



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

Gabriela Soltes Ferreira

Utilização de bactérias nitrificantes no cultivo do camarão-branco-do-pacífico em sistema superintensivo de flocos microbianos

Florianópolis

2020

Gabriela Soltes Ferreira

Utilização de bactérias nitrificantes no cultivo do camarão-branco-do-pacífico em sistema superintensivo de flocos microbianos

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de doutor em Aquicultura.

Orientador: Prof. Dr. Felipe do Nascimento Vieira

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Ferreira, Gabriela Soltes

Utilização de bactérias nitrificantes no cultivo do camarão-branco-do-pacífico em sistema superintensivo de flocos microbianos / Gabriela Soltes Ferreira ; orientador, Felipe do Nascimento Vieira, 2020.

96 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Litopenaeus vannamei. 3. Nitrificação. 4. Compostos nitrogenados. 5. Sais de amônia e nitrito. I. Vieira, Felipe do Nascimento . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Aquicultura. III. Título.

Gabriela Soltes Ferreira

Utilização de bactérias nitrificantes no cultivo do camarão-branco-do-pacífico em sistema superintensivo de flocos microbianos

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Felipe do Nascimento Vieira, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Walter Quadros Seiffert, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Bruno Corrêa da Silva, Dr.
Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina

Prof. Paulo Cesar Oliveira Vergne de Abreu, Dr.
Universidade Federal do Rio Grande

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Aquicultura.

Profª. Dra. Leila Hayashi
Coordenação do Programa

Prof. Dr. Felipe do Nascimento Vieira
Orientador

Florianópolis, 13 de dezembro de 2019.

Este trabalho é dedicado a todas as Mulheres cientistas que nos inspiram.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e poder compartilhar o meu melhor neste mundo.

Agradeço a minha mãe, Josefina Stefania Soltes, por ser uma grande incentivadora, provedora e exemplo de vida para mim. Obrigada mãe, eu te amo.

Agradeço a minha irmã, Kathiar Soltes Raso, que cuida de mim como uma segunda mãe e sempre está ao meu lado em todos os momentos. Eu te amo mana.

Agradeço meu noivo, Ricardo Shunji Takeuchi, que mesmo não muito favorável a entrar nesta jornada de doutorado, torceu para que tudo ocorresse bem, eu te amo amor.

Agradeço ao meu cunhado, José Renato Teixeira Raso, pelas palavras de conforto e me encorajar a seguir até o final do doutorado.

Agradeço ao meu orientador, Felipe do Nascimento Vieira, por aceitar esse desafio e servir de exemplo como um excelente profissional. Obrigada!

Agradeço as amigas do Laboratório de Camarões Marinhos, Ana Clara Chede, Ariane Martins, Claudia Machado, Camila Miranda, Daniele Santos, Esmeralda Chamorro, Isabela Pinheiro, Jamilly Sousa Rocha, Jaqueline da Rosa Coelho, Josele Redig, Karolina Rosa, Mariana Soares, Norha Bolivar, Patriula Moreira, Priscila Rezende, por toda ajuda durante os experimentos, pelos momentos de confraternização, pelas palavras de apoio e pensamento positivo.

Agradeço as minhas grandes amigas Beatriz Andrade, Elisa Siqueira, Erica Maia, Fernanda Salles, Joanna Godinho, Juliana Ribeiro Rosa, Karine Oliveira, Luiza Mann, Mariana Dutra Vieira, Raquel Piccinini, Scheila Pereira, Shana Boff, Tania Wilke, Tatiane Amadio e Vandressa Soberanski por compartilhar segredos, confissões e auxiliar nesta caminhada.

Agradeço a Frederike Schmachtl pela amizade e ajuda durante o experimento, além das aulas de inglês compartilhadas. Thank you so much darling.

Agradeço aos meus filhos Jhon Dionicio, Mateus Aranha Martins, Marcos Teixeira e Vitor Fernandes Silva, por ajudarem no desenvolvimento do projeto e compartilharem suas experiências.

Agradeço aos professores da Pós-graduação em Aquicultura, em especial Leila Hayashi e Walter Quadros Seiffert, por confiarem no trabalho desenvolvido e incentivarem o crescimento profissional. Obrigada!

Agradeço aos funcionários do Laboratório de Camarões Marinhos, Deia, Ilsinho, Davi, Dimas, Salete, Motorzinho, Teia, por toda ajuda nos experimentos e dividir seu conhecimento prático de forma divertida e carinhosa. Sentirei saudades!

Agradeço ao Carlito pela dedicação que desempenha na Pós-graduação e sempre ser solícito aos nossos pedidos. Obrigada, você é o coração dessa Pós.

Agradeço a Capes pelo apoio financeiro da bolsa de doutorado.

Agradeço a CNPq pelas bolsas de iniciação científica que permite essa troca de conhecimento entre a Pós-graduação e a Graduação.

As empresas privadas que apoiaram financeiramente o laboratório nesses tempos de crise e contribuíram para o aprendizado e geração de conhecimento científico.

Renda-se, como eu me rendi. Mergulhe no que você não conhece como eu mergulhei.
Não se preocupe em entender, viver ultrapassa qualquer entendimento (Clarice Lispector).

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar diferentes estratégias de preparo de água: heterotrófica, quimioautotrófica e madura no sistema de bioflocos na fase de berçário e na fase de engorda do camarão-branco-do-Pacífico (*Litopenaeus vannamei*). Os experimentos tiveram duração de 35 dias cada. Foram utilizadas pós-larvas de camarões com $0,08 \pm 0,02$ g, estocados em doze tanques de 300 L a uma densidade de 2000 camarões m^{-3} no experimento de berçário. Para o experimento de engorda foram utilizados camarões juvenis com $3,46 \pm 0,02$ g, estocados em doze tanques de 300 L a uma densidade de 350 camarões m^{-3} . Os parâmetros analisados foram desempenho zootécnico, parâmetros físico-químicos da água, volume de sólidos produzido, análise microbiológica da água, análise centesimal do floco (proteína, carboidrato, fibra e cinzas), análise metagenômica e microscopia eletrônica de varredura. As estratégias de preparação de água para a criação de camarão avaliadas neste estudo incluíram: i) Tratamento heterotrófico, onde a água recebeu adição de carboidrato (açúcar e melado) como fonte de carbono; ii) tratamento quimioautotrófico, onde sais de amônio e nitrito foram adicionados à água; e iii) Tratamento maduro, realizado através da adição de uma quantidade significativa de água (30%) contendo bioflocos maduro de outro sistema BFT já estabelecido. Nos dois experimentos os tratamentos maduros e quimioautotróficos conseguiram manter os compostos nitrogenados tóxicos como a amônia e o nitrito em baixos níveis, sem a necessidade de adição de carboidratos. Por outro lado, o sistema heterotrófico apresentou picos de amônia e nitrito durante o período experimental que foram controlados com adição de carboidrato. O sistema quimioautotrófico exibiu uma menor abundância de bactérias da família *Vibrionaceae* no início do experimento de berçário, em comparação com os tratamentos heterotróficos e maduros. A combinação de baixa abundância de *Vibrionaceae* e boa qualidade da água comparada ao sistema heterotrófico resultou em melhor desempenho do crescimento do camarão nesse tratamento na fase de berçário. A produção de lodo no sistema heterotrófico foi maior no experimento de berçário e também o maior volume de SS e TSS no experimento de engorda em comparação aos demais sistemas. Porém, o tratamento heterotrófico apresentou maior conteúdo proteico na análise centesimal do floco nos dois experimentos, conferindo um desempenho zootécnico do camarão melhor do que os outros tratamentos. Os resultados da análise metagenômica mostraram que a comunidade microbiana associada ao sistema foi representada por 10 filos, sendo as *Proteobacteria* e as *Bacteroidetes* os filos mais abundantes no início e no final do experimento. Nossos estudos sugerem que diferentes estratégias para a preparação da água afetaram a diversidade e variedade de microrganismos presentes no sistema bioflocos, resultando em uma comunidade bacteriana rica que pode ajudar a controlar a qualidade da água e servir como fonte de proteína microbiana.

Palavras-chave: Aquicultura. *Litopenaeus vannamei*. Nitrificação. Compostos nitrogenados. Sais de amônia e nitrito.

ABSTRACT

The objective of this work was to assess different water preparation strategies: heterotrophic, chemoautotrophic and mature in nursery and rearing phases in BFT system of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Both experiments lasted for 35 days. Post-larvae shrimp (0.08 ± 0.02 g) stocked in twelve 300 L tanks at a stocking density of 2000 shrimp m^{-3} in nursery phase and in rearing phase with juvenile 3.46 ± 0.02 g shrimps stocked in twelve 300 L tanks at a stocking density of 350 shrimp m^{-3} . The parameters analyzed were shrimp performance, water quality, amount of sludge, microbiological parameters of the water, floc analysis (crude protein, carbohydrate, crude fiber and ash), metagenomic analysis and scanning electron microscopy. The water preparation strategies for shrimp rearing that were evaluated in this study included: i) Heterotrophic treatment, where the water received sugar or molasses as a carbon source; ii) Chemoautotroph treatment, where ammonium and nitrite salts were added to the water; and iii) Mature treatment, which was created by the addition of a significant amount (30%) of water containing mature biofloc from another established BFT system. In both experiments mature and chemoautotrophic treatments, the nitrification process was able to keep toxic nitrogen compounds (ammonia and nitrite) at low levels without the addition of carbohydrates. In contrast, heterotrophic system showed peaks of ammonia and nitrite during the rearing cycle. The chemoautotrophic system exhibited a lower abundance of bacteria from the family *Vibrionaceae* in the beginning of the experiment compared to the heterotrophic and mature treatments. The combination of low *Vibrionaceae* abundance and better water quality than heterotrophic treatment resulted in improved growth performance in this treatment. The sludge production in the heterotrophic system was higher in nursery phase and also the higher SS and TSS volume in rearing phase compared to the other systems. However, the heterotrophic treatment presented higher protein content in floc analysis in both experiments, giving a better shrimp performance than the other treatments. The metagenomic analysis results showed that microbial community associated to Biofloc system is represented by 10 phyla. *Proteobacteria* and *Bacteroidetes* were also abundant phyla at the beginning and end of the experiment. Our study suggests that different strategy for water preparation affected the diversity and variety of microorganisms present in the biofloc system results in a rich bacterial community that can help control water quality and serve as a source of microbial protein.

Keywords: Aquaculture. *Litopenaeus vannamei*. Nitrification. Nitrogen compounds. Ammonium and nitrite salts.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Resposta do camarão as diferentes concentrações de oxigênio dissolvido..... 19
- Figura 2.** Representação esquemática do ph e sua relação com os organismos aquáticos..... 20
- Figura 3.** Diagrama esquemático do ciclo dos principais compostos nitrogenados no sistema de bft. Legenda: NAT (nitrogênio na forma de amônia total); NO_3^- (nitrato), NO_2^- (nitrito), N_2 (nitrogênio)..... 23
- Figura 4.** Esquema do desenvolvimento temporal do manejo de fertilização orgânica adotada no Laboratório de Camarões Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina para o *Litopenaeus vannamei* em sistema de bioflocos. 25
- Figura 5.** Processos metabólicos de degradação das proteínas que acabam formando amônia. 28
- Figure 6.** Total ammonia nitrogen (TAN) (a) and nitrite (b) in pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nursery. Tanks were stocked with 2,000 shrimp m^{-3} in biofloc using different systems (heterotrophic, chemoautotrophic and mature) for 35 days. 42
- Figure 7.** Total viable heterotrophic and *Vibrionaceae* bacteria count in the water at the beginning (a) and end (b) of the nursery phase of *Litopenaeus vannamei* under different systems (heterotrophic, chemoautotrophic and mature). 45
- Figura 8.** Nitrogênio de amônia total NAT (a) e nitrito (b) do camarão-branco-do-pacífico (*Litopenaeus vannamei*) estocados na densidade de 350 camarões m^{-3} em bioflocos, utilizando diferentes sistemas (heterotrófico, quimioautotrófico e maduro) por 35 dias. 67
- Figura 9.** Contagem de bactérias heterotróficas totais e *Vibrio* spp. Na água no início (a) e no final (b) do cultivo em sistema de bioflocos com o camarão-branco-do-pacífico (*Litopenaeus vannamei*) estocado na densidade de 350 camarões m^{-3} utilizando diferentes sistemas (heterotrófico, quimioautotrófico e maduro) por 35 dias..... 71
- Figura 10.** As curvas de rarefação mostram o número de utos nos sistemas quimioautotrófico (q), heterotrófico (h) e maduro (m) nas fases inicial e final do cultivo do camarão-branco-do-pacífico (*Litopenaeus vannamei*) estocado na densidade de 350 camarões m^{-3} , utilizando diferentes sistemas (a). As Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) foram baseadas em 97% de similaridade de

sequência (b). O número de sequências amostradas indica o número de leituras de sequenciamento.....	72
Figura 11. Composição bacteriana a nível de filo dos sistemas quimioautotrófico (Q), heterotrófico (H) e maduro (M) das fases inicial e final do cultivo do camarão-branco-do-pacífico (<i>Litopenaeus vannamei</i>) estocado na densidade de 350 camarões m ⁻³ utilizando diferentes sistemas fertilização da água.	73
Figura 12. Abundância relativa (%) dos cinco principais filios dos sistemas quimioautotrófico (Q), heterotrófico (H) e maduro (M) das fases inicial e final do cultivo do camarão-branco-do-pacífico (<i>Litopenaeus vannamei</i>) estocados na densidade de 350 camarões m ⁻³ utilizando diferentes sistemas de fertilização da água.	75
Figura 13. Índices de riqueza e diversidade dos sistemas quimioautotrófico (Q), heterotrófico (H) e maduro (M) nas fases inicial e final do cultivo em bioflocos do camarão-branco-do-pacífico (<i>Litopenaeus vannamei</i>) estocados na densidade de 350 camarões m ⁻³ utilizando diferentes sistemas de fertilização da água.....	77
Figura 14. Sequenciamento profundo metagenômico rarefeito (MDS) da água dos sistemas quimioautotrófico (Q), heterotrófico (H) e maduro (M) das fases inicial e final do cultivo do camarão-branco-do-pacífico (<i>Litopenaeus vannamei</i>) estocadas na densidade de 350 camarões m ⁻³ usando diferentes sistemas de fertilização da água.....	78
Figura 15. O mapa de calor da análise microbiana do núcleo que mostra a distribuição da família dos três tratamentos: quimioautotrófico (Q), heterotrófico (H) e maduro (M).	80
Figura 16. Observações de microscopia eletrônica de varredura de (a) superfície de tratamento heterotrófico (dia 1), (b) superfície de tratamento heterotrófico (dia 35), (c) superfície de tratamento maduro (dia 1), (d) superfície de maduro tratamento (dia 35), (e) superfície do tratamento quimioautotrófico (dia 1), (f) superfície do tratamento quimioautotrófico (dia 35).	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação das características principais dos sistemas de cultivo semi-intensivo com o sistema superintensivo.	21
Tabela 2. Análise da composição nutricional (proteína, carboidrato e lipídeo) do bioflocos em diferentes estudos.....	24
Tabela 3. Comparação do consumo de amônia por bactérias heterotróficas e quimioautotrófica através do uso de carbono orgânico, carbonatos e oxigênio dissolvido (O ₂) e produção de biomassa bacteriana e dióxido de carbono (CO ₂) no sistema de bioflocos.....	26
Table 4. Water quality variables of pacific white shrimp (<i>Litopenaeus vannamei</i>) nursery stocked with 2000 shrimp m ⁻³ in biofloc using different systems (heterotrophic, chemoautotrophic and mature) for 35 days.	43
Table 5. Inputs of the systems: salt, sugar, feed intake, calcium hydroxide and sludge produced by the pacific white shrimp <i>L. vannamei</i> in nursery using biofloc with heterotrophic, chemoautotrophic and mature biofloc systems for 35 days stocked at a density of 2000 shrimp m ⁻³	43
Table 6. Characteristics of biofloc (centesimal composition) of pacific white shrimp (<i>Litopenaeus vannamei</i>) nursery stocked with 2000 shrimp m ⁻³ in biofloc using different systems (heterotrophic, chemoautotrophic and mature) for 35 days.	46
Table 7. Pacific white shrimp <i>L. vannamei</i> performance in the nursery using biofloc with heterotrophic, chemoautotrophic and mature biofloc systems for 35 days stocked at a density of 2000 shrimp m ⁻³	46
Tabela 8. Variáveis de qualidade da água do camarão-branco-do-pacífico (<i>Litopenaeus vannamei</i>) estocados a uma densidade de 350 camarões m ⁻³ em sistema de bioflocos, utilizando diferentes sistemas (heterotrófico, quimioautotrófico e maduro) por 35 dias.	66
Tabela 9. Entradas dos sistemas: sais, melão, consumo de ração, hidróxido de cálcio e lodo produzido no sistema de bioflocos com o camarão-branco-do-pacífico <i>L. vannamei</i> estocados a uma densidade de 350 m ⁻³ usando diferentes sistemas: heterotrófico, quimioautotrófico e bioflocos maduro por 35 dias.	69
Tabela 10. Características do bioflocos (composição nutricional) do cultivo do camarão-branco-do-pacífico (<i>Litopenaeus vannamei</i>) estocado na densidade de 350	

camarões m^{-3} em sistema de bioflocos, utilizando diferentes sistemas (heterotrófico, maduro e quimioautotrófico) por 35 dias. 70

Tabela 11. Desempenho zootécnico do camarão-branco-do-pacífico *L. vannamei* cultivado em sistema de bioflocos em diferentes sistemas de fertilização de água: heterotrófico, quimioautotrófico e maduro por 35 dias, estocados a uma densidade de 350 camarões m^{-3} 83

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1.	OBJETIVOS DO TRABALHO	31
1.1.1.	Objetivo Geral.....	31
1.1.2.	Objetivos Específicos	31
1.2.	ESTRUTURA DO TRABALHO	31
2.	ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	33
2.1	STRATEGIES FOR AMMONIUM AND NITRITE CONTROL IN <i>Litopenaeus</i> <i>vannamei</i> NURSERY SYSTEMS WITH BIOFLOCS	33
2.1.1	Introduction	34
2.1.2	Material and methods.....	37
2.1.2.1	Experimental units and maintenance	37
2.1.2.2	Description of the biofloc systems	38
2.1.2.2.1	<i>Heterotrophic system</i>	38
2.1.2.2.2	<i>Chemoautotrophic system</i>	38
2.1.2.2.3	<i>Mature biofloc system</i>	38
2.1.2.3	Shrimp performance	39
2.1.2.4	Water quality variables	39
2.1.2.5	Amount of sludge	39
2.1.2.6	System fertilization.....	40
2.1.2.7	Microbiological parameters of the water.....	40
2.1.2.8	Floc analysis	40
2.1.2.9	Statistical analysis.....	40
2.1.3	Results.....	41
2.1.3.1	Water quality variables	41
2.1.3.2	Amount of sludge and inputs used in the system	43
2.1.3.3	Microbiological parameters of the culture water.....	44

2.1.3.4	Characteristics of the biofloc	45
2.1.3.5	Shrimp performance	46
2.1.4	Discussion	47
2.1.5	Conclusion	49
2.1.6	Reference	50
2.2	ESTIMULAÇÃO DA NITRIFICAÇÃO NO SISTEMA DE BIOFLOCOS PARA O CAMARÃO MARINHO <i>Litopenaeus vannamei</i>	55
2.2.1	Introdução	56
2.2.2	Material e métodos	58
2.2.2.1	Design Experimental	58
2.2.2.2	Descrição dos Tratamentos	59
2.2.2.2.1	<i>Sistema heterotrófico</i>	59
2.2.2.2.2	<i>Sistema quimioautotrófico</i>	59
2.2.2.2.3	<i>Sistema biofoco maduro</i>	60
2.2.2.3	Desempenho do camarão	60
2.2.2.4	Variáveis de qualidade da água	60
2.2.2.5	Quantidade de lodo	61
2.2.2.6	Fertilização do sistema	61
2.2.2.7	Análise do floco	61
2.2.2.7.1	<i>Conteúdo de cinzas</i>	61
2.2.2.7.2	<i>Análise C/N</i>	62
2.2.2.7.3	<i>Extrato Etéreo</i>	62
2.2.2.7.4	<i>Extrato não nitrogenado</i>	63
2.2.2.8	Parâmetros microbiológicos da água	63
2.2.2.9	Análise metagenômica	63
2.2.2.10	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	64
2.2.2.11	Análise estatística	65

2.2.3	Resultados e discussão.....	65
2.2.3.1	Variáveis de qualidade da água	65
2.2.3.2	Quantidade de lodo e insumos utilizados no sistema	68
2.2.3.3	Análises químicas do floco.....	69
2.2.3.4	Parâmetros microbiológicos da água.....	70
2.2.3.5	Análise metagenômica.....	71
2.2.3.6	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	81
2.2.3.7	Desempenho do camarão.....	82
2.2.4	Conclusão	83
2.2.5	Referências	83
3.	CONCLUSÕES GERAIS	91
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO	92

1. INTRODUÇÃO

Carcinicultura marinha

Segundo dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) a aquicultura é o segmento da produção de origem animal com o crescimento mais rápido, tendo alcançado uma produção mundial de 110,2 milhões de toneladas em 2016. A aquicultura engloba a criação de peixes, crustáceos, moluscos e plantas aquáticas (FAO, 2018). Atualmente, mais de 598 espécies aquáticas são cultivadas em mais de 194 países (FAO, 2018). A expansão da atividade se deve em parte, ao aumento da população mundial e ao consequente crescimento do consumo mundial per capita de pescado.

Seguindo o panorama mundial, a carcinicultura marinha é uma das maiores indústrias dentro da aquicultura, com um volume comercializado de 7,9 milhões de toneladas representando um montante de USD 57,1 bilhões. Dentre as espécies de crustáceos cultivadas, o camarão-branco-do-pacífico *Litopenaeus vannamei* ganha destaque, sendo responsável por 53% da produção mundial de crustáceos em 2016. Embora a maior parte do consumo ocorra nos países desenvolvidos, os países da América Latina e do leste e sudeste da Ásia são de longe a maior parcela da produção (FAO, 2019).

A representação do Brasil no mercado mundial desta espécie foi de 41 mil toneladas em 2017, sendo 40,5 mil toneladas provenientes da região nordeste do país, com uma representação de 98,8%. Os principais estados produtores foram Rio Grande do Norte e Ceará que corresponderam com 37,7% e 28,9% do total, respectivamente (IBGE, 2017). A carcinicultura brasileira enfrenta grandes desafios como: a crise hídrica nas regiões sudeste e nordeste do país, a ocorrência de enfermidades e a possibilidade de abertura das importações de camarões de outros países, os quais limitam sua expansão (KUBITZA, 2015).

As enfermidades virais como vírus da síndrome da mancha branca (WSSV), o vírus da mionecrose infecciosa (IMN) e mais recentemente a enfermidade da necrose hepatopancreática aguda (AHPND) ou síndrome da mortalidade precoce (EMS) dificultam o crescimento da carcinicultura. A AHPND ou EMS é uma doença de origem bacteriana causada pelo *Vibrio parahaemolyticus*. Os *Vibrio* spp. fazem parte da flora autóctone de organismos aquáticos e do meio ambiente marinho, representando assim uma fonte constante de possíveis infecções (COSTA et al., 2009).

Fatores ambientais, como temperatura, salinidade, pH, dióxido de carbono e compostos nitrogenados, podem ter um efeito significativo no desencadeamento da infecção

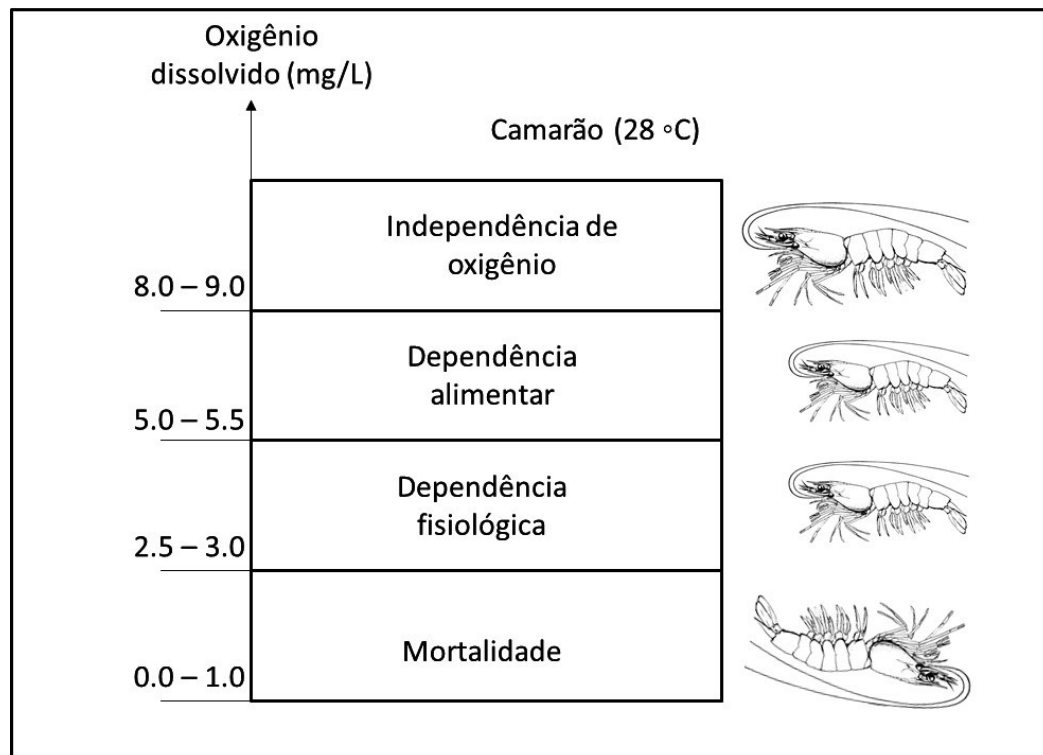
(BROCK; MAIN, 1994). O princípio básico da gestão da saúde dos animais aquáticos continua sendo uma consideração minuciosa das interações entre hospedeiro, patógeno e o meio ambiente (MEYER, WARREN; CAREY, 1983). As espécies aquáticas estão em contato direto com o ambiente aquático e mudanças neste meio. Variações nos fatores de qualidade de água podem levar a um desequilíbrio da interação entre os camarões e o meio aquático, tornando-os mais suscetíveis as doenças (SNIESZKO, 1973, apud APOLINÁRIO, 2009).

Qualidade de água

A água é um recurso natural e essencial a vida, a qualidade da água afeta diretamente os organismos aquáticos que estão em constante contato com esse recurso. Suas propriedades físicas, químicas e biológicas interagem individualmente ou coletivamente influenciando os parâmetros de qualidade de água utilizados na aquicultura. O oxigênio dissolvido é sem dúvida o parâmetro mais importante no sistema de produção aquícola. É a principal molécula utilizada pelos seres vivos para extrair energia química dos nutrientes (SÁ, 2012). No sistema de cultivo podem ocorrer quatro situações distintas quanto à disponibilidade de oxigênio:

- 1) Independência de oxigênio: onde o organismo aquático tem oxigênio suficiente para desempenhar todas suas atividades metabólicas;**
- 2) Dependência alimentar: onde o organismo aquático não dispõe de oxigênio suficiente para metabolizar os alimentos ingeridos;**
- 3) Dependência fisiológica: onde o organismo aquático fica estressado e doente e por fim;**
- 4) Mortalidade: onde o organismo aquático morre por asfixia (PETIT, 1990, apud VINATEA, 2010). As situações estão ilustradas na Figura 1.**

Figura 1. Resposta do camarão as diferentes concentrações de oxigênio dissolvido.

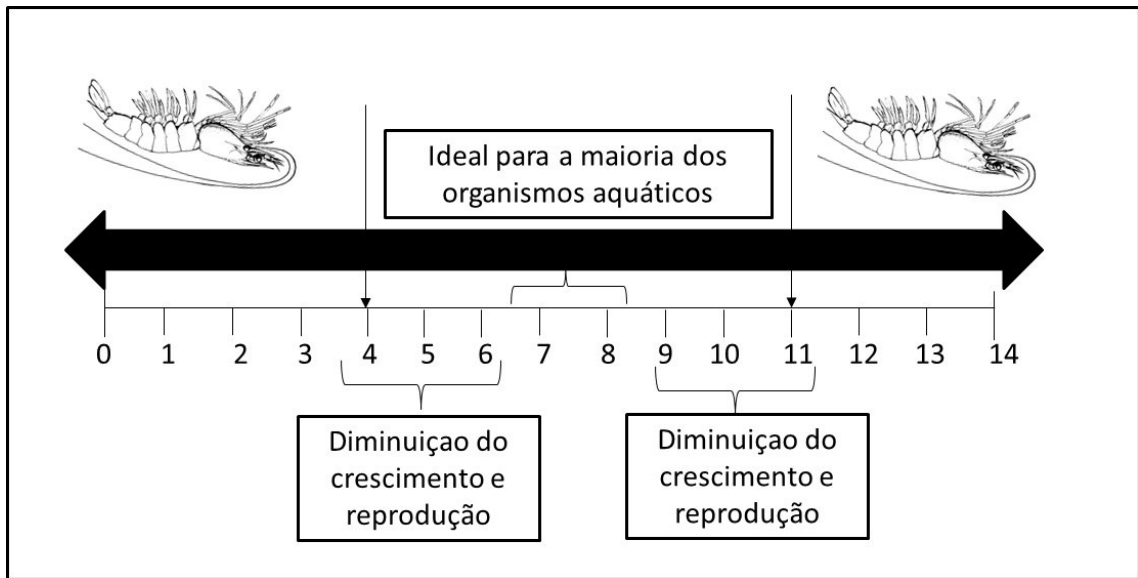


Fonte: Adaptado de Vinatea (2010).

