



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

Augusto Costa Cardoso

**Estratégia de maturação de biorreator de leito móvel sob condição de enriquecimento do biofilme aderido para cultivos de recirculação de água doce**

Florianópolis

2022

Augusto Costa Cardoso

**Estratégia de maturação de biorreator de leito móvel sob condição de enriquecimento do biofilme aderido para cultivos de recirculação de água doce**

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

Orientadora: Profa. Katt Regina Lapa, Dr<sup>a</sup>.

Florianópolis

2022

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

Cardoso, Augusto Costa

Estratégia de maturação de biorreator de leito móvel sob  
condição de enriquecimento do biofilme aderido para  
cultivos de recirculação de água doce / Augusto Costa  
Cardoso ; orientador, Katt Regina Lapa, 2022.

49 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós  
Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. nitrificação. 3. biofiltro. 4.  
partida. 5. RAS. I. Lapa, Katt Regina . II. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Aquicultura. III. Título.

Augusto Costa Cardoso

**Estratégia de maturação de biorreator de leito móvel sob condição de enriquecimento do biofilme aderido para cultivos de recirculação de água doce**

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

Prof<sup>ª</sup>. Katt Regina Lapa, Dra.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Luis Alejandro Vinatea Arana Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof<sup>ª</sup>. Selma Aparecida Cubas, Dra.  
Universidade Federal do Paraná

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

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof<sup>ª</sup>. Katt Regina Lapa, Dra.  
Orientadora

Florianópolis, 2022

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por todas as oportunidades que apareceram na minha vida. Aos meus pais, Mercio e Cristina e ao meu irmão Gustavo, por todo suporte que me deram para conseguir executar o trabalho longe de casa. A minha esposa Izabel, pelo apoio emocional e companheirismo durante os anos do mestrado.

A minha orientadora Katt, por todo o conhecimento repassado e pela incrível orientação para a execução da pesquisa. Aos membros da banca, prof. Vinatea e profa. Selma Cubas por todo o conhecimento e pelas excelentes sugestões dadas para o enriquecimento do trabalho.

Aos colegas Vinicius e Higor, por todo o suporte dado para a execução do experimento, pelo convívio harmônico no laboratório e pela troca de conhecimentos. A Michele, Renata e Cláudia por todo o conhecimento repassado para a execução das metodologias de análise. Ao Jurandir e ao Luciano pelo apoio e pela troca de conhecimento.

Ao LAPAD (UFSC) e ao LABNUTRI (UFSC) por disponibilizarem a ótima estrutura para a execução do trabalho e por todo apoio do corpo técnico que estava sempre comprometido em contribuir da melhor forma para sanar os problemas. Aos colegas do laboratório pelo convívio nos momentos de descontração.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro e a UFSC pela estrutura disponibilizada e pela dedicação dos seus servidores.

## RESUMO

O biorreator de leito móvel, conhecido pela sigla *MBBR* (do inglês: *moving bed biofilm reactor*), é um equipamento utilizado para remoção de compostos orgânicos e frequentemente encontrado nos cultivos aquícolas em sistemas de recirculação de água devido a sua ampla gama de vantagens como redução do consumo de energia, manutenções simplificadas e plantas de tratamentos mais compactas em relação a outros biofiltros. No entanto, uma das limitações enfrentadas pelos produtores ao utilizarem biofiltros encontra-se no longo período de maturação que esse sistema precisa para estar apto a nitrificar plenamente. Este trabalho teve o objetivo de avaliar a melhor estratégia de maturação do biofilme em um biorreator de leito móvel com biomassa aderida em material suporte, utilizando um meio de enriquecimento com  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e um meio sem enriquecimento. O experimento foi composto por 2 sistemas de recirculação aquícola independentes, simulando um cultivo de peixes de água doce que produzia uma concentração de 1,0 mg/L de NAT. Cada tratamento foi composto por um reservatório e dois biorreatores experimentais que receberam os materiais suportes para a colonização da biomassa aderida. Os resultados indicaram que os biorreatores do tratamento enriquecido tiveram um desempenho mais lento, levando 29 dias até atingir a maturação, enquanto o tratamento enriquecido levou 27 dias. Os resultados sugerem que o processo de nitratação no tratamento controle obteve um desempenho superior do que os biorreatores enriquecidos. A espécie *Candidatus Nitrospira defluvii* responsável por atuar no processo de nitrificação, se tornou mais abundante no tratamento controle onde representou 23% da composição do biofilme, enquanto o tratamento enriquecido apresentou apenas 3%. O estudo concluiu que o processo de maturação de *MBBR* utilizando  $\text{NH}_4\text{Cl}$  no enriquecimento foi mais lento que o tratamento sem o enriquecimento. No entanto, ambos os tratamentos tiveram uma velocidade de maturação satisfatória, levando menos de 30 dias. O que se pode constatar que o uso de meios sintéticos como  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e acetato de sódio como fontes de C:N associado ao efluente de *Pimelodus Maculatus* durante o processo de partida, tiveram um benefício importante no tempo de maturação.

**Palavras-chave:** Aquicultura; nitrificação; biofiltro; partida; RAS.

## ABSTRACT

The moving bed biofilm reactor, known by the acronym MBBR, is an equipment used for the removal of organic compounds and frequently found in recirculation aquaculture systems due to its wide range of advantages such as energy consumption, simplified maintenance and more compact treatment plants compared to other biofilters. However, one of the limitations faced by producers when using biofilters is the long maturation period that this system needs to be able to fully nitrify. This work aimed to evaluate the best biofilm maturation strategy in a moving bed bioreactor with biomass adhered to a support material, using a medium enriched with  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and a medium without enrichment. The experiment consisted of 2 independent aquaculture recirculation systems, simulating a freshwater fish culture that produced a concentration of 1.0 mg/L of TAN. Each treatment consisted of a reservoir and two experimental bioreactors that received support materials for the colonization of the adhered biomass. The results indicated that the enriched treatment bioreactors had a slower performance, taking 29 days to reach maturation, while the enriched treatment took 27 days. The results suggest that the nitrification process in the control treatment performed better than the enriched bioreactors. The *Candidatus Nitrospira defluvii* species, responsible for acting in the nitrification process, became more abundant in the control treatment where it represented 23% of the biofilm composition, while the enriched treatment presented only 3%. The study concluded that the maturation process of MBBR using  $\text{NH}_4\text{Cl}$  enrichment was slower than the treatment without enrichment. However, both treatments had a satisfactory maturation speed, taking less than 30 days. It can be seen that the use of synthetic media such as  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and sodium acetate as sources of C:N associated with the effluent of *Pimelodus Maculatus* during the start-up process had an important benefit in the maturation time.

