3,3)	3,0 (3,9)	5,3 (1,2)	*	*	*
Cianofíceas ^b	1,8 (3,5)	1,3 (1,3)	3,8 (1,1)	NS	*	NS
<i>(x 10³ células / ml)</i>						
Flagelados ^a	6,5 (4,9)	1,1 (1,2)	6,5 (4,9)	NS	*	NS
Ciliados ^a	5,4 (3,1)	6,1 (6,9)	6,2 (6,4)	NS	*	NS

a Dados transformados ($\log x$) anteriormente à análise

b Dados transformados ($\sqrt[2]{x}$) anteriormente à análise

A figura 4 representa os valores em porcentagem das diferentes formas bacterianas encontradas ao longo do experimento. O início se caracterizou por uma alta abundância de cocos e bastonetes com maiores percentagens de filamentosas nos tratamentos 20/1 e 30/1 e de vibriões no tratamento 10/1. A partir do dia 12, a comunidade bacteriana foi dominada pelos vibriões com abundância relativa maior nos tratamentos 20/1 e 30/1. A partir do dia 19, estas formas passaram então a ser substituídos pelas filamentosas que praticamente dominam a abundância bacteriana no dia 30, com 58% do total no tratamento 30/1 e com 43% e 39 % respectivamente nos tratamentos 20/1 e 10/1. Apesar de não ser dominante em número, o valor médio de biomassa das formas filamentosas no final do experimento foi 391% maior do que a soma da biomassa das demais formas bacterianas demonstrando dominância das formas filamentosas.

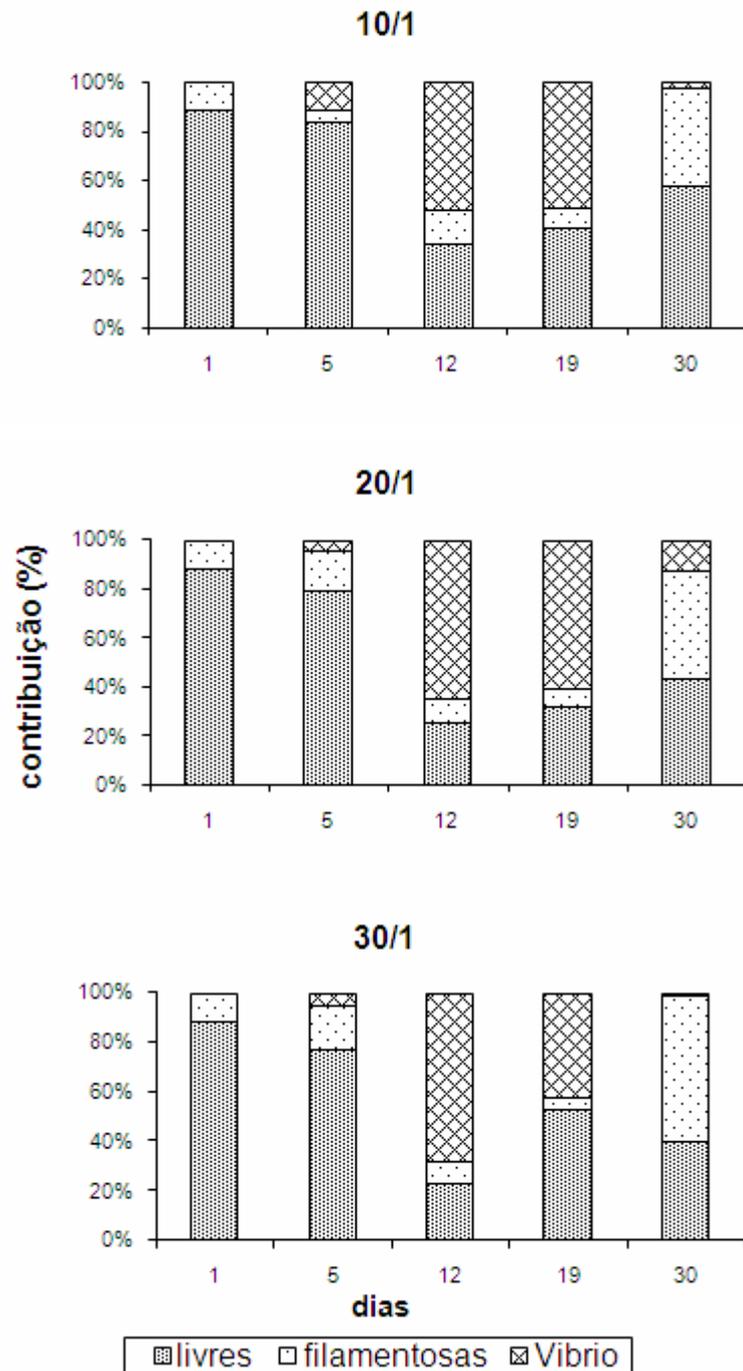


Figura 4. Percentual de abundância das diferentes formas bacterianas ao longo de 30 dias de experimento para tanques sujeitos as 3 diferentes relações C/N 10/1, 20/1 e 30/1.

A análise de PCA foi realizada para os dias de cultivo no diferentes tratamentos e apresentou uma porcentagem de variância total de 84% para os dois primeiros eixos sendo 66% para o eixo 1 e 17% para o eixo 2 (Fig 5). Ao transpor os dados sobre o eixo 1, de maior porcentagem de variância, é possível distinguir três diferentes agrupamentos. Um representado pelas amostras do período inicial dos dias 1 e 5 em todos os tratamentos e ainda incluindo o dia 12 do tratamento 10/1, outro caracterizando a fase intermediária de cultivo no dias 12. O terceiro grupo, caracterizando a etapa final, dias 19 e 30. O agrupamento localizado na porção negativa deste eixo, contendo os dias 1 e 5,

se caracteriza por maiores taxas de produção primária líquida, disponibilidade de luz e maior presença de oxigênio dissolvido (tab. 6).