A quantidade máxima de oxigênio que pode se difundir do ar para água depende principalmente da temperatura e da salinidade da água (SÁ, 2012). Portanto, a solubilidade dos gases na água diminui com o incremento da salinidade e da temperatura, existindo uma relação inversa entre esses parâmetros (VINATEA, 2010).

Outro parâmetro muito especial é o potencial hidrogeniônico (pH) medido através da quantidade de prótons (H^+) na água. Esse parâmetro possui profundo efeito sobre o metabolismo e processos fisiológicos nos camarões. Além do mais, o pH exerce uma forte influência sobre a toxicidade de certos parâmetros químicos, tais como: a amônia não ionizada (NH_3), que se torna mais abundante em pH alcalino, e o ácido sulfídrico (H_2S) que aumenta proporcionalmente em pH ácido (VINATEA, 2010). A faixa do pH é representada por uma escala que vai de 0 a 14, no qual o pH 7 indica neutralidade, abaixo de 7 é considerado pH ácido e acima de 7 o pH é básico (Figura 2). A faixa do pH ideal para a maioria dos organismos aquáticos é de 7 a 8, acima ou abaixo disso temos diminuição no crescimento e reprodução.

Figura 2. Representação esquemática do pH e sua relação com os organismos aquáticos.



Fonte: Adaptado de Vinatea (2010).

O pH influencia a disponibilidade de alguns nutrientes na água como por exemplo: o fósforo. Uma diminuição no pH (<7) da água libera o fósforo e esse junta-se com o ferro e o alumínio. Em contrapartida, o aumento do pH (>7) da água o fósforo é adsorvido pelo cálcio no ambiente de cultivo e, por fim, no pH de 6,5 o fósforo fica livre na água (VINATEA, 2010). Segundo a teoria da Entropia as reações químicas tendem ao equilíbrio, e a dissociação das moléculas dependerá do pH do meio.

Os sistemas de aquicultura, em geral, baixam o pH da água, o que torna necessário à sua correção. A correção do pH da água é feito através da adição de soda cáustica (hidróxido de sódio), ou com a cal hidratada (hidróxido de cálcio) ou ainda utilizando a barrilha (carbonato e bicarbonato de sódio). A intenção é manter o equilíbrio da água de cultivo com certa quantidade de sais de ácido carbônico como os carbonatos, bicarbonatos, além dos hidróxidos. A análise feita no laboratório para medir esses sais é a alcalinidade da água, representada em equivalentes de miligrama por litro de carbonato de cálcio (CaCO_3). Segundo Van Wyk e Scarpa (1999) a alcalinidade ideal para o bom desenvolvimento do *L. vannamei* é alcalinidade acima de 100 mg L^{-1} de CaCO_3 . Nos sistemas aquícolas ocorre a interação dos parâmetros físico-químico da água e os aspectos biológicos da espécie. Contudo, o controle da qualidade da água fica condicionado ao sistema de cultivo empregado.

Sistemas de cultivo

Os sistemas de cultivo de camarão podem ser divididos em: sistema extensivo, semi-intensivo, intensivo e superintensivo. A diferença entre eles está caracterizada de acordo com o aporte de nutrientes, densidade de estocagem e controle de qualidade de água (MAGALHÃES, 2004). O sistema de cultivo semi-intensivo está baseado na produção primária através do fitoplâncton para desenvolver a cadeia trófica e servir de alimento ao camarão. A densidade de estocagem é baixa nesse sistema de 20 a 30 camarões/m². Esse sistema utiliza grandes volumes de água, cerca de 65.000 L/kg de camarão produzido para renovar os tanques e retirar os compostos nitrogenados tóxicos (Tabela 1). Por outro lado, o sistema superintensivo, como o sistema de bioflocos, utiliza uma alta densidade de estocagem de camarão, acima de 120 camarões/m², sendo necessário o uso de ração artificial para complementar a dieta. A ciclagem dos nutrientes é realizada no próprio tanque de cultivo através das bactérias, sendo necessário o uso de somente 1.380 L/kg de camarão produzido (POERSCH et al., 2012).

Tabela 1. Comparação das características principais dos sistemas de cultivo semi-intensivo com o sistema superintensivo.

	SEMI-INTENSIVO	SUPERINTENSIVO
CONTROLE DA QUALIDADE DE ÁGUA	Fitoplâncton	Bactéria
DENSIDADE (CAMARÕES/M²)	10-20	120
LITROS DE ÁGUA POR KG DE CAMARÃO	65.000	1.380
RENOVAÇÃO	Diária	Sem renovação

Fonte: Adaptado de Poersch et al. (2012).

Além disso, para cada fase de desenvolvimento do camarão marinho, seja na maturação, larvicultura, pré-berçário, berçário ou engorda, pode ser empregado um tipo sistema de criação. A fase de berçário recebeu grande atenção nos últimos anos devido à possibilidade de reduzir o tempo de engorda e aumentar o número de ciclos produtivos.

A fase de berçário é definida como a fase intermediária entre a larvicultura e a fase de engorda (ARNOLD et al., 2009). Estudos prévios já relataram vários efeitos benéficos da incorporação da fase de berçário no ciclo de produção, que incluem: aumento da sobrevivência, eficiência na alimentação e aumento do potencial de crescimento do camarão (MISHRA et al., 2008; EMERENCIANO et al., 2012; WASIELESKY et al., 2013). É nessa fase larval de desenvolvimento que o camarão marinho é mais susceptível as doenças, tanto virais quanto

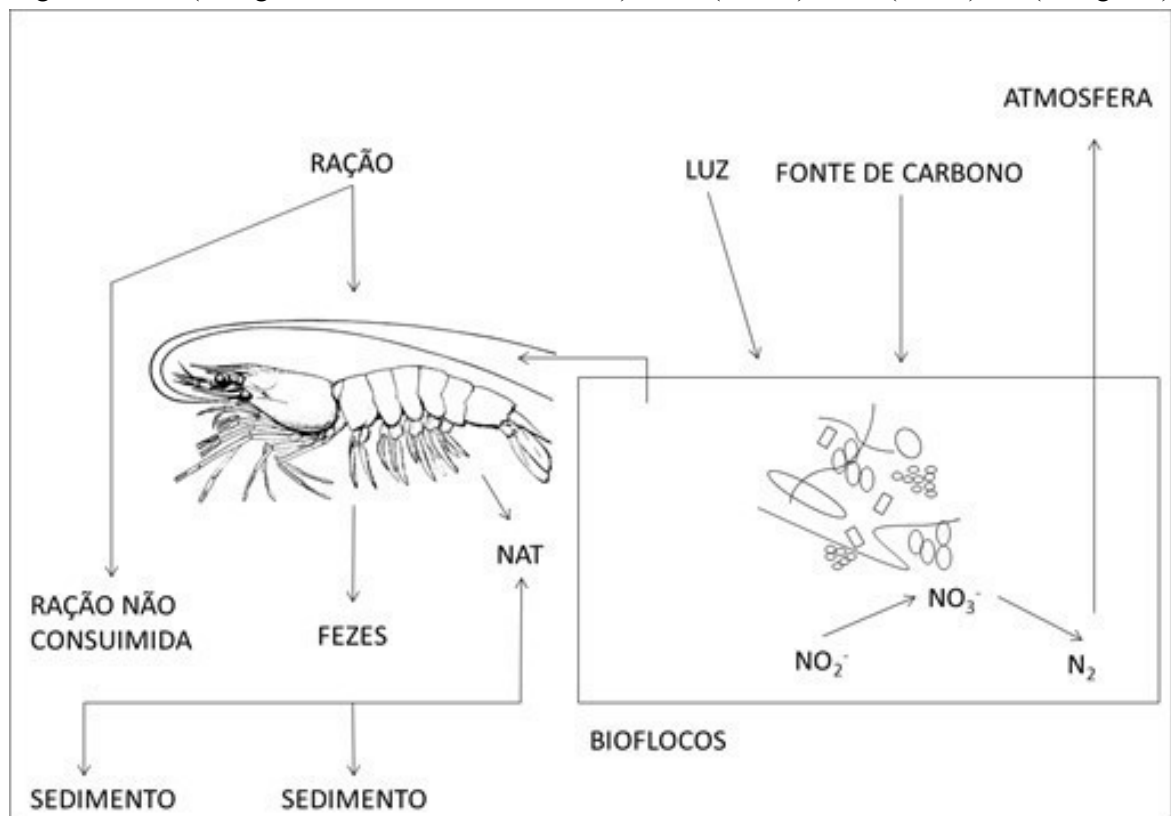
bacterianas, sendo as de origem virais as que causam os maiores impactos econômicos (FLEGEL, 2001).

A fim de minimizar os impactos com perdas econômicas no setor de carcinicultura, os sistemas de cultivo foram se aprimorando passando de sistemas extensivos a sistemas superintensivos (FOÉS, GAONA; POERSCH, 2012). A mudança nos sistemas de cultivo trouxe grandes transformações no setor produtivo e o uso de novas tecnologias permitiu a biossegurança e a sustentabilidade da cadeia produtiva. Um exemplo de avanço tecnológico que vem sendo estudado nos últimos anos é o sistema de Bioflocos.

Sistema de bioflocos

O sistema superintensivo de cultivo de camarão também conhecido como sistema de bioflocos (“Biofloc Technology” -BFT) tem ganhado bastante atenção. Não obstante, essa tecnologia tem surgido como alternativa para aumentar a produtividade e garantir a biossegurança dos cultivos. O BFT é um sistema fechado, com pouca ou nenhuma renovação de água, a qual permite uma elevada densidade de estocagem de camarões por metro quadrado de tanque (BURFORD et al., 2003). Tem como princípio básico a manipulação da comunidade microbiana (Figura 3), através da adição de uma fonte de carbono orgânico, tais como: melão de cana, dextrose, açúcar, glicose, tapioca, farelo de arroz, dentre outras, para incrementar a relação carbono e nitrogênio ($\geq 15:1$) do sistema (AVNIMELECH, 1999; HARI et al., 2006).

Figura 3. Diagrama esquemático do ciclo dos principais compostos nitrogenados no sistema de BFT. Legenda: NAT (nitrogênio na forma de amônia total); NO_3^- (nitrato), NO_2^- (nitrito), N_2 (nitrogênio).



Fonte: Adaptado de Crab et al. (2007).

O cálculo da relação C:N é realizado de acordo com a porcentagem de carbono do carboidrato adicionado (AVNIMELECH, 1999). As diferentes fontes de carboidrato adicionadas ao cultivo diferem na quantidade de carbono (EKASARI; CRAB; VERSTRAETE, 2010). O melão, por exemplo, possui 20% de carbono e o açúcar possui 40% de carbono. Essa diferença faz com que a quantidade de melão adicionada no tanque de cultivo seja maior do que a quantidade de açúcar. Além disso, diferentes fontes de carbono podem influenciar a composição nutricional do floco (AVNIMELECH; KOCHBA, 2009; KHATOON et al., 2016). Diversos estudos relatam diferentes valores de proteína, carboidrato e lipídeo conforme a fonte de carboidrato adicionada ao cultivo de camarões (Tabela 2).

Tabela 2. Análise da composição nutricional (proteína, carboidrato e lipídeo) do biofloco em diferentes estudos.

Fonte de carbono	Proteína %	Carboidrato %	Lipídeo %	Autores
Açúcar	49,0	36,4	1,13	Kuhn et al., 2009
Glicerol	43,0	34,0	2,9	Crab et al., 2010
Acetato	42,0	29,0	2,3	Crab et al., 2010
Glicose	28,0	50,0	5,4	Crab et al., 2010
Glicose	28,6		6	Ekasari et al., 2010
Glicerol	31		9	Ekasari et al., 2010
Melaço e farelo de trigo	28,76		2,11	Maicá et al., 2012
Farelo de trigo	35,4	44	1,1	Mahanand et al., 2013
Melaço (90%) e farelo de trigo (10%)	24,7	26,3	0,6	Emerenciano et al., 2013
Açúcar	26,64	21,77	0,11	Presente estudo
Melaço	30,03	22,06	0,85	Presente estudo

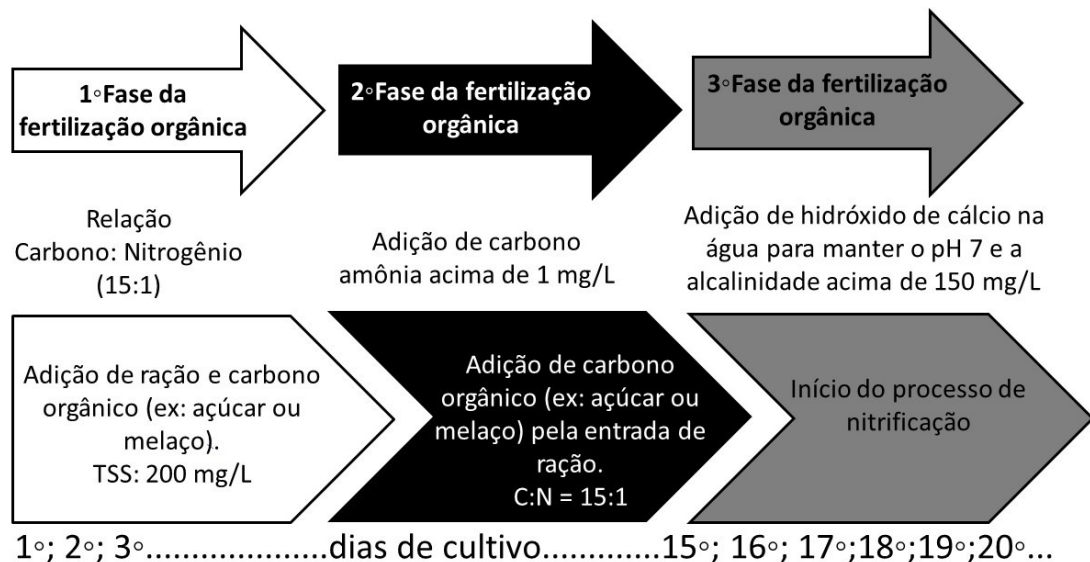
Fonte: Adaptado de Avnimelech (2009).

Contudo, além da fonte de carboidrato influenciar a composição nutricional do biofloco outros fatores como: o volume de sólidos totais, a densidade de estocagem dos organismos cultivados, a idade do floco, a salinidade da água e a comunidade bacteriana e do fitoplâncton contribuem para diferentes porcentagens de nutrientes (SAMOCHA et al., 2017; KHATOON et al., 2016; WEI, LIAO, WANG, 2016; EMERENCIANO; GAXIOLA; CUZO, 2013; DE SCHRIVVER; VERSTRAETE, 2009). Conforme relatado por Schweitzer et al. (2013), a maior porcentagem de proteínas e menor porcentagem de cinzas no sistema de bioflocos está relacionada à maior produção de biomassa bacteriana. Esses autores concluem que a entrada contínua de carbono orgânico no sistema resulta em um floco mais nutritivo para o camarão. Porém, o baixo teor de cinzas aumenta a digestibilidade de outros ingredientes na dieta, resultando em excelente desempenho zootécnico do organismo cultivado (WEI, LIAO, WANG, 2016).

De acordo com o protocolo adotado no Laboratório de Camarões Marinhos (LCM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), o sistema de bioflocos tem três fases distintas. A primeira fase é feita com a adição do fertilizante orgânico e ração moída três dias antes do povoamento dos camarões. A intenção é estimular, primeiramente, o crescimento de bactérias heterotróficas e estas irão assimilar os compostos nitrogenados formando biomassa bacteriana (AVNIMELECH, 2012). A segunda fase é marcada por picos de composto nitrogenados,

principalmente a amônia, sendo necessária a correção através da adição de carbono orgânico no sistema, além da adição diária pela entrada de ração. Na terceira e última fase, ocorre a nitrificação do sistema, com a presença de bactérias quimioautotróficas que utilizam compostos inorgânicos, transformando a amônia em nitrito e o nitrito em nitrato. Neste momento também é possível observar um acúmulo de nitrito no sistema sendo necessária a adição de hidróxido de cálcio para corrigir o pH e manter a alcalinidade acima de 150 mg/L para as bactérias quimioautotróficas. Ao final do cultivo nota-se o acúmulo de nitrato no sistema de bioflocos revelando o processo de nitrificação (Figura 4).

Figura 4. Esquema do desenvolvimento temporal do manejo de fertilização orgânica adotada no Laboratório de Camarões Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina para o *Litopenaeus vannamei* em sistema de bioflocos.



Fonte: Adaptado de Espírito Santo (2014).

A nitrificação em água salgada leva cerca de 20 dias para se estabelecer em um sistema bioflocos, período durante o qual é comum ter picos de compostos nitrogenados (OTOSHI; MOSS, 2011). Isso devido ao longo tempo de geração dessas bactérias, que é na ordem de 12 hs versus cerca de 30 min para bactérias heterotróficas (AVNIMELECH, 2009). Porém, ao compararmos o desempenho das bactérias quimioautotróficas e das heterotróficas, para fixar 1 g de amônia no sistema de bioflocos verificamos que as quimioautotróficas consomem 7,05 g de carbonatos (medido através da alcalinidade) e produzem muito menos biomassa bacteriana (0,2 g), enquanto as bactérias heterotróficas consomem cerca da metade dos carbonatos 3,57 g e produzem uma biomassa bacteriana maior (8,07 g) com aproximadamente o mesmo nível de oxigênio dissolvido consumido (Tabela 3).

Tabela 3. Comparação do consumo de amônia por bactérias heterotróficas e quimioautotrófica através do uso de carbono orgânico, carbonatos e oxigênio dissolvido (O₂) e produção de biomassa bacteriana e dióxido de carbono (CO₂) no sistema de bioflocos.

Por grama de amônia fixada	Heterotrófico	Quimioautotróficas
CONSOME		
Carbono orgânico	15,17 g	-
Carbonatos	3,57 g	7,05 g
O ₂	4,71 g	5,85 g
PRODUZ		
Biomassa bacteriana	8,07 g	0,2 g
CO ₂	9,65 g	5,85 g

Fonte: Adaptado de Ebeling, Timmons, Bisogni (2006).

Essa biomassa bacteriana quando não aproveitada no sistema acaba gerando a formação de lodo rico em matéria orgânica (RAY et al., 2010). Alguns autores relatam efeitos negativos sobre a saúde e o desempenho dos organismos cultivados quando o sistema apresenta altas concentrações de sólidos (GAONA et al., 2012; SCHVEITZER et al., 2013). Além disso, as bactérias heterotróficas liberam muito dióxido de carbono (9,65 g) comparado às quimioautotróficas (5,85 g) que em sistemas sem renovação de água acumulam, e podem causar danos aos organismos cultivados, bem como a redução dos níveis de pH que interferem no processo de nitrificação e demais ciclos como os do carbono (EBELING; TIMMONS; BISOGNI, 2006).

A maior parte do carbono (C) em meio aquático marinho encontra-se sob a forma de carbonatos dissolvidos na água (MADIGAN et al., 2016). Há também consideráveis quantidades de carbono orgânico e particulado na água do cultivo em bioflocos. As bactérias heterotróficas interferem sobre o pH do meio, em geral, abaixando-o (EBELING; TIMMONS; BISOGNI, 2006). Esta situação ocorre devido aos intensos processos de decomposição e respiração, através dos quais há liberação de gás carbônico, que por hidrólise origina ácido carbônico e íons de hidrogênio (Equação 1) (VINATEA, 2010).



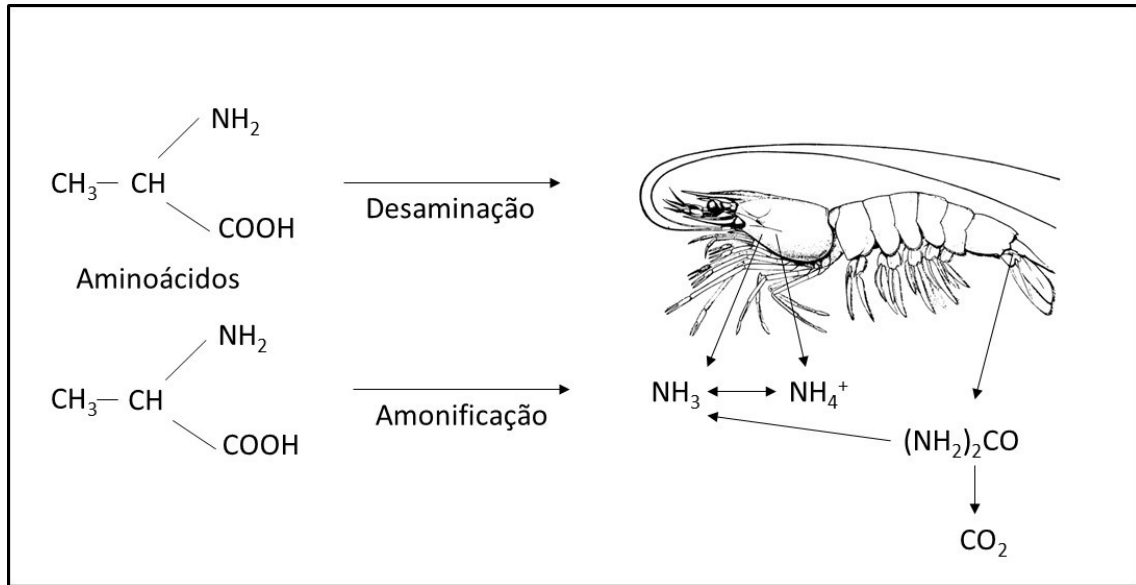
Compostos nitrogenados

Todos os ciclos de nutrientes vinculam de alguma maneira para o ciclo de carbono, porém o ciclo do nitrogênio (N) apresenta ligações especialmente importantes. O carbono e o nitrogênio, com exceção da água, compõem a maior parte dos organismos vivos (MADIGAN et al., 2016). A atmosfera terrestre é composta por 78% de nitrogênio, 21% de oxigênio e 1% de outros gases. O nitrogênio atmosférico encontra-se no estado gasoso e por isso muito estável, possuindo pouca tendência a reagir com outros elementos. O ciclo biogeoquímico deste elemento pode ser dividido em algumas etapas: fixação, amonificação, nitrificação e desnitrificação. A fixação do nitrogênio ocorre pela ação de bactérias que retiram o nitrogênio do ar e faz com que reaja com o hidrogênio formando a amônia. A amonificação pode ser resultado da degradação da matéria orgânica ou pelo processo de fixação no solo, realizado pelas bactérias e fungos. A nitrificação realizada por bactérias é capaz de transformar a amônia em nitratos. A desnitrificação é realizada por bactérias que são capazes de transformar os nitratos em nitrogênio molecular que voltará para a atmosfera e fechará o ciclo.

A amônia é o principal produto do catabolismo das proteínas provenientes da ração ofertada aos camarões (TIMMONS et al., 2002), sendo também o resultado da excreção dos animais cultivados e da mineralização de detritos orgânicos como a ração não consumida e as fezes dos animais cultivados (Figura 5). O aumento da concentração de amônia pode afetar o desempenho zootécnico através da alteração de proteínas na hemolinfa do camarão assim como nos níveis de aminoácidos livres, trazendo consequências como o aumento do consumo de oxigênio e mortalidade (LIN; CHEN, 2001).

O nitrito é um produto intermediário do processo de nitrificação, no qual a amônia é oxidada a nitrito e o nitrito em nitrato. As bactérias que convertem amônia em nitrito têm uma taxa de crescimento mais rápido do que aquelas que convertem nitrito em nitrato, especialmente em água salgada (MADIGAN et al., 2016). O acúmulo de amônia na água pode deteriorar a qualidade da água, reduzir o crescimento, aumentar o consumo de oxigênio e a excreção de amônia-N, alterar as concentrações de proteína na hemolinfa e os níveis de aminoácidos livres e até causar mortalidade no cultivo.

Figura 5. Processos metabólicos de degradação das proteínas que acabam formando amônia.



Fonte: Adaptado de Vinatea (2010).

Os picos de compostos nitrogenados podem causar estresse aos animais, além de prejudicar o crescimento (COHEN et al., 2005). A nitrificação é afetada por fatores ambientais como: temperatura, pH, concentrações de substrato e oxigênio dissolvido (CERVANTES, 2009). A adição de carbono orgânico diminui o oxigênio dissolvido na água de cultivo (DE SCHRYVER; VERSTRAETE, 2009), o que pode interferir no processo de nitrificação do sistema (EBELING; TIMMONS; BISOGNI, 2006). Alguns autores relataram problemas com o acúmulo de nitrito em sistemas de bioflocos que afetaram o desempenho zootécnico do *L. vannamei* (COHEN et al., 2005; VINATEA et al., 2010). Altas concentrações de nitrito podem causar a oxidação de átomos de cobre (Cu^{+1} a Cu^{+2}), de modo que a molécula funcional da hemocianina é convertida em meta-hemocianina, incapaz de transportar o oxigênio para os tecidos (CHEN; CHIN, 1988). Além disso, pode influenciar o processo de muda, pois durante esse processo, o consumo de oxigênio dissolvido é maior nesse período (ARMSTRONG; STEPHENSON; KNIGHT, 1976). Segundo Jayasankar e Mathu (1983), os estágios larvais são mais sensíveis ao nitrito, o que está relacionado ao desenvolvimento ontogenético dos mecanismos de regulação de íons.

Portanto, uma das principais questões sobre o BFT é como obter um sistema estável mais rapidamente, com o objetivo de evitar picos de compostos nitrogenados, em especial de amônia e nitrito e ter bons resultados zootécnicos no cultivo de camarão. Uma alternativa eficaz é reaproveitar a água por diversos ciclos e utilizar a comunidade microbiana formada nos tanques para a manutenção da qualidade de água, conhecido como sistema maduro

(KRUMMENAEUER et al., 2014). Porém o acúmulo de nitrato ao final do cultivo, pode ser um fator limitante na reutilização de água durante vários ciclos de cultivo (LARA, 2012). Prangnell et al. (2016) avaliaram a composição iônica da água e observaram que o estrôncio (Sr^+) precisa ser suplementado na água usada para sucessivos ciclos de cultivo do camarão marinho em bioflocos. O estrôncio desempenha um papel importante na mineralização de exoesqueletos dos crustáceos, que está diretamente relacionada ao crescimento do camarão. Pesquisas futuras são necessárias para investigar esse ponto e determinar se outros microelementos podem contribuir para essa diferença no desempenho do camarão. Além disso, é difícil ter um total controle sobre as comunidades microbianas que irão se formar ao longo do cultivo, devido à complexidade das interações que ocorrem dentro dos tanques ou viveiros.

Outra opção para evitar os picos de compostos nitrogenados é fertilizar o tanque, previamente, com sais de cloreto de amônio (NH_4Cl) e nitrito de sódio (NaNO_2) acelerando o processo de nitrificação do tanque. Os sais fornecem substratos para bactérias quimioautotróficas imediatamente, em vez de esperar que amônia e nitrito se acumulem naturalmente no tanque de cultivo (OTOSHI; MOSS, 2011). Alguns autores já testaram esses sais no cultivo de camarão e de tilápia e observaram um rápido processo de nitrificação nos tanques de cultivo (SESUK; POWTONGSOOK; NOOTONG, 2009; OTOSHI; MOSS, 2011; LARA et al., 2016).

Metagenômica

Para o avanço da aquicultura informações relacionadas à diversidade e dinâmica microbiana no sistema de bioflocos torna-se indispensável. A análise metagenômica pode fornecer informações relacionadas à diversidade dos microrganismos que prosperam em determinada área e pode revelar inclusive informações relacionadas às suas funções e papéis biológicos.

A comunidade bacteriana desempenha um importante papel no sistema de cultivo em bioflocos, são responsáveis pela ciclagem dos nutrientes auxiliando na qualidade de água, nutrição, saúde e desempenho zootécnico dos organismos aquáticos (BURFORD et al., 2003; MARTÍNEZ-CÓRDOVA et al., 2017; AGUILERA-RIVERA et al., 2014; EMERENCIANO et al., 2017). O uso de métodos tradicionais para cultivar as bactérias e realizar um estudo da comunidade bacteriana tem limitações, pois cerca de 99% das bactérias não podem ser cultivadas (STREIT; SCHMITZ, 2004). Na última década, a tecnologia de metagenômica foi desenvolvida para superar essas dificuldades. Essa técnica usa a abordagem de sequenciamento

de 16S rRNA de alto rendimento. O gene 16S rRNA é o marcador mais abrangente disponível, uma vez que possui boa resolução filogenética entre as bactérias e um dos maiores bancos de dados de sequências de DNA (HUGENHOLTZ; SKARSHEWSKI; PARKS, 2016; YANG; WANG; QIAN, 2016). Portanto, essa metodologia permite elucidar as interações que ocorrem no tanque de cultivo com os parâmetros físico-químicos da água e comunidade bacteriana.

Cardona et al. (2016) forneceram as primeiras informações que descrevem a complexa comunidade microbiana no sistema de bioflocos usando melaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono orgânico. Wei, Liao, Wang (2016) demonstraram que diferentes fontes de carbono (glicose, amido e glicerol) interferem na composição nutricional e na comunidade microbiana. Deng et al. (2017) investigaram que diferentes fontes de carbono orgânico (farinha de tapioca, celulose de planta e combinação das duas fontes) afetaram a diversidade microbiana no cultivo de *Pelteobagrus vachelli*. Muitas pesquisas mostraram que os microrganismos presentes nos sistemas de BFT desempenham um papel importante no fornecimento de nutrientes essenciais, e com isso a comunidade microbiana pode ser moldada pela fonte de carbono adicionada (DENG et al., 2017).