**Keywords:** Aquaculture, nitrification, biofilter, start-up, *RAS*.

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Desenho esquemático do experimento, representando as etapas de enriquecimento dos materiais suportes com NH <sub>4</sub> Cl e a etapa de partida dos biorreatores. ....  | 22 |
| Figura 2. Modelo do sistema operacional com os seus compartimentos: 1- Reservatório de abastecimento, 2- Reator biológico, 3- Tanque de equalização, 4- Difusores de ar, 5- Aquecedor, 6- Reservatório de equalização de vazão, 7- Bomba submersa..... | 23 |
| Figura 3. A imagem mostra o material suporte sendo transferido para os biorreatores da etapa de operação.....  | 25 |
| Figura 4. Valores médios de alcalinidade durante o processo de operação nos biorreatores controle e enriquecido. ....  | 29 |
| Figura 5. Concentração de amônio (A), nitrito (B) e nitrato (C) ao longo do experimento, nos biorreatores controle e enriquecido. * indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos.....   | 30 |
| Figura 6. Conversão dos compostos nitrogenados no tratamento Controle (a) e Enriquecido (b).....   | 32 |
| Figura 7. Concentração média de sólidos suspensos totais (a) e voláteis (b) ao longo do experimento nos tratamentos controle e enriquecido. ....   | 35 |
| Figura 8. Concentração de sólidos suspensos (a) e voláteis (b) aderidos no material suporte no início e no fim do experimento nos tratamentos controle e enriquecido. ....   | 36 |
| Figura 9. Concentração de oxigênio dissolvido durante o ensaio de respirometria nos biorreatores controle (a) e enriquecido (b).....   | 38 |
| Figura 10. Abundância relativa das espécies encontradas no início (a) no fim (b) do experimento nos tratamentos controle e enriquecido. ....   | 40 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1. Concentração de temperatura, oxigênio dissolvido, condutividade, salinidade, pH e Alcalinidade nos biorreatores ao longo do experimento..... | 28 |
|--|----|

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|      |  |
|------|--|
| AOB  | Bactérias Oxidadoras de amônia ( <i>Amonia Oxidizing Bacteria</i> )          |
| DNA  | Ácido desoxirribonucleico  |
| MBBR | Reator Biológico de Leito Móvel ( <i>Moving Bed Biofilm Reactor</i> )        |
| NAT  | Nitrogênio Amoniacal Total   |
| NOB  | Bactérias Oxidadoras de Nitrito ( <i>Nitrite Oxidizing Bacteria</i> )        |
| OD   | Oxigênio Dissolvido  |
| RAS  | Sistema de Recirculação Aquícola ( <i>Recirculating Aquaculture System</i> ) |
| SST  | Sólidos Suspensos Totais   |
| SSV  | Sólidos Suspensos Voláteis   |

## SUMÁRIO

|              |   |           |
|--------------|---|-----------|
| <b>1</b>     | <b>INTRODUÇÃO .....</b>                                     | <b>11</b> |
| 1.1          | PANORAMA ATUAL DA AQUICULTURA .....                         | 11        |
| 1.2          | SISTEMA DE RECIRCULAÇÃO AQUÍCOLA (RAS) .....                | 12        |
| 1.3          | NITRIFICAÇÃO .....  | 14        |
| 1.4          | PARTIDA DE BIOFILTRO.....                                   | 16        |
| 1.5          | OBJETIVOS .....   | 17        |
| <b>1.5.1</b> | <b>Objetivo Geral.....</b>                                  | <b>17</b> |
| <b>1.5.2</b> | <b>Objetivos Específicos .....</b>                          | <b>17</b> |
| <b>2</b>     | <b>ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>                              | <b>18</b> |
| 2.1          | INTRODUÇÃO .....  | 19        |
| 2.2          | MATERIAL E MÉTODOS .....                                    | 22        |
| <b>2.2.1</b> | <b>Sistema Operacional.....</b>                             | <b>23</b> |
| <b>2.2.2</b> | <b>Partida dos Biorreatores .....</b>                       | <b>24</b> |
| <b>2.2.3</b> | <b>Coleta de Dados.....</b>                                 | <b>25</b> |
| <b>2.2.4</b> | <b>Análise do Biofilme .....</b>                            | <b>25</b> |
| <b>2.2.5</b> | <b>Análise Estatística .....</b>                            | <b>26</b> |
| 2.3          | RESULTADOS E DISCUSSÃO.....                                 | 27        |
| <b>2.3.1</b> | <b>Características Físico-Químicas do Efluente .....</b>    | <b>27</b> |
| <b>2.3.2</b> | <b>Desempenho dos Biorreatores .....</b>                    | <b>29</b> |
| <b>2.3.3</b> | <b>Avaliação do Biofilme.....</b>                           | <b>33</b> |
| 2.3.3.1      | <i>Sólidos suspensos totais, voláteis e aderidos .....</i>  | 33        |
| 2.3.3.2      | <i>Respirometria .....</i>                                  | 36        |
| 2.3.3.3      | <i>Característica microbiológica dos biorreatores .....</i> | 38        |
| 2.4          | CONCLUSÃO.....  | 43        |
|              | REFERÊNCIAS .....   | 44        |
|              | <b>REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL.....</b>                 | <b>48</b> |

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 PANORAMA ATUAL DA AQUICULTURA

A tendência de que a aquicultura se torne a principal fonte de alimentos aquáticos nos próximos anos está cada vez mais próxima devido a estabilização da captura pesqueira, que desde a década de 90, se mantém em 90 milhões de toneladas por ano (FAO, 2020). A produção aquícola mundial ultrapassou 82,1 milhões de toneladas em 2018, sendo a maior parte da produção encabeçada por peixes de água doce seguido por plantas aquáticas, moluscos, crustáceos, peixes diádromos e peixes marinhos. A Ásia contribui com a maior parte da produção global aquícola, totalizando cerca de 59% da produção total, seguido pela África e Europa (FAO,2020).