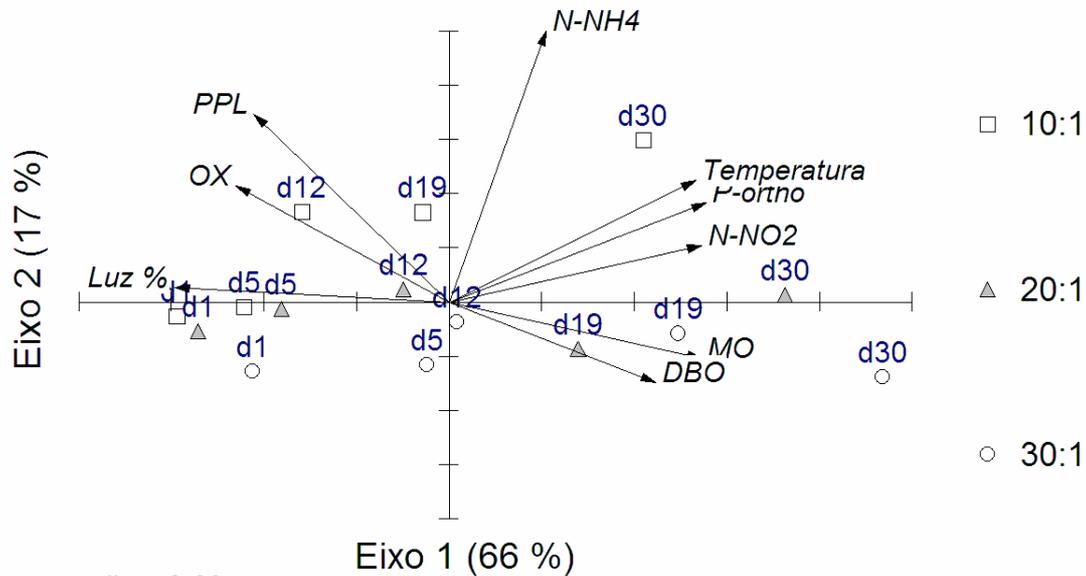


Figura 5. Análise dos componentes principais (PCA) de valores médios em cada dia entre os tratamentos C/N 10/1, 20/1 e 30/1. Legendas d1, d5, d12, d19 e d30 indicam respectivamente dias 1, 5, 12, 19, 30 de cultivo.

No extremo deste grupo, se encontra o dia 12 do tratamento 10/1 um pouco influenciado pela presença de amônia. O terceiro agrupamento, disposto na porção positiva deste eixo, demonstra que os dias 19 e 30 se caracterizam significativamente pelas maiores taxas de respiração da coluna d'água, maior acúmulo de matéria orgânica e valores maiores de nutrientes (nitrito e ortofosfato) tabela 6. O dia 30 no tratamento 10/1 aparece no extremo deste grupo e muito próximo do vetor de amônia. O dia 5 do tratamento 30/1 foi incluído no grupo intermediário próximo ao dia 12 dos demais tratamentos porém se posiciona na parte negativa do eixo 2.

O segundo eixo com maior porcentagem de variância, explica 17% da variação e está relacionado principalmente, na sua parte positiva, com a presença de amônia, produção primária líquida e temperatura. Na parte negativa com a respiração e sólidos voláteis totais. Grande parte dos dias do tratamento 10;1 estão posicionados na parte superior deste eixo influenciados principalmente pela presença de amônia.

Tabela 6. Análise dos componentes principais, porcentagens de variância dos eixos e correlação das variáveis com cada eixo. Valores em negrito correlações estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

		Eixo 1	Eixo 2
Porcentagem de variância do eixo		66 %	17 %
Variáveis	Siglas	Correlação	Componentes Principais
Sólidos Voláteis Totais	MO	0,370	-0,141
Amônia	N-NH ₄ ⁺	0,143	0,678
Nitrito	N-NO ₂	0,370	0,141
Ortofosfato	P-Ortho	0,377	0,247
Oxigênio Dissolvido	OX	-0,312	0,290
Temperatura	TEMP	0,362	0,304
Respiração	DBO	0,303	-0,201
Produção Primária Líquida	PPL	-0,286	0,471
Incidência Luminosa	Luz %	-0,402	0,036

2.4. DISCUSSÃO

As taxas de crescimento, próximas a 0,77 gramas/semana, encontraram-se abaixo da descrita por outros autores para cultivos com descarga limitada de água. Boyd & Clay (2002) e Samocha et al (2007) descrevem taxas de crescimento de 0,95 e 0,97 g/semana, respectivamente, entretanto empregando densidades menores do que a utilizada neste estudo 120 camarões/m² e 81 camarões/m³. Estes autores reportam taxas médias de crescimento semanal com camarões que atingiram peso final acima de 12 gramas. O presente estudo, entretanto, apresenta taxas de crescimento em um período em que os camarões crescem mais lentamente entre 1,0 e 5,0 gramas nos primeiros 36 dias de cultivo já que o ganho de biomassa no período intermuda não é tão significativo quanto para camarões maiores do que 5 gramas. Portanto é provável que a alta densidade de estocagem empregada neste experimento tenha limitado o crescimento tal como reportado por Williams et al (1996) em cultivos sem renovação de água. Todavia, outros fatores não identificados por nós podem ter mantido os camarões fora dos limites de conforto para um crescimento ótimo. Moss et al (2002) e Otoshi et al (2006) reportam taxas de crescimento de 1,49 g/semana, para camarões com peso final de 21 gramas, utilizando densidades de 300 camarões/m².

Outros fatores como a salinidade, oxigênio pH e temperatura podem afetar a taxa de crescimento. Valores de salinidade mantiveram-se constantes ao longo do experimento e a temperatura da água variou dentro de níveis ótimos para o crescimento de *L. vannamei* (Chien, 1992) em todos os tratamentos. Segundo Ebeling et al. (2006b) os principais fatores que limitam os cultivos em troca zero são o oxigênio e amônia. Apesar das diferenças nos teores de oxigênio entre os três tratamentos, os valores encontrados no presente trabalho (> 5,0 mg/L) não influenciaram o crescimento já que se encontraram na faixa ótima para o cultivo de camarões penaeídeos (Chien 1992). No caso da amônia, os camarões foram submetidos a valores máximos de 3,9 mg/L no tratamento 10/1. A diferença nos níveis de amônia entre os tratamentos 10/1 e 30/1 mostrou que não houve influência deste parâmetro sobre o crescimento e a sobrevivência dos camarões cultivados. Moss et al (2002) relatam valores de amônia superiores a 15 mg/L no 16^o dia de cultivo sem afetar os valores de crescimento e sobrevivência.

Os valores de pH mantiveram-se constantes ao longo de todo o período de cultivo em todos os tratamentos. Entretanto, mantiveram-se um pouco mais elevados do que o descrito em cultivos sem renovação de água (Moss et al. 2002; Burford et al 2003). A atividade de nitrificação possui uma maior influência sobre os valores de pH da água de cultivo do que as algas e bactérias heterotróficas devido à grande produção de dióxido de carbono e consumo da alcalinidade (Ebeling et al 2006). O curto tempo de duração do experimento provavelmente não o foi suficiente para que o processo de nitrificação estivesse atuando de forma significativa como indicado pelos valores altos de nitrito e pela ausência do nitrato em todos os tanques de cultivo por este motivo o pH manteve-se mais alto do que o esperado.