As *Proteobactérias* e *Bacteroidetes* são as bactérias dominantes na aquicultura e encontradas na maioria dos estudos em sistemas de bioflocos (WEI, LIAO, WANG, 2016; LUO et al., 2017; MARTINEZ-CORDOVA et al., 2018; CIENFUEGOS et al., 2018; DENG et al., 2017; MARTINS et al., 2020). São responsáveis por compor a maioria da diversidade bacteriana no oceano (MADIGAN et al., 2016), sendo as *Proteobactérias* responsáveis por um dos maiores filos. São bactérias Gram-negativas e algumas delas são responsáveis pela fixação do nitrogênio (FALKIEWICZ-DULIK et al., 2005). Estão divididas em cinco classes: alfa, beta, gama, delta e epsilon (MADIGAN et al., 2016). Os *Bacteroidetes* são bactérias Gram-positivas e são conhecidas por sua significativa diversidade metabólica, além de serem importantes na degradação de vários biopolímeros e compostos húmicos (MADIGAN et al., 2016). São divididos em três classes: *Bacteroides*, *Flavobacteria* e *Sphingobacteria*.

JUSTIFICATIVA

O cultivo em sistema de bioflocos é uma tecnologia recente que necessita de adaptações e um maior conhecimento. Diversas pesquisas visando à otimização do sistema estão sendo desenvolvidas como: densidade de estocagem ótima, diferentes fontes de fertilização orgânica, controle de sólidos, uso de substratos verticais, manejo alimentar, reúso da água entre outras. Porém, há alguns obstáculos para prosseguir o desenvolvimento sustentável do sistema de

bioflocos. Uma questão que muito se discute são os picos de nitrito, que quando mal manejados, podem ultrapassar os níveis de segurança para os camarões tendo consequência no desempenho zootécnico. Além disso, o aumento de sólidos em excesso devido à fertilização constante com carbono orgânico para as bactérias heterotróficas torna o sistema insustentável. Portanto, este estudo justifica-se por aprimorar as técnicas que contribuam para a manutenção das concentrações de amônia e nitrito abaixo dos níveis tóxicos aos animais cultivados através da estimulação, prévia, de bactéria quimioautotróficas no sistema, resultando em menor volume de sólido formado em comparação ao sistema heterotrófico convencional.

1.1. OBJETIVOS DO TRABALHO

1.1.1. Objetivo Geral

Contribuir para o desenvolvimento do sistema superintensivo de cultivo de camarões marinhos, através da manipulação da comunidade microbiana do bioflocos.

1.1.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o uso de sais de cloreto de sódio e nitrito de sódio para estimular o crescimento de bactérias quimioautotróficas e comparar com sistema de bioflocos com fertilização inicial (heterotrófico) e com inóculo de bioflocos maduro na qualidade de água, na comunidade bacteriana, no efluente gerado, na composição nutricional do flocos e no desempenho zootécnico do camarão-branco-do-pacífico na fase de berçário (PL 20 a 1-2 g).

- Avaliar o uso de sais de cloreto de sódio e nitrito de sódio para estimular o crescimento de bactérias quimioautotróficas e comparar ao sistema de bioflocos com fertilização inicial (heterotrófico) e com inóculo de bioflocos maduro na qualidade de água, na comunidade bacteriana, no efluente gerado, na composição nutricional do flocos e no desempenho zootécnico do camarão-branco-do-pacífico na fase de engorda (2 g a 12 g).

1.2. ESTRUTURA DO TRABALHO

A tese está dividida em dois capítulos: o primeiro referente ao artigo científico original (primeiro artigo) sobre o primeiro objetivo específico publicado no periódico *Aquacultural*

Enginnering e o segundo capítulo refere-se ao artigo científico original sobre o segundo objetivo específico que será enviado ao periódico Aquaculture.

2. ARTIGOS CIENTÍFICOS

2.1 STRATEGIES FOR AMMONIUM AND NITRITE CONTROL IN *Litopenaeus vannamei* NURSERY SYSTEMS WITH BIOFLOCS

Gabriela Soltes Ferreira, Vitor Fernandes Silva, Mateus Aranha Martins, Ana Clara Chede Pereira da Silva, Cláudia Machado, Walter Quadros Seiffert, Felipe do Nascimento Vieira*

Laboratório de Camarões Marinhos, Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil.

*Corresponding author. Tel:+554837214103. E mail address: felipe.vieira@ufsc.br (Vieira, F.N.). Servidão dos Coroas, 503, Barra da Lagoa, 88061600, Florianópolis, SC, Brazil.

ABSTRACT

In biofloc technology (BFT) rearing systems, nitrogen compounds, especially ammonia and nitrite, have to be controlled by microbial pathways, mainly through the activity of heterotrophic and chemoautotrophic bacteria. The objective of this work was to assess different water preparation strategies (heterotrophic, chemoautotrophic and mature) in BFT system for nursery of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). A 35-day study was conducted with post-larvae shrimp (0.08 g) stocked in twelve 300 L tanks at a stocking density of 2000 shrimp m⁻³. The water preparation strategies for shrimp rearing that were evaluated in this study included: i) Heterotrophic treatment, where the water received sugar as a carbon source; ii) Chemoautotroph treatment, where ammonium and nitrite salts were added to the water; and iii) Mature treatment, which was created by the addition of a significant amount (30%) of water containing mature biofloc from another established BFT system. In both mature and chemoautotrophic treatments, the nitrification process was able to keep toxic nitrogen compounds (ammonia and nitrite) at low levels without the addition of carbohydrates. In contrast, heterotrophic system showed peaks of ammonia and nitrite during the rearing cycle, and the level of these compounds were found to be higher in this treatment. The chemoautotrophic system exhibited a lower abundance of bacteria from the family *Vibrionaceae* in the beginning of the experiment compared to the heterotrophic and mature treatments. The combination of low *Vibrionaceae* abundance and good water quality resulted in improved growth performance in this treatment. These findings demonstrate the importance of manipulating the environment of BFT systems to induce an enrichment of nitrifying bacteria before stocking shrimp. We have also found that the addition of a carbon source to BFT systems is necessary only in emergency situations, when ammonia spikes need to be controlled.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, microbiology, nitrification, *Vibrionaceae*, ammonium chloride, sodium nitrite.

2.1.1 Introduction

The total global production of farmed shrimp reached more than 7.9 million tons in 2016, representing a value of nearly 57.1 million U.S. dollars. Countries in Latin America and East and Southeast Asia account for the major share of shrimp production (FAO, 2018). Nevertheless, shrimp aquaculture production has been suffering serious disease outbreaks (Subasinghe, 2017). Outbreaks of Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND), white spot syndrome virus (WSSV) and infectious myonecrosis virus (IMN) have recently expanded in these regions, causing substantial impacts to the industry (FAO, 2018).

Vibrio spp. are autochthonous to marine environments and are part of the microbiota of marine organisms, thus representing a widespread source of potential infections. Environmental factors, such as temperature, salinity, pH, carbon dioxide and nitrogen compounds, may have a significant effect on triggering infection by *Vibrio* (Brock and Main, 1994). The basic principle of aquatic animal health management relies on the interplay between host, pathogen and environmental conditions. Biofloc Technology (BFT) represents a novel approach designed to enhance production while maintaining the balance between host, pathogen and the environment (Meyer et al., 1983).

BFT has advantages over semi-intensive shrimp farming systems, such as improved space utilization, reduced water usage and reduced effluent discharge (Bossier and Ekasari, 2017). In addition, it is considered a sustainable and environmentally friendly technology because it employs low/no water exchange, reducing the risk of disease outbreaks (Burford et al., 2004; Ootshi and Moss, 2011). According to Poersch et al. (2012), semi-intensive farming systems employ a stocking density of 20 to 30 shrimp m⁻², consume 65,000 L of water kg⁻¹ and yield 6,000 kg ha⁻¹ with feed conversion ratio of 1.5 and survival rate of 60 - 70%. On the other hand, biofloc systems employ a stocking density of 120 shrimp m⁻², consume only 1,000 L of water kg⁻¹ and yield 1.5 kg ha⁻¹ with feed conversion ratio of 1.3 and survival rate of 80 - 90%. The improved performance of BFT systems demands a high investment in labor, facilities and equipment (e.g. aerators, pumps, heaters, greenhouses and liners) (Hargreaves, 2013). Nonetheless, some producers, mainly from Latin America, have opted for this technology for rearing early life stages of marine shrimp. For instance the rearing of shrimp post-larvae (PL) to juveniles (~2 g), which is called nursery phase, has been successfully performed in indoor BFT facilities (Coelho et al., 2007; Foes et al., 2011; Wasielesky et al., 2013; Silva et al., 2015).

In classic nursery systems, daily water exchange is required to remove toxic nitrogen compounds produced by the animals, and, in subtropical regions, such as southern Brazil, it is

necessary to heat and pump the rearing water, which results in additional energy cost. The super-intensive BFT nursery system, in contrast, enables a more efficient use of the water as well of the food resources. The low/no water exchange contributes to system biosecurity as it minimizes the risk of pathogen entry, and substantially reduces effluent discharge into the environment. The suspended microbial flocs present in the system act as a supplementary food source, allowing the reduction of the crude protein content required in the feed (Wasielesky et al., 2006; Esparza-Leal et al., 2015).

The BFT nursery system has become a valuable asset for the sustainable production of marine shrimp, since it provides the conditions to maximize yield and profit, while limiting the risks of disease outbreaks (Crab et al., 2012). The increase in efficiency of BFT nursery system is associated with good management strategies at the initial stages of rearing, when shrimp are more susceptible to environmental variations and infectious diseases (Wasielesky et al., 2006). Thus, by enhancing survival and growth rates at early life stages, the overall production (yield) can be considerably improved (Moss and Moss, 2004; Wasielesky et al., 2013). In this context, the shorter length of the final grow-out phase enables the execution of a higher number of rearing cycles per year, which, in turn, reflect in greater economic benefits to the producer (Mishra et al., 2008). However, one of the main challenges regarding BFT, particularly during shrimp early developmental stages, is to be able to achieve the ideal environmental conditions rapidly, to maintain them at constant levels during the operation cycle, preventing the accumulation of nitrogen compounds such as ammonia and nitrite.

In aquaculture systems, nitrogen compounds can be recycled basically by three pathways: heterotrophic bacteria, chemoautotrophic bacteria and microalgae (Ebeling et al., 2006). The use of carbon sources in intensive systems promotes the succession and dominance of bacteria over microalgae (Baloi et al., 2013; González-Félix et al., 2007; Ju et al., 2008). Therefore, the removal of nitrogenous compounds in BFT-based systems is performed mainly by heterotrophic and chemoautotrophic bacteria, and the process depends on the C:N ratio present in the system (Avnimelech, 1999). Heterotrophic bacteria require organic carbon such as sugar, dextrose or molasses as source of energy, in addition to requiring a C:N ratio higher than 10:1. Chemoautotrophic bacteria have slower growth rates and use inorganic carbon instead. As a result, the C:N ratio is lower in chemoautotrophic systems (6:1) (Ebeling et al., 2006).

When comparing the performance of chemoautotrophic and heterotrophic bacteria while fixing 1 g of ammonia in a BFT system, chemoautotrophic bacteria consume 7.05 g of carbonates and produce a very low bacterial biomass (0.2 g), whereas heterotrophic bacteria

consume less carbonates (3.57 g) but produce a much larger bacterial biomass (8.07 g). This represents a 40-fold production increase with approximately the same level of dissolved oxygen utilization (Ebeling et al., 2006). When this bacterial biomass is not consumed in the system, it ends up accumulating in the form of sludge. Given that the sludge produced in BFT systems is rich in organic matter (which is quantified through total suspended solids), it needs to be periodically removed from the system, and this increases the cost of production (Ray et al. 2010). In addition, heterotrophic bacteria release a higher carbon dioxide load (9.65 g) compared to chemoautotrophic bacteria (5.85 g). This is of particular concern because carbon dioxide tends to accumulate in systems with no/low water exchange, inducing the decrease of water pH levels and having the potential to cause damages to the shrimp (Ebeling et al. al., 2006).

Therefore, BFT operates over two different phases, an initial heterotrophic phase that requires the addition of organic carbon and a subsequent chemoautotrophic phase without additional organic carbon in the system. The bacterial community takes several weeks to stabilize in BFT, due to the complexity of the interactions that occur in the system. To overcome this, some initiatives have tested the reuse of the water over multiple production cycles, which have been shown to be effective in avoiding spikes of nitrogen compounds. The fundamental principal of this practice, known as mature system, is to make use of the already established microbial community to inoculate the new tank (Krummenauer et al., 2014). However, the lack of information on the microbial community composition and the accumulation of compounds in the system can be limiting factors for the reuse of water, as poor conditions could induce diseases outbreaks and production losses (Furtado et al., 2015; Xu et al., 2016).

The use of chemoautotrophic bacteria at the initial phase of BFT systems has the potential to prevent the formation of excess sludge and spikes of nitrogen compounds, which are often observed when inoculation of mature water is not performed (Krummenauer et al., 2014). Furthermore, the process of nitrification has been found to be accelerated by the addition of either ammonium chloride or sodium nitrite for tilapia and shrimp rearing in BFT (Sesuk et al., 2009; Otoshi and Moss, 2011; Lara et al., 2016). Therefore, the use of inorganic salts in BFT systems could accelerate the establishment and activity of nitrifying bacteria, thus avoiding spikes of ammonia and nitrite in the system. In this work, we assessed different strategies for water preparation (heterotrophic, chemoautotrophic and mature) for nursery of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in BFT system.

2.1.2 Material and methods

This study was carried out at the Laboratório de Camarões Marinhos (LCM), Estação de Maricultura Elpídio Beltrame, Barra da Lagoa, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. Post-larvae (PL20) of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* were obtained in August 2017 from a commercial hatchery (Aquatec LTDA, Rio Grande do Norte, Canguaretama, Brazil). This breeding line (HB12) was free of any shrimp disease listed by the World Animal Health Organization (OIE). PL20 were reared in a 50 m³ circular tank at a stocking density of 625 PLs m⁻³ and salinity of 35 g L⁻¹. The rearing tank operated in a BFT system with no water exchange. Once PL40 stage was reached, shrimp were transferred to the experimental units.

2.1.2.1 Experimental units and maintenance

The experiment was performed in a randomized way and included three treatments with four replicates each. A total of 600 shrimp weighing 0.08 g (± 0.02 g; SD) were split into 12 fiberglass tanks, each containing 300 L of water (0.58 m² bottom area). Water temperature was controlled by a Full Gauge thermostat coupled with 500 W titanium heaters (MT512 RI, Porto Alegre, RS) set to maintain the temperature at $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Aeration was kept constant by diffusion hoses (Aero Tube[®]) connected to a 7.5 HP air blower (Ibram Indústria Brasileira de Máquinas e Equipamentos, São Paulo, SP). Four artificial substrates (needlona[®]) were distributed uniformly in each tank, resulting in an increase of 100% of tank surface area (additional area of 0.58 m²). The tanks were kept in an isolated room and were subjected to a photoperiod of 12:12 light/dark cycles, by using a 15 W compact fluorescent lamp (Digital Hikari HK-881A, São Paulo, SP), which provided light intensity of 25833.3 ± 533.9 lx at the water's surface. To maintain total alkalinity at the target level (>120 mg L⁻¹), calcium hydroxide was added at 20% of the amount of feed provided. Water was not exchanged during the experiment; water loss due to evaporation was replaced with freshwater. Shrimp feed (Guabi Potimar 40PL – containing 40% of crude protein) was added to the tanks four times a day according to Van Wyk and Scarpa's (1999) feeding table. After 1 h, feed consumption was verified by using a fishing net, and feeding adjustments were calculated according to consumption rate. The experiment was carried out for 35 days.

2.1.2.2 Description of the biofloc systems

The experiment evaluated the rearing of shrimp post-larvae in three different biofloc systems: heterotrophic, chemoautotrophic and mature biofloc.

2.1.2.2.1 *Heterotrophic system*

Three days before stocking, water was fertilized with feed and white sugar at carbon/nitrogen ratio (C:N) of 15:1 in order to reach 200 mg L⁻¹ of total suspended solids (TSS) at the beginning of the rearing period. During the experiment, when total ammonia nitrogen (TAN) surpassed 1 mg L⁻¹, extra sugar was added to the system at a ratio of 20 g of sugar per each gram of TAN.

2.1.2.2.2 *Chemoautotrophic system*

During 25 days before stocking, filtered seawater (400 L) was fertilized with 1 mg L⁻¹ of NaNO₂ (Neon Comercial, São Paulo, SP) and 1 mg L⁻¹ of NH₄Cl (Neon Comercial, São Paulo, SP) per day in a bioreactor tank (Otoshi and Moss, 2011). The bioreactor tank was equipped with 16 artificial substrates (needlona[®]) and distributed in each tank (n=4), heaters and aeration system, without light exposure. After 25 days, the four experimental tanks of the chemoautotrophic treatment were prepared by mixing 100 L of water from the bioreactor tank (33 g L⁻¹) and 200 L of seawater. Water quality parameters in the bioreactor tank at day 25 were as follows: salinity 34.5 g L⁻¹, TAN 0.002 mg L⁻¹, alkalinity (CaCO₃) 272 mg L⁻¹, pH 8.5, temperature 28.5°C, DO 6.83 mg L⁻¹, nitrite (NO₂-N) 0.02 mg L⁻¹ and nitrate (NO₃-N) 47.64 mg L⁻¹, indicating that the process of nitrification had started.

2.1.2.2.3 *Mature biofloc system*

The experimental tanks of the mature biofloc treatment (n = 4) were by mixing 90 L (Ferreira et al., 2020) of water from a biofloc tank stocked with shrimp (30%; matrix tank) and 210 L of seawater. The matrix tank was a 9 m³ circular tank stocked with 300 adult shrimp m⁻³ (weight = 21.3 ± 0.52 g). Water quality parameters of matrix tank were as follows: salinity 37 g L⁻¹, TAN 0.21 mg L⁻¹, alkalinity 136 mg L⁻¹, pH 8.01, TSS 450 mg L⁻¹, orthophosphate 1.2 ± 0.08 mg L⁻¹, nitrite 0.12 mg L⁻¹ and nitrate 41.7 mg L⁻¹, indicating that the process of nitrification had occurred.

2.1.2.3 Shrimp performance

Weekly measurements of shrimp weight under each of the three treatments were taken throughout the study (n = 30 shrimp per tank; 4 tanks per treatment), using a digital scale with two decimal places (BEL Equipamentos Analíticos, Piracicaba, SP). Following 35 days of experiment, the following performance parameters were evaluated: mean final weight, growth rate per week, final biomass, survival rate, feed conversion ratio and yield.

2.1.2.4 Water quality variables

Dissolved oxygen (DO) and temperature (YSI 550A Dissolved Oxygen Meter) were monitored twice a day. TAN, nitrite, alkalinity (APHA, 2005 – 2320B), salinity (YSI 30 Digital Salinity Meter) and pH (Tecnal Tec-5, Piracicaba, SP) were monitored three times per week. Nitrate, orthophosphate, total suspended solids (TSS) (APHA, 2005 – 2540D), volatile and fixed solids (APHA, 2005 – 2540E), and settleable solids volume (Imhoff cones) were analyzed once a week. TAN, nitrite, nitrate and orthophosphate were measured using the colorimetric method according to the procedure described by Strickland and Parsons (1972).

2.1.2.5 Amount of sludge

To maintain the required total suspended solids (TSS) levels for shrimp rearing, a 90 L settling chamber (adapted from Ray et al., 2010) was attached to each tank and was operated at a flow rate of 650 L h⁻¹ when the TSS reached a concentration of 600 mg L⁻¹ (Schveitzer et al., 2013). The amount of sludge was evaluated each time the solid was removed from each tank. A sample was collected in a 50 mL decanter, filtered with 47 µm microfilter fiberglass (Mancherey Nagel, German), and dried at 105°C during 24 h (APHA, 2005 – 2540 D). At the end of the experiment, the amount of sludge was quantified using the following formula:

$$\text{Amount of sludge} = (\text{TSS final} \times V) - (\text{TSS initial} \times V)/100 + \text{SR}$$

TSS final = final concentration of total suspended solids of experiment in mg L⁻¹.

V = volume of the tank in L.

TSS initial = initial concentration of suspended solids of experiment in mg L⁻¹.

SR = amount of solids withdrawn from the system in g.

2.1.2.6 System fertilization

In order to fertilize the BFT rearing systems, the different inputs were used, as follows: feed, sugar and calcium hydroxide were added to the heterotrophic system; feed, calcium hydroxide and salt (sodium nitrite and ammonium chloride) were added to the chemoautotrophic system; and feed and calcium hydroxide were added to the mature system.

2.1.2.7 Microbiological parameters of the water

Water samples (10 mL) were collected from each tank at the beginning and at the end (day 35) of the experiment, using 15 mL sterile test tubes. Aliquots of 1 mL were inoculated in serial dilutions (seven-fold) in tubes containing saline solution (3% NaCl). The assessment of viable heterotrophic bacteria and *Vibrionaceae* present in the water was performed by seeding about 100 μL of the water samples on Petri plates containing bacteriological culture medium Marine Agar or Thiosulphate Citrate Bile Sucrose (TCBS), respectively. Seeded media were incubated in a microbiological oven at 30°C. After 24 h incubation, the colony forming units per milliliter (CFU mL⁻¹) were counted.

2.1.2.8 Floc analysis

At the end of the experiment, solid samples were collected (as described in section 2.5), freeze-dried (Freeze drier L101 Liotop, Liobras), and sent to the physicochemical analysis laboratory (CBO, Campinas, SP). Floc samples were analyzed for proximate composition according to the methodology reported by Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal (2013). Carbohydrate content was calculated according to the following formula: nitrogen-free extract (% DW) = 100 - ((crude protein [% DW] + ethereal extract [% DW] + ash [% DW])) (Manush et al., 2005).

2.1.2.9 Statistical analysis

The data were subjected to Shapiro-Wilk and Bartlett tests to verify normality and homoscedasticity, respectively (significant at 5% level). Data from mean final weight, growth rate, feed conversion ratio assessments were transformed by square root, microbiological data were log₁₀ transformed, while angular transformation was used for survival rate. Unifactorial

ANOVA was applied, and when statistically significant differences were detected ($p < 0.05$), Tukey's multiple comparison test was performed. Two-way ANOVA with repeated measurements was used for the analysis of TAN and nitrite. Treatments were considered the main factors, and the rearing weeks the additional factor. Statistically significant differences among treatments and rearing weeks were analyzed using the Tukey's test.

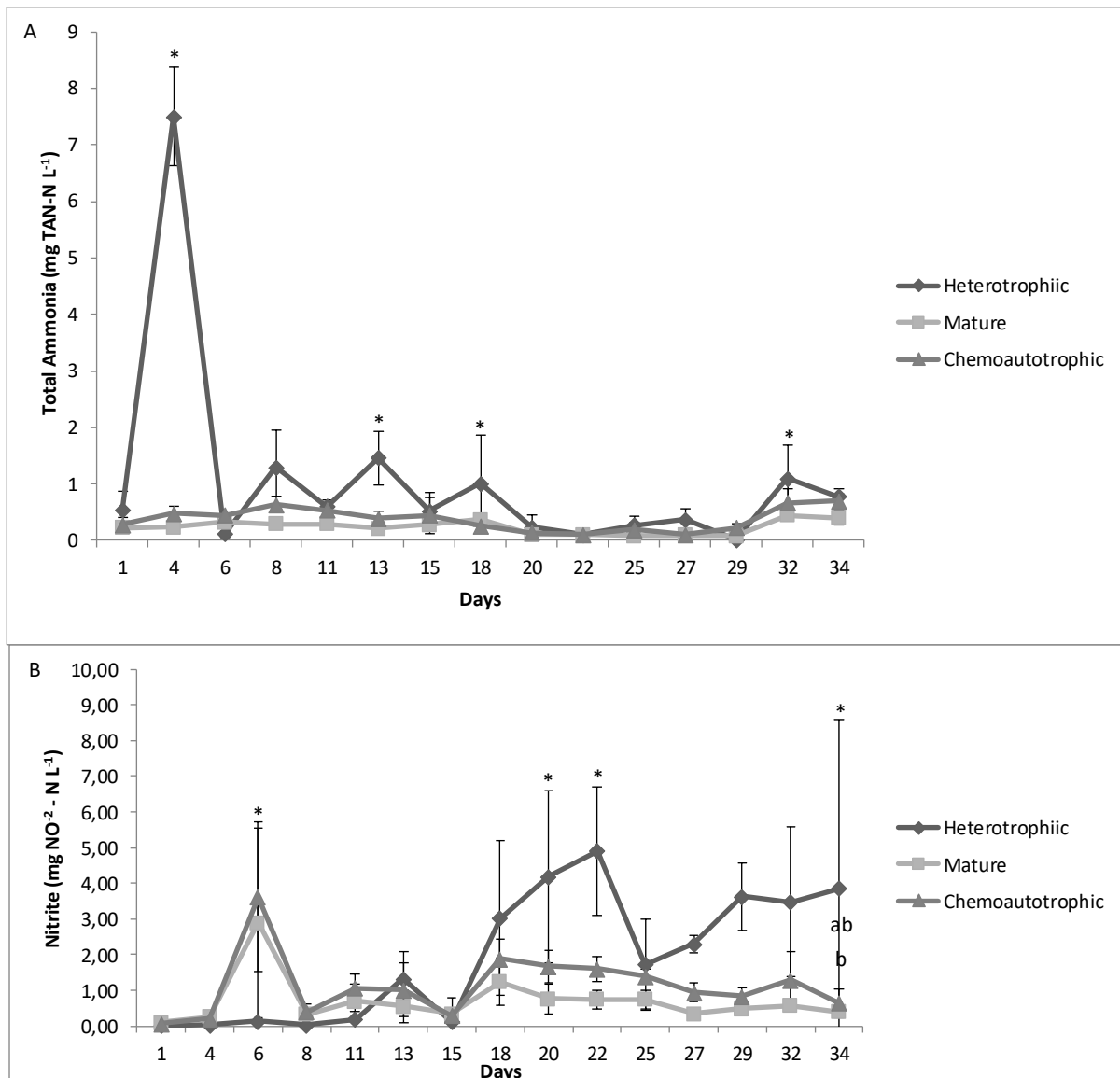
2.1.3 Results

2.1.3.1 Water quality variables

The rearing system had an effect on the DO concentration ($p = 0.04$), which was found to be lower in the heterotrophic treatment compared to the mature and chemoautotrophic treatments (Table 1). The mature treatment showed lower alkalinity ($p < 0.0001$) in comparison to the heterotrophic and chemoautotrophic treatments (Table 1). To correct alkalinity, calcium hydroxide was added to the experimental tanks at different levels: (i) 55.41 ± 4.25 g was added to the heterotrophic tanks, (ii) 95.21 ± 12.45 g was added to chemoautotrophic tanks, and (iii) 102.21 ± 5.63 g was added to mature tanks.

TAN ($p < 0.0001$) and nitrite ($p < 0.0001$) were higher in the heterotrophic treatment compared to the mature and chemoautotrophic treatments (Figure 6A, 6B). The heterotrophic system had five peaks of ammonia ($> 1 \text{ mg L}^{-1}$) and one spike of nitrite ($> 4 \text{ mg L}^{-1}$) throughout the experiment. TSS was higher ($p = 0.04$) in the heterotrophic treatment relative to the mature treatment. VSS, FSS and SS were higher ($p = 0.04$) in the heterotrophic treatment compared to both mature and chemoautotrophic treatments.

Figure 6. Total ammonia nitrogen (TAN) (A) and nitrite (B) in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nursery. Tanks were stocked with 2,000 shrimp m^{-3} in biofloc using different systems (heterotrophic, chemoautotrophic and mature) for 35 days.



‡ Means \pm SD. * indicate significant difference ($p < 0.05$) among heterotrophic treatment and other treatments (mature and chemoautotrophic) by Tukey test.

Orthophosphate was found at higher levels ($p < 0.0001$) in the mature treatment, followed by the chemoautotrophic and heterotrophic treatments. No statistically significant differences ($p \geq 0.05$) were observed in temperature, salinity, pH, or nitrate concentration in response to the treatments (Table 4).

Table 4. Water quality variables of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nursery stocked with 2000 shrimp m⁻³ in biofloc using different systems (heterotrophic, chemoautotrophic and mature) for 35 days.

Water quality variables	Treatments		
	Heterotrophic	Mature	Chemoautotrophic
Temperature (°C)	28.7±0.58	28.4±0.58	28.6±0.46
DO (mg L ⁻¹)	5.84±0.32 ^b	6.07±0.28 ^a	5.98±0.29 ^a
Salinity g L ⁻¹	34.23±0.76	34.32±1.02	34.16±0.60
pH	8.18±0.14	8.22±0.12	8.24±0.19
Alkalinity (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	186.78±34.08 ^a	157.30±22.77 ^b	189.21±21.72 ^a
Total Ammonia N-NH ₃ (mg L ⁻¹)	1.06±1.83 ^b	0.24±0.13 ^a	0.37±0.23 ^a
Nitrite NO ₂ -N (mg L ⁻¹)	1.93±2.30 ^b	0.68±0.92 ^a	1.13±1.04 ^a
Nitrate NO ₃ -N (mg L ⁻¹)	9.29±8.94	14.58±12.7	12.36±10.18
Orthophosphate P-PO ₄ ⁻³ (mg L ⁻¹)	0.06±0.07 ^a	1.44±0.36 ^b	0.71±0.52 ^c
Settleable Solids SS (mL L ⁻¹)	6.5±4.82 ^b	3.56±3.31 ^a	3.45±3.96 ^a
Total Suspended Solids TSS (mg L ⁻¹)	491.60±177.64 ^a	337.60±175.10 ^b	400.60±217.15 ^{ab}
Volatile Suspended Solids VSS (%)	48.30±9.37 ^b	34.86±9.79 ^a	36.78±8.35 ^a
Fixed Suspended Solids FSS (%)	51.70±9.37 ^b	65.14±9.79 ^a	63.22±8.35 ^a

Means ± SD. The different letters indicate significant difference (p<0.05) among treatments in the same row as the Tukey test.