Em um ano marcado pelos fortes impactos da pandemia nos setores industriais, o papel do agronegócio, em especial da aquicultura, foi fundamental para amenizar os impactos na economia brasileira. A produção de peixes no Brasil teve um resultado positivo no ano de 2020 com um crescimento de 5,93 %, grande parte liderada pela produção de tilapia que atingiu a marca de 486.155 toneladas produzidas (Peixe BR, 2021).

Além de fatores econômicos e sociopolíticos, o crescimento da aquicultura tem sido possível devido a uma diversidade de sistemas e espécies de cultivo que permite que a atividade seja praticada numa série de ambientes e habitats, desde mares abertos a bacias fluviais (FAO, 2021). A intensidade da aquicultura também varia de acordo com sistemas de cultivos, desde intensivos e recirculantes a sistemas extensivos que dependem largamente do ambiente para a alimentação e manutenção da qualidade da água (FAO, 2017).

Atualmente, há uma tendência de uma intensificação sustentável da aquicultura, afim de responder ao aumento de exigências ambientais por órgãos governamentais em relação a produção animal (FAO, 2020). A intensificação sustentável neste contexto está definida como sistemas de produção aquícola ou tecnologias e práticas de gestão que melhoram a eficiência na produção e utilização de recursos naturais (FAO, 2022).

Para suprir essas demandas, tecnologias intensivas como as de recirculação de água vem sendo utilizadas em diversos lugares, pois possibilitam uma produção elevada e um impacto ambiental menor do que aqueles encontradas em outros sistemas de cultivo (TIMMONS; EBBELING, 2010). Um exemplo disso para peixes de água doce é a produção de trutas, que vem sendo conduzida em muitos países em sistemas de recirculação aquícola, no

qual é considerada um dos métodos mais sustentáveis de produção de peixe (ROQUE D'ORBCASTEL, 2009).

A tecnologia denominada RAS (do inglês, *Recirculating Aquaculture System*) é essencialmente uma tecnologia para a criação de peixes ou outros organismos aquáticos, reutilizando a água na produção (HEINEN, et al., 1996). A princípio, o método pode ser utilizado para quaisquer espécies cultivadas em aquicultura, tais como peixes, camarões e moluscos. No entanto, são necessários estudos científicos e tecnológicos para se estabelecerem os parâmetros de projeto e protocolos de manejo adequado a cada espécie aquícola. A maioria da produção é destinada a piscicultura, principalmente de salmonídeos (BREGNBALLE, 2015).

Há muitas vantagens em utilizar a tecnologia de recirculação de água, desde o aumento da produtividade a redução de impactos ambientais (TIMMONS; EBELING, 2010). Em relação ao aumento da produtividade, um aspecto importante a ser mencionado é o das doenças. O impacto dos agentes patogénicos é consideravelmente reduzido num sistema de recirculação, pois algumas doenças do ambiente externo são minimizadas pela captação reduzida de água e o tratamento da mesma.

## 1.2 SISTEMA DE RECIRCULAÇÃO AQUÍCOLA (RAS)

O sistema RAS existe há mais de 60 anos, quando pesquisadores japoneses começaram a estudar a tecnologia para reutilização de água na aquicultura (MURRAY, 2014; AHMED; TURCHINI, 2021; SAEKI, 1958). No entanto, foi na década de 1980 que o RAS foi colocado em prática como um sistema de produção comercial através do Instituto Dinamarquês de Aquicultura (WARRER-HANSEN, 2015).

Nas últimas duas décadas, o RAS se tornou mais popular e houve avanços significativos no desenvolvimento desse sistema (AHMED; TURCHINI, 2021). Essa tecnologia tornou possível o cultivo de peixes em lugares onde as características ambientais não eram favoráveis para determinadas espécies alvo (MURRAY, 2014). A tecnologia também é amplamente utilizada em laboratórios de reprodução de organismos aquáticos devido o controle dos parâmetros da água serem fundamentais nesse processo (MALONE, 2013).

Um sistema de recirculação aquícola é uma tecnologia que permite a reutilização da água do cultivo por meio de uma série de processos de filtrações (físicas e biológicas) que permitem o equilíbrio dos parâmetros de qualidade de água e a homeostase dos organismos cultivados (TIMMONS; EBELING, 2010). Um RAS deverá conter: sistema de clarificação (*ex:*

filtro tambor, sedimentador), biofiltro (MBBR, filtros percoladores), sistema de desinfecção (UV, ozônio) e sistema de desnitrificação (TAKEUCHI, 2017; TIMMONS; EBELING, 2010).

Os compostos orgânicos originários da decomposição de ração e excreção dos organismos liberam compostos nitrogenados como amônia e nitrito, que são tóxicos para os organismos aquáticos (VINATEA, 1997). A etapa de remoção desses compostos pela fitragem biológica é de fundamental importância para um bom funcionamento do sistema, pois permite que água seja reutilizada (TIMMONS; EBELING, 2010).

Existem diferentes sistemas de biofilmes utilizados no tratamento biológico da água, como reator de leito móvel com biofilme (MBBR, sigla em inglês que significa *moving bed biofilm reactor*), filtros percoladores, contadores biológicos rotativos, biofiltros submersos de leito fixo, biofiltros granulares, biorreatores de leito fluidizado, etc. Todos eles têm vantagens e desvantagens. O *MBBR* é um biorreator que vem sendo bastante difundido na aquicultura devido sua baixa perda de carga, baixa colmatação e uma elevada conversão dos compostos nitrogenados (RUSTEN, 2006).

O *MBBR* usa um processo de tratamento biológico com base no processo convencional de lodo ativado e reator de leito fluidizado. É um reator de biofilme totalmente misturado e continuamente operado, onde a biomassa cresce em pequenos elementos poliméricos que são um pouco mais leves que a densidade da água e são mantidos em movimento devido a agitação dentro do reator (ØDEGAARD et al., 1994).