As razões 30/1 e 20/1 testadas aqui contribuíram para a redução nos valores de amônia nos tanques de cultivo, devido ao incremento da abundância bacteriana com maiores taxas de acúmulo de sólidos voláteis. O aumento da razão C/N estimula a incorporação do nitrogênio inorgânico na

forma de biomassa bacteriana (imobilização) gerando alimento disponível para os camarões (Avnimelech et al 1994; Avnimelech 1999). Apesar de *L. vannamei* ser capaz de ingerir e reter o nitrogênio derivado da biota natural (Burford et al 2004), a maior disponibilidade deste alimento natural na forma de sólidos em suspensão não afetou as taxas de crescimento e conversão alimentar neste estudo. Samocha et al (2007) testaram diferentes fertilizações com melação e também não encontraram diferença nos índices de crescimento e conversão alimentar dos camarões em um sistema com troca limitada de água, onde o melação não contribuiu como suplemento alimentar, servindo apenas no controle da qualidade da água. Os autores demonstraram que a amônia pôde ser controlada rapidamente após o início da adição de melação em razões C/N = 13,9, sem causar um aumento significativo de sólidos em suspensão quando comparados aos tratamentos de razões C/N mais baixos. Ebeling et al. (2004) encontraram maiores quantidades de amônia nos tratamentos que receberam carbono via melação na razão C/N de 11,4, muito semelhante ao observado no tratamento 10/1 deste estudo. O trabalho de Samocha et al (2007) também apresenta picos maiores de amônia, mantendo entradas constantes de melação em razão C/N = 11,4, 6,5 mg/L quando comparados a tratamentos controle sem adição de carbono máximo de 3,0 mg/L.

A entrada de melação em relações C/N próximas a 10/1 parece ter estimulado a produção de amônia. Alguns estudos podem ser utilizados para suportar a hipótese de que as bactérias heterotróficas utilizam primeiro a fração orgânica para em seguida absorverem compostos inorgânicos da água (Kirchman et al 1989). Esta absorção da fração inorgânica só acontece sob condições de alta disponibilidade de carbono C/N > 10 e depende da eficiência bruta de crescimento da comunidade bacteriana (Goldman et al 1987; Goldman & Dennett 1991) e da presença de protozoários já que estes são importantes remineralizadores do material orgânico (Azam et al 1983). Nos cultivos de camarão esta absorção completa pode ocorrer em relações C/N próximas a 14/1 (Avnimelech 1999; Samocha et al. 2007).

Samocha et al (2007) avaliando o crescimento em um cultivo intensivo de camarões, sem renovação de água, observaram que após o 43^o dia de experimento, os tratamentos com razão C/N de 8,9 (sem adição de melação) apresentaram valores estáveis de amônia, próximos a zero. Assim, percebe-se que as bactérias nitrificantes exerceram um papel importante no controle da amônia daquele experimento. Em sistemas de aquicultura, as bactérias nitrificantes podem colonizar ativamente a superfície dos tanques quando condições de água ótimas são alcançadas (Atwood et al., 2004). Neste experimento o nitrato não esteve presente na água dos tanques e o nitrito se encontrou em níveis próximos de 5,0 mg/L nos dias finais de cultivo para todos os tratamentos. Desta forma, é de se esperar que com um tempo de cultivo mais longo do que o testado, uma maior remoção de amônia via nitrificação poderia contribuir para a manutenção dos altos níveis no tratamento 10/1. Na verdade, em sistemas de troca zero dominados por bioflocos, a nitrificação in-situ tem se mostrado efetiva no controle dos níveis de amônia e nitrito (Browdy et al 2001, Bratvold & Browdy 2001).

O controle da amônia pode ser realizado pelas algas que têm alta capacidade de absorção de nitrogênio inorgânico (Brune et al. 2003; Cohen et al. 2005). No presente experimento, as microalgas podem ter contribuído para o controle da amônia no tratamento 10/1, porém de forma discreta, já que

os valores de produção primária não foram elevados ($\sim 0,8 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}\text{h}^{-1}$). Segundo o proposto por Ebeling et al. (2006a), o consumo de amônia nos tanques varia conforme a produção de oxigênio. Em viveiros operando sem renovação de água, taxas de absorção de amônia pelo fitoplâncton podem chegar a $60 \mu\text{g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ sob condições de produção primária variando entre $5,06$ e $1,6 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}\text{h}^{-1}$ (Burford et al. 2003).

Neste estudo, pode-se observar que o aumento da entrada de carbono por adição de melão promoveu queda nas taxas de produção primária. Dada uma quantidade suficiente de carbono, bactérias não irão apenas competir umas com as outras, mas também com o fitoplâncton por nitrogênio e fósforo inorgânicos (Ovreas et al. 2003). A entrada de carbono estimulou o crescimento e a atividade de bactérias, como indicado por valores maiores de respiração, de produção de sólidos e pelos menores valores de oxigênio dissolvido na água nos tratamentos 20/1 e 30/1. Desta forma, a competição entre bactérias e algas pode ter influenciado negativamente as taxas de produção primária, principalmente nos dias iniciais do experimento. A partir do dia 16 entretanto, o principal fator que limitou a produção primária foi a quantidade crescente de sólidos que reduziu a disponibilidade de luz nos tanques estudados. Sob condições reduzidas de iluminação, os valores de produção primária são geralmente menores e as taxas de respiração maiores (Kirk et al. 1994).

A produção primária não atua apenas na manutenção da qualidade da água, mas também na nutrição dos camarões que é fortemente influenciada pela presença de microalgas fotossintetizantes (Burford et al 2003; Moss et al 2002). Estas microalgas servem como uma importante fonte de nutrição para os camarões (Moss et al 2002) e são melhores do que as bactérias no fornecimento de alguns aminoácidos e ácidos graxos insaturados de cadeia longa da série n-3 (Van Wyk 2006). Nos tanques do tratamento 10/1 houve dominância das algas (autotrófico). Entretanto, valores de crescimento dos camarões não foram superiores aos demais. As taxas de produção primária encontradas nestes tanques foram bem menores do que aquelas citadas por Burford et al. (2003), $5,06 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}\text{h}^{-1}$, na fase inicial do ciclo de cultivo e por Otoshi et al (2006), $3,1 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}\text{h}^{-1}$. Altos valores de PPL indicam uma renovação constante nas populações de algas e estas, mais novas, mantêm um alto valor nutricional (Weirich et al. 2002). Os resultados baixos de produção primária encontrados aqui não sugerem esta renovação, indicando um baixo valor nutricional da comunidade autotrófica presente.

A presença de grupos de algas com valor nutricional inferior também pode ser um fator determinante no resultado de crescimento encontrado aqui. As cianobactérias estiveram presentes em grande quantidade dominando o ambiente e somente uma pequena fração de diatomáceas foi observada aderida aos flocos. Uma maior quantidade de diatomáceas pode contribuir de forma significativa para o crescimento dos camarões Penaeídeos (Moss & Pruder 1995). As altas concentrações de ácidos graxos poliinsaturados (Phillips 1984), aminoácidos sulfurosos e baixo teor de fibras (Mann 1988) fazem das diatomáceas uma melhor fonte alimentar para os camarões do que outros tipos de algas (Boyd 1990). A disponibilidade de sílica encoraja o crescimento de diatomáceas (Rhiter & Officer 1981) e quando presente em quantidades adequadas, a sílica pode canalizar Nitrogênio e Fósforo para as diatomáceas evitando espécies menos desejáveis (Yusoff et al 2002).