2.1.3.2 Amount of sludge and inputs used in the system

The amount of sludge produced by the end of the experiment was higher (p=0.002) in the heterotrophic treatment compared to the chemoautotrophic and mature treatments (Table 5). The highest feed intake was observed in the chemoautotrophic treatment, followed by the heterotrophic and mature treatments. Mature and chemoautotrophic treatments received a higher amount of calcium hydroxide than the heterotrophic treatment in order to correct their alkalinity levels.

Table 5. Inputs of the systems: salt, sugar, feed intake, calcium hydroxide and sludge produced by the Pacific white shrimp *L. vannamei* in nursery using biofloc with heterotrophic, chemoautotrophic and mature biofloc systems for 35 days stocked at a density of 2000 shrimp m⁻³.

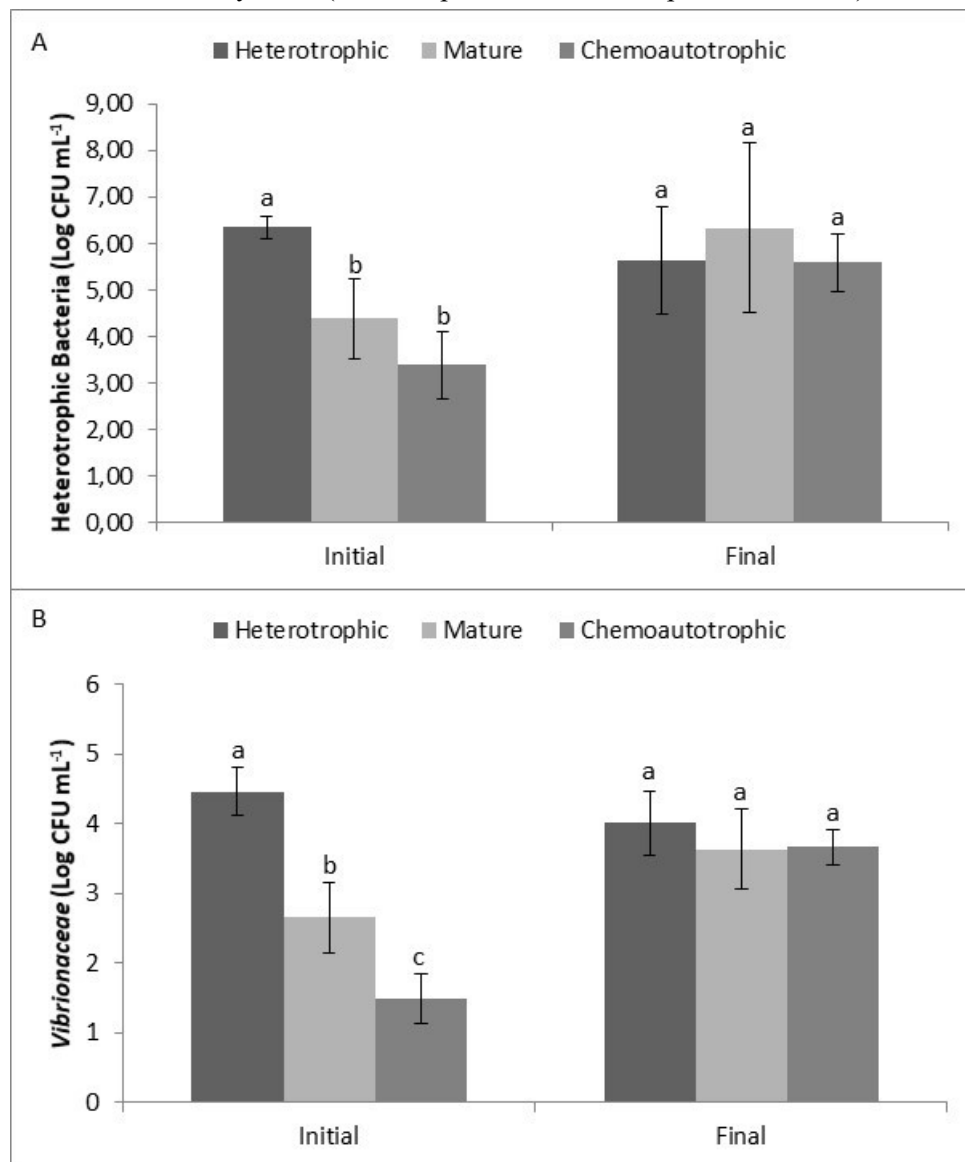
Treatment	Heterotrophic	Mature	Chemoautotrophic
Salt (g)			0.80±0.01*
Sugar (g)	153.5±38.6		
Feed (g)	1002.7±68.9 ^b	839.5±48.8 ^c	1181.2±50.6 ^a
Calcium hydroxide (g)	57.9±5.9 ^a	102.2±5.6 ^b	95.2±12.4 ^b
Sludge (g)	318.6±61.6 ^b	131.1±38.4 ^a	203.4±58.4 ^a

*Salt was added before stocking of shrimp. Means ± SD. Different letters indicate significant difference (p<0.05) among treatments in the same row as the Tukey test.

2.1.3.3 Microbiological parameters of the culture water

At the beginning of the experiment, viable heterotrophic bacteria counts were higher ($p=0.04$) in the heterotrophic system compared to the mature and chemoautotrophic treatments (Figure 7A). Similarly, bacteria from the family *Vibrionaceae* were more abundant in the heterotrophic system relative to the mature and chemoautotrophic treatments at the same time point (Figure 7B). No significant differences ($p \geq 0.05$) in the abundance of viable heterotrophic bacteria and *Vibrionaceae* were observed among treatments at the end of the experiment (Figure 7A and 7B). We found an increase in the abundance of total heterotrophic and *Vibrionaceae* bacteria in the chemoautotrophic and mature treatments throughout the experiment (comparing day 0 and day 35) (Figure 7B).

Figure 7. Total viable heterotrophic and *Vibrionaceae* bacteria count in the water at the beginning (A) and end (B) of the nursery phase of *Litopenaeus vannamei* under different systems (heterotrophic, chemoautotrophic and mature).



‡ Means \pm SD. The different letters indicate significant difference ($p < 0.05$) among treatments in the same day by Tukey test.

2.1.3.4 Characteristics of the biofloc

Crude protein and carbohydrate contents were higher ($p = 0.04$) in the flocs from the heterotrophic treatment compared to those of the mature and chemoautotrophic treatments. Conversely, ash was lower ($p = 0.04$) in the heterotrophic treatment compared to the mature and chemoautotrophic treatments. No significant differences ($p \geq 0.05$) in crude lipid, crude fiber and moisture were observed among the treatments (Table 6).

Table 6. Characteristics of biofloc (centesimal composition) of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nursery stocked with 2000 shrimp m⁻³ in biofloc using different systems (heterotrophic, chemoautotrophic and mature) for 35 days.

Characteristics of Biofloc	Heterotrophic	Mature	Chemoautotrophic
Crude Protein (% DW p:p)	26.64±1.15 ^a	16.9±1.14 ^b	18.29±1.63 ^b
Nitrogen-Free Extract (% DW p:p)	21.77±1.17 ^a	17.85±1.12 ^b	18.37±1.64 ^b
Ethereal Extract (% DW p:p)	0.11±0.02	0.11±0.02	0.12±0.03
Crude Fiber (% DW p:p)	3.44±0.40	3.29±0.74	2.46±1.70
Moisture (% DW p:p)	94.38±0.97	93.98±1.43	94.27±1.50
Ash (% DW p:p)	51.70±9.37 ^a	65.14±9.79 ^b	63.22±8.35 ^b

Means ± SD. Different letters indicate significant difference ($p < 0.05$) among treatments in the same row by Tukey test. DW, dry weight.

2.1.3.5 Shrimp performance

Average body weight ($p=0.01$) and growth rate ($p=0.01$) were higher in shrimp reared in the chemoautotrophic treatment compared to the mature treatment, However, no difference ($p \geq 0.05$) was observed between the heterotrophic treatment and the other treatments. Final biomass ($p=0.01$) and yield ($p=0.04$) were higher in both chemoautotrophic and heterotrophic treatments compared to the mature treatment. No significant differences ($p \geq 0.05$) were observed in survival rate and feed conversion ratio among treatments (Table 7).

Table 7. Pacific white shrimp *L. vannamei* performance in the nursery using biofloc with heterotrophic, chemoautotrophic and mature biofloc systems for 35 days stocked at a density of 2000 shrimp m⁻³.

Parameters	Heterotrophic	Mature	Chemoautotrophic
Mean final weight (g)	1.46±0.21 ^{ab}	1.16±0.03 ^a	1.64±0.15 ^b
Growth rate (g week ⁻¹)	0.29±0.04 ^{ab}	0.23±0.007 ^a	0.32±0.03 ^b
Final biomass (Kg)	0.77±0.12 ^b	0.51±0.07 ^a	0.91±0.03 ^b
Survival (%)	85.1±13.55	73.5±8.94	92.8±6.96
Feed conversion ratio	1.48±0.34	1.64±0.24	1.29±0.04
Yield (Kg m ⁻³)	2.58±0.42 ^b	1.72±0.25 ^a	3.04±0.11 ^b

Means ± SD. Different letters indicate significant difference ($p < 0.05$) among treatments in the same row by Tukey test.

2.1.4 Discussion

This study demonstrated that different water preparation strategies have substantial impact on the biofloc composition, water quality and shrimp performance. During the course of the experiment, both chemoautotrophic and mature systems were able to control the levels of nitrogen compounds within acceptable limits for *Litopenaeus vannamei*, mainly due to the presence of autotrophic nitrifying bacteria from the beginning of the experiment in these systems. Although chemoautotrophic and mature systems showed a similar capacity to prevent the accumulation of nitrogen compounds, shrimp performance was different in these two systems. Specifically, shrimp growth was 41% higher in the chemoautotrophic treatment than that seen in the mature system, and floc compositional analysis could not explain this difference. Floc from mature and chemoautotrophic treatments had equivalent protein and carbohydrate content. Prangnell et al. (2016) evaluated the ionic composition of shrimp rearing water and observed that strontium (Sr^+) may need to be supplemented into the water used in successive no/low-exchange culturing cycles. Strontium plays a role in crustacean exoskeleton mineralization which is directly related to shrimp growth. Further research should investigate this point and determine if other microelements could also contribute to this difference in shrimp performance between rearing conditions.

Over the course of this experiment, the heterotrophic treatment displayed a higher number of spikes of nitrogen compounds, which were controlled by the addition of sugar as a carbon source. Although ammonia and nitrite can be lethal to shrimp, short-term exposure to ammonia and nitrite at the concentrations observed in this study (7.5 mg L^{-1} and 4.9 mg L^{-1} , respectively) should be considered of secondary importance given their limited (or lack thereof) impact on the health and survival of shrimp. In general, the nitrifying bacterial community takes about 20 days to establish itself in a biofloc system without inoculation of mature water, during which it is common to find spikes of nitrogen compounds in the water (Otoshi and Moss, 2011). Such conditions have been shown to be stressful to the animals, hindering their growth (Cohen et al., 2005). The accumulation of nitrite at the midpoint of the experiment in the heterotrophic system indicates that the nitrification process is occurring in the tanks. Bacteria that convert ammonia into nitrite have faster growth rate than those that convert nitrite to nitrate, especially in saltwater (Madigan et al., 2016). Nitrifying bacterial and, as consequences, the nitrification process, are affected by environmental factors, such as temperature, pH, substrate concentrations, inhibiting factors and dissolved oxygen (Cervantes, 2009).

Previous studies have reported that nitrite accumulation in biofloc systems affects *L. vannamei* growth performance, through its effects on multiple physiological processes (Cohen et al., 2005; Vinatea et al., 2010). For instance, high concentrations of nitrite can cause the oxidation of copper atoms (Cu^{+1} to Cu^{+2}) such that the functional hemocyanin molecule is converted into meta-hemocyanin which cannot reversibly bind molecular oxygen to tissues (Chen and Chin, 1988). This change can also influence the molting process because during this process oxygen consumption is higher (Armstrong et al., 1976). In addition, according to Jayasankar and Mathu (1983), the larval stages are more sensitive to nitrite due to the ontogenetic development of ion regulation mechanisms.

In the present study, the centesimal composition of floc from the heterotrophic treatment (crude protein 26.64% and carbohydrate 21.77%) may have compensated for the physiological stress derived from the spikes of nitrogen compounds. The microbial community might have contributed to the higher protein level than that observed in the mature or chemoautotrophic systems. The floc protein level was comparable to 24.7% and 28%, as detected by Emerenciano et al. (2013) and Crab et al. (2010), respectively, and less than 35.4% reported by Mahanand et al. (2013).

The nutritional composition of the floc is dependent on the carbohydrate source, total suspended solids, stocking density, age of the floc as well as the bacterial and microalgal communities present in the system (De Schryver and Verstraete, 2009; Emerenciano et al., 2013; Wei et al., 2016; Khatoon et al., 2016; Samocha et al., 2017). The low levels of protein and carbohydrate in the mature (16.9% and 17.85%) and chemoautotrophic (18.29% and 18.37%) systems are related to the nitrifying bacteria community dominant in these systems. As reported by Schweitzer et al. (2013), the highest percentage of protein and lowest percentage of ash in the heterotrophic treatment was associated with higher bacterial biomass production by the continuous entry of organic carbon into the system, which resulted in a more nutritious floc for the shrimp. Low ash content increases the digestibility of other ingredients in the diet, resulting in improved shrimp growth (Wei et al., 2016).

Fertilization with sugar in the heterotrophic system resulted in increased sludge production in this treatment. The amount of sludge removed from the heterotrophic tanks was 143% higher than the other treatments. According to Ebeling et al. (2006), in order to consume 1 g of ammonia, heterotrophic bacteria must produce 8.07 g of VSS, whereas chemoautotrophic bacteria consume 1 g of ammonia and produce only 0.20 g of VSS, a 40-fold difference. Furthermore, nitrification can be affected by high concentration of organic material, which contributes to the growth of heterotrophic bacteria (Silva et al., 2013; Souza et al., 2019). The

results from this study allow us to conclude that the addition of a carbon source (sugar) is not necessary to control nitrogen compounds in a system with an active nitrifying community. Therefore, the addition of carbon sources, such as sugar or molasses, can be used only as an emergency tool to control occasional spikes of ammonia (Souza et al., 2019; Lara et al., 2016).

The supply of feed and organic fertilizers in tanks increase organic matter content, favoring the growth of *Vibrio* spp. (Ferreira et al., 2011). This hypothesis was confirmed in the heterotrophic system at the beginning and end of the experiment. *Vibrio* spp. are opportunistic, Gram-negative saprophyte bacteria autochthonous to aquatic organisms in marine and estuarine waters (Madigan et al., 2016). Under certain circumstances, they are harmful to shrimp, causing, for example, mortality, necrosis, and growth reduction (Aguirre-Guzmán et al., 2004). The bacterial load of *Vibrionaceae* in the chemoautotrophic system at the beginning of the experiment came from the water supply used in the tanks with a concentration of 10^2 to 10^3 UFC mL⁻¹. In the mature system, the bacterial load of *Vibrionaceae* came from the inoculum used to fertilize the water of this treatment. The increase in heterotrophic bacteria at the end of the experiment could have resulted from the supply of feed in the mature and chemoautotrophic systems. The increase in C:N ratio during the experiment provided favorable conditions for the development of heterotrophic bacteria in the mature and chemoautotrophic treatments (Ebeling et al., 2006). Throughout the experiment, feed intake increased the organic matter content in the chemoautotrophic and mature systems, and this allowed the growth of *Vibrionaceae*. In addition, there is a direct relationship between the number of total bacteria and the amount of *Vibrionaceae* in biofloc systems (Kumar et al., 2018). In this context, the chemoautotrophic system can be advantageous among biofloc strategies by starting with a lower bacterial load of *Vibrionaceae* compared to the heterotrophic and mature systems. It is worth mentioning that it is difficult to have complete control over the microbial communities that form during rearing due to the complexity of interactions occurring in the system. Basic microbiology techniques cannot tell which nitrifying bacteria are acting on each system. Further studies should be carried out with more precise microbiology techniques, such as metagenomics, in order to identify the species that are at play in the systems.

2.1.5 Conclusion

The assessment of shrimp performance revealed that both chemoautotrophic and heterotrophic systems are good approaches for managing shrimp nursery using BFT. The chemoautotrophic treatment stood out for its capacity to keep water quality at constant levels

and for harboring a lower population of bacteria from the family *Vibrionaceae* at the beginning of the rearing cycle. Despite the improved composition of the flocs from the heterotrophic treatment, this variable was not enough to enhance shrimp performance when compared to the other treatments. Moreover, tanks from this treatment exhibited a higher production of sludge. Although the reuse of water rich in microorganisms can be an interesting approach to control ammonia and nitrite levels (mature treatment) at the beginning of the rearing cycle, shrimp overall performance did not benefit from this strategy.

2.1.6 Reference

Aguirre-Guzmán, G., Ruiz, H.M., Ascencio, F., 2004. A review of extracellular virulence product of *Vibrio* species important in diseases of cultivated shrimp. *Aquaculture Research*. 35, 1395-1404. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01165.x>

APHA (American Public Health Association), 2005. Standard methods for the examination of water and waste water, 21^{ed}. AWWA (American Water Works Association), Washington.

Armstrong, D., Stephenson, M., Knight, A., 1976. Acute toxicity of nitrite to larvae of the giant Malayasian prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*. 9, 39-46.

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

Baloi, M., Arantes, R., Schweitzer, R., Magnotti, C., Vinatea, L., 2013. Performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* raised in biofloc systems with varying levels of light exposure. *Aquacultural Engineering*. 52, 39-44. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2012.07.003>

Bossier, P., Ekasari, J., 2017. Biofloc technology application in aquaculture to support sustainable development goals. *Microbial Biotechnology*. 10, 1012-1016. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12836>

Brock, J.A., Main, K.L.A., 1994. Guide to the common problems and diseases of culture *Penaeus vannamei*, first ed. The Oceanic Institute, Honolulu.

Burford, M.A., Thompson, P.J., McIntosh, R.P., Bauman, R.H., Pearson, D.C., 2004. The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero-exchange system. *Aquaculture*. 232, 525-537. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00541-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00541-6)

Cervantes, F.J., 2009. Environmental Technologies to Treat Nitrogen Pollution, second ed. IWA Publishing, London and New York.

Chen, J., Chin, T., 1988. Joint action of ammonia and nitrate on tiger prawn *Penaeus monodon* postlarvae. *Journal of the World Aquaculture Society*. 19, 143-148.

- Coelho, E., Gustavo, M., Wasielesky, W., Soares, R., Ballester, E., Izeppi, E., Cavalli, R., 2007. Crescimento e sobrevivência do camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) na fase de berçário em meio heterotrófico. *Acta Scientiarum*. 29, 1-7. <https://doi.org/10.4025/actasciobiolsci.v29i1.120>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2004.09.005>
- Compêndio brasileiro de alimentação animal, 2013. Métodos Analíticos, third ed. Sindirações, Mapa, Anfalpet, Asbram, São Paulo.
- Crab, R., Chielens, B., Wille, M., Bossier, P., Verstraete, W., 2010. The effect of different carbon sources on the nutritional value of bioflocs, a feed for *Macrobrachium rosenbergii* postlarvae. *Aquaculture Research*. 41, 559-567. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02353.x>
- Crab, R., Defoirdt, T., Bossier, P., Verstraete, W., 2012. Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges. *Aquaculture*. 356-357, 351-356. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.04.046>.
- De Schryver, P., Verstraete, W., 2009. Nitrogen removal from aquaculture pond water by heterotrophic nitrogen assimilation in lab-scale sequencing batch reactors. *Bioresource Technology*. 100, 1162-1167. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.08.043>
- Ebeling, J.M., Timmons, M.B., Bisogni, J.J., 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia–nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*. 257, 346-358. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.03.019>
- Emerenciano, M., Gaxiola, G., Cuzo, G., 2013. Biofloc Technology (BFT): A Review for Aquaculture Application and Animal Food Industry. *Biomass Now-Cultivation and Utilization*, Intech, London, pp. 301-328.
- Esparza-Leal, H.M., Cardozo, A.P., Wasielesky, W., 2015. Performance of *Litopenaeus vannamei* postlarvae reared in indoor nursery tanks at high stocking density in clear-water versus biofloc system. *Aquacultural Engineering*. 68, 28-34. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2015.07.004>
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture - Meeting the sustainable development goals. Sofia, Rome.
- Ferreira, N.C., Bonetti, C., Seiffert, W.Q., 2011. Hydrological and Water Quality Indices as management tools in marine shrimp culture. *Aquaculture*. 318, 425-433. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.05.045>
- Foes, G.K., Fróes, C., Krummenauer, D., Poersch, L., Wasielesky, W., 2011. Nursery of pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* in biofloc technology culture system: survival and growth

at different stocking densities. *Journal of Shellfish Research*. 30(2), 1-7.
<https://doi.org/10.2983/035.030.0224>

Furtado, P.S., Campos, B.R., Serra, F.P., Klosterhoff, M., Romano, L.A., Wasielesky Jr, W., 2015. Effects of nitrate toxicity in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, reared with biofloc technology (BFT). *Aquaculture International*. 23, 315-327.
<http://doi.org/10.1007/s10499-014-9817-z>

González-Félix, M., Gómez-Jiménez, S., Perez-Velazquez, M., Davis, D.A., Velazco-Ramenos, J.G., 2007. Nitrogen budget for a low salinity, zero-water exchange culture system: I. effect of dietary protein level on the performance of *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquaculture Research*. 38, 798-808. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01657.x>

Hargreaves, J.A., 2013. Biofloc Production Systems for Aquaculture. Southern Regional Aquaculture Center. 4503, 1-12.

Jayasankar, P., Mathu, M., 1983. Toxicity of nitrite to the larvae of *Penaeus indicus*. *Indian Journal of Fisheries*. 30, 231-240.

Ju, Z.Y., Forster, I., Conquest, L., Dominy, W., 2008. Enhanced growth effects on shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from inclusion of whole shrimp floc or floc fractions to a formulated diet. *Aquaculture Nutrition*. 14, 533-543. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00559.x>

Khatoun, H., Banerjee, S., Yuan, G.T.G., Haris, N., Ikhwanuddin, M., Ambak, M.A., Endut, A., 2016. Biofloc as a potential natural feed for shrimp postlarvae. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 113, 304-309. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.04.006>

Krummenaeur, D., Samocha, T., Poersch, L., Lara, G., Wasielesky Jr, W., 2014. The Reuse of Water on the Culture of Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in BFT System. *Journal of the World Aquaculture Society*. 45, 3-14. <https://doi.org/10.1111/jwas.12093>

Kumar, V. S., Pandey, P.K., Anand, T., Bhuvanewari, G.R., Dhinakaran, A., Kumar, S., 2018. Biofloc improves water, effluent quality and growth parameters of *Penaeus vannamei* in an intensive culture system. *Journal of Environmental Management*. 215, 206-215.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.03.015>

Lara, G., Furtado, P.S., Hostins, B., Poersch, L., Wasielesky Jr, W., 2016. Addition of sodium nitrite and biofilm in a *Litopenaeus vannamei* biofloc culture system. *Latin American Journal of Aquatic Research*. 44, 760-768. <http://dx.doi.org/10.3856/vol44-issue4-fulltext-11>

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, D.H., Stahl, D.A., 2016. *Microbiologia de Brock*, 14o ed. Artmed, Porto Alegre.

Mahanand, S.S., Moulick, S., Rao, P.S., 2013. Optimum formulation of feed for rohu, *Labeo rohita* (Hamilton), with biofloc as a component. *Aquaculture Internacional*. 21, 347-360.
<https://doi.org/10.1007/s10499-012-9557-x>

Manush, S.M., Pal, A.K., Das, T., Mukherjee, S.C., 2005. Dietary high protein and vitamin C mitigate stress due to chelate claw ablation in *Macrobrachium rosenbergii* males. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 142, 10-18.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.07.004>

- Meyer, F.P., Warren, J.W., Carey, T.G., 1983. A guide to integrated fish health management in the Great Lakes basin. Great Lakes Fishery Commission, Special Publication 83-1. Ann Arbor, Michigan.
- Mishra, J.K., Samocha, T.M., Patnaik, S., Speed, M., Gandy, R.L., Ali, A.B., 2008. Performance of an intensive nursery system for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, under limited discharge condition. *Aquacultural Engineering*. 38, 2-15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaeng.2007.10.003>.
- Moss, K.R.K., Moss, S.M., 2004. Effects of Artificial Substrate and Stocking Density on the Nursery Production of Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 35, 536-542. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2004.tb00121.x>
- Otoshi, C.A., Moss, N.R., 2011. Establishing Nitrifying Bacteria in Super-Intensive Biofloc Shrimp Production. *Global Aquaculture Advocate*, May-June.
- Poersch, L.H., Foes, G., Krummenauer, D., Romano, L.A., Wasielesky, W., 2012. Biofloc: uma alternativa para camarões saudáveis. *Panorama da Aquicultura*. 130° ed. Laranjeiras.
- Prangnell, D.I., Castro, L.F., Ali, A.S., Zimba, P.V., Laramore, S.E., Samocha, T.M., 2016. Some Limiting Factors in Superintensive Production of Juvenile Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in No-water-exchange, Biofloc-dominated Systems. *Journal of the world aquaculture society*. 47, 396-413. <https://doi.org/10.1111/jwas.12275>
- Ray, A.J., Seaborn, G., Leffler, J.W., Wilde, S.B., Lawson, A., Browdy, C.L., 2010. Characterization of microbial communities in minimal-exchange, intensive aquaculture systems and the effects of suspended solids management. *Aquaculture*. 310, 130-138. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.10.019>
- Samocha, T.M., Prangnell D.I., Hanson, T.R., Treece, G.D., Morris, T.C., Castro, L.F., Staresinic, N., 2017. Design and operation of super-intensive biofloc-dominated systems for indoor production of the pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: The Texa A&M AgriLife Research Experience. The World Aquaculture Society, Louisiana.
- Schweitzer, R., Arantes, R., Costodio, P.F.S., Espirito Santo, C.M., Arana, L.V., Seiffert, W.Q., Andreatta, E.R., 2013. Effect of different biofloc levels on microbial activity, water quality and performance of *Litopenaeus vannamei* in a tank system operated with no water Exchange. *Aquacultural Engineering*. 56, 59-70. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaeng.2013.04.006>
- Sesuk, T., Powtongsook, S., Nootong, K., 2009. Inorganic nitrogen control in a novel zero-water exchanged aquaculture system integrated with airlift-submerged fibrous nitrifying biofilters. *Bioresource Technology*. 100, 2088-2094. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.10.027>
- Silva, K.R., Wasielesky Jr., W., Abreu, P.A., 2013. Nitrogen and Phosphorus Dynamics in the Biofloc Production of the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 44, 30-41. <https://doi.org/10.1111/jwas.12009>

Silva, E., Silva, J., Ferreira, F., Soares, M., Soares, R., Peixoto, S., 2015. Influence of stocking density on the zootechnical performance of *Litopenaeus vannamei* during the nursery phase in a biofloc system. *Boletim do Instituto de Pesca*. 41, 777-783. <https://doi.org/10.20950/1678-2305.2015v41nep777>

Souza, J., Cardozo, A., Wasielesky Jr., W., Abreu, P. A., 2019. Does the biofloc size matter to the nitrification process in Biofloc Technology (BFT) systems? *Aquaculture*. 500, 443-450.

Strickland, J.D.H., Parsons, T.R., 1972. A practical handbook of seawater analysis. Fishery Research Board, Ottawa.

Subasinghe, R., 2017. Regional review on status and trends in aquaculture development in Asia-Pacific – 2015. FAO Fisheries and Aquaculture Circular n°. 1135/5, Rome.

Van Wyk, P., Scarpa, J., 1999. Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Tallahassee, Florida, p.128-138.

Vinatea, L., Galvez, A.O., Browdy, C.L., Stokes, A., Venero, J., Haveman, J., Lewis, B. L., Lawson, A., Shuler, A., Leffler, J.W., 2010. Photosynthesis, water respiration and growth performance of *Litopenaeus vannamei* in a super-intensive raceway culture with zero water exchange: Interaction of water quality variables. *Aquacultural Engineering*. 42, 17-24. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2009.09.001>

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

Wasielesky Jr, W., Froes, C., Foes, G., Krummenauer, D., Lara, G., Poersch, L., 2013. Nursery of *Litopenaeus vannamei* reared in a biofloc system: the effect of stocking densities and compensatory growth. *Journal of Shellfish Research*. 32, 799–806. <http://dx.doi.org/10.2983/035.032.0323>.

Wei, Y.F., Liao, S.A., Wang, A.I., 2016. The effect of different carbon sources on the nutritional composition, microbial community and structure of bioflocs. *Aquaculture*. 465, 88-93. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.08.040>.

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

2.2 ESTIMULAÇÃO DA NITRIFICAÇÃO NO SISTEMA DE BIOFLOCOS PARA O CAMARÃO MARINHO *Litopenaeus vannamei*

Gabriela S. Ferreira, Daniele Santos, Frederike Schmachtl, Cláudia Machado, Ana Clara Chede, Vitor Fernandes, Thiago C. Santos, Felipe N. Vieira*, Walter Q. Seiffert.

Laboratório de Camarões Marinhos, Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil.

*Corresponding author. Tel:+554837214103. E mail address: felipe.vieira@ufsc.br (Vieira, F.N.). Servidão dos Coroas, 503, Barra da Lagoa, 88061600, Florianópolis, SC, Brazil.