O conceito básico por trás de um *MBBR* é ter um reator biofilme operando continuamente com baixo risco de entupimento, baixa perda de carga e uma área de superfície de biofilme elevada (ØDEGAARD, 2006). A movimentação contínua dos suportes em seu interior, cujos mecanismos empregados estão relacionados com o regime de aeração do sistema. Em reatores aeróbios, nos quais a injeção de ar ou oxigênio é requerida, pode-se distribuir os dispositivos aeradores de forma a favorecer a agitação do meio através de uma vazão adequada. Alternativamente, em sistemas anóxicos/anaeróbios pode-se utilizar impelidores no tanque, os quais proverão a energia necessária para manter os suportes suspensos e em movimento (CARMATI, 2016).

A alta área de superfície específica para o crescimento do biofilme é alcançada fazendo com que o biofilme cresça em pequenos elementos transportadores que se movem junto com o fluxo da água no reator. Os elementos transportadores de biofilme mais amplamente utilizados, originalmente desenvolvidos para uso no processo de Leito Móvel Kaldnes, são feitos de polietileno (densidade  $0,95 \text{ g/cm}^3$ ) e têm a forma de pequenos cilindros com uma cruz dentro do transportador e aletas ao longo do lado externo do transportador (ØDEGAARD, 2006).

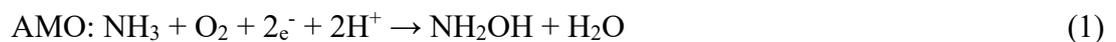
### 1.3 NITRIFICAÇÃO

O processo de nitrificação depende da presença de amônia, que está ligado a processos como amonificação (decomposição de compostos orgânicos de nitrogênio, como aminoácidos e nucleotídeos), fixação de nitrogênio (N<sub>2</sub> como fonte de N celular para um pequeno número de procariontes) e redução dissimilativa de nitrato a amônia (MADIGAN et al. 2012).

A nitrificação é um processo microbiano aeróbico composto por duas etapas: oxidação da amônia a nitrato por bactérias aeróbicas oxidantes de amônia (AOB), que oxidam amônia a nitrito, e bactérias aeróbicas oxidantes de nitrito (NOB), que oxidam o nitrito em nitrato (SLIEKERS; STAFSNES, 2005; SUZUKI et al. 1974). Esses dois grupos são chamados de bactérias nitrificantes e crescem quimioautotroficamente através de fontes de nitrogênio inorgânico.

O gênero *Nitrosomonas* é o mais estudado dentro do grupo AOB. Isso pode ser devido ao crescimento relativamente rápido de muitas cepas cultivadas em comparação com outras AOB (AAKRA, 2000). Alguns estudos afirmam que *Nitrosomonas* são os mediadores primários (AOB) da nitrificação biológica (WALLACE; NICHOLAS, 1969), que apesar do idade continuam sendo afirmados em estudos recentes (SHITU et al., 2022). No entanto, outros trabalhos questionam esta afirmação, não mostrando nenhum sinal de *Nitrosomonas*, mas sim *Nitrospira* em biofiltros (SCHRAMM et al., 1998).

AOB obtém energia apenas por oxidação de amônia e assimilando CO<sub>2</sub> através do ciclo de Calvin. A oxidação da amônia consiste na ação sucessiva de duas enzimas amônia monooxigenase (AMO) e hidroxilamina oxidoreductase (HAO).



Dois dos quatro elétrons retornam à reação AMO por causa de uma proteína de transferência de elétrons, o citocromo c tetraheme (554). Os outros dois são redutores para a biossíntese ou passam para um aceptor de elétrons terminal (CHAIN et al., 2003)

As bactérias oxidantes de nitrito (NOB) são classificadas em quatro gêneros: *Nitrobacter*, *Nitrospina*, *Nitrococcus* e *Nitrospira*. *Nitrospina* pertencem à classe delta enquanto *Nitrococcus* e *Nitrobacter* pertencem à classe gama e beta, respectivamente (MADIGAN et al., 2012; TESKE et al., 1994). *Nitrospira* forma seu próprio filo, como

mencionado anteriormente. O gênero *Nitrobacter* forma um grupo restrito de espécies muito próximas: *Nitrobacter winogradskyi*, *Nitrobacter hamburgensis*, *Nitrobacter vulgaris* e *Nitrobacter alkalicus*. Várias cepas foram determinadas dentro de cada espécie de lugares de todo o mundo (BOCK et al., 1990; TESKE et al., 1994).

Ao longo da história, os membros do gênero *Nitrobacter* foram os mais estudados, pois são usados como organismos modelo primários para estudar a fisiologia e bioquímica de NOB. Wallace e Nicholas (1969) também afirmam que *Nitrobacter* são os mediadores primários (NOB) da nitrificação biológica. No entanto, muitos estudos questionam esta afirmação, sugerindo que *Nitrospira* são os mais abundantes tanto na natureza quanto nos biofiltros (MADIGAN et al. 2012; SCHRAMM et al. 1998; SCHREIER et al. 2010).

O NOB ganha sua energia principalmente da oxidação do nitrito e fixa o CO<sub>2</sub> através do ciclo de Calvin. No entanto, várias espécies de *Nitrobacter* têm a capacidade de crescer em compostos orgânicos simples de carbono, como piruvato, acetato, alfa-cetoglutarato e glicerol, na ausência de nitrito e também podem crescer anaerobicamente se necessário, no entanto, o crescimento é tipicamente muito mais lento. (BOCK et al. 1988).



Na cinética da nitrificação, se considera o efeito produzido pela limitação de OD e substrato (NH<sub>3</sub> e HNO<sub>3</sub>), além de dois tipos de inibição: por substrato e por competição (RUIZ; JEISON; CHAMY, 2003). O pH e a temperatura influenciam diretamente o estado em que o íon NH<sub>3</sub> se encontra, uma vez que determina o equilíbrio entre as formas ionizadas e não ionizadas dos substratos (ANTILEO; ROECKEL; WIESMANN, 2003; apud ZOPPAS; BERNARDES; MENEGUZZI, 2016).