No presente estudo, fertilizações adicionais com sílica não foram realizadas. Entretanto, parece importante que sua presença seja mantida elevada já que as cianofíceas aparentemente dominaram o ambiente de cultivo. A baixa densidade de diatomáceas com dominância de cianobactérias e flagelados também foram encontrados em viveiros de troca zero por Burford et al (2003). Moss et al (2002) descrevem taxas de crescimento elevadas dos camarões 1,7 g/semana, com altos níveis de produção primária na água de cultivo. Estes autores empregaram filtrações periódicas e a adição de metassilicato de sódio (Na_2SiO_2), na tentativa de estimular o crescimento de algas diatomáceas, mantendo concentrações de SiO_2 acima de 10 mg/L.

Pode-se dizer que é importante implementar formas de estimular a produção primária e a nitrificação nos tanques de cultivo, sem buscar apenas a conversão heterotrófica da amônia. Segundo Ebeling (2006a), quantidades extremamente grandes de biomassa bacteriana são geradas em sistemas heterotróficos, tais como observado aqui para os tratamentos 20/1 e 30/1. Desta forma, o tratamento C/N = 10/1 foi o que resultou em um melhor equilíbrio entre a quantidade de sólidos, produção primária e concentração de amônia para o cultivo.

Uma das formas de estimular as taxas de produção primária em sistemas de troca zero é através da filtração mecânica dos sólidos (Atwood et al 2004). Retirar a biomassa microbiana da coluna de água a fim de aumentar a penetração de luz e estimular a fotossíntese pode ter um efeito positivo no crescimento do camarão (Browdy et al 2006), na redução dos teores de sólidos e na melhoria da qualidade da água como um todo (Atwood et al 2004). A filtração retira células velhas, menos ativas, e promove uma comunidade microbiana mais jovem e mais ativa, dominada pelo fitoplâncton (Weirich et al 2003). Isto produz células ricas em novos açúcares e ácidos graxos aumentando a qualidade nutricional dos flocos (Browdy et al 2006) e a absorção da amônia (Cohen et al 2005).

A entrada de carbono via melaço afetou o padrão de sucessão das formas bacterianas encontradas no cultivo apenas na etapa inicial (até o dia 5). Um menor número de bactérias cocos, bastonetes e bactérias filamentosas foram encontrados no tratamento 10/1 nesta etapa. Isto associado à tendência de incremento dos valores de amônia neste tratamento indica uma limitação do crescimento bacteriano por carbono. De acordo com o proposto por Goldmann et al. (1987) a limitação por carbono reduz a assimilação líquida de nitrogênio e conseqüentemente o incremento de biomassa, assim, parte do nitrogênio orgânico passa a ser mineralizado na forma de amônia.

Nos tratamentos 20/1 e 30/1, o maior número de bactérias pode ter consumido o nitrogênio reduzindo sua disponibilidade. Isto pode ter favorecido o aparecimento das formas filamentosas. Que estiveram em maiores quantidades nestes tratamentos no período inicial. As células filamentosas possuem uma constante de afinidade (K_s) menor do que bactérias cocos e bastonetes permitindo que cresçam em uma taxa maior sob condições limitadas de nutrientes (Chudoba et al. 1973).

A medida que os nutrientes vão sendo absorvidos pela biomassa bacteriana e então, mudam da forma dissolvida para a particulada. As bactérias heterotróficas utilizam carbono e nitrogênio na forma orgânica e inorgânica produzindo biomassa particulada com razão C/N geralmente abaixo de 5 (Kirchman 2000). Burford et al (2003) demonstraram que a razão C/N do material particulado nos tanques sem renovação de água é em média de 4,58 e que a relação do material dissolvido DOC/DN

cai com o passar do tempo. O material particulado presente nos tanques na forma de SVT, portanto torna-se rico em nitrogênio.

Sem renovações de água ou retirada de sólidos, o tempo de residência desta biomassa dentro dos tanques aumenta e as células bacterianas se tornam senescentes ou morrem. Esta biomassa fica disponível para que outras formas bacterianas com características metabólicas distintas, aptas a degradar a biomassa particulada rica em nitrogênio se tornem abundantes, como no caso dos vibriões. Mudanças nas formas dominantes e ativas de bactérias influenciam fortemente o padrão de hidrólise de polímeros e a ciclagem de matéria orgânica em ambientes aquáticos. (Thompson & Poltz, 2006; Painting et al 1989).

O padrão de sucessão encontrado, com grande quantidade de vibriões em todos os tanques no dia 12, provavelmente foi consequência da degradação da biomassa bacteriana gerada nos dias iniciais do cultivo. Vibriões são geralmente encontrados em locais ricos em matéria orgânica e geralmente degradam material orgânico complexo através da hidrólise extracelular (Thompson & Poltz, 2006; Rieman & Azam, 2002). Eles estão envolvidos tanto na absorção como na remineralização (reciclagem) de elementos chave como C, N e P (Sarker et al 1994). A degradação do material particulado pelos vibriões retorna nutrientes para a forma regenerada e dissolvida, os quais aliados ao fornecimento constante de carbono via melação podem ter favorecido as bactérias filamentosas com alta relação área/volume na fase final do experimento (dia 30). Estas aumentam em número e passam a ser dominantes em todos os tratamentos (fig. 4), principalmente naqueles com alta entrada de melação, C/N de 20/1 e 30/1, possivelmente devido à preferência destas bactérias pela alta razão C/N (Jenkins 1992).

Nesta fase final do experimento, percebeu-se que os camarões mortos em sua maioria apresentaram problemas de sujeira nas brânquias (biofouling). A observação microscópica demonstrou densos emaranhados de bactérias filamentosas finas envolvendo os filamentos branquiais. Estas observações coincidem com a doença bacteriana da brânquia, descrita por Lightner (1996). Hopkings et al (1993) trabalhando com cultivo de *Penaeus setiferus*, sem renovação de água encontraram o mesmo tipo de mortalidade devido à colmatação de brânquias, devido à presença e colonização por bactérias filamentosas associados a um acúmulo de material detritico sobre os filamentos branquiais. Os autores também relataram uma relação da mortalidade com períodos de aumento anormal de sólidos orgânicos na água. Pode-se perceber que o biofouling foi mais intenso nos camarões em período de pós muda, quando os pereópodos não estão rígidos para possibilitar uma limpeza eficiente da superfície branquial.

A presença de bactérias filamentosas parece ter sido a principal causa de mortalidade nos tanques de cultivo principalmente na fase final do experimento. Outros fatores como o estresse causado pela intensa movimentação de água devido à forte aeração e a presença de alto número de vibriões podem ter causado mortalidade crônica ao longo do período de cultivo. Porém, não foram observados sintomas de vibriose nos camarões cultivados, visto que estes sintomas são geralmente ligados a um aumento no número de espécies patogênicas de vibriões e não a um aumento no número total de vibriões (Lavilla-Pitogo et al 1998; Sung et al 1999).

No final do experimento o número de vibriões caiu significativamente e uma das explicações é que no ambiente natural estas bactérias estão sujeitas à intensa predação por protozoários, como já observado em sistemas experimentais (Beardsley et al 2003). Entretanto, neste experimento, não foi observada correlação de sua abundância com o número de protozoários, apesar de o número destes aumentarem no final do cultivo.