RESUMO

A conversão de nitrogênio pelas bactérias quimioautotróficas e heterotróficas tem implicações nos parâmetros de qualidade da água e na composição do bioflocos. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos na qualidade da água, na comunidade bacteriana da água, na composição do bioflocos e no rendimento de três estratégias diferentes para o preparo da água: sistema heterotrófico, quimioautotrófico e maduro do *L. vannamei* em sistemas de bioflocos. Foi realizado um estudo de 35 dias com camarões juvenis ($3,46 \pm 0,02$ g) estocados em doze tanques de 300 L a uma densidade de 350 camarões m^{-3} . As estratégias de preparação de água para a criação de camarão avaliadas neste estudo incluíram: i) Tratamento heterotrófico, onde a água recebeu melação como fonte de carbono (15:1) de carbono e nitrogênio; ii) tratamento quimioautotrófico, onde sais de cloreto de amônio e nitrito de sódio foram adicionados à água previamente; e iii) Tratamento maduro, realizado através da adição de uma quantidade significativa de água contendo bioflocos maduro (30% de água) de outro sistema BFT com nitrificação já estabelecida. Nos tratamentos maduro e quimioautotrófico o processo de nitrificação foi capaz de manter os compostos tóxicos de nitrogênio (amônia e nitrito) em baixos níveis sem a adição de carboidratos. Por outro lado, o sistema heterotrófico apresentou picos de amônia e nitrito durante o ciclo produtivo. O sistema heterotrófico apresentou volume significativamente maior de sólidos sedimentáveis e sólidos suspensos totais do que os demais tratamentos. A análise nutricional do bioflocos revelou uma proporção relativamente alta de proteínas, sendo o sistema heterotrófico o de maior conteúdo proteico ($p < 0,05$). Os resultados da análise metagenômica mostraram que a comunidade microbiana associada ao sistema Bioflocos é representada por 10 filos, as *Proteobactérias* e as *Bacteroidetes* representam os dois maiores filos encontrados tanto no início quanto no final do experimento. O desempenho do camarão revelou que sistemas heterotróficos, maduros e quimioautotróficos são boas abordagens para o gerenciamento de camarões usando o BFT. Nosso estudo sugere que diferentes estratégias para a preparação da água afetaram a diversidade e variedade de microrganismos presentes no sistema bioflocos, resultando em uma comunidade bacteriana rica que pode ajudar a controlar a qualidade da água e servir como fonte de proteína microbiana para o camarão marinho.

Palavras-chave: *Litopenaeus vannamei*, proteína, amônia, nitrito, água.

Introdução

Os camarões marinhos dominam a produção de crustáceos tipicamente cultivados na aquicultura costeira (FAO, 2018). O cultivo de camarão marinho tem crescido nos últimos anos a uma taxa média anual de 4,2% (FAO, 2017; GOAL, 2017). Esse crescimento deve-se em parte à alta demanda pelo produto no mercado internacional e ao uso de novas tecnologias (Tahim, 2019). A tecnologia Bioflocos (BFT) é um exemplo de inovação tecnológica no campo da aquicultura. Essa tecnologia se tornou uma alternativa promissora para promover a sustentabilidade e a biossegurança dos animais aquáticos (Avnimelech, 1999; Naylor et al., 2000).

O BFT tem sido estudado extensivamente na última década (Avnimelech, 2012). O BFT é uma tecnologia de cultivo baseada no estímulo e no estabelecimento de uma comunidade microbiana que será responsável por reciclar os nutrientes, principalmente os resíduos de nitrogênio como amônia e nitrito, o intuito é manter a qualidade de água nos níveis ideais para o cultivo do *L. vannamei* (Avnimelech e Kochba, 2009; Kuhn et al., 2010). As vantagens dessa tecnologia incluem: o menor consumo de água, além de descarga reduzida de efluentes e de matéria orgânica para o meio ambiente resultando em um menor impacto ambiental (Wasielesky et al., 2006). A remoção do nitrogênio inorgânico dissolvido na água pode ocorrer de duas maneiras: oxidação por bactérias quimioautotróficas e assimilação bacteriana heterotrófica (Ebeling et al., 2006).

As bactérias quimioautotróficas realizam nitrificação durante a qual a amônia é oxidada em nitrito, que é então oxidado para formar nitrato, sendo este considerado o composto menos tóxico ao camarão marinho. As bactérias quimioautotróficas têm um longo tempo de geração e, assim, desenvolvem-se lentamente durante semanas (Otoshi e Moss, 2011). Elas têm um período de geração na ordem de 12 h versus cerca de 30 min para bactérias heterotróficas (Avnimelech e Kochba, 2009). As vantagens dos sistemas quimioautotróficos são que esse processo consome e libera menos oxigênio e CO₂ do que os processos heterotróficos e geram uma biomassa bacteriana menor que a heterotrófica, com praticamente a mesma taxa de nitrificação (Ebeling et al., 2006; Browdy et al., 2012).

As bactérias heterotróficas utilizam o carbono orgânico como fonte de energia e assimilam o nitrogênio da amônia para construir proteínas celulares (Ray, 2012). Ao adicionar carboidratos à água, a assimilação heterotrófica pode remover rapidamente a amônia (De Schryver et al., 2008). A assimilação bacteriana heterotrófica consome uma taxa maior de oxigênio dissolvido (DO) do que a comunidade bacteriana quimioautotrófica (Ebeling et al.,

2006). Além disso, a população bacteriana deve se expandir para assimilar continuamente a amônia, levando a um acúmulo de sólidos na coluna d'água (Ray e Lotz, 2014). No entanto, esse sistema pode ser usado como alimento alternativo para o camarão devido à sua alta nutrição (Samocha et al., 2004; Ballester et al., 2010). Burford et al. (2004) relatam que cerca de 30% da biota natural do bioflocos pode contribuir substancialmente para a nutrição de *L. vannamei*.

Outra possibilidade para o controle de compostos nitrogenados é reutilizar a água por vários ciclos, também conhecido como sistema maduro, usando a comunidade microbiana (bactérias heterotróficas e quimioautotróficas) para manter a boa qualidade da água e contribuir como alimento adicional para os animais cultivados (Silva et al., 2013; Krummenaeur et al., 2014). Por outro lado, a falta de informações sobre a composição da comunidade microbiana e o acúmulo de compostos no sistema pode ser um fator limitante para a reutilização da água, pois condições precárias podem induzir a surtos de doenças e perdas na produção (Furtado et al., 2015; Lara et al., 2016; Xu et al., 2016).

Os sistemas de bioflocos são geralmente difíceis de controlar a qualidade da água e podem ter um longo período de estabelecimento antes que bactérias adequadas estejam presentes para processar os metabólitos animais (Prangnell et al., 2016). Os sistemas de bioflocos são biologicamente complexos e oscilam nas concentrações tóxicas de amônia e nitrito (Ray et al., 2017). A conversão de nitrogênio por bactérias quimioautotróficas e heterotróficas tem implicações nos parâmetros de qualidade da água e na composição do bioflocos (Ebeling et al., 2006; Martínez-Córdova et al., 2015). Entretanto, o uso de sais inorgânicos nos sistemas de BFT pode acelerar o estabelecimento e a atividade de bactérias nitrificantes, evitando picos de amônia e nitrito no sistema (Sesuk et al., 2009; Otoshi e Moss, 2011; Lara et al., 2016).

Nosso estudo anterior demonstrou que a aplicação de diferentes estratégias de preparação de água nos sistemas de bioflocos afeta a composição do bioflocos e a produção de camarão (Ferreira et al., 2019). A ecologia microbiana do sistema de bioflocos deve ser investigada para o desenvolvimento de estratégias com intuito de aumentar a produção de camarão. A metagenômica pode fornecer informações relacionadas à diversidade dos microrganismos que prosperam em determinada área e pode revelar inclusive informações relacionadas às suas funções e papéis biológicos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos na qualidade da água, na comunidade bacteriana da água, na composição nutricional do bioflocos, na microscopia eletrônica e no desempenho zootécnico do camarão das três estratégias diferentes para o preparo da água:

sistema heterotrófico, quimioautotrófico e maduro no cultivo de *L. vannamei* em sistema de bioflocos.

Material e métodos

Este estudo foi realizado no Laboratório de Camarões Marinhos (LCM), Estação de Maricultura Elpídio Beltrame, Barra da Lagoa, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. As pós-larvas (PL₂₀) do camarão-branco-do-pacífico *L. vannamei* foram obtidas em agosto de 2018 de uma larvicultura comercial (Aquatec LTDA, Rio Grande do Norte, Canguaretama, Brasil). A linhagem (HB16) estava livre de qualquer doença do camarão listada pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE). Uma vez atingido o estágio juvenil (3 g), os camarões foram transferidos para as unidades experimentais.

Design Experimental

O experimento foi realizado de forma aleatória e incluiu três tratamentos com quatro repetições cada. Um total de 105 camarões pesando 3,45 g ($\pm 0,02$ g; DP) foram divididos em 12 tanques de fibra de vidro, cada um contendo 300 L de água (0,58 m² de área inferior). A temperatura da água foi controlada através de um aquecedor de titânio de 500 W, acoplado ao termostato Full Gauge (MT512 RI, Porto Alegre, RS), ajustado para manter a temperatura em $28 \pm 1^\circ\text{C}$. A aeração foi mantida constante por mangueiras de difusão (Aero-Tube[®]) conectadas a um soprador de ar de 7,5 HP (Ibram Indústria Brasileira de Máquinas e Equipamentos, São Paulo, SP). Quatro substratos artificiais (needlona[®]) foram distribuídos uniformemente em cada tanque, resultando em um aumento de 100% da área de superfície do tanque (área adicional de 0,58 m²). Os tanques foram mantidos em uma sala isolada e submetidos a um fotoperíodo de 12:12 ciclos claro/escuro, usando uma lâmpada fluorescente compacta de 15 W (Digital Hikari HK-881A, São Paulo, SP) que forneceu intensidade de luz de $26543,11 \pm 425,35$ lx na superfície da água. Para manter a alcalinidade (> 120 mg L⁻¹), foi adicionado hidróxido de cálcio a 15% da quantidade de alimento fornecida ao dia. A água não foi trocada durante o experimento; somente houve a reposição de água doce devido a perda de água por evaporação. A alimentação do camarão com ração foi ofertada quatro vezes ao dia (Guabi Potimar 1,6 mm - contendo 35% de proteína bruta) de acordo com a tabela de alimentação de Van Wyk e Scarpa (1999). Após 1 h, o consumo de ração foi verificado nas bandejas e os

ajustes de alimentação foram calculados de acordo com a taxa de consumo. O experimento foi realizado por 35 dias.

Descrição dos Tratamentos

O experimento avaliou a criação de juvenis de camarão em três diferentes sistemas biofloc: heterotrófico, quimioautotrófico e biofloc maduro.

Sistema heterotrófico

Três dias antes da estocagem dos camarões nos tanques, a água foi fertilizada com ração e melão na proporção carbono/nitrogênio (C: N) de 15:1, a fim de atingir 200 mg L⁻¹ de sólidos suspensos totais (SST) no início do experimento. Durante o experimento, quando a amônia total (NAT) ultrapassou 1 mg L⁻¹, foi adicionado melão extra ao sistema na proporção de 20g de melão por cada grama de NAT. Quatro substratos artificiais (needlona[®]) foram distribuídos uniformemente em cada tanque, representando um aumento de 100% da área do tanque. Os parâmetros de qualidade da água do primeiro dia foram os seguintes: nível de salinidade 34,07±0,35 g L⁻¹, NAT 0,19±0,15 mg L⁻¹, nitrito (NO₂-N) 0,015±0,05 mg L⁻¹, nitrato (NO₃-N) 0 mg L⁻¹, alcalinidade (CaCO₃) 282±2,30 mg L⁻¹, pH 8,28±0,04, temperatura 28,99±0,76°C, DO 5,59±0,44 mg L⁻¹, sólidos suspensos totais (SST) 645,5±39,91 mg L⁻¹ e ortofosfato 1,21±0,16 mg L⁻¹.

Sistema quimioautotrófico

Durante 30 dias antes da estocagem dos camarões nos tanques, a água do mar filtrada (400 L) foi fertilizada com 1 mg L⁻¹ de nitrito de sódio NaNO₂ (Neon Comercial, São Paulo, SP) e 1 mg L⁻¹ de cloreto de amônio NH₄Cl (Neon Comercial, São Paulo, SP) diariamente em um tanque (Otoshi e Moss, 2011). Este tanque foi equipado com 16 substratos artificiais (needlona[®]), aquecedor e sistema de aeração, sem exposição à luz. Após 30 dias, os quatro tanques experimentais do tratamento quimioautotrófico foram preparados misturando 100 L de água do tanque de biorreator e 200 L de água do mar (salinidade de 33 g L⁻¹) e os substratos foram distribuídos nos tanques, 4 por tanque. Os parâmetros de qualidade da água no tanque de biorreator no dia 30 foram os seguintes: salinidade 34,2±0,32 g L⁻¹, NAT 0,27±0,06 mg L⁻¹, alcalinidade (CaCO₃) 146±2,30 mg L⁻¹, pH 8,18±0,01, temperatura 28,15±0,55°C, DO 6,07±0,43 mg L⁻¹, sólidos suspensos totais (SST) 245,5±55,83 mg L⁻¹, ortofosfato 0,88±0,46

mg L⁻¹, nitrito (NO₂-N) 1,04±0,5 mg L⁻¹ e nitrato (NO₃-N) 8,26±2,03 mg L⁻¹, indicando que o processo de nitrificação já estava estabelecido.

Sistema biofoco maduro

Os tanques experimentais do tratamento de biofoco maduro (n = 4) foram misturados com 90L de água de um tanque de biofoco (30% do tanque matriz) e 210L de água do mar filtrada. O tanque matriz era um tanque circular de 50 m², abastecido com 300 camarões juvenis m⁻² (peso = 7,3 ± 0,32 g). Os parâmetros de qualidade da água do tanque matriz foram os seguintes: salinidade 33,97±0,46 g L⁻¹, NAT 0,28±0,06 mg L⁻¹, alcalinidade (CaCO₃) 134±1,63 mg L⁻¹, pH 8,10±0,015, temperatura 27,73±0,73 mg L⁻¹, DO 6,13±0,44 mg L⁻¹, sólidos suspensos totais (SST) 243,75±11,47 mg L⁻¹, ortofosfato 1,18±0,39 mg L⁻¹, nitrito (NO₂-N) 0,68±0,26 mg L⁻¹ e nitrato (NO₃-N) 4,89±1,32 mg L⁻¹, indicando que o processo de nitrificação já estava estabelecido.

Desempenho do camarão

Foram realizadas biometrias semanais ao longo do experimento (n = 30 camarões por tanque; 4 tanques por tratamento), utilizando uma balança digital com duas casas decimais (BEL Equipamentos Analíticos, Piracicaba, SP). Após 35 dias de experimento, foram avaliados os seguintes parâmetros de desempenho zootécnico: peso médio final, taxa de crescimento semanal, biomassa final, taxa de sobrevivência, taxa de conversão alimentar e rendimento.

Variáveis de qualidade da água

O oxigênio dissolvido (DO) e a temperatura (medidor de oxigênio dissolvido YSI 550A) foram monitorados duas vezes por dia. NAT, nitrito, alcalinidade (APHA, 2005 - 2320B), salinidade (YSI 30 Digital Salinity Meter) e pH (Tecnal Tec-5, Piracicaba, SP) foram monitorados três vezes por semana. Nitrato, ortofosfato, sólidos suspensos totais (TSS) (APHA, 2005 - 2540D), sólidos voláteis e fixos (APHA, 2005 - 2540E) e volume de sólidos sedimentáveis (cones de Imhoff) foram analisados uma vez por semana. A concentração NAT, nitrito, nitrato e ortofosfato foram medidos usando o método colorimétrico de acordo com o procedimento descrito por Strickland e Parsons (1972).

Quantidade de lodo

Para manter os níveis de SST necessários para o cultivo de camarões, os SST foram retirados quando a concentração chegou a 600 mg L^{-1} . Para isso, um tanque de decantação de 90 L (adaptado de Ray et al., 2010) foi conectado a cada tanque e foi operado a uma vazão de 650 L h^{-1} (Schveitzer et al., 2013). A quantidade de lodo foi avaliada cada vez que o sólido foi removido dos tanques. As amostras de sólido coletadas do decantador foram filtradas com microfiltro de $47 \mu\text{m}$ de fibra de vidro (Mancherey Nagel, Alemanha) e secas a 105°C durante 24 h (APHA, 2005 - 2540 D). Ao final do experimento, a quantidade de lodo foi quantificada usando a seguinte fórmula:

$$\text{Quantidade de lodo} = (\text{SST final} \times V) - (\text{SST inicial} \times V) / 100 + \text{SR}$$

SST final = concentração final dos sólidos suspensos totais do experimento em mg L^{-1} .

V = volume do tanque em L.

SST inicial = concentração inicial dos sólidos suspensos totais do experimento em mg L^{-1} .

SR = quantidade de sólidos retirados do sistema em g.

Fertilização do sistema

Para fertilizar os sistemas de cultivo em BFT, foram utilizados diferentes insumos como segue: ração e melão foram adicionados ao sistema heterotrófico; ração, hidróxido de cálcio e sais (nitrito de sódio e cloreto de amônio) foram adicionados ao sistema quimioautotrófico; e ração e hidróxido de cálcio foram adicionados ao sistema maduro.

Análise do floco

Conteúdo de cinzas

O teor de cinzas foi determinado queimando a amostra dentro da mufla por 8 h a 550°C . Para isso, 1 g de cada amostra foi pesada em um cadinho com uma balança de precisão Sartorius (máx. 220000 mg; d = 0,1 mg). O cadinho foi incendiado e tarado. As amostras foram secas em estufa por 24 h a 100°C . Posteriormente, as amostras foram colocadas na mufla e a temperatura foi aumentada gradualmente para 550°C . As amostras foram resfriadas e pesadas. Todas as substâncias orgânicas foram queimadas e permaneceram as substâncias

inorgânicas no crisol. Antes, era necessário pesar o cadinho vazio com a balança analítica (precisão $\pm 0,1$ mg), para que o teor de cinzas pudesse ser calculado com a seguinte fórmula:

m_{Cinzas} : massa das cinzas da amostra após a queima (g)

m_{Amostra} : Massa da amostra antes da queima (g)

Análise C/N

O teor de proteína foi determinado usando a análise C/N (Euro EA Element Analyzer, EuroVector). Com este método, a amostra foi queimada com oxigênio adicionado externamente a 1800°C. Os óxidos de nitrogênio resultantes e outros compostos são então misturados com hélio por uma coluna de cobre, onde os óxidos de nitrogênio são reduzidos a nitrogênio elementar. Os gases são então passados para uma coluna de dessorção regulada por temperatura, onde todos os gases, exceto o nitrogênio, se ligam à coluna. Posteriormente, as substâncias são alteradas sucessivamente por uma mudança de temperatura da coluna e por um sensor de condutividade térmica. O sinal elétrico é proporcional à concentração de nitrogênio ou carbono. Para a preparação da amostra, mediram-se 1 mg das amostras em cartuchos de estanho (5x9 mm por Hekatech GmbH # HE 24056400) com um Ultra Micro Balance Mettler Toledo XP6U (máx 6,1 mg; d = 0,0001 mg). Depois disso, os cartuchos de estanho foram armazenados em um dessecador até a análise.

Extrato Etéreo

Para a determinação do extrato etéreo, as amostras de bioflocos foram liofilizadas e homogeneizadas. Utilizou-se 0,1 g de cada amostra e foram colocadas no recipiente Duran. 2 mL de diclorometano/metanol (V 2:1) foram então adicionados para precipitar os lipídios e ácido nucleico. Esse processo foi conduzido sob um exaustor. Para auxiliar nessa precipitação, as amostras foram homogeneizadas usando ultra-som (Hielscher, Ultrasonic Prozessor UTR200) e depois centrifugadas (Eppendorf Centrifuge 5810 R). A fase líquida foi removida e coletada em um segundo recipiente Duran. O passo de precipitação foi repetido duas vezes. A fase sólida pode ser descartada após precipitação. Posteriormente, 2 mL de cloreto de potássio (0,88%) foram adicionados ao vidro Duran para extração de gordura. A mistura foi agitada e centrifugada para melhor dissolver o extrato etéreo. A fase líquida inferior foi então adicionada a outro recipiente Duran, que foi pesado anteriormente. Em seguida, foi adicionado diclorometano ao primeiro recipiente Duran para extrair todos os extratos etéreos do tecido

biológico. Novamente, o vidro foi agitado, centrifugado e depois a fase líquida inferior foi transferida para o segundo recipiente Duran. Este passo foi repetido novamente. No último passo, a fase líquida teve que ser evaporada com nitrogênio. Como resultado, o extrato etéreo puro permaneceu dentro do vidro e foi pesado com uma balança analítica (precisão $\pm 0,1$ mg) (Wildförster, 2016), em duplicata.

Extrato não nitrogenado

O carboidrato foi calculado de acordo com a seguinte fórmula: extrato não nitrogenado (% DW) = $100 - ((\text{proteína bruta [\% DW]} + \text{extrato etéreo [\% DW]} + \text{cinza [\% DW]}))$ (Manush et al., 2005).

Parâmetros microbiológicos da água

Amostras de água (10 mL) foram coletadas de cada tanque no início (dia 1) e no final (dia 35) do experimento, usando tubos de ensaio estéreis de 15 mL. Alíquotas de 1 mL foram inoculadas em diluições seriadas (sete vezes) em tubos contendo solução salina (NaCl a 3%). A avaliação de bactérias heterotróficas viáveis e de *Vibrionaceae* presentes na água foi realizada semeando cerca de 100 μL das amostras de água em placas de Petri contendo meio de cultura bacteriológico Marine Agar e Tiosulfato de Citrato Biliar de Sacarose (TCBS), respectivamente. Os meios semeados foram incubados em estufa microbiológica a 30°C. Após 24 h de incubação, as unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC mL^{-1}) foram contadas.

Análise metagenômica

As amostras foram coletadas no início (dia 1) e no final (dia 35) do experimento, foram coletados 4 mL (pool de 1 mL de cada réplica por tratamento) em um Eppendorf livre de DNA/RNA/DNase/RNase. As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 5 min a 4°C (Eppendorf 5804 R), o sobrenadante foi removido e o sedimentado foi armazenado em um freezer a -80°C para análise posterior. O DNA foi extraído usando fenol/clorofórmio seguindo as instruções do protocolo de extração de esferas estabelecido pela Neopropectra Microbiome Technologies, Brasil. Para o sequenciamento NGS bacteriano os primers V3-V4 com as seguintes condições: os primeiros primers de PCR contêm as sequências de Illumina

baseadas no adaptador de estrutura TruSeq (Illumina, San Diego, CA), permitindo a segunda PCR com sequências de indexação. As reações de PCR sempre foram realizadas em triplicatas usando Platinum Taq (Invitrogen, EUA) com as condições: 95°C por 5 min, 25 ciclos de 95°C por 45s, 55°C por 30s e 72°C por 45s e um extensão final de 72°C por 2 min para PCR 1. Na PCR 2, as condições eram 95°C por 5 min, 10 ciclos de 95°C por 45s, 66°C por 30s e 72°C por 45s e uma extensão final de 72°C por 2 min. Para comparação, o protocolo Illumina 16S foi usado como descrito (Nota técnica Illumina 15044223 Rev. B). A reação final de PCR foi limpa usando esferas AMPureXP (Beckman Coulter, Brea, CA) e as amostras foram reunidas nas bibliotecas de sequenciamento para quantificação. As estimativas de amplificação de pool foram realizadas com ensaios Picogreen dsDNA (Invitrogen, EUA) e, em seguida, as bibliotecas agrupadas foram diluídas para quantificação precisa de qPCR usando o KAPA Library Quantification Kit para plataformas Illumina (KAPA Biosystems, Woburn, MA).

As bibliotecas foram sequenciadas em um sistema MiSeq, usando os primers Illumina padrão fornecidos no kit. As leituras brutas foram processadas para remover bases e adaptadores de baixa qualidade e cortadas para um comprimento fixo de 280 pb (Trimmomatic, versão 0.36). A remoção de quimera e o agrupamento de leituras em Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) foram realizados usando USEARCH/UPARSE (com 97% de similaridade) (versão 10.0.240). A atribuição taxonômica das sequências bacterianas foi realizada usando o banco de dados SILVA com 90% de similaridade (versão 132).

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para microscopia eletrônica de varredura, 40 mL (pool de 10 mL de cada réplica por tratamento) foram coletados no início (dia 1) e no final (dia 35) do experimento, usando tubos de ensaio estéreis de 50 mL. As amostras foram centrifugadas a 4.000 g por 10 min a 10°C (Eppendorf 5804 R), o sobrenadante foi removido e as análises foram utilizadas com o precipitado de bioflocos. As amostras de bioflocos (inicial e final) foram fixadas em glutaraldeído a 2,5% em cacodilato 0,1 M (pH 7,2) contendo sacarose 0,2 M (Schmidt et al., 2010). Após 24 h, essa solução foi substituída pela solução tampão em cacodilato 0,1 M (pH 7,2) até o dia da análise da amostra. O estágio de desidratação foi realizado com solução serial etanólica (50%, 70%, 80%, 90% e 100%) por 10 min e secas no ponto crítico EM-CPD-030 (Leica, Heidelberg, Alemanha). Posteriormente, as amostras foram aderidas a suportes de metal e revestidas com spray de ouro (Bal-Tec Sputter Coater, CED 030). As fotomicrografias foram feitas em um microscópio SEM JSM 6390 LV (JEOL Ltd., Tóquio, Japão) a 20 kV.

Análise estatística

Os dados foram submetidos aos testes Shapiro-Wilk e Bartlett para verificar a normalidade e a homocedasticidade, respectivamente (nível de significância de 5%). Os dados do rendimento e da taxa de conversão alimentar foram transformados em raiz quadrada, os dados microbiológicos foram transformados \log_{10} , enquanto a transformação angular foi usada para sobrevivência. ANOVA unifatorial foi aplicada e, quando foram detectadas diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$), foi realizado o teste de separação média de Tukey. Os dados de metagenômica foram analisados utilizando o R estatístico do meio ambiente (versão 3.5.1). As curvas de rarefação, os índices de riqueza e diversidade foram calculados usando o pacote R vegan. Os resultados foram plotados através de gráficos com o programa ggplot.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Variáveis de qualidade da água

O tratamento heterotrófico apresentou valores de pH significativamente maiores ($p < 0,05$) do que os demais tratamentos (Tabela 8). O uso de melão como fonte de carbono no tratamento heterotrófico contribuiu para o aumento do pH nos tanques. O melão possui bicarbonato de cálcio em sua composição, o que impediu a queda do pH (Espírito Santo et al., 2016). A respiração pela comunidade bacteriana e a alcalinidade consumida durante a nitrificação aumentam a concentração de dióxido de carbono, que conseqüentemente diminui o valor do pH na água (Wasielesky et al., 2006; Ebeling et al., 2006). Nos tratamentos maduros e quimioautotróficos, adicionamos hidróxido de cálcio para corrigir o pH, evitando a queda.

Tabela 8. Variáveis de qualidade da água do camarão-branco-do-pacífico (*Litopenaeus vannamei*) estocados a uma densidade de 350 camarões m⁻³ em sistema de bioflocos, utilizando diferentes sistemas (heterotrófico, quimioautotrófico e maduro) por 35 dias.

Variáveis de Qualidade de água	Tratamentos		
	Heterotrófico	Maduro	Quimioautotrófico
Temperatura (°C)	28,4±0,95 ^{ab}	28,3±0,70 ^b	28,5±1,04 ^a
OD (mg L ⁻¹)	5,77±0,34 ^b	5,88±0,28 ^a	5,83±0,32 ^{ab}
Salinidade g L ⁻¹	33,96±0,37	34,21±0,77	34,09±0,57
pH	8,37±0,06 ^a	8,19±0,05 ^b	8,21±0,04 ^b
Alcalinidade (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	373,86±58,32 ^a	171,40±26,51 ^b	174,25±17,78 ^b
Amônia Total N-NH ₃ (mg L ⁻¹)	1,34±3,45 ^a	0,30±0,19 ^b	0,46±0,33 ^{ab}
Nitrito NO ₂ -N (mg L ⁻¹)	4,23±5,11 ^a	0,54±0,41 ^b	0,91±0,69 ^b
Nitrato NO ₃ -N (mg L ⁻¹)	1,33±4,33	8,12±3,32	8,94±3,00
Ortofosfato P-PO ₄ ⁻³ (mg L ⁻¹)	1,21±0,16 ^a	1,18±0,39 ^a	0,88±0,46 ^b
SS (mL L ⁻¹)	20,89±10,92 ^a	3,57±3,41 ^b	4,33±5,59 ^b
TSS (mg L ⁻¹)	617,28±154,4 ^a	359,67±139,16 ^b	374,10±165,15 ^b
VSS (%)	49,00±7,91	39,2±6,30	37,20±8,22
FSS (%)	52,80±27,24	76,80±39,53	72,30±31,49

Média ± DP. As diferentes letras indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos na mesma linha pelo teste de Tukey.