A taxa de oxidação da amônia e nitrito é dependente da presença da concentração desses nutrientes numa solução. Em uma solução controlada, a nitrificação pode expressa pela equação de Monod (TIMMONS, EBLING, 2010).

$$R = R_{\max} S / (K_s + S) \quad (3)$$

Onde R: taxa de remoção de substrato (g/(m<sup>2</sup>.d<sup>1</sup>)); R<sub>max</sub>: taxa máxima de remoção de substrato (g/(m<sup>2</sup>.d<sup>1</sup>)); S: Concentração limitante de substrato (mg/L), geralmente, amônia, nitrito e oxigênio dissolvido; K<sub>s</sub>: metade da constante de saturação (mg/L). Duas características importantes dessa reação é que em concentrações elevadas de substrato (amônia >2 mg/L), a

remoção do substrato se torna uma expressão de ordem zero, um valor constante. E em concentrações baixas (amônia  $<1$  mg/L), a relação se torna linear de primeira ordem, proporcional a concentração de substrato (TIMMONS; EBLING, 2010).

#### 1.4 PARTIDA DE BIOFILTRO

As unidades de produção aquícola que utilizam sistemas de remoção de compostos orgânicos, como biorreatores do tipo *MBBR*, precisam inicialmente maturar os biorreatores para dá início ao processo de cultivo, uma vez que um biorreator que não está maturado não consegue converter compostos tóxicos para os organismos (TIMMONS; EBELING, 2010, ODEGAARD, 1998). Diferentes procedimentos foram desenvolvidos para acelerar esse processo de maturação, também denominado de partida, que em condições naturais, a partir de microrganismos presentes no ambiente, pode levar de 4 a 12 semanas (REJISH KUMAR et al., 2013; SHITU et al., 2022).

Diversos estudos têm proposto metodologias seguras para beneficiar o crescimento de bactérias nitrificantes no desenvolvimento do biofilme, considerando alterações de condições ambientais, fornecimento de substrato selecionado ou a seleção e inoculação de cepas de bactérias nitrificantes (DRØNEN et al., 2021; GAO, Y. et al., 2020; GUO, Q. et al., 2007; LI et al., 2019; MANJU et al., 2009; MARKANDE et al., 2016; MAYA ERNA et al., 2013; OWATARI et al., 2018; PARK et al., 2010; ROALKVAM et al., 2020). Para o caso de utilização de técnicas para acelerar o processo de maturação de reatores *MBBR*, os períodos relatados variam de sete a 42 dias (SHITU et al., 2022). À parte dos resultados satisfatórios apresentados nos estudos, as metodologias são muitas vezes complexas ou dependem de investimento para aquisição de produtos que proporcionem esse beneficiamento.

O processo de partida deve beneficiar o estabelecimento de bactérias nitrificantes para o sistema que possibilite que os organismos cultivados se desenvolvam em uma água de boa qualidade (ATTRAMADAL et al., 2014). Pouco se conhece a respeito do desenvolvimento da comunidade microbiana de um *MBBR* utilizado em RAS (LI et al., 2019; ROALKVAM et al., 2020). O entendimento desse processo utilizando um meio químico como enriquecimento do biofilme é crucial para o entendimento do comportamento do microbioma de um biorreator.

## 1.5 OBJETIVOS

### 1.5.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi contribuir com o desenvolvimento de tecnologias de cultivo intensivos aquícolas ao avaliar o tempo de maturação de biorreatores nitrificantes de leito móvel do tipo MBBR, utilizados em sistemas de recirculação aquícola (RAS) de água doce.

### 1.5.2 Objetivos Específicos

- Testar um meio de cultura artificial composto de cloreto de amônio que vise favorecer o crescimento de bactérias nitrificantes.
- Acelerar a colonização de bactérias nitrificantes em um MBBR afim de diminuir o tempo de partida desses biorreatores;
- Monitorar o desempenho dos biorreatores através das taxas de conversão dos compostos nitrogenados;
- Identificar a comunidade microbiana presente no início e no final do experimento nos biorreatores, utilizando análises metagenômicas e ensaio de respirometria para avaliação quantitativa e qualitativa da comunidade bacteriana.

## 2 ARTIGO CIENTÍFICO

### **Estratégia de maturação de biorreator de leito móvel sob condição de enriquecimento do biofilme aderido para cultivos de recirculação em água doce**

Augusto Costa Cardoso\*; Vinicius Muller Buratto; Katt Regina Lapa

Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brasil

O biorreator de leito móvel, conhecido pela sigla *MBBR* (do inglês: *moving bed biofilm reactor*), é um equipamento utilizado para remoção de compostos orgânicos e frequentemente encontrado nos cultivos aquícolas em sistemas de recirculação de água devido a sua ampla gama de vantagens. No entanto, uma das limitações enfrentadas pelos produtores encontra-se no longo período de maturação que esse biofiltro precisa para estar apto a nitrificar plenamente. Este trabalho teve o objetivo de avaliar a melhor estratégia de maturação do biofilme em um biorreator de leito móvel com biomassa aderida em material suporte, utilizando um meio de enriquecimento com  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e um meio sem enriquecimento. O experimento foi composto por 2 sistemas de recirculação aquícola independentes, simulando um cultivo de peixes de água doce que produzia uma concentração de 1,0 mg/L de NAT. Cada tratamento foi composto por um reservatório e dois biorreatores experimentais que receberam os materiais suportes para a colonização da biomassa aderida. Os resultados indicaram que os biorreatores do tratamento enriquecido tiveram um desempenho mais lento, levando 29 dias até atingir a maturação, enquanto o tratamento controle levou 27 dias. Os resultados sugerem que o processo de nitratação no tratamento controle obteve um desempenho superior do que os biorreatores enriquecidos. A espécie *Candidatus Nitrospira defluvii* responsável por atuar no processo de nitrificação, se tornou mais abundante no tratamento controle onde representou 23% da composição do biofilme, enquanto o tratamento enriquecido apresentou apenas 3%. O estudo concluiu que o uso de meios sintéticos como  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e acetato de sódio como fontes de C:N associado ao efluente de *Pimelodus Maculatus* durante o processo de partida, tiveram um benefício importante no tempo de maturação.

**Palavras-chave:** Aquicultura; nitrificação; biofiltro; partida; RAS.

## 2.1 INTRODUÇÃO

A atividade aquícola vem crescendo mundialmente e, no Brasil, o crescimento foi expressivo nas últimas duas décadas, sendo que em 2018, o patamar de produção foi o segundo maior em volume na América do Sul (FAO, 2020). No entanto, sabe-se que a disponibilidade de áreas terrestres aptas para cultivos aquícolas tradicionais devido ao uso e ocupação do solo de outras atividades associado a disponibilidade de água doce de boa qualidade, além das preocupações com a poluição ambiental são considerados obstáculos importantes para a expansão dos sistemas convencionais de aquicultura (BADIOLA; MENDIOLA; BOSTOCK, 2012).