À medida que o tempo de retenção da água aumenta, microorganismos mais complexos como flagelados e ciliados crescem e se alimentam uns dos outros (Van Wik, 2006). Quando isto ocorre, a DBO da água não é consumida e a energia necessária para manter esta demanda de oxigênio é alta (Gray 1990).

O efeito benéfico da filtração na redução da carga orgânica em sistemas de troca zero parece ser um fator chave para o bom andamento do cultivo e já foi reportado por outros autores (Van Wyk & Scarpa 1999; Moss 2001; Weirich et al 2003; Atwood et al 2004; Browdy et al 2006; Van Wik 2006). A manutenção de uma comunidade microbiana não senescente e mais ativa pode melhorar a qualidade dos sólidos, reduzir a demanda de oxigênio e evitar a presença de bactérias patogênicas associadas com a degradação do material em suspensão, como no caso de víbrios. Entretanto, as taxas de retirada de sólidos devem ser manejadas de forma a não eliminar a presença de bactérias nitrificantes do sistema (Browdy et al 2006), já que estas possuem crescimento lento (Ebeling et al 2006a).

Os níveis baixos de amônia em sistemas de troca zero são mantidos por três diferentes vias: autotrófica, heterotrófica e foto autotrófica. O sistema deve funcionar buscando um equilíbrio entre os processos atuantes manipulados através do manejo empregado (Browdy et al 2006; Van Wik 2006; Ebeling et al 2006a; Otoshi et al 2006). Altas concentrações de melaço como as utilizadas aqui nos tratamentos 20/1 e 30/1 parecem não contribuir para o melhor andamento do cultivo num período longo. A razão C/N ideal para o controle da amônia no cultivo parece ser maior do que 10/1 e menor do que 20/1, tal como 14/1 descrita por Avnimelech (1999). Entretanto, o estabelecimento tardio da comunidade de bactérias nitrificantes força uma mudança nos valores da razão C/N para que se busque evitar o acúmulo de sólidos e permitir a presença de algas. Uma razão variável de acordo com a necessidade do cultivo parece ser a ideal (Schweitzer, R. com. pess.) e deve ser testada através de fertilizações emergenciais.

2.5. CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que não é necessário o uso excessivo de melaço para controlar a amônia nos tanques de cultivo. Quantidades intermediárias, pouco maiores do que 10/1, já são suficientes para controlar a amônia.

O incremento na abundância dos microorganismos e as maiores quantidade de sólidos nos tratamentos 20/1 e 30/1, não contribuíram para melhorar a conversão alimentar e o crescimento dos camarões.

Diferentes fertilizações com melaço não afetaram a composição de formas dos microorganismos, uma vez que o padrão de sucessão microbiológica foi influenciado apenas pelo tempo de permanência dos sólidos nos tanques.

O elevado tempo de retenção dos sólidos na água pode gerar acúmulo de bactérias filamentosas, aumento na demanda de oxigênio e redução na disponibilidade de luz o que limita a produção primária.

2.7. Referências Bibliográficas

APHA (1998) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20^a ed, American Public Health Association. Washington DC.

Atwood H.L., Bruce J.W., Pierrard L.M., Kelg R.A., Stokes A.D., Browdy C.L. (2004). Intensive zero-exchange shrimp production systems – Incorporation of filtration Technologies to improve survival and growth. In: *Proceedings o the 5th International conference Recirculating Aquaculture*. p. 152-162. Virginia Tech University, Blacksburg.

Avnimelech Y. 1999. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture* **176**: 227-235.

Avnimelech Y. (2007) Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. *Aquaculture* **264**, 140-147.

Avnimelech Y., Kochva M., Diab S. 1994. Development of controlled intensive aquaculture systems with a limited water exchange and adjusted C to N ratio. *Israeli Journal of Aquaculture.- Bamidgeh* **46**, 119–131.

Azam F., Fenchel T., Gray J.G., Meyer-Rail L.A., Thingstad T.(1983). The Ecological Role of Water-Colum Microbes in the Sea. *Marine Ecology Progress Series* **10**, 257-263.

Baird D.J., Beveridge M.C.M., Kelly L.A., Muir J. (1996). *Aquaculture and water resource management*. Blackwell Science, London 219 p.

Beardsley C., Pernthaler J., Wosniok W. & Amann R. (2003) Are readily culturable bacteria in coastal North Sea waters suppressed by selective grazing mortality? *Applied and Environment Microbiology* **69**: 2624-2630.

Bendschneider K. & Robinson R.J. (1952) A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in seawater. *Journal of Marine Research* **11**, 87-96.

Boopathy, R., Fontenot, Q., Kilgen, M., (2005) Biological treatment of sludge from a recirculating aquaculture system using a sequencing batch reactor. *Journal of the World Aquaculture Society* **36**, 542–545.

Boyd C.E. & Clay J.W (2002) Evaluation of Belize Aquaculture, Ltd: A Super-intensive Shrimp Aquaculture System. *Report prepared under the World Bank, NACA, WWF and FAO Consortium Program on Shrimp Farming and the Environment*. Work in Progress for Public Discussion. Published by the Consortium. 17 p.

Boyd C.E. (1990) *Water quality in ponds for aquaculture*. Auburn University, Auburn AL, USA.

Bratvold D. & Browdy C.L. (1998) Simple electrometric methods for estimating microbial activity in aquaculture ponds. *Aquacultural Engineering* **19**, 29 – 39.

Bratvold D., Lu J., Browdy C.L. (1999). Disinfection, microbial community establishment and shrimp production in a prototype biosecure pond. *Journal of World Aquaculture Society*. **30**, 422–432

Browdy C.L., Bratvold D., Stokes A.D. & McIntosh R.P. (2001) Perspectives on the application of closed shrimp culture systems. In: *The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture 2001*. (ed. by Browdy C.L. & Jory D.E.) pp. 20–34. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA.

Browdy C.L., Stokes A.D., McAbee B.J., Atwood H. (2006) Insights into the functional roles of major components of microbial communities in zero exchange super-intensive shrimp systems. In: *Microbial Controlled Systems Special Symposium*. WAS America Meeting (program and abstracts). Las Vegas.