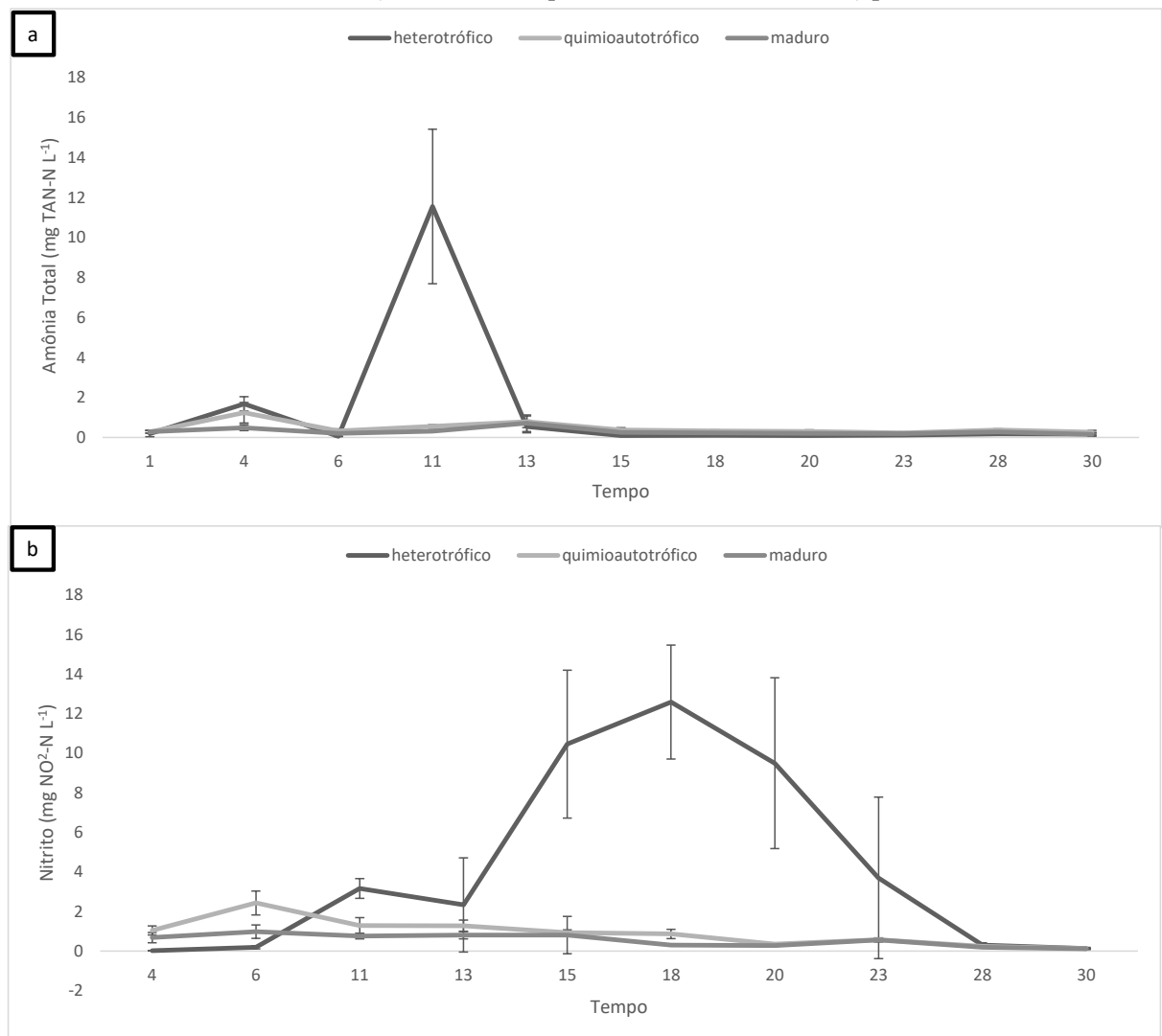
O tratamento heterotrófico apresentou concentração significativamente maior de alcalinidade total ($p < 0,05$) do que os tanques dos tratamentos maduros e quimioautotróficos (Tabela 8). A adição de melaço como fonte de carbono no tratamento heterotrófico manteve a alcalinidade em níveis aceitáveis para o cultivo de *L. vannamei*, e por isso não foi necessário adicionar hidróxido de cálcio a este tratamento. Ebeling et al. (2006) recomendam uma alcalinidade de 150 mg L⁻¹ de CaCO₃ no sistema bioflocos.

O tratamento heterotrófico apresentou concentração significativamente maior de amônia total ($p < 0,05$) do que o tratamento maduro (Figura 8A). Não foi observada diferença ($p \geq 0,05$) entre os tanques do tratamento quimioautotrófico e os demais tratamentos. A fertilização diária com carbono orgânico estimulou o crescimento constante de bactérias heterotróficas que competem com bactérias quimioautotróficas por espaço, nutrientes (amônia), oxigênio dissolvido e outros micronutrientes (Ebeling et al., 2006). O primeiro pico da concentração de amônia total ocorreu ao 11º dia de experimento no tratamento heterotrófico (Figura 8A). No 13º dia, a concentração de amônia total diminuiu e a concentração de nitrito apareceu indicando a transformação dos compostos nitrogenados.

O tratamento heterotrófico apresentou concentração significativamente maior de nitrito ($p < 0,05$) do que os tanques dos tratamentos maduros e quimioautotróficos (Tabela 8).

O primeiro pico da concentração de nitrito ocorreu no dia 15º dia de experimento no tratamento heterotrófico (Figura 8B). A concentração de nitrito diminui apenas no 28º dia de experimento, a reação de nitrificação é realizada completamente, conforme indicado. Luo et al. (2017) observaram que o processo de nitrificação nos tanques de bioflocos ocorre somente após o décimo quinto dia de cultivo. Nos tratamentos maduros e quimioautotróficos, as bactérias nitrificantes presentes desde o início do experimento mantiveram a concentração de nitrito baixo.

Figura 8. Nitrogênio de amônia total NAT (A) e nitrito (B) do camarão-branco-do-pacífico (*Litopenaeus vannamei*) estocados na densidade de 350 camarões m^{-3} em bioflocos, utilizando diferentes sistemas (heterotrófico, quimioautotrófico e maduro) por 35 dias.



O tratamento quimioautotrófico apresentou uma concentração significativamente menor de ortofosfato ($p < 0,05$) do que os tratamentos heterotróficos e maduros. O aumento da relação C:N no tratamento heterotrófico permitiu maior conversão de ortofosfato em biomassa

bacteriana heterotrófica. No tratamento maduro, a água de reuso de outro ciclo acumulou o ortofosfato no sistema. As concentrações de fosfato ao longo do experimento provavelmente se devem à ingestão constante de nutrientes, que normalmente ocorre nos sistemas de cultivo, principalmente devido à alimentação não consumida e fezes de animais em tanques (Barak et al., 2003).

O tratamento heterotrófico apresentou volume significativamente maior de SS e TSS ($p < 0,05$) que os demais tratamentos. Essa diferença no tratamento heterotrófico deve-se ao uso do melaço como fonte de carbono, o que estimula a produção heterotrófica (Avnimelech e Kochba, 2009), aumentando a concentração de sólidos (Ebeling et al., 2006). Avnimelech (2012) recomenda o assentamento de sólidos de 2 a 20 ml L⁻¹ de volume de flocos para o cultivo de camarões. As bactérias heterotróficas produziram grande quantidade de biomassa bacteriana em comparação com as bactérias quimioautotróficas (Ebeling et al., 2006). Avnimelech (2012) sugere que o TSS deve ser limitado a cerca de 200 mg L⁻¹ no cultivo de camarão. Schveitzer et al. (2013) recomendam que a concentração de TSS entre 400 e 600 mg L⁻¹ pareça ser mais adequada para o cultivo de camarão no sistema bioflocos. Foi necessário ligar os tanques de decantação, operando por aproximadamente 1,5 h, durante as três semanas para reduzir a concentração de sólidos no tratamento heterotrófico. Nos tratamentos maduros e quimioautotróficos não foi necessário ligar os tanques de decantação de sólidos, indicando uma economia de energia e equipamentos neste tipo de sistemas em bioflocos. Não foram observadas diferenças significativas ($p \geq 0,05$) nas concentrações de salinidade, nitrato, VSS e FSS entre os tratamentos (Tabela 8).

Quantidade de lodo e insumos utilizados no sistema

Os sais (nitrito de sódio e cloreto de amônio) foram adicionados apenas no tratamento quimioautotrófico, com valor médio de 0,52 g L⁻¹. O melaço foi utilizado apenas no tratamento heterotrófico, com valor médio de 388,1 g. A ingestão de ração foi significativamente menor no tratamento heterotrófico ($p < 0,05$) em comparação aos tratamentos quimioautotrófico e maduro (Tabela 9). O bioflocos serve como alimento natural rico em macronutrientes e micronutrientes e está disponível 24 h por dia ao camarão. Os flocos podem ser usados como uma fonte complementar na alimentação do camarão marinho como reportado por Wasielesky (2006) e Xu e Pan (2014). Não foram observadas diferenças significativas ($p \geq 0,05$) na produção de lodo entre os tratamentos. Os tratamentos maduros e quimioautotróficos receberam hidróxido de cálcio para manter a nitrificação. Não foi necessário remover o lodo

dos tratamentos maduros e quimioautotróficos durante as cinco semanas de experimento; isso pode ser considerado como uma vantagem desses sistemas. O produtor pode economizar energia e equipamentos no ciclo de produção sem prejudicar o desenvolvimento do camarão.

Tabela 9. Entradas dos sistemas: sais, melaço, consumo de ração, hidróxido de cálcio e lodo produzido no sistema de bioflocos com o camarão-branco-do-pacífico *L. vannamei* estocados a uma densidade de 350 m⁻³ usando diferentes sistemas: heterotrófico, quimioautotrófico e bioflocos maduro por 35 dias.

Tratamentos	Heterotrófico	Maduro	Quimioautotrófico
Sal (g)			0,52±0,18 ¹
Melaço (g)	388,1±48,73		
Ração(g)	797,20±76,48 ^b	924,58±16,95 ^a	920,77±30,80 ^a
Hidróxido de cálcio (g)		112,91±2,99*	103,99±5,39
Lodo (g)	228,4±134,7	85,42±24,3	100,8±28,4

*Indica diferença significativa ($p<0,05$) entre os tratamentos na mesma linha pelo teste T de Student. ¹O sal foi adicionado antes de estocar camarão. Média ± DP. As diferentes letras indicam diferença significativa ($p<0,05$) entre os tratamentos na mesma linha pelo teste de Tukey.

Análises químicas do floco

O sistema heterotrófico apresentou proteína bruta significativamente maior ($p<0,05$) do que os demais tratamentos (Tabela 10). Resultados semelhantes foram relatados por Emerenciano et al. (2012) e níveis mais baixos de proteína bruta foram relatados por Wei et al. (2016). O tratamento heterotrófico teve um bom valor nutricional devido à composição do melaço que contém níveis de proteína, minerais, vitaminas e energia (Curtin, 2003). O tipo de carbono adicionado pode afetar não apenas a produção de bioflocos, mas também o conteúdo de proteína bruta presente nas amostras como também a estrutura taxonômica da comunidade bacteriana presente no cultivo (Martínez-Cordova et al., 2018).

Tabela 10. Características do bioflocos (composição nutricional) do cultivo do camarão-branco-do-pacífico (*Litopenaeus vannamei*) estocado na densidade de 350 camarões m⁻³ em sistema de bioflocos, utilizando diferentes sistemas (heterotrófico, maduro e quimioautotrófico) por 35 dias.

Parâmetros	Heterotrófico	Maduro	Quimioautotrófico
Proteína (% PS p:p)	30,03± 0,54 ^a	23,12± 2,17 ^b	22,62± 1,62 ^b
Extrato não nitrogenado (% PS p:p)	22,06±4,13	21,75±4,21	19,95±6,09
Cinzas (% DW p:p)	47,04± 3,83 ^b	53,89± 2,93 ^{ab}	56,65± 4,73 ^a

Média ± DP. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos na mesma linha pelo teste de Tukey. PS, peso seco.

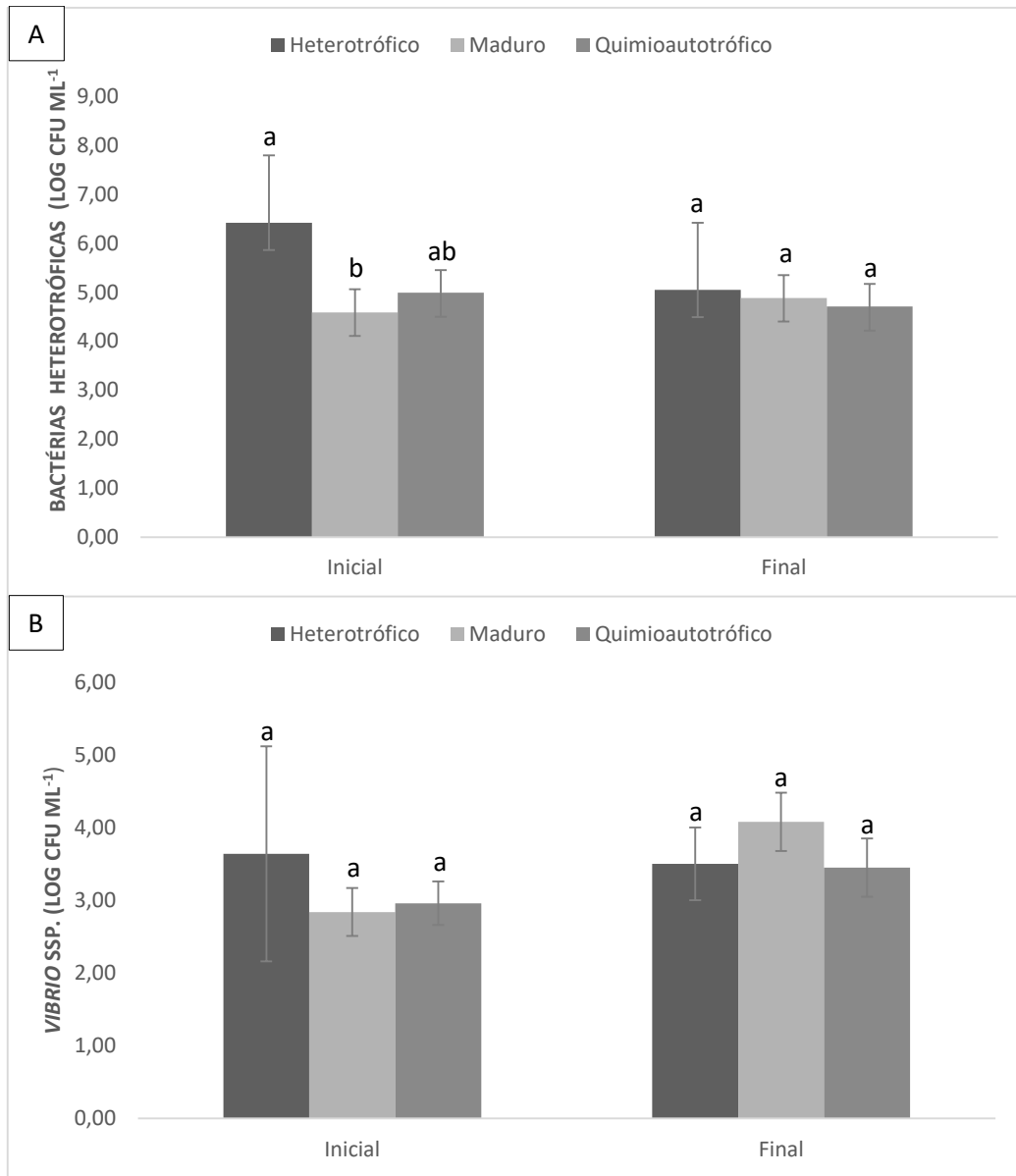
O tratamento quimioautotrófico apresentou o teor de cinzas significativamente maior ($p < 0,05$) do que o tratamento heterotrófico, não houve diferença significativa entre os tratamentos maduro e os demais tratamentos. A adição de sal contribuiu para o maior nível de cinzas no tratamento quimioautotrófico. Como sugerido por Schweitzer et al. (2013) o menor nível de cinzas no tratamento heterotrófico está relacionado à maior produção de biomassa bacteriana pela adição de fonte de carbono ao sistema. Não foram observadas diferenças significativas ($p \geq 0,05$) nos extratos não nitrogenados entre os tratamentos (Tabela 10). Com base em nossos resultados, podemos afirmar que além da composição nutricional pode ser influenciada pela estratégia de fertilização, a comunidade bacteriana que se desenvolve no sistema durante o período experimental também difere entre os tratamentos.

Parâmetros microbiológicos da água

A contagem de bactérias heterotróficas viáveis foi significativamente maior ($p < 0,05$) nos tanques do sistema heterotrófico em comparação com os tanques do sistema maduros no início do experimento (Figura 9A). Esses resultados foram semelhantes aos relatados por Kim et al. (2014), Pierri et al. (2015) e Espírito Santo et al. (2016) para o cultivo de camarão marinho no sistema bioflocos. No entanto, não foi observada diferença significativa ($p \geq 0,05$) entre os tanques do tratamento quimioautotrófico e os demais tratamentos. Não houve diferenças significativas ($p \geq 0,05$) na contagem de bactérias heterotróficas viáveis ao final do experimento entre os tratamentos (Figura 9). Não houve diferenças significativas ($p \geq 0,05$) na contagem de *Vibrio* spp. na água nem no início e nem no final do experimento entre os tratamentos (Figura 9B). Esses resultados foram semelhantes aos observados por Espírito Santo et al. (2016) usando melaço como fonte de carbono no sistema bioflocos para *L. vannamei*. Como nos sistemas maduros e quimioautotróficos não foi necessário remover os sólidos

durante as cinco semanas do experimento; essa condição pode ter ajudado a aumentar a concentração de *Vibrio* spp. nesses tratamentos.

Figura 9. Contagem de bactérias heterotróficas totais e *Vibrio* spp. na água no início (A) e no final (B) do cultivo em sistema de bioflocos com o camarão-branco-do-pacífico (*Litopenaeus vannamei*) estocado na densidade de 350 camarões m^{-3} utilizando diferentes sistemas (heterotrófico, quimioautotrófico e maduro) por 35 dias.



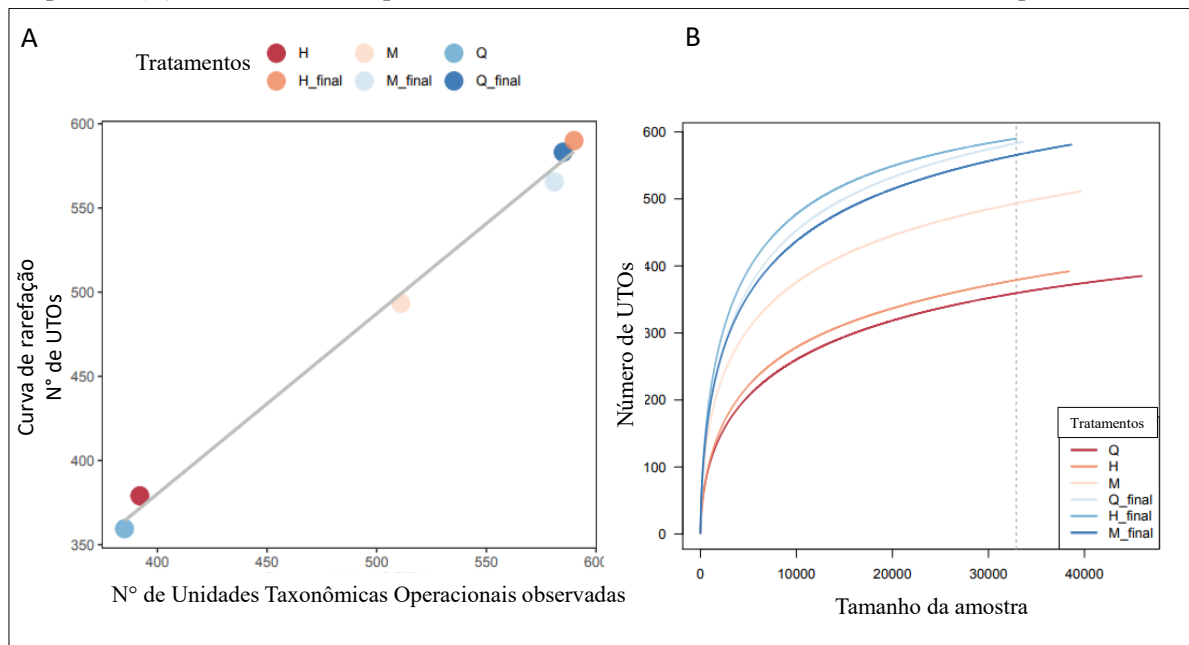
Média \pm DP. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos na mesma linha pelo teste de Tukey.

Análise metagenômica

O sequenciamento gerou um grande número de dados brutos, totalizando 23.625 seqüências, das quais 15.012 (média de 5.004 seqüências por amostra) estavam no início do

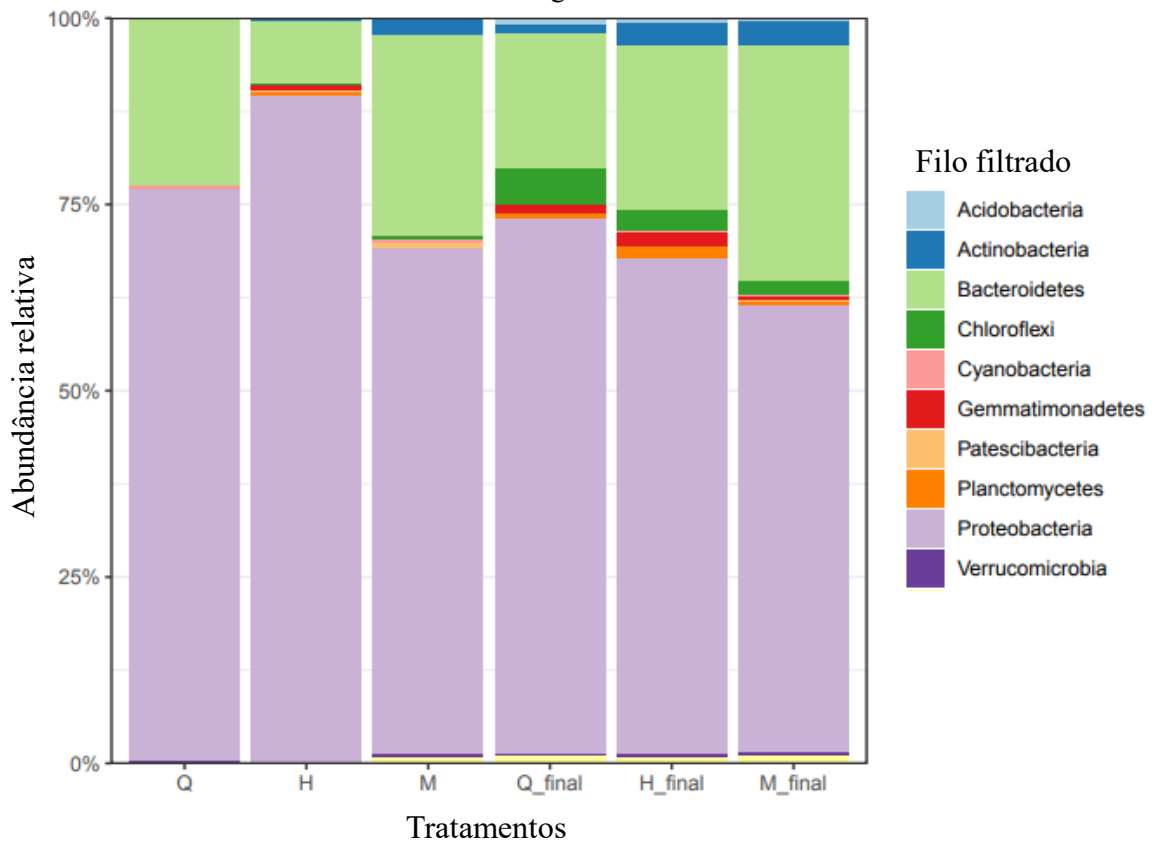
experimento e 8.613 no final do experimento (média de 2.871 sequências por amostra). As curvas de rarefação dos tratamentos em diferentes estágios do experimento (inicial e final) são mostradas na Figura 3. Foi observado que o número de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) variou entre 350 e 600. Um bom índice de cobertura (min = 99,78 e max = 100,00) indicou amostragem quase completa das comunidades bacterianas (Figura 10). A UTO foi maior na fase inicial do experimento no sistema maduro e na fase final do experimento em todos os tratamentos.

Figura 10. As curvas de rarefação mostram o número de UTOs nos sistemas quimioautotrófico (Q), heterotrófico (H) e maduro (M) nas fases inicial e final do cultivo do camarão-branco-do-pacífico (*Litopenaeus vannamei*) estocado na densidade de 350 camarões m^{-3} , utilizando diferentes sistemas (A). As unidades taxonômicas operacionais (UTOs) foram baseadas em 97% de similaridade de sequência (B). O número de sequências amostradas indica o número de leituras de sequenciamento.



Os resultados da análise metagenômica mostraram que a comunidade microbiana associada ao sistema bioflocos é representada por 10 filos (Figura 11). *Proteobactérias* e *Bacteroidetes* são as bactérias dominantes na aquicultura e ocupam uma proporção muito grande em todos os tratamentos (Wei et al., 2016; Luo et al., 2017; Martínez-Cordova et al., 2018; Cienfuegos et al., 2018; Deng et al., 2018; Martins et al., 2020).

Figura 11. Composição bacteriana a nível de filo dos sistemas quimioautotrófico (Q), heterotrófico (H) e maduro (M) das fases inicial e final do cultivo do camarão-branco-do-pacífico (*Litopenaeus vannamei*) estocado na densidade de 350 camarões m⁻³ utilizando diferentes sistemas fertilização da água.



Proteobactérias e *Bacteroidetes* são responsáveis por compor a maioria da diversidade no oceano (Madigan et al., 2014). As *Proteobactérias* formam um dos maiores filos, são bactérias Gram-negativas e algumas bactérias desse filo são responsáveis pela fixação do nitrogênio (Falkiewicz-Dulik et al., 2005). São divididas em cinco classes; alfa, beta, gama, delta e epsilon (Madigan et al., 2014). As *Bacteroidetes* são bactérias Gram-positivas e são conhecidas por sua significativa diversidade metabólica, são responsáveis pela degradação de vários biopolímeros e compostos húmicos (Madigan et al., 2014). São divididas em três classes: *Bacteroides*, *Flavobacteria* e *Sphingobacteria*.

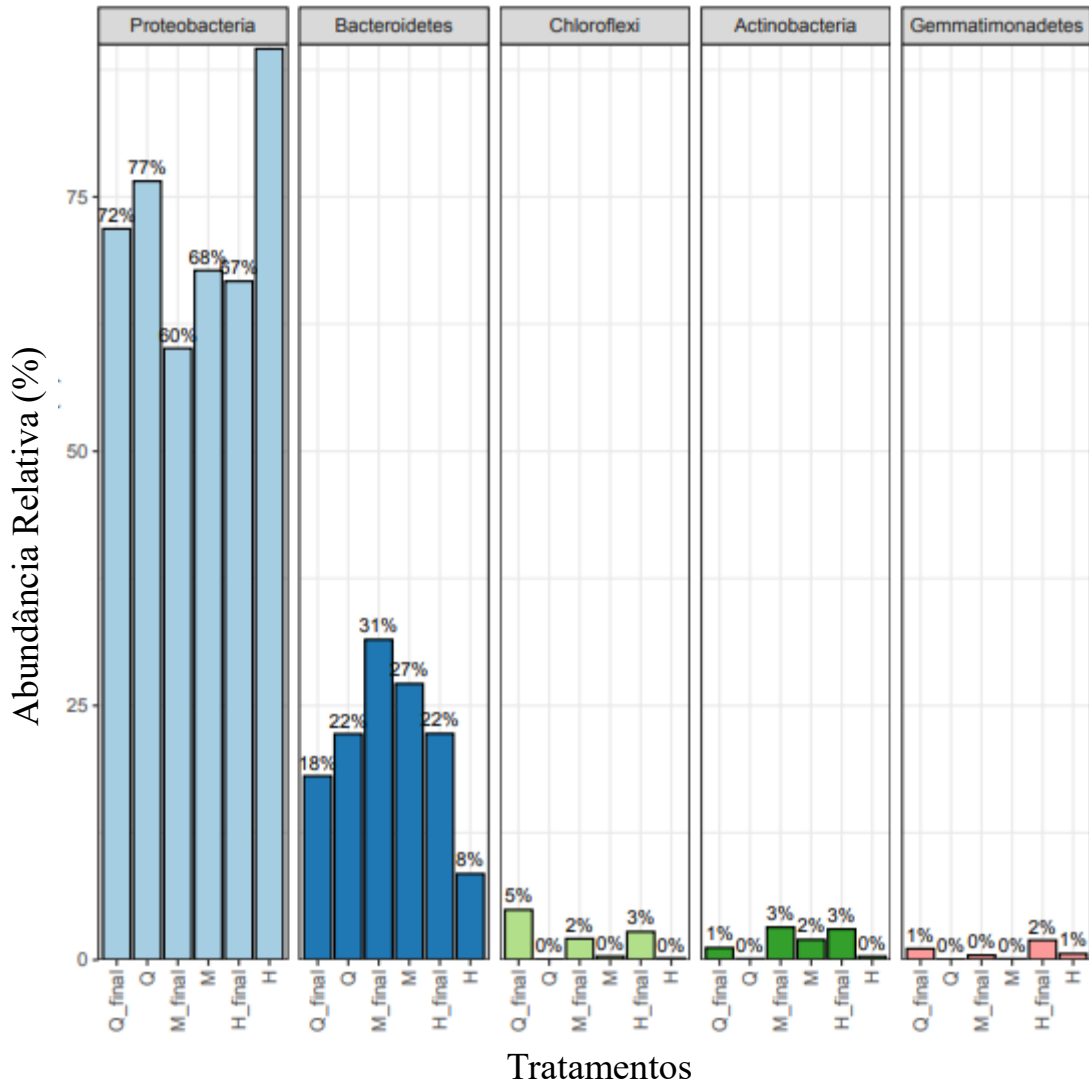
No início do experimento, ambos os filos representaram 98% de abundância relativa no tratamento heterotrófico, 95% no tratamento maduro e 99% no tratamento quimioautotrófico. No final do experimento, essa abundância relativa mudou para 89% no tratamento heterotrófico, 91% no tratamento maduro e 90% no tratamento quimioautotrófico. A abundância relativa de *Proteobacteria* diminuiu do início ao fim do experimento em todos os tratamentos. No tratamento heterotrófico, a abundância relativa foi de 90% para 67%, no tratamento maduro, de 68% para 60% e no tratamento quimioautotrófico, de 77% para 72%.