Uma das formas de otimizar a ocupação do solo e da água é realizar o cultivo dos organismos aquáticos com tecnologia capaz de tratar e recircular a água. Essa tecnologia é tecnicamente chamada no mundo de RAS (do inglês, *Recirculating Aquaculture System*) e começou a ser utilizada como sistema comercial na década de 1980 na Dinamarca para o cultivo de truta (*Oncorhynchus mykiss*) (WARRER-HANSEN, 2015). O RAS permite que até 99% da água seja reciclada, por meio da utilização de diferentes processos unitários de tratamento de água (BADIOLA; MENDIOLA; BOSTOCK, 2012; TAKEUCHI, 2017; TIMMONS; EBELING, 2010). Esses sistemas permitem ao operador maior controle sobre os parâmetros ambientais de qualidade da água, possibilitando condições ótimas para a piscicultura (HEINEN; HANKINS; ADLER, 1996).

Um sistema de recirculação de água do tipo RAS deve conter equipamentos necessários para permitir o equilíbrio dos parâmetros de qualidade de água e a homeostase dos organismos cultivados. Os processos unitários envolvidos no sistema RAS são principalmente: remoção de sólidos sedimentáveis e suspensos, também chamado de clarificação da água (ex: sedimentador e filtro de tambor), remoção de compostos orgânicos, principalmente os nitrogenados, como os biofiltros (ex: *MBBR*, filtros de gotejamento), sistema de desinfecção para redução ou eliminação de patógenos (ex: UV, ozônio) e sistema de desnitrificação (BADIOLA; MENDIOLA; BOSTOCK, 2012; RUSTEN et al., 2006; TAKEUCHI, 2017; TIMMONS; EBELING, 2010).

No que se refere aos processos unitários para remoção de compostos nitrogenados, sabe-se que existem diferentes processos de tratamentos biológicos de águas residuárias que se beneficiam de biofilmes microbianos para degradar compostos orgânicos indesejáveis na água, como biorreator de leito móvel com biofilme, biofiltros de gotejamento, contadores biológicos rotativos, biofiltros submersos de mídia fixa, biorreatores de biomassa granular, biorreatores de leito fluidizado, etc. Todos eles têm suas vantagens e desvantagens descritas na literatura

especializada (RUSTEN et al., 2006). Dentre eles, destaca-se para uso em RAS o biorreator de leito móvel com biofilme (MBBR, do inglês *moving bead biofilm reactor*). Este é um equipamento de tratamento biológico eficaz que foi desenvolvido com base no processo convencional de lodo ativado e biorreator de leito fluidizado. É um biorreator de biofilme aderido a material suporte inerte, cujo movimento da água proporciona movimentação constante e contínuo do leito, no qual a biomassa microbiana cresce em pequenos elementos suportes que podem ser poliméricos, com densidade ligeiramente inferiores a da água e são mantidos em movimento devido a agitação dentro do biorreator (TIMMONS; EBELING, 2010; ØDEGAARD et al., 1994).

O MBBR apresenta as vantagens de possuir uma baixa perda de carga, não necessitar de retrolavagens e ter uma elevada área disponível para o crescimento de bactérias nitrificantes nos materiais suportes (RUSTEN et al., 2006). No entanto, esse biofiltro necessita de um longo período para que as bactérias o colonizem até que esteja apto para o funcionamento, o que causa um aumento no custo de produção (LI et al., 2019).

Fazendas aquícolas que utilizam sistemas de remoção de compostos orgânicos, como biorreatores do tipo *MBBR*, necessitam primeiramente iniciar o processo de partida nos biorreatores, uma vez que um biorreator que não está maturado não consegue converter compostos tóxicos para os organismos (TIMMONS; EBELING, 2010). Diferentes procedimentos foram desenvolvidos para acelerar esse processo de maturação, também denominado de partida, que em condições naturais, a partir de microrganismos presentes no ambiente, pode levar de 4 à 12 semanas (REJISH KUMAR *et al.*, 2013; SHITU *et al.*, 2022).

A partida de um biofiltro em um RAS é um processo que envolve uma série de riscos, principalmente devido as condições de criação não serem ideais, o que acaba pondo em risco a saúde dos organismos cultivados. Isso porque a microbiota ainda não se estabeleceu por completo, o que acaba causando problemas derivados da nitrificação, tornando os organismos cultivados suscetíveis a uma série de enfermidades devido a concentrações elevadas de amônia e nitrito (ROALKVAM et al., 2020).

A amônia pode se apresentar na forma não ionizada ( $\text{NH}_3$ ) e na forma ionizada ( $\text{NH}_4^+$ ) conhecida como íon amônio. A soma das duas formas é conhecida como amônia total ou nitrogênio amoniacal. A dinâmica do oxigênio dissolvido influencia diretamente as concentrações de íon amônio na água, uma vez que para oxidar 1,0 mg do íon amônio são necessários cerca de 4,3 mg de oxigênio, o que, por sua vez, influi sobre a comunidade de peixes, pois, em pH básico, o íon amônio se transforma em amônia ( $\text{NH}_3$  livre, gasoso), que pode ser tóxica para esses organismos (PEREIRA, L.P.F; MERCANTE, 2005).

A amônia pode ser um fator limitante na aquicultura em sistemas intensivos, uma vez que, mesmo em baixas concentrações, este composto pode ser tóxico para organismos aquáticos, afetando negativamente o desempenho zootécnico e a mortalidade dos animais (ARANA, 1997; URBINATI; CARNEIRO, 2004). Os efeitos tóxicos da amônia presente na água estão relacionados principalmente à forma não ionizada ( $\text{NH}_3$ ), devido à facilidade com que esta molécula se difunde para dentro dos peixes (HILLABY; RANDALL, 1979).