- Browdy C. L., Holloway J.D., King C.O., Stokes A.D., Hopkins J.S., Sandifer P.A. (1993). IHNV virus and intensive culture of *Penaeus vannamei*: Effects of stocking density and water exchange rates. *Journal of Crustacean Biology* **13**, 87-94.
- Brune, D.E., Schwartz, G., Eversole, A.G., Collier, J.A., and Schwedler, T.E. (2003) Intensification of Pond Aquaculture and High Rate Photosynthetic Systems, *Aquacultural Engineering* **28**, 65–86.
- Burford M.A., Thompson P.J., McIntosh R.P., Bauman R.H., Pearson D.C. (2003) Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize. *aquaculture* **219**, 393–411.
- Burford M.A., Thompson P.J., McIntosh R.P., Bauman R.H., Pearson D.P. (2004) The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero-exchange system. *Aquaculture* **232**, 525-537.
- Chien Y.-H. (1992) Water quality requirements and management for marine shrimp culture. In: *Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming* (ed. by J. Wyban) pp. 30-42. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana.
- Chudoba J., Grau P., Ottov!a V. (1973) Control of activated sludge filamentous bulking — II. Selection of microorganisms by means of a selector. *Water Research* **7**, 1398–1406.
- Clarke K.R., Warwick R.M. (1994). *Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation*. Natural Environmental Research Council (UK), Plymouth, UK. 144p.
- 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. *Aquacultural engineering* **32**, 425-442.
- Crab R., Avnimelech Y., Defroit T., Bossier P., Verstraete W. (2007) Nitrogen removal techniques in aquaculture for sustainable production. *Aquaculture* In press.
- Ebeling J.M., Rishel K.L., Welsh C.F. & Timmons M.B. (2004) Impact of the Carbon/Nitrogen Ratio on Water Quality in Zero-Exchange Shrimp Production Systems In: *Proceedings o the 5th International conference Recirculating Aquaculture*. p. 361-369. Virginia tech University, Blacksburg.
- Ebeling J.M., Timmons M.B., Bisogni J.J (2006a) Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia–nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture* **257**, 346–348.
- Ebeling J.M., Timmons M.B., Bisogni J.J (2006b) An engineering analysis of the stoichiometry of autotrophic, heterotrophic bacterial control of ammonia–nitrogen in zero-exchange production. In: *Proceedings o the 6th International conference Recirculating Aquaculture*. p. 28-37. Virginia tech University, Blacksburg.
- FAO (2004) *State of world fisheries and aquaculture 2004*. FAO, Rome
- Fontenot Q., Bonvillain M., Kilgen M., Boopaphy R (2007) Effects of temperature, salinity, and carbon: nitrogen ratio on sequencing batch reactor treating shrimp aquaculture wastewater. *Bioresource Technology* **98**, 1700-1703.
- Goldman J.C., Caron D.A., & Dennet M.R. (1987) Regulation of gross efficiency and ammonium regeneration in bacteria by substrate C:N ratio. *Limnology and Oceanography* **32**, 1239-1252.
- Goldman J.C., Dennett M.R. (1991) Ammonium regeneration and carbon utilization by marine bacteria grown on mixed substrates. *Marine biology* **109**, 369 -378.
- Gray N.F. (1990) *Activated Sludge: theory and practice*. 272 p. Oxford University Press Oxford.

- Hobbie J. E., Daley R. J. Jasper S. 1977 Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and environmental microbiology* **33**, 1225-1228
- Hopkins J.S., DeVoe M.R., Holland A.F. (1995) Environmental impacts of shrimp farming with special reference to the situation in the continental United States *Estuaries* **18**, 25-42.
- Hopkins J.S., Hamilton D.S., Sandifer P.A., Browdy C.L., Stokes A.D. (1993). Effect of water exchange rate on the production, water quality, effluent characteristics and nitrogen budgets in intensive shrimp ponds. *Journal of the World Aquaculture Society*, **24**, 304-320
- Iso 8245 (1987) Guidelines for determination of total organic carbon (TOC).
- Jenkins D. (1992) Towards a comprehensive model of activated sludge bulking and foaming. *Water Science and Technology* **25**, 215–230.
- Kirchman D.L. (2000) Uptake and regeneration of inorganic nutrients by marine heterotrophic bacteria. In: *Microbial Ecology of the oceans* (ed. by Kirchman, D. L.). pp. 261-288 Willey-Liss. USA.
- Kirchman D.L., Keil R.G., Wheeler P.A. (1989) The effect of amino-acids on ammonium utilization and regeneration by heterotrophic bacteria in sub-arctic pacific. *Deep-sea research Part-A* **36**, 1763-1776.
- Kirk J.T.O. (1994) *Light & Photosynthesis in Aquatic Ecosystems*. 509p. Cambridge university Press. Cambridge U.K.
- Koroleff F. (1976) Determination of nutrients In: *Methods of sea water analysis*. (ed. by Grasshoff K.) pp. 117-181 Verlag. Chemie Weinheim.
- Lavilla-Pitogo C.R., Leaño E.M. & Paner M.G. (1998) Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with the dominance of luminescent *vibrios* in the rearing environment. *Aquaculture* **164**, 337-349.
- Leber, K.M. & Pruder G.D. (1988) Using experimental microcosms in shrimp research: the growth enhancing effect of shrimp pond water. *Journal of the World Aquaculture Society*, **19**, 197-203.
- Lightner D.V. (1993) Diseases of cultured penaeid shrimp. In: *Crustacean Aquaculture CRC Handbook of Mariculture*. (ed. by McVey J.P.) pp. 393– 486. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Mann, K.H., 1988. Production and use of detritus in various freshwater, estuarine, and coastal marine ecosystems. *Limnology and Oceanography* **33**, 910-930.
- Martins A.M.P., Pagilla K., Heijnen J.J. & van Loosdrecht, MCM. (2004) Filamentous bulking sludge — a critical review. *Water Research* **38**, 793-817
- Massana R., Gasol J.M., Bjornsen P.K., Blackburn N., Hagström A., Hietanen S., Hygum B.H. Kuparinen J. & Pedros-Alió C. (1997) Measurement of bacterial size via image analyses of epifluorescence preparations: description of an inexpensive system and solutions of the common problems. *Scientia Marina* **61**, 397-407.
- McNeil R. (2000). Zero exchange, aerobic, heterotrophic systems: key considerations. *The advocate*, **June**: 72 – 76.
- McIntosh, R.P. 1999. Changing paradigms in shrimp farming: General description. *Global Aquaculture Advocate* **2**, 42-47.
- McIntosh, R.P. & Avnimelech, Y., 2001. New production technologies. *Global Aquaculture Advocate* **4**, 54–56.
- Moss S.M. (1995) Production of growth-enhancing particles in a plastic-lined shrimp pond. *Aquaculture* **132**, 253-260.

Moss S.M. (2001). Biosecure zero-exchange systems for intensive shrimp culture: Past experiences, biocomplexity challenges, future opportunities. USDA Website: <http://nps.ars.usda.gov/static/arsoibiotechws2001/contributions/Moss.htm>. Washington, D.C. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service.

Moss S.M. (2002) Dietary importance of microbes and detritus in penaeid shrimp aquaculture In: *Microbial approaches to aquatic nutrition within environmentally sound aquaculture production systems*. (ed. by Lee C. S. & O'Brien P.) pp. 1 – 18. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, FL., USA.

Moss S.M., Otoshi C.A., Holl C.M., Tallamy C., Beardsley C. Azam F. (2006). Intensive microbial reuse systems or super-intensive shrimp production: Experiences from the oceanic institute. In: *Microbial Controlled Systems Special Symposium*. WAS America Meeting (program and abstracts). Las Vegas.