As *Bacteroidetes* aumentaram sua abundância relativa nos tratamentos heterotrófico de 8% para 22% e no maduro de 27% para 31%.

A mudança na concentração de *Proteobacteria* para *Bacteroidetes* pode ser devido ao acúmulo de matéria orgânica no sistema, onde muitas espécies de *Bacteroidetes* são responsáveis pela mineralização da matéria orgânica, além da entrada de carbono nesses dois tratamentos (Zhang et al., 2019). No tratamento quimioautotrófico, este Filo diminuiu do início para o final do experimento (22% a 18%). A quantidade de ortofosfato disponível no sistema quimioautotrófico pode ter alterado a abundância dessas bactérias. As *Bacteroidetes* desempenham um papel importante na ciclagem de compostos que apresentam fósforos inorgânicos e orgânicos com baixo peso molecular (Rofner et al., 2016).

Três outros filós estavam presentes em menor abundância relativa como *Actinobacteria*, *Chloroflexi* e *Gemmatimonadetes* (Figura 12). *Chloroflexi* (2-5%) estava presente apenas no final do experimento em todos os tratamentos. As *Actinobacteria* (1-3%) estavam presentes apenas no início do experimento no tratamento maduro e em todos os tratamentos ao final do experimento. As *Gemmatimonadetes* (1-2%) estavam presentes no início do experimento apenas no tratamento heterotrófico e no final do experimento nos tratamentos heterotrófico e quimioautotrófico. As bactérias menos abundantes (<0%) foram *Acidobacteria*, *Cyanobacteria*, *Patescibacteria*, *Planctomycetes* e *Verrucomicrobia*.

Figura 12. Abundância relativa (%) dos cinco principais filos dos sistemas quimioutotrófico (Q), heterotrófico (H) e maduro (M) das fases inicial e final do cultivo do camarão-branco-do-pacífico (*Litopenaeus vannamei*) estocados na densidade de 350 camarões m⁻³ utilizando diferentes sistemas de fertilização da água.



Actinobactérias são bactérias Gram-positivas e apresentam filamentos ramificados, são bactérias quimiorganotróficas (saprófitas) que nos lagos são responsáveis por degradar ácidos nucleicos e proteínas (Madigan et al., 2014). Além disso, podem desempenhar um importante papel biológico, como a reciclagem de biomateriais. Algumas espécies estão relacionadas a comportamentos mutualístico ou parasitário com plantas e animais (Goodfellow e Williams, 1983). Este grupo de bactérias possui potenciais cepas probióticas para a aquicultura e está associado a microbiota intestinal do camarão *L. vannamei* (Schleder et al., 2019). Elas são responsáveis pela produção de muitas enzimas hidrolíticas (quitinase, quitinolítica, ácidos graxos, celulolítica, hidrolisante de nitrila, amilolítica, proteolítica e liolítica), podendo fornecer benefícios nutricionais para o cultivo do camarão marinho (Das et al., 2008). Essas bactérias apresentam crescimento lento (Araújo, 1998) e, por esse motivo,

estavam presentes apenas ao final do experimento nos tratamentos heterotróficos e quimioautotróficos. No tratamento maduro por ser uma água reutilizada, essas bactérias aparecem no início, demonstrando seu potencial na ciclagem de nutrientes.

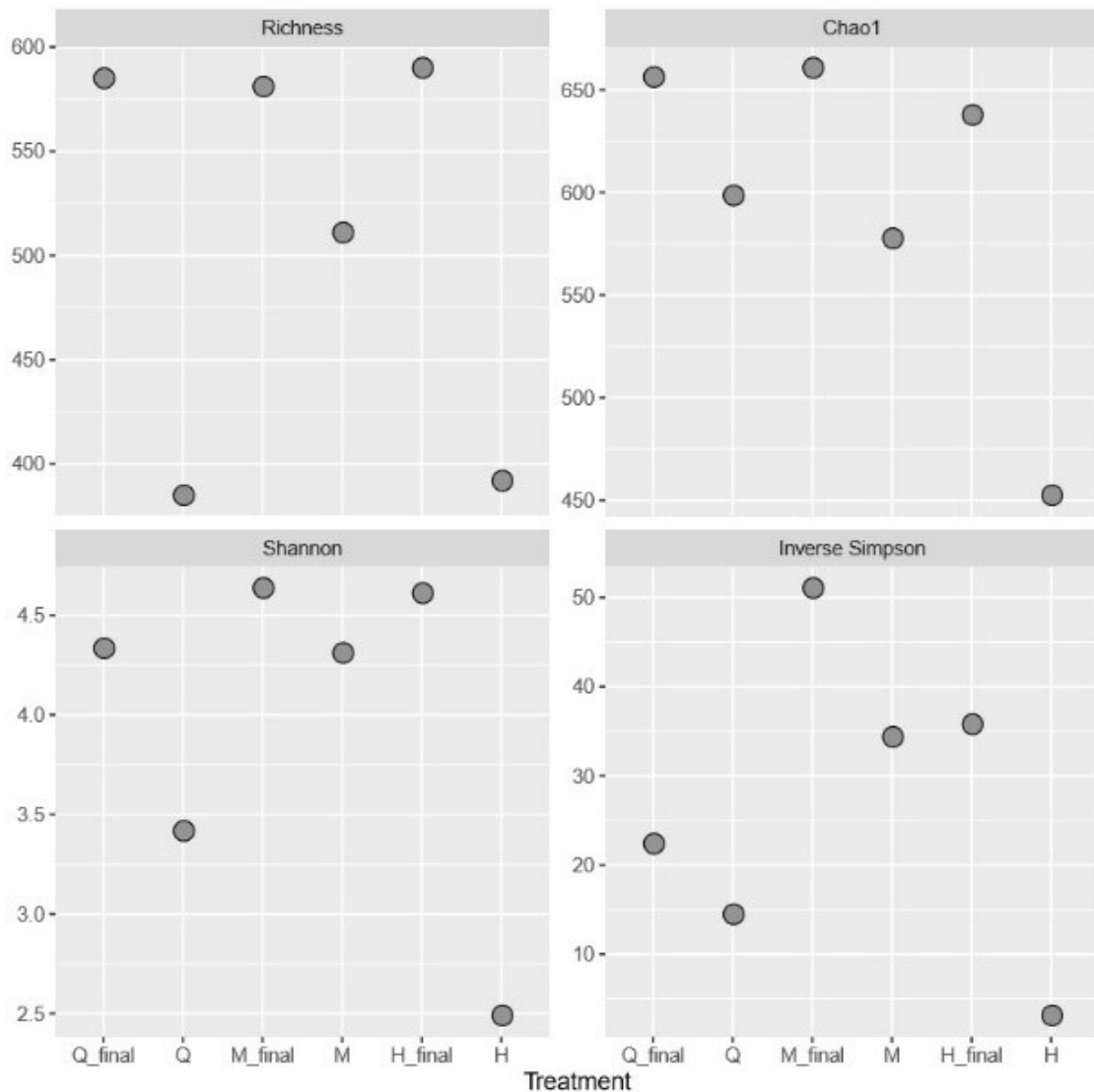
As *Chloroflexi* produzem energia a partir da luz, têm uma forma filamentosa alongada e são encontradas no tratamento de águas residuais (Falkiewicz-Dulik et al., 2005). Essas bactérias crescem e consomem compostos produzidos por outros microrganismos e utilizam também o mesmo tipo de substrato das *Bacteroidetes*, e, portanto, é provável a competição entre essas espécies (Kragelund et al., 2006). Em nosso estudo, o tratamento quimioutotrófico apresentou uma diminuição na quantidade de bactérias do filo *Bacteroidetes* do início para o final do experimento, dando espaço para as bactérias do filo *Chloroflexi*.

As *Gemmatimonadetes* representam um filo bacteriano pouco compreendido com apenas poucas espécies cultivadas. O primeiro membro desse filo foi descoberto em 2003 em um lodo ativado do sistema de tratamento de esgoto (Zhang et al., 2003). Essas bactérias são encontradas em ambientes marinhos, sedimentos, solos e lodo industrial (Zeng et al., 2006). Esse filo provavelmente precisa de uma carga de matéria orgânica alta para se desenvolver nos sistemas de aquicultura, e por esse motivo apareceu apenas no final do experimento. Luo et al. (2017) e Deng et al. (2018) relatam esse filo no sistema de aquicultura usando diferentes fontes de carbono no sistema de bioflocos.

Nossos resultados demonstram que as diferentes estratégias de fertilização da água no sistema bioflocos induziram mudanças na composição da microbiota da água durante o experimento e, além disso, o tempo do experimento pode alterar a abundância relativa das comunidades bacterianas. Cardona et al. (2016) mostraram que as comunidades bacterianas eram diferentes entre o sistema bioflocos (BF) e o sistema de água limpa (CW) devido a alterações nos fatores ambientais bióticos e abióticos.

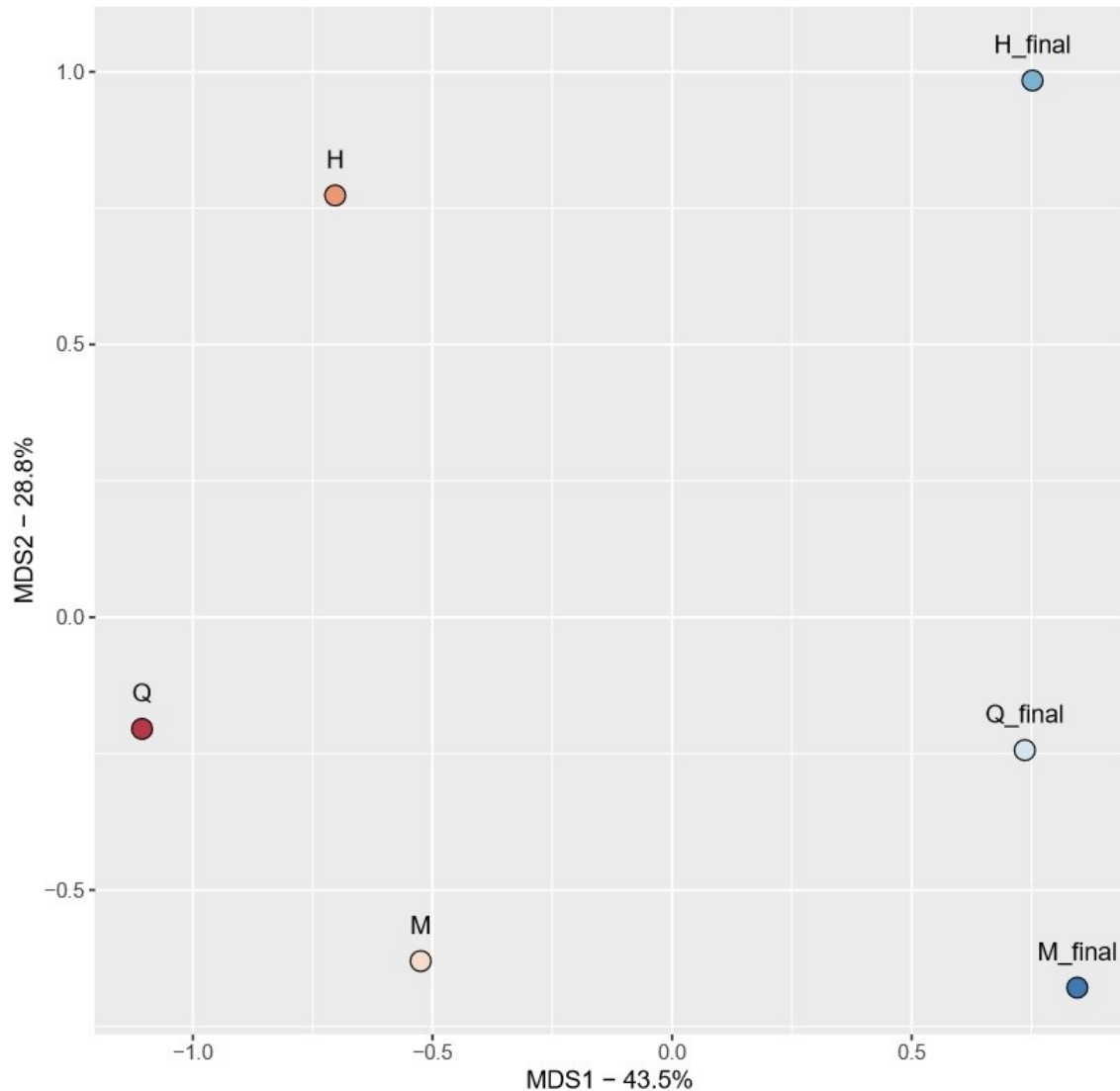
A riqueza e a diversidade aumentaram do início para o final do experimento em todos os tratamentos, sendo mais expressivas nos tratamentos heterotróficos e quimioautotróficos (Figura 13). Em geral, o índice de diversidade e riqueza apresentou valores crescentes entre as fases inicial e final.

Figura 13. Índices de riqueza e diversidade dos sistemas quimioautotrófico (Q), heterotrófico (H) e maduro (M) nas fases inicial e final do cultivo em bioflocos do camarão-branco-do-pacífico (*Litopenaeus vannamei*) estocados na densidade de 350 camarões m^{-3} utilizando diferentes sistemas de fertilização da água.



Os resultados da análise do sequenciamento metagenômico rarefeito (MDS) mostraram que a composição das comunidades bacterianas na água do sistema heterotrófico, maduro e quimioautotrófico eram relativamente diferentes e ao decorrer do experimento as comunidades bacterianas foram alteradas pela entrada de matéria orgânica no sistema (Figura 14).

Figura 14. Sequenciamento profundo metagenômico rarefeito (MDS) da água dos sistemas quimioautotrófico (Q), heterotrófico (H) e maduro (M) das fases inicial e final do cultivo do camarão-branco-do-pacífico (*Litopenaeus vannamei*) estocadas na densidade de 350 camarões m^{-3} usando diferentes sistemas de fertilização da água.

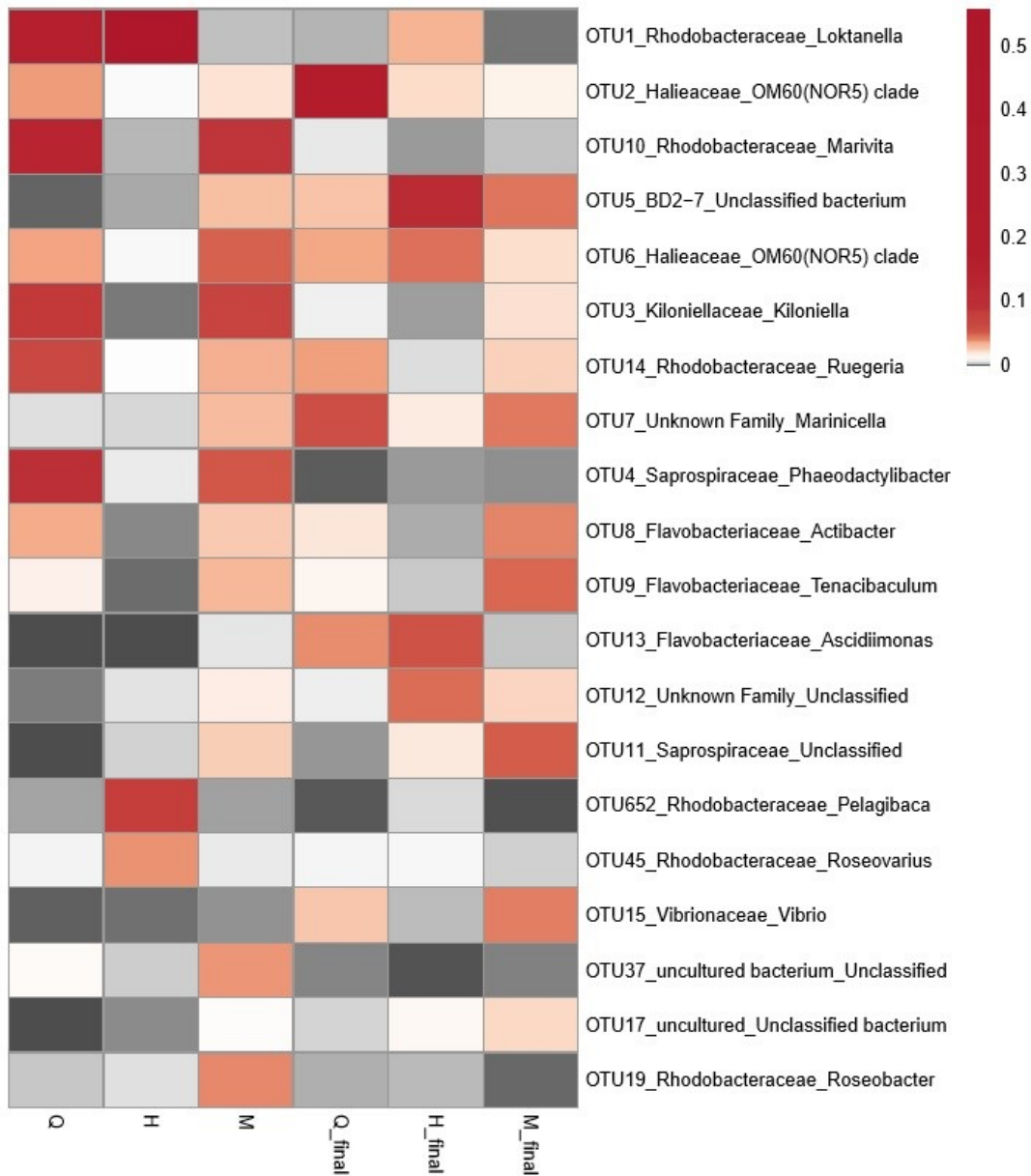


A Figura 15 mostra as 20 espécies mais abundantes de bactérias dos tratamentos heterotrófico, maduro e quimioautotrófico. *Rhodobacteraceae* foi mais abundante em todos os tratamentos nos dois tempos de amostragem. Esses achados corroboram com estudos anteriores realizados no sistema de bioflocos, como Martins et al. (2020). Alguns pesquisadores relataram efeitos probióticos com essas bactérias, onde diminuíram a mortalidade contra o *Vibrio* spp. (Balcazár et al., 2007).

Flavobacteriaceae foi mais abundante nos tratamentos quimioautotrófico e maduro para o tempo de amostragem inicial e no tempo de amostragem final em todos os tratamentos. Essas bactérias representam um dos microrganismos mais abundantes em ambientes aquáticos

(Kirchman, 2002). Pilotto et al. (2018) relataram que esta bactéria era a principal família de *Bacteroidetes* presente no intestino médio de *L. vannamei* cultivado em bioflocos e em sistema de água clara. *Saprospiraceae* foi mais abundante nos tratamentos quimiorautotrófico e maduro para o tempo inicial de amostragem e no tratamento maduro para o tempo final de amostragem. Martins et al. (2020) encontraram essas bactérias apenas em tratamento maduro e se relacionaram ao aparecimento de nitrato no sistema. *Halieaceae* foi mais abundante nos tratamentos quimioautotrófico e maduro para o tempo inicial de amostragem e em todos os tratamentos para o tempo final de amostragem. Schweitzer et al. (2020) encontraram essa família apenas no tratamento com 1030 mg L⁻¹ de sólidos suspensos totais no sistema de bioflocos. *Kiloniellaceae* foi mais abundante nos tratamentos quimioautotrófico e maduro para o tempo inicial de amostragem e no tratamento maduro para o tempo final de amostragem. São bactérias mesofílicas, quimio-heterotróficas, com resposta típica do crescimento marinho e moderadamente halotolerante. O metabolismo é aeróbico e facultativamente anaeróbico, com nitrato como aceitador de elétrons (Wiese et al., 2009). Esta característica explica sua abundância nos tratamentos quimioautotrófico e maduro.

Figura 15. O mapa de calor da análise microbiana do núcleo que mostra a distribuição da família dos três tratamentos: quimioautotrófico (Q), heterotrófico (H) e maduro (M).



O mapa de calor indica a densidade relativa para cada filo de bactéria em cada amostra. A coloração branca representa os menores valores e a coloração vermelha representa os valores mais elevados. As siglas Q, H, M, Qfinal, Hfinal, Mfinal indicam os tratamentos quimioautotrófico inicial, heterotrófico inicial, maduro inicial, quimioautotrófico final, heterotrófico final e maduro final, respectivamente.

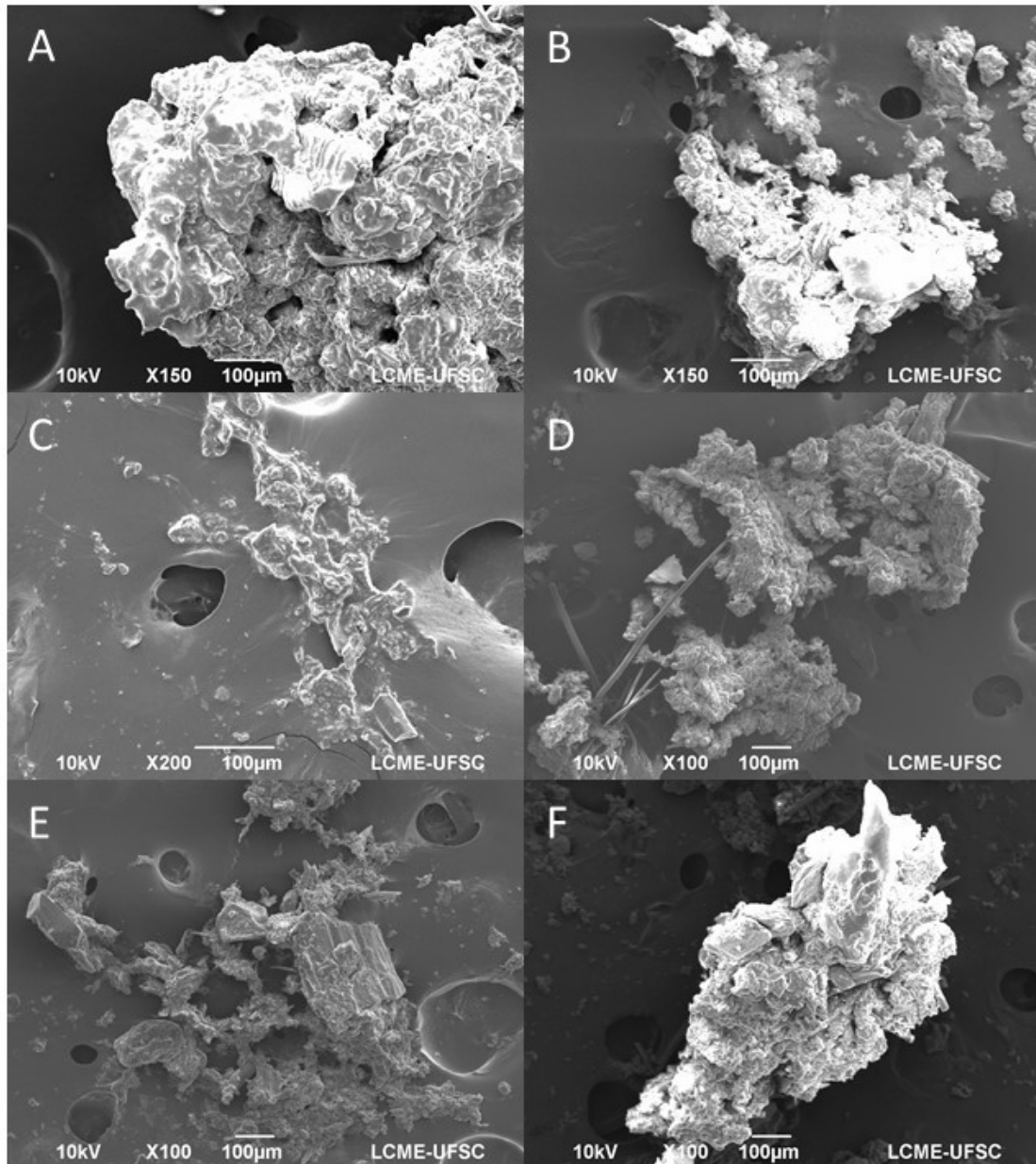
Vibrionaceae foi mais abundante no final do experimento nos tratamentos maduro e quimioautotrófico. Essa relação pode estar relacionada ao acúmulo de matéria orgânica nesses sistemas e também à ausência de remoção de sólidos nesses sistemas. O tratamento heterotrófico teve os sólidos removidos em três momentos, a fim de reduzir o risco de

entupimento branquial e exigir níveis adequados de oxigênio dissolvido. Portanto, podemos concluir que a remoção de sólidos é importante não apenas para o entupimento de brânquias, mas também como controle de bactérias oportunistas como o gênero *Vibrio* (Hargreaves 2013).

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Uma imagem do biofloco é mostrada na Figura 16. Os flocos são semelhantes em forma, mas variam em tamanho variando de 20 a 500 μm . A microestrutura dos bioflocos examinada por MEV não mostrou diferença significativa entre os tratamentos. Arias-Moscoso et al. (2016) encontraram tamanhos semelhantes variando de 3 a 800 μm no sistema bioflocos para camarão *L. vannamei*. O tamanho do biofloco pode desempenhar um papel importante na qualidade em termos de composição nutricional e retenção de nitrogênio pelos animais (Ekasari et al., 2014). Os indivíduos (bactérias, algas, protozoários, nematóides) em um biofloco se agregam pela secreção de lodo bacteriano (Thong, 2014). A estrutura dos bioflocos pode ser favorável ou não ao desenvolvimento de alguns grupos de microrganismos, e no caso do grupo nitrificante, torna-se necessárias condições ideais para o estabelecimento de microcolônias para garantir a eficácia no processo de nitrificação (Souza et al., 2019). O processo de nitrificação ocorreu em todos os tratamentos.

Figura 16. Observações de microscopia eletrônica de varredura de (A) superfície de tratamento heterotrófico (dia 1), (B) superfície de tratamento heterotrófico (dia 35), (C) superfície de tratamento maduro (dia 1), (D) superfície de maduro tratamento (dia 35), (E) superfície do tratamento quimioautotrófico (dia 1), (F) superfície do tratamento quimioautotrófico (dia 35).



Desempenho do camarão

Não foi observada diferença significativa ($p \geq 0,05$) no desempenho zootécnico do camarão marinho entre os tratamentos (Tabela 11). O peso médio final dos camarões nos tratamentos chegou a 9,6 g em 35 dias de experimento. O *L. vannamei* possui uma boa adaptação e rusticidade as condições ambientais que não interferem no seu crescimento. Os picos de compostos nitrogenados no tratamento heterotrófico não interferiram no crescimento

do camarão. O peso final e ganho de peso dos camarões cultivados em sistema de bioflocos aumenta devido aos benefícios nutricionais gerados pela alta produtividade natural presente nos sistemas (Wasiolesky et al. 2006). A taxa de crescimento foi semelhante à obtida por Jatobá et al. (2014) no sistema bioflocos. Os FCRs para os três tratamentos foram <1,7 e taxa de sobrevivência ficou acima de 90%. A sobrevivência e as FCRs encontradas estavam de acordo com o esperado em sistemas de bioflocos (Scopel et al., 2011; Pierri et al., 2015; Espírito Santo et al., 2016).

Tabela 11. Desempenho zootécnico do camarão-branco-do-pacífico *L. vannamei* cultivado em sistema de bioflocos em diferentes sistemas de fertilização de água: heterotrófico, quimioautotrófico e maduro por 35 dias, estocados a uma densidade de 350 camarões m⁻³.

Parâmetros	Heterotrófico	Maduro	Quimioautotrófico
Peso médio final (g)	9,85±0,87	9,81±0,47	9,42±0,83
Crescimento semanal (g semana⁻¹)	1,28±0,70	1,27±0,44	1,19±0,41
Biomassa final (Kg)	942,87±120,21	961,70±51,98	938,87±54,08
Sobrevivência (%)	90,9±6,24	93,3±2,57	91,6±3,59
Taxa de conversão alimentar	1,37±0,36	1,48±0,13	1,62±0,19
Produtividade (Kg m⁻³)	3,14±0,40	3,20±0,17	3,12±0,18

Média ± DP. As diferentes letras indicam diferença significativa (p <0,05) entre os tratamentos na mesma linha pelo teste de Tukey.

Conclusão

Em resumo, os tratamentos quimioautotrófico e maduro destacaram-se por sua capacidade de manter a qualidade da água em níveis constantes. O desempenho do camarão revelou que sistemas heterotrófico, maduro e quimioautotrófico são boas abordagens para o gerenciamento do camarão usando o BFT. Nosso estudo sugere que diferentes estratégias para a preparação da água afetaram a diversidade e variedade de microrganismos presentes no sistema bioflocos, resultando em uma comunidade bacteriana rica que pode ajudar a controlar a qualidade da água e servir como fonte de proteína microbiana.

Referências

APHA (American Public Health Association), 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Waste water. 21.ed. Washington, DC, p.1368.

Araújo, J. M. 1998. Estratégias para isolamento seletivo de actinomicetos. In: Melo, I. S., Azevedo, J. L. (Eds.) *Ecologia Microbiana*. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, p. 351-367.

Arias-Moscoso, J. L., Cuevas-Acuna, D. A., Rivas-Veja, M. E., Martínez-Córdova, L. R., Osuna-Amarilas, P., Miranda-Baeza, A. 2016. Physical and chemical characteristics of lyophilized biofloc produced in whiteleg shrimp cultures with different fishmeal inclusion into the diets. *Latin American Journal Aquatic Research*. 44 (4), 769-778.
<https://doi.org/10.3856/vol44-issue4-fulltext-12>

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

Avnimelech, Y. 2012. *Biofloc Technology – A Practical Guide Book*, second ed. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. United States, p. 283.