O nitrogênio amoniacal é um dos parâmetros que mais influencia a qualidade de água para piscicultura, no qual tem como suas fontes principais os resíduos de ração e a excreção dos organismos. A amônia pode ser oxidada a nitrito e então a nitrato durante o processo de nitrificação. Assim, a nitrificação é a principal garantia para a manutenção da qualidade da água, melhorando a biossegurança e a sustentabilidade ambiental em um RAS (DIAZ et al., 2012; LI et al., 2019).

No processo de conversão dos compostos nitrogenados participam as bactérias oxidadoras de amônia (AOB) e oxidadoras de nitrito (NOB). Os dois grupos são compostos por bactérias quimioautotróficas que utilizam respectivamente  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_2^-$  como fonte de energia, gás carbônico ( $\text{CO}_2$ ) ou carbonatos como fonte de carbono e o  $\text{O}_2$  como agente oxidante (LEKANG, 2007). São exemplos de AOB as bactérias dos gêneros *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus* e *Nitrosovibrio* e NOB as bactérias dos gêneros *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira* e *Nitrospina* (ALBERS et al., 2018; TIMMONS; EBELING, 2010; VAN KESSEL et al., 2015).

Existem algumas estratégias para acelerar a partida de um MBBR na qual podem ser utilizados um inóculo de bactérias nitrificantes; meio de cultura seletivo para o crescimento de bactérias; mudanças graduais de parâmetros físico-químicos como salinidade (JIANG et al., 2019). PULKKINEM (2018) observou que a utilização de cloreto de amônio e nitrato de sódio conseguiu adiantar em uma semana a partida de um MBBR em comparação com o tratamento sem a utilização desses compostos químicos.

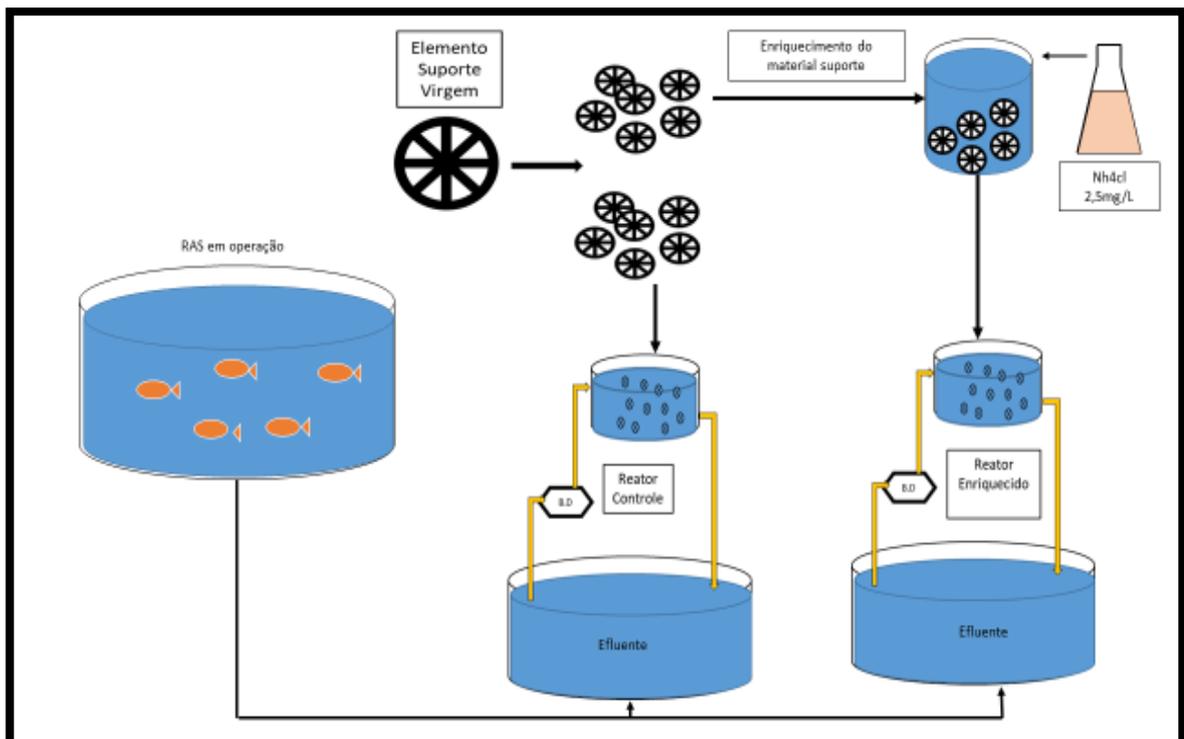
O processo de maturação envolve o estabelecimento de uma comunidade microbiana diversa e com presença de bactérias benéficas para o sistema, possibilitando que os principais parâmetros de qualidade de água fiquem estáveis e influenciem positivamente na sobrevivência e no crescimento dos organismos cultivados (ATTRAMADAL et al., 2014). Pouco se conhece a respeito do desenvolvimento da comunidade microbiana de um MBBR utilizado em RAS (LI et al., 2019; ROALKVAM et al., 2020). O entendimento desse processo utilizando um meio químico como cloreto de amônio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) para enriquecimento do biofilme possibilitará a compreensão de como a sucessão microbiana utilizando essas duas estratégias afetará o

processo de maturação. O estudo teve o objetivo avaliar a estratégia de enriquecimento do material suporte utilizando uma solução de cloreto de amônio, em função do tempo de maturação dos biorreatores, da velocidade de conversão dos compostos nitrogenados e de aspectos microbiológicos envolvidos no processo de partida de um *MBBR*.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Peixes de Água Doce (LAPAD) da Universidade Federal de Santa Catarina entre os meses de junho e setembro de 2021. Foi avaliada uma estratégia de maturação de biorreatores de leito móvel utilizando um meio de cultura químico composto por cloreto de amônio com uma concentração de 2,5 mg/L de amônia (Figura 1). O tratamento controle foi caracterizado por materiais suportes em nenhum tipo de enriquecimento. Após essa etapa, os materiais foram transferidos para os biorreatores do sistema operacional. O efluente de um cultivo experimental de pintado, *Pimelodus maculatus*, foi utilizado para abastecer as unidades durante a operação. O regime de operação dos biorreatores foi de fluxo contínuo com recirculação de água simulando as condições de um sistema de recirculação aquícola convencional.