Moss S.M., Otoshi C.A., Montgomery A.D., Matsuda E.M. (2002). Recirculating Aquaculture Systems for the Production of Market-Sized Shrimp In: *Proceedings o the 4th International conference Recirculating Aquaculture*. p. 245-254. Virginia Tech University, Blacksburg.

Moss S.M. & Pruder G.D. (1995) Characterization of Organic Particles Associated with Rapid Growth in Juvenile White Shrimp, *Penaeus vannamei* Boone, Reared Under Intensive Culture Conditions. *Journal of Experimental Marine Biology* **187**, 175-191.

Otoshi C.A., Tang L.R., Dagdagan D.V., Holl C.M., Tallamy C.J., Moss D.R., Arce S.M., Moss S.M. (2006) Super-Intensive growout of the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*: Recent advances at the Oceanic Institute. In: *Proceedings o the 6th International conference Recirculating Aquaculture* p. 1-5. Virginia Tech University, Blacksburg.

Øvreås L., Bourne D., Sandaa R.A., Casamayor E.O., Benloch , Goddard V., Smerdon G., Heldal M. & Thingstad T.F. (2003) Response of bacterial and viral communities to nutrient manipulations in seawater mesocosms. *Aquatic microbial ecology* **31**, 109-121.

Painting S.J., Lucas M.I., Muir D.G. (1989) Fluctuations in heterotrophic bacterial community structure, activity and production in response to development and decay of phytoplankton in microcosm. *Marine Ecology Progress Series* **53**, 129-141.

Parsosns T.R., Takahashi M. & Hargravé B. (1984) *Biological oceanographic processes 3rd edition* Pergamon Press, Oxford.

Phillips, N.W., 1984. Role of different microbes and substrates as potential suppliers of specific essential nutrients to marine detritivores. *Bulletin of Marine Science* **35**, 283-298.

Porter K.G. & Feig Y.S. (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography* **25**, 943-948.

Rhiter J.H. & Officer C.B. (1981) Impact of nutrient enrichment on water uses. In: *Estuaries and Nutrients* (ed. by B .J. Neilson & L. E. Cronin), pp. 247-262. Humana Press Inc., totawa NJ, USA.

Rieman B., Sorensen H. M., Borges, P.K., Horsted, S.J., Jensen, L.M., Nielsen, T.G., Sondergaard, M. (1990). Carbon budgets of the microbial food web in estuarine enclosures. *Marine Ecology Progress Series* **65**, 159-170.

Rieman L. & Azam F. (2002) Widespread N-acetyl-D-glucosamine uptake among pelagic marine bacteria and its ecological implications. *Applied and environmental microbiology* **68**, 5554-5562.

Samocha T.M., Patnaik S., Speed M., Ali A., Burger J.M., Almeida R.V., Ayub Z., Harisanto M. Horowitz A., Brock D.L. (2007). Use of molasses as a carbon source in limited discharge nursery and grow-out systems for *Litopenaeus vannamei*. *Aquacultural engineering* **36**, 184-191.

Schneider O., Sereti V., Eding E.H., Verreth J.A.J. (2006) Molasses as C source for bacterial heterotrophic production on solid fish waste. *Aquaculture* **261**, 1239-1248.

Smith S.V. & Hollibaugh J.T. (1997). Annual cycle and interannual variability of ecosystem metabolism in a temperate climate embayment. *Ecological Monographs* **67**, 509-533.

Soeder C.J. & Talling J.F.(1969) The enclosure of phytoplankton communities. In: *A manual methods for measuring primary production in aquatic environments*. (ed. by. Volleinweider R.A.) pp 62 – 70. Blackwell Scientific, Oxford.

Sarker R.I., Ogawa W., Tsuda M., Tanaka, R., Tsuchiya T. (1994) Characterization of a glucose transport system in *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology* **176**, 7378-7382.

Sung H.H., Li H.C., Tsai F.M., Ting Y.Y. & Chao W.L. (1999) Changes in the composition of *Vibrio* communities in pond water during tiger shrimp *Penaeus monodon* cultivation and in the hepatopancreas of healthy and diseased shrimp. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **236**, 261–271

Thompson J.T. & Poltz, M.F. (2006) Dynamics of *Vibrio* population and their role in environmental nutrient cycling In: *Biology of vibrios* (ed. by Thompson F.L., Austin B. & Swings J.) pp. 190-203. ASM press, Washington D.C.

Underwood A.J. (1981) Techniques of Analysis of Variance in Experimental Marine Biology and Ecology. *Oceanography. Mar. Bio. Ann. Rev* **19**, 513-605

Utermöl H. (1958) Zur Vervollkommung der quantitativen Phytoplankton Methodik. *Int. Ver. Theor. Angew. Limnologie*, **9**, 1-38

Van Wyk P. 2006 Production of *Litopenaeus vannamei* in recirculating aquaculture systems: Management and design considerations. In: *Proceedings o the 6th International conference Recirculating Aquaculture*. p. 38-47 Virginia Tech University, Blacksburg.

Van Wyk P. & Scarpa J. (1999).Water Quality and Management. In: Van Wyk, P., et al. (Eds.), *Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems*. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Tallahassee, pp. 128–138.

Weirich C.R., Browdy C.L., Bratvold D., McAbee B.J., Stokes A.D. (2002) Preliminary characterization of prototype minimal exchange super-intensive shrimp production systems. In: *Proceedings o the 4th International conference Recirculating Aquaculture*. p.255-270. Virginia Tech University, Blacksburg.

Weirich, C.R., Bratvold, D., Browdy, C.L., McAbee, B.J. 2003. Preliminary Evaluation Of Emerging Water Treatment Technologies For Use In Minimal Exchange Super-Intensive Pacific White Shrimp *Litopenaeus Vannamei* Culture Systems [abstract]. In: *Aquaculture America Conference*. P. 318.

Wickins J.F. (1976). The tolerance of warm-water prawns to recirculated water. *Aquaculture* **9**, 19-37.

Williams A.S., Davis D.A., Arnold C.R. (1996). Density-Dependent Growth and Survival of *Penaeus setiferus* and *Penaeus vannamei* in a Semi-Closed Recirculating System *Journal of the world Aquaculture Society* **27**, 107–112.

Yusoff F.M., Zubaidah M.S., Matias H.B. & Kawn T.S. (2002) Phytoplankton succession in intensive marine shrimp culture ponds treated with a commercial bacterial product *Aquaculture Research* **33**, 269-278.

Zar J. (1999) *Biostatistical analysis 3rd edition*, Pentice Hall, New Jersey. 667p.

Zwirtes, I. R. 2003. Uso de geocronologia e da distribuição de lipídios e fósforo na reconstituição histórica dos sedimentos da Lagoa da Conceição, Florianópolis, SC. Dissertação de mestrado em Química, Universidade Federal de Santa Catarina. 69 p.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO

Artologaza I., Ayo B., Latatu A., Azua, M., Uname, M., & Iribieril, J.(2000). Spatial distribution of protists in the presence of macroagregates in marine system. *FEMS Microbiology Ecology* **33**, 191 – 196.