Avnimelech, Y; Kochba, M. 2009. Evaluation of nitrogen uptake and excretion by tilapia in bio floc tanks, using N-15 tracing. *Aquaculture*. 287 (1-2), 163-168.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.10.009>

Balcázar, J. L., Rojas-Luna, T., Cunningham, D. P. 2007. Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 96, 147-150. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.04.008>

Ballester, E., Abreu, P. C., Cavalli, R., Emerenciano, M., Abreu, L., Wasielesky, W. 2010. Effect of practical diets with different protein levels on the performance of *Farfantepenaeus paulensis* juveniles nursed in a zero-exchange suspended microbial flocs intensive system. *Aquaculture Nutrition*. 16 (2), 163–172. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00648.x>

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

Browdy, C.L., Stokes, A.D., McAbee, B., Atwood, H., Wasielesky, W., Leffer, J., 2006. Insights into the functional roles of major components of microbial communities in zero exchange superintensive shrimp systems. *Aquaculture America 2006 Book of Abstracts*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA.

Burford, M. A., Thompson, P. J., McIntosh, R. P., Bauman, R. H., Pearson, D. C. 2004. The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero-exchange system. 232, 525-537. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00541-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00541-6)

Cardona, E., Gueguen, Y., Magré, K., Lorgeoux, B., Piquemal, D., Pierrat, F., Noguier, F., Saulnier, D. 2016. Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system. *BMC Microbiology*,
<https://doi.org/10.1186/s12866-016-0770-z>

Cienfuegos, M. K., Monroy, D. M. C., Hamdan, P. A., Castro, M. J., Aguirre, G. J. F., Bustos, M. J. A. 2018. Effect of two probiotics on bacterial community composition from

biofloc system and their impact on survival and growth of tilapia (*Oreochromis niloticus*). International Journal of Fisheries and Aquatic Studies. 6 (2), 525-533.

Curtin, L. V. 2003. Molasses – general considerations. Ambler, Pennsylvania, p. 11.
 Das, S., Ward, L. R., Burke, C. 2008. Prospects of using marine actinobacteria as probiotics in aquaculture. Appl Microbiology Biotechnology. 81, 419-429.
<https://doi.org/10.1007/s00253-008-1731-8>

De Schryver, P., Verstraete, W., 2009. Nitrogen removal from aquaculture pond water by heterotrophic nitrogen assimilation in lab-scale sequencing batch reactors. Bioresource Technology. 100, 1162-1167. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.08.043>

Deng, M., Chen, J., Gou, J., Hou, J., Li, D., He, X. 2018. The effect of different carbon sources on water quality, microbial community and structure of biofloc systems. Aquaculture. 482, 102-110. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.09.030>

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

Ekasari, J., Angela, D., Waluyo, S. H., Bachtiar, T., Surawidjaja, E. H., Bossier, P., DeSchryver, P. 2014. The size of biofloc determines the nutritional composition and the nitrogen recovery by aquaculture animals. Aquaculture. 426-427. 105-111.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.01.023>

Emerenciano, M., Ballester, E. I. C., Cavalli, R. O., Wasielesky, W. 2012. Biofloc technology application as a food source in a limited water exchange nursery system for pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817). Aquaculture Research. 43, 447-457.
<http://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02848.x>

Espírito Santo, C. M. E., Pinheiro, I. C., Jesus, G. F. A., Mourino, J. L. P., Vieira, F. N., Seiffert, W. Q. 2016. Soybean molasses as na organic carbono source in the farming of *Litopenaues vannamei* (Boone, 1931) in a biofloc system. Aquaculture Research. 1-9.
<https://doi.org/10.1111/are.13020>

Falkiewicz-Dulik, M., Janda, K., Wypych, G. 2005. Handbook of Material Biodegradation, Biodeterioration, and Biostablization. Second ed. Published by Chem Tec Publishing, Toronto, Canada.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture - Meeting the sustainable development goals. Sofia, Rome.

FAO, 2017. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org> (accessed 16 September 2017).

Ferreira, G. S., Silva, V. F., Martins, M. A., Silva, A. C. C. P., Machado, C., Seiffert, W. Q., Vieira, F. N. 2019. Strategies for ammonium and nitrite control in *Litopenaues vannamei* nursery systems with bioflocs. Aquacultural Engineering (*in press*).

- Furtado, P.S., Campos, B.R., Serra, F.P., Klosterhoff, M., Romano, L.A., Wasielesky Jr, W., 2015. Effects of nitrate toxicity in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, reared with biofloc technology (BFT). *Aquaculture International*. 23, 315-327. <http://doi.org/10.1007/s10499-014-9817-z>
- GOAL, 2017. Global Aquaculture Alliance. <https://www.aquaculturealliance.org/goal/> (accessed 20 October 2019).
- Goodfellow, M., Williams, S.T. 1983. Ecology of actinomycetes. *Annual Review of Microbiology*. 37, 189-216. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.37.100183.001201>.
- Hargreaves, J. A. 2013. Biofloc production systems for aquaculture. Southern Regional Aquaculture Center. 4503.
- Jatobá, A., Silva, B. C., Silva, J. S., Vieira, F. N., Mourino, J. L. P., Seiffert, W. Q., Toledo, T. M. 2014. Protein levels for *Litopenaeus vannamei* in semi-intensive and biofloc systems. *Aquaculture*. 432, 365-371. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.005>
- Kim, S. K., Pang, Z., Seo, H. C., Cho, Y. R., Samocha, T. M., Jang, I. K. 2014. Effect of bioflocs on growth and immune activity of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* postlarvae. *Aquaculture Research*. 45, 362–371. <https://doi.org/10.1111/are.12319>
- Kirchman, D. L. 2002. The ecology of *Cytophaga-Flovobacteria* in aquatic environments. *FEMS Microbiology Ecology*. 39, 91-100. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00910.x>
- Kragelund, C., Levantesi, C., Borger, A., Thelen, K., Eikelboom, D., Tandoi, V., Kong, Y., Waarde, J. V. D., Krooneman, J., Rossetti, S., Thomsen, T. R., Nielsen, P. H. 2006. Identity, abundance and ecophysiology of filamentous *Chloroflexi* species present in activated sludge treatment plants. *Microbiology Ecology*. 59, 671-682. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00251.x>
- Krummenaeur, D., Samocha, T., Poersch, L., Lara, G., Wasielesky Jr, W. 2014. The Reuse of Water on the Culture of Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in BFT System. *Journal of the World Aquaculture Society*. 45, 3-14. <https://doi.org/10.1111/jwas.12093>
- Kuhn, D. D., Boardman, G. D., Lawrence, A. L., Marsh, L., Flick Jr., G. J. 2009. Microbial floc meal as a replacement ingredient for dish meal and soybean protein in shrimp feed. *Aquaculture*. 296, 51-57. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.07.025>
- Lara, G., Furtado, P.S., Hostins, B., Poersch, L., Wasielesky Jr, W. 2016. Addition of sodium nitrite and biofilm in a *Litopenaeus vannamei* biofloc culture system. *Latin American Journal of Aquatic Research*. 44, 760-768. <http://dx.doi.org/10.3856/vol44-issue4-fulltext-11>
- Luo, G., Zhang, N., Cai, S., Tan, H., Liu, Z. 2017. Nitrogen dynamics, bacterial community composition and biofloc quality in biofloc-based systems cultured *Oreochromis niloticus* with poly-b-hydroxybutyric and polycaprolactone as external carbohydrates. *Aquaculture*. 1-28. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.07.017>

- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, D.H., Stahl, D.A., 2016. *Microbiologia de Brock*. Artmed, 14o ed., p.1032.
- Manush, S.M., Pal, A.K., Das, T., Mukherjee, S.C. 2005. Dietary high protein and vitamin C mitigate stress due to chelate claw ablation in *Macrobrachium rosenbergii* males. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 142, 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.07.004>
- Martínez-Córdova, L. R., Vargas-Albores, F., Garibay-Valdez, E., Ortíz-Estrada, A. M., Porchas-Cornejo, M. A., Lago-Lestón, A., Martínez-Porchas, M. 2018. Amaranth and wheat grains tested as nucleation sites of microbial communities to produce bioflocs used for shrimp culture. *Aquaculture*. 497, 503-509. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.031>
- Martínez-Córdova, L.R., Emerenciano, M., Miranda-Baeza, A., Martínez-Porchas, M., 2015. Microbial-based systems for aquaculture of fish and shrimp: an updated review. *Reviews in Aquaculture*. 7, 131-148. <https://doi.org/10.1111/raq.12058>
- Martins, M. A., Poli, M. A., Legarda, E. C., Pinheiro, I. C., Carneiro, R. F. S., Pereira, S. A., Martins, M. L., Gonçalves, P., Schleder, D. D., Vieira, F. N. 2020. Heterotrophic and mature biofloc systems in the integrated culture of Pacific white shrimp and Nile tilapia. *Aquaculture*. 514, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019>.
- Naylor, R.L., Goldburg, R.J., Primavera, J.H., Kautsky, N., Beveridge, M.C.M, Clay, J., Folke, C., Lubchenco, J., Mooney, H., Troell. M., 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature*. 405, 1017-1024. <https://doi.org/10.1038/35016500>
- Otoshi, C.A., Moss, N.R. 2011. Establishing Nitrifying Bacteria in Super-Intensive Biofloc Shrimp Production. *Global Aquaculture Advocate*, May-June.
- Piérri, V., Severino, V., Oliveira, K. G., Espírito Santo, C. M., Vieira, F. N., Seiffert, W. Q. 2015. Cultivation of marine shrimp in biofloc technology (BFT) system under different water alkalinities. *Brazilian Journal of Biology*. 75 (3), 558-564. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.16213>
- Pilotto, M. R., Gonçalves, A. N. A., Vieira, F. N., Seiffert, W. Q., Bachere, E., Rosa, R. D., Perazzolo, L. M. 2018. Exploring the impact of the biofloc rearing system and a oral WSSV challenge on the intestinal bacteriome of *Litopenaeus vannamei*. *Microorganisms*. 6, 83. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6030083>
- Prangnell, D.I., Castro, L.F., Ali, A.S., Zimba, P.V., Laramore, S.E., Samocha, T.M., 2016. Some Limiting Factors in Superintensive Production of Juvenile Pacific Whit Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in No-water-exchange, Biofloc-dominated Systems. *Journal of the world aquaculture society*. 47, 396-413. <https://doi.org/10.1111/jwas.12275>
- Ray, A. K., Ghosh, K., Ringo, E. 2012. Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review. *Aquaculture Nutrition*. 18, 465-492. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2012.00943.x>

- Ray, A.J., Drury, T.H., Cecil, A., 2017. Comparing clear-water RAS and biofloc systems: Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production, water quality, and biofloc nutritional contributions estimated using stable isotopes. *Aquacultural Engineering*. 77, 9-14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaeng.2017.02.002>
- Ray, A.J., Lotz, J.M., 2014. Comparing a chemoautotrophic-based biofloc system and three heterotrophic-based systems receiving different carbohydrate sources. *Aquacultural Engineering*. 63, 54-61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaeng.2014.10.001>
- Ray, A.J., Seaborn, G., Leffler, J.W., Wilde, S.B., Lawson, A., Browdy, C.L. 2010. Characterization of microbial communities in minimal-exchange, intensive aquaculture systems and the effects of suspended solids management. *Aquaculture*. 310, 130-138. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.10.019>
- Rofner, C., Sommaruga, R., Pérez, M. T. 2016. Phosphate and ATP uptake by lake bacteria: does taxonomical identity matter? *Environmental Microbiology*. 18 (12), 4782-4793. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13368>
- Samocha, T. M., Lawrence, A. L., Collins, C. A., Castille, F. L., Bray, W. A., Davies, C. J., Lee, P. G., Wood, G. F. 2004. Production of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in high-density greenhouse-enclosed raceways using low salinity groundwater. *Aquaculture*. 15, 1-19. https://doi.org/10.1300/J028v15n03_01
- Schleder, D. D., Black, M., Peruch, L. G. B., Poli, M., Rosa, K. V., Gonçalves, P., Fracalossi, D., Vieira, F. N., Andreatta, E. R., Hayashi, L. 2019. Impact of combinations of brown seaweeds on shrimp gut microbiota and response to thermal shock and White Spot Disease. *Aquaculture (in press)*.
- Schmidt, E.C., Dos Santos, R., Horta, P.A., Maraschin, M., Bouzon, Z.L. 2010. Effects of UVB radiation on the agarophyte *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta, Gracilariales): changes in cell organization, growth and photosynthetic performance. *Micron*. 41 (8), 919-930. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2010.07.010>
- Schweitzer, R., Arantes, R., Costodio, P. F. S., Espirito Santo, C. M., Arana, L. V., Seiffert, W. Q., Andreatta, E. R. 2013. Effect of different biofloc levels on microbial activity, water quality and performance of *Litopenaeus vannamei* in a tank system operated with no water Exchange. *Aquacultural Engineering*. 56, 59-70. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaeng.2013.04.006>
- Schweitzer, R., Fonseca, G., Orteney, N., Menezes, F. C. T., Thompson, F. L., Thompson, C. C., Gregoracci, G. B. 2020. The role of sedimentation in the structuring of microbial communities in biofloc-dominated aquaculture tanks. *Aquaculture*. 514. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734493>
- Scopel, B. R., Schweitzer, R., Seiffert, W. Q., Piérri, V., Arantes, R. F., Vieira, F. N., Vinatea, L. A. 2011. Substituição da farinha de peixe em dietas para camarões marinhos cultivados em sistema de bioflocos. *Revista Agropecuária Brasileira*. 46 (8), 928-934.
- Sesuk, T., Powtongsook, S., Nootong, K. 2009. Inorganic nitrogen control in a novel zero-water exchanged aquaculture system integrated with airlift-submerged fibrous nitrifying

biofilters. *Bioresource Technology*. 100, 2088-2094.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.10.027>

Silva, K.R., Wasielesky Jr., W., Abreu, P.A., 2013. Nitrogen and Phosphorus Dynamics in the Biofloc Production of the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 44, 30-41. <https://doi.org/10.1111/jwas.12009>

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

Strickland, J.D.H., Parsons, T.R. 1972. A practical handbook of seawater analysis. Ottawa: Fishery Research Board Canada, p.310.

Tahim, E.F., Damaceno, M.N., Araújo, I.F., 2019. Trajetória tecnológica e sustentabilidade ambiental na cadeia de produção da carcinicultura no Brasil. *Revista de Economia e Sociologia Rural*. 57 (1), Jan./Mar. <http://dx.doi.org/10.1590/1234-56781806-94790570106>

Thong, P. Y. 2014. Biofloc technology in shrimp farming: success and failure. *Aquaculture Asia Pacific*. 10 (4), 13-16.
https://www.academia.edu/24674545/Use_of_Bioflocs_in_shrimp_farming

Van Wyk, P., Scarpa, J. 1999. Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Tallahassee, Florida, p.128-138.

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

Wei, Y. F., Liao, S. A., Wang, A. I. 2016. The effect of different carbon sources on the nutritional composition, microbial community and structure of bioflocs. *Aquaculture*, 465, 88-93.

Wiese, J., Thiel, V., Gartner, A., Schmaljohann, R., Imhoff, J. F. 2009. *Kiloniella laminariae* gen. nov., sp. nov., an alphaproteobacterium from the marine macroalga *Laminaria saccharina*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59, 350-356. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.001651-0>

Wildförster, L. 2016. Extração de lípidos. Universidade de Ciências Aplicadas de Bremerhaven.

Xu, W. J., Pan, L. Q. 2014. Evaluation of dietary protein level on selected parameters of immune and antioxidant systems, and growth performance of juvenile *Litopenaeus vannamei* reared in zero-water exchange biofloc-based culture tanks. *Aquaculture*. 426-427, 181-188. <https://doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.02.003>

Xu, W.J., Morris, T.C., Samocha, T.M., 2016. Effects of C/N ratio on biofloc development, water quality, and performance of *Litopenaeus vannamei* juveniles in a biofloc-based, high-

density, zero-exchange, outdoor tank system. *Aquaculture*. 453, 169-175.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.11.021>

Zeng, Y., Baumbach, J., Barbosa, E. G. V., Azevedo, V., Zhang, C., Koblizek, M. 2016. Metagenomic evidence for the presence of phototrophic Gemmatimonadetes bacteria in diverse environments. *Environmental Microbiology Reports*. 8 (1), 139-149.
<https://doi.org/10.1111/1758-2229.12363>

Zhang, H., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Hugenholtz, P., Kim, H., Kamagata, Y., Nakamura, K. 2003. *Gemmatimonas aurantiaca* gen. Nov., sp. Nov., a Gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum *Gemmatimonadetes* phyl. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53, 1155-1163. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02520-0>

Zhang, M., Pan, L., Huang, F., Gao, S., Su, C., Zhang, M., He, Z. 2019. Metagenomic analysis of composition, function and cycling processes of microbial community in water, sediment and effluent of *Litopenaeus vannamei* farming environments under different culture modes. *Aquaculture*. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.03.038>

3. CONCLUSÕES GERAIS

Foi possível contribuir para o desenvolvimento do sistema superintensivo de cultivo de camarões marinhos, através da manipulação da comunidade microbiana do bioflocos. As estratégias de fertilização do tanque demonstraram resultados satisfatórios para os parâmetros zootécnicos, composição centesimal do floco, controle da qualidade de água e alteração na riqueza e diversidade de bactérias no sistema. A presença das bactérias nitrificantes desde o início do experimento mantém os parâmetros de qualidade de água, em especial a amônia e o nitrito em níveis ideais para o cultivo de *L. vannamei* sem a necessidade de adicionar carbono orgânico no tanque, o que confere uma menor produção de lodo no sistema contribuindo para a sustentabilidade da carcinicultura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO

AGUILERA-RIVERA, D. *et al.* Probiotic effect of floc on *Vibrios* in the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 425, p. 215–219, 2014.

APOLINÁRIO, D.F. **Avaliação do estado sanitário de camarões (*Litopenaeus vannamei*) cultivados em quatro fazendas no estado do Ceará**. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

ARMSTRONG, D.; STEPHENSON, M.; KNIGHT, A. Acute toxicity of nitrite to larvae of the giant Malaysian prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **Aquaculture**, v. 9, p. 39-46, 1976.

ARNOLD, S. J. *et al.* High-intensity, zero water-exchange production of juvenile tiger shrimp *Penaeus monodon*: An evaluation of artificial substrates and stocking density. **Aquaculture**, v. 293, p. 42-48, 2009.

AVNIMELECH, Y. **Biofloc Technology – A Practical Guide Book**, 2^a Edition. **The World Aquaculture Society**, Baton Rouge, Louisiana. United States, 2012. 283 p.

AVNIMELECH, Y. Carbon nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. **Aquaculture**, v. 176, p. 227-235, 1999.

AVNIMELECH, Y; KOCHBA, M. Evaluation of nitrogen uptake and excretion by tilapia in bio floc tanks, using N-15 tracing. **Aquaculture**, v. 287, n. 1-2, p. 163-168, 2009.

BROCK, J. A., MAIN, K. L. A guide to the common problems and disease of cultured *Penaeus vannamei*. **World Aquaculture Society**, 242 pp. 1994.

BURFORD, M. A. *et al.* Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize. **Aquaculture**, v. 219, p. 393-411, 2003.

CARDONA, E. *et al.* Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system. **BMC Microbiology**, 2016.

CERVANTES, F. J. **Environmental Technologies to Treat Nitrogen Pollution**. London: IWA Publishing, 2009.

CHEN, J.; CHIN, T. Joint action of ammonia and nitrate on tiger prawn *Penaeus monodon* postlarvae. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 19, p. 143-148, 1988.

CIENFUEGOS, M. K. *et al.* Effect of two probiotics on bacterial community composition from biofloc system and their impact on survival and growth of tilapia (*Oreochromis niloticus*). **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, v. 6, n. 2, p. 525-533, 2018.

COHEN, J.M. *et al.* Characterization of water quality factors during intensive raceway production of juvenile *Litopenaeus vannamei* using limited discharge and biosecure management tools. **Aquacultural Engineering**, v. 32, p. 425–442, 2005.

COSTA, R.A.; VIEIRA, G.H.F.; VIEIRA, R.H.S.F.; SAMPAIO, S.S. *Vibrio* em amostras de água de viveiros de cultivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, no Ceará-Brasil. **Atlântica**, v. 31 (2), p. 177-182, 2009.

CRAB, R. *et al.* Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. **Aquaculture**, v. 270, p. 1-14, 2007.

CRAB, R. *et al.* The effect of different carbon sources on the nutritional value of bioflocs, a feed for *Macrobrachium rosenbergii* postlarvae. **Aquaculture Research**, v. 41, p. 559–567, 2010.

DE SCHRYVER, P., VERSTRAETE, W. Nitrogen removal from aquaculture pond water by heterotrophic nitrogen assimilation in lab-scale sequencing batch reactors. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1162-1167, 2009.

DENG, M. *et al.* The effect of different carbon sources on water quality, microbial community and structure of biofloc systems. **Aquaculture**, v. 482, p. 102-110, 2018.

EBELING, J. M.; TIMMONS, M. B.; BISOGNI, J. J. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. **Aquaculture**, v. 257, n. 1-4, p. 346-358, 2006.

EKASARI, J.; CRAB, R.; VERSTRAETE, W. Primary nutritional content of bio-flocs cultured with different organic carbon sources and salinity. **Journal of Biosciences**, v. 17, n. 3, p. 125-130, 2010.

EMERENCIANO, M. *et al.* Biofloc technology application as a food source in a limited water exchange nursery system for pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817). **Aquaculture Research**, v. 43, p. 447-457, 2012.

EMERENCIANO, M., GAXIOLA, G., Cuzo, G. Biofloc Technology (BFT): A Review for Aquaculture Application and Animal Food Industry. **Biomass Now-Cultivation and Utilization**, Intech. pp 301-328, 2013.

EMERENCIANO, M.G.C., *et al.* **Biofloc technology (BFT): a tool for Water quality management in aquaculture**. In: Tutu, Hlanganani (Ed.), Water Quality. Intech, pp. 91–109. 2017. <http://dx.doi.org/10.5772/66416>.

ESPÍRITO SANTO, Carlos Manoel do; SEIFFERT, Walter Quadros orientador. **Melaço de soja na fertilização do cultivo super-intensivo de camarão branco do Pacífico em sistema de bioflocos microbianos**. 2014. 49 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2014.

FALKIEWICZ-DULIK, M.; JANDA, K.; WYPYCH, G. **Handbook of Material Biodegradation, Biodeterioration, and Biostabilization**, Published by Chem Tec Publishing, Toronto, Canadá, Second edition, 2005.

FAO (**Food and Agriculture Organization of the United Nations**). Disponível em: <<http://www.fao.org/3/x6941e/x6941e04.htm>>. Acesso em: 23/07/2019.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals**. Rome. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. 2018.

FLEGEL, T. W. The shrimp response to viral pathogens. In: Browdy, C. L., Jory, D. E. (Eds.), *The new wave. Proceedings of the special session on sustainable shrimp aquaculture*. **World Aquaculture Society**, Boca Raton. P. 190-214, 2001.

FÓES, G. K., GAONA, C. A. P., POERSCH, L. H. Cultivo em bioflocos (BFT) é eficaz na produção intensiva de camarões. **Segmentos da Aquicultura**, p. 28-32, 2012.

GAONA, C.A.P. *et al.* The effect of solids removal on water quality, growth and survival of *Litopenaeus vannamei* in a biofloc technology culture system. **International Journal of Recirculating Aquaculture**, v. 12, p. 54-73, 2012.

HARI, B. *et al.* The effect of carbohydrate addition on water quality and the nitrogen budget in extensive shrimp culture systems. **Aquaculture**, v. 252, p. 248-263, 2006.

HUGENHOLTZ, P., SKARSHEWSKI, A., PARKS, D. Genome-Based Microbial Taxonomy Coming of Age. **Cold Spring Harbor perspectives in Biology**, v. 8, 2016.

IBGE (**Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**). Disponível em: [<ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2016/ods/>](http://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2016/ods/). Acesso em: 24/07/2017.

JAYASANKAR, P.; MATHU, M. Toxicity of nitrite to the larvae of *Penaeus indicus*. **Indian Journal of Fisheries**, v. 30, p. 231-240, 1983.

KHATOON, H. *et al.* Biofloc as a potential natural feed for shrimp postlarvae. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 113, p. 304-309, 2014.

KRUMMENAEUR, D. *et al.* The Reuse of Water on the Culture of Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in BFT System. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 45, p. 3-14, 2014.

KUBITZA, F. Aquicultura no Brasil: Principais espécies, áreas de cultivo, rações, fatores limitantes e desafios. **Panorama da Aquicultura**, v. 25, n. 150, julho/agosto, 2015.

KUHN, D. D. *et al.* Microbial floc meal as a replacement ingredient for dish meal and soybean protein in shrimp feed. **Aquaculture**, v. 296, p. 51-57, 2009.

LARA, G. *et al.* Addition of sodium nitrite and biofilm in a *Litopenaeus vannamei* biofloc culture system. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 44, p. 760-768, 2016.

LARA, G. R. **Técnicas de manejo aplicadas a redução das concentrações de nitrito na água de cultivo de *Litopenaeus vannamei* em sistema de bioflocos**. Dissertação (Mestrado em Aquicultura), Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2012.

LIN, Y. C.; CHEN, J. C. Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* Boone juveniles at different salinity levels. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 259, p. 109-119, 2001.

- LUO, G. et al. Nitrogen dynamics, bacterial community composition and biofloc quality in biofloc-based systems cultured *Oreochromis niloticus* with poly-b-hydroxybutyric and polycaprolactone as external carbohydrates. **Aquaculture**, p. 1-28, 2017.
- MADIGAN, M. T. *et al.* Microbiologia de Brock. Artmed, 14o ed., p.1032, 2016.
- MAGALHÃES, M. S. E. **Cultivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (boone,1931) em sistema multifásico**. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2004.
- MAHANAND, S. S.; MOULICK, S.; RAO, P. S. Optimum formulation of feed for rohu, *Labeo rohita* (Hamilton), with biofloc as a component. **Aquaculture Internacional**, v. 21, p. 347-360, 2013.
- MAICÁ, P. F.; BORBA, M. R.; WASIELESKY Jr, W. Effect of low salinity on microbial floc composition and performance of *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles reared in a zero-water-exchange super-intensive system. **Aquaculture Research**, v. 43, p. 361-370, 2012.
- MARTÍNEZ-CÓRDOVA, L. R. et al. Amaranth and wheat grains tested as nucleation sites of microbial communities to produce bioflocs used for shrimp culture. **Aquaculture**, v. 497, p. 503-509, 2018.
- MARTINS, M. A. et al. Heterotrophic and mature biofloc systems in the integrated culture of Pacific white shrimp and Nile tilapia. **Aquaculture**, 2020.
- MEYER, F.P.; WARREN, J.W.; CAREY, T.G. **A guide to integrated fish health management in the great lakes basin**. Great Lakes Fishery Commission, Special Publication 83-1. Ann Arbor, MI, USA, 1983.
- MISHRA, J.K. *et al.* Performance of an intensive nursery system for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, under limited discharge condition. **Aquacultural Engineering**, v. 38, p. 2-15, 2008.
- OTOSHI, C.A., MOSS, N.R. Establishing Nitrifying Bacteria in Super-Intensive Biofloc Shrimp Production. **Global Aquaculture Advocate**, May-June, 2011.
- POERSCH, L. H. *et al.* Biofloc: uma alternativa para camarões saudáveis. **Panorama da Aquicultura**. Edição 130, 2012.
- PRANGNELL, D. I. *et al.* Some Limiting Factors in Superintensive Production of Juvenile Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in No-water-exchange, Biofloc-dominated Systems. **Journal of the world aquaculture society**, v. 47, p. 396-413, 2016.
- RAY, A.J. *et al.* Characterization of microbial communities in minimal-exchange, intensive aquaculture systems and the effects of suspended solids management. **Aquaculture**, v. 310, p. 130-138. 2010.

SÁ, M. V. C. **Limnocultura: limnologia para aquicultura**, Fortaleza: Edições UFC, 218 pp. 2012.

SAMOCHA, T.M. *et al.* Design and operation of super-intensive biofloc-dominated systems for indoor production of the pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: The Texa A&M AgriLife Research Experience. Louisiana: **The World Aquaculture Society**, p. 398. 2017.

SCHVEITZER, R. *et al.* Use of artificial substrates in the culture of *Litopenaeus vannamei* (Biofloc System) at different stocking at effects on microbial activity, water quality and production. **Aquacultural Engineering**, v. 54, p. 93-103, 2013.

SESUK, T., POWTONGSOOK, S., NOOTONG, K. Inorganic nitrogen control in a novel zero-water exchanged aquaculture system integrated with airlift-submerged fibrous nitrifying biofilters. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2088-2094, 2009.

STREIT, W. R.; SCHMITZ, R. A. Metagenomics—the key to the uncultured microbes. **Current opinion in microbiology**, v.7, n. 5, p. 492-498, 2004.

TIMMONS, M. B. *et al.* **Recirculating aquaculture systems**, 2nd Edition. Cayuga Aqua Ventures, New York, 769 pp. 2002.

VAN WYK, P.; SCARPA, J. **Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems**. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Tallahassee, Florida, p. 128-138, 1999.

VINATEA, L. A., **Qualidade da água em aquicultura: princípios e práticas**. 3.ed. ver. e modif. Florianópolis: Ed. da UFSC, 238 pp. 2010.

WASIELESKY Jr, W. *et al.* Nursery of *Litopenaeus vannamei* reared in a biofloc system: the effect of stocking densities and compensatory growth. **Journal of Shellfish Research**, v. 32, p. 799–806, 2013.

WEI, Y.F., LIAO, S.A., WANG, A.I., The effect of different carbon sources on the nutritional composition, microbial community and structure of bioflocs. **Aquaculture**, v. 465, p. 88-93, 2016.

YANG, B., WANG, Y., QIAN, P.Y. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. **Bmc Bioinformatics**, v. 17, p. 135, 2016.