Avnimelech Y. (1999). Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture* **176**: 227-235.

Avnimelech, Y., Kochva, M. & Diab, S. (1994). Development of controlled intensive aquaculture systems with a limited water exchange and adjusted C to N ratio. *Israeli Journal of Aquaculture.-Bamidgeh* **46**, 119–131.

Baird D.J., Beveridge M.C.M., Kelly L.A., Muir J. (1996). *Aquaculture and water resource management*. Blackwell Science, London 219 p.

Bianchi M.E., Berdier A. Bianchi A.M., Domenach & MARTY D. (1990). Use of ¹⁵N Labelled Food Pellets to Estimate the Consumption of Heterotrophic Microbial Communities to Penaeid Prawns Diet in Closed-System Aquaculture. In: R. Lésel (ed.). *Microbiology in Poecilotherms*, Elsevier Science Publishers, B. V. (Biomedical Division), Amsterdam, the Netherlands.

Bratvold D. & Browdy C.L. (1998) Simple electrometric methods for estimating microbial activity in aquaculture ponds. *Aquacultural Engineering* **19**, 29 – 39.

Bratvold D., Lu J., Browdy C.L. (1999). Disinfection, microbial community establishment and shrimp production in a prototype biosecure pond. *Journal of World Aquaculture Society*. **30**, 422–432

Browdy C.L., Bratvold D., Stokes A.D. & McIntosh R.P. (2001) Perspectives on the application of closed shrimp culture systems. In: *The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture 2001*. (ed. by Browdy C.L. & Jory D.E.) pp. 20–34. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA.

Browdy C. L., Holloway J.D., King C.O., Stokes A.D., Hopkins J.S., Sandifer P.A. (1993). IHHN virus and intensive culture of *Penaeus vannamei*: Effects of stocking density and water exchange rates. *Journal of Crustacean Biology* **13**, 87-94.

Burford M.A., Thompson P.J., McIntosh R.P., Bauman R.H., Pearson D.C. (2003) Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize. *aquaculture* **219**, 393–411.

Conover R.J. (1982). Interrelations between microzooplankton and other plankton organisms. *Ann. Inst. Océanogr*, Paris **58**: 31-46.

Decamp O., Conquest L., Foster I., Tacon A.G.J. (2002). The nutrition and feeding of marine shrimp within zero water exchange aquaculture production systems: role of eukariotic microorganisms. In: *Microbial Approaches to Aquatic Nutrition Within Environmentally Sound Aquaculture Production Systems*. (ed. by Lee C. S. & O'Brien P.) pp. 79 – 86. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, FL., USA.

Del Giorgio P.A. & Cole J.J. (2000) Bacterial energetics and growth efficiency In: *Microbial Ecology of the oceans* (ed. by Kirchman, D. L.). pp. 289-325 Willey-Liss. USA.

FAO, (2005). *Yearbook of Fisheries Statistics 2002*, Table B1, world Aquaculture production by species groups. Rome, Italy. <http://www.fao.org/fi/statist/summtab>

Fast A.W. & MENASVETA P. (2000). Some recent issues and innovations in marine shrimp pond culture. *Reviews in Fisheries Science*, **8**,151-233.

- Fuhrman J.A., Horrigan S.G., Capone D.G. (1988). Use of ^{13}N as tracer for bacterial and algal uptake of ammonium from seawater. *Marine Ecology Progress series* **45**, 271 – 278.
- Goldmann J.C., Caron D.A., & Dennett M.R. (1987) Regulation of gross efficiency and ammonium regeneration in bacteria by substrate C:N ratio. *Limnology and Oceanography* **32**, 1239-1252.
- Goldman J.C. & Dennett M.R. (1991). Ammonium regeneration and carbon utilization by marine bacteria grown on mixed substrates. *Marine Biology* **109**, 369 -378.
- Hargreaves, J. A., 1998. Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds. *Aquaculture*, **166**, 181- 212.
- Hoch M.P., & Kirchman D.L. (1995). Ammonium uptake by heterotrophic bacteria in the Delaware estuary and adjacent coastal waters. *Limnology and Oceanography* **40**: 886 – 897.
- Hopkins J.S., DeVoe M.R., Holland A.F. (1995) Environmental impacts of shrimp farming with special reference to the situation in the continental United States *Estuaries* **18**, 25-42.
- Hopkins J.S. & Villalon, J. (1992). Synopsis of industrial panel input on shrimp pond management. In: Wiban J.A. (ed) Proceedings of the special Session on shrimp Farming. World Aquaculture Society, pp. 138 – 143.
- Horowitz A. & S Horowitz. 2001. Microorganismos e práticas de alimentação em acuicultura. *Aquan. de Latin.*, 1(1): 37-39.
- Kiorbe, T. (2000). Colonization of marine snow aggregates by invertebrate zooplankton: abundance scaling and possible role. *Limnology and Oceanography* **45**, 479 – 484.
- Kroer N., Jorgensen N. O. G., Coffin R. B. (1994). Utilization of dissolved nitrogen by heterotrophic bacterioplankton: a comparison of three ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 4116 – 4123.
- Lehto, J.S., Sulkin, S., Strom, S. & Johnson, D. (1998). Protists and detrital particles as prey for the first larval stage of brachyuran crab, *Hemigrapsus oregonensis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **230**, 213 – 224.
- McNeil R. (2000). Zero exchange, aerobic, heterotrophic systems: key considerations. *The advocate*, **June**: 72 – 76.
- Montoya R.A., Lawrence A.L., Grant W.E. & Velasco M. (2002) Simulation of nitrogen dynamics in shrimp culture system. *Aquaculture Research* **33**, 81 - 94
- Moriarty, D.J.W. (1997). The role of microorganisms in aquaculture ponds. *Aquaculture*, **151**: 333-349.
- Nunes, A.J.P., Gesteira, T.C.V. & Goddard, S. (1997). Food ingestion and assimilation by the Southern brown shrimp *Penaeus subtilis* under semi-intensive culture in NE Brazil. *Aquaculture*, **149**: 121-136.
- Ostrensky, N.A. & Barbieri R.C.J. (2002). Camarões Marinhos., Aprenda Fácil. 367p. Viçosa.
- Stoeker, D. K. & Capuzzo, J. M. (1990). Predation on protozoa: its importance to zooplankton. *Journal of Plankton research* **12**, 891 – 908.
- Thomson F.L., Abreu P.C. & Cavalli R. (1999) The use of microorganisms as food source for *Penaeus paulensis* larvae. *Aquaculture* **174**, 139-153.
- Wheeler P.A. & Kirchman D.L. (1986). Utilization of inorganic and organic nitrogen by bacteria in marine systems. *Limnology and Oceanography* **31**, 998 – 1009.
- Wickins J.F. (1976). The tolerance of warm-water prawns to recirculated water. *Aquaculture* **9**, 19-37.