Figura 1. Desenho esquemático do experimento, representando as etapas de enriquecimento dos materiais suportes com  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e a etapa de partida dos biorreatores.

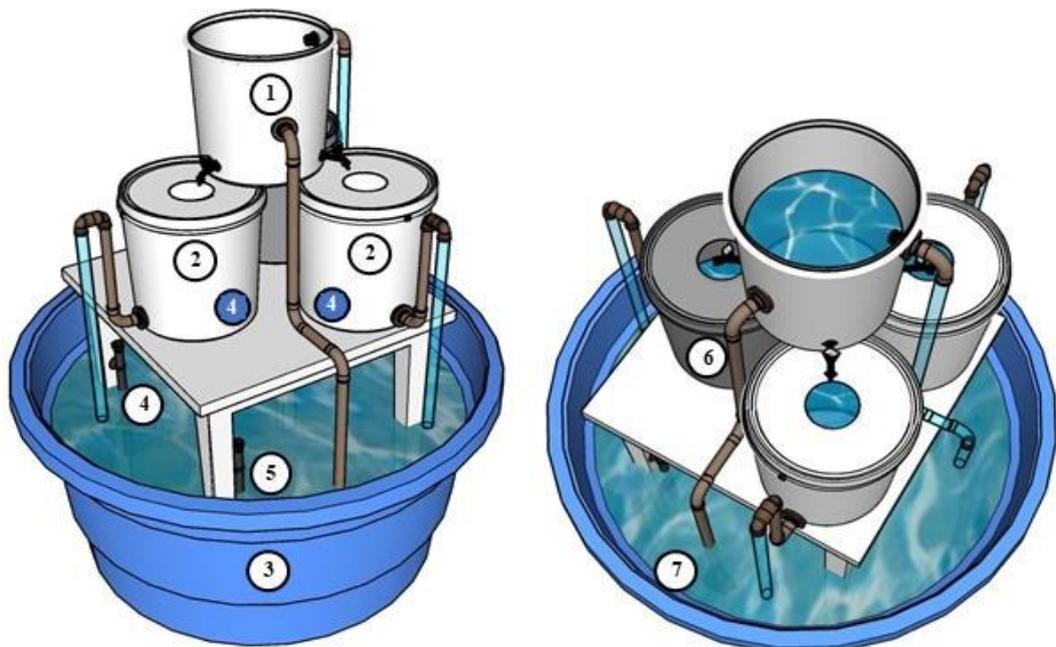


Fonte: Ilustração elaborada pelo autor (2022).

### 2.2.1 Sistema Operacional

O experimento foi composto por dois sistemas independentes de recirculação de água. Cada sistema foi composto por um tanque de equalização, um reservatório de abastecimento, um reservatório de equalização de vazão e dois biorreatores experimentais. Os biorreatores tinham formato cilíndrico, de PEAD opaco, com volume útil de 20 L. A fração de enchimento de material suporte foi de 50% do volume dos biorreatores (LEKANG, 2007). Os reservatórios tinham um volume de 500 L cada. Foram utilizadas bombas dosadoras para abastecer os biorreatores, com entrada do efluente poção superior e saída poção inferior. A aeração e agitação do efluente e material suporte foi feita por difusores de ar abastecidos por um sistema central de aeração constituído de sopradores. A manutenção da temperatura foi realizada por aquecedores de resistência controlados por termostato (Figura 2). O material suporte utilizado consistia de um extrusado de polipropileno com área superficial de  $687 \text{ m}^2/\text{m}^3$ , área superficial protegida de  $525 \text{ m}^2/\text{m}^3$ , formato cilíndrico com 15 mm de altura e 30 mm de diâmetro, com placas distribuídas uniformemente sob o eixo central e ranhuras na superfície externa e interna do material.

Figura 2. Modelo do sistema operacional com os seus compartimentos: 1- Reservatório de abastecimento, 2- Reator biológico, 3- Tanque de equalização, 4- Difusores de ar, 5- Aquecedor, 6- Reservatório de equalização de vazão, 7- Bomba submersa.



Fonte: Ilustração elaborada por Higor Tenfen (2022).

O regime de operação dos biorreatores foi caracterizado por uma vazão aproximada de 20 L/h e tempo de retenção hidráulica de 60 minutos. A temperatura do efluente no reservatório de abastecimento foi mantida em 28 °C. A vazão de ar foi ajustada para manutenção do oxigênio dissolvido próximo ao ponto de saturação. Os biorreatores foram operados até o estágio de estabilização dos parâmetros do efluente de saída dos biorreatores, também conhecido como estado estacionário.

### 2.2.2 Partida dos Biorreatores

A etapa de partida consistiu em duas etapas distintas, a de enriquecimento e a de operação. A etapa de enriquecimento consistiu em operar o biorreator sob constante aeração e agitação sem renovação de água e com temperatura de 28°C durante 13 dias. Foi inserido nos biorreatores uma solução de cloreto de amônio contendo 2,5 mg/L de amônia, e em seguida foi adicionado 0,70 g de bicarbonato de sódio para deixar a alcalinidade em 40 mg/L CaCO<sub>3</sub>. Em seguida, os materiais suportes foram retirados e transferidos para os biorreatores para iniciar a etapa de operação (Figura 3).

Após a etapa de enriquecimento, os materiais suportes foram transferidos para os biorreatores, nos quais permaneceram por 43 dias. O efluente utilizado para abastecer os biorreatores foi proveniente de um sistema experimental de cultivo de pintado (*Pimelodus maculatus*). O efluente foi coletado na fase intermediária do experimento de cultivo, em momento posterior à biometria para determinação da biomassa atual dos peixes. Os animais tinham um comprimento de 12 cm, peso médio de 45g e estavam estocados em um sistema de recirculação dispostos em 6 tanques de 1 m<sup>3</sup> com uma densidade de estocagem 20 kg/m<sup>3</sup>. A ração ofertada para a alimentação continha 32% de proteína bruta, e foi ofertada 3 vezes por semana a razão de 2% da biomassa.

O volume coletado foi de 700 L com coletas subsequentes para reposição de perdas por evaporação e de coletas para análises do efluente durante a operação dos biorreatores. O efluente utilizado apresentou valores nulos de amônio e nitrito e um valor de nitrato na ordem de 60,84 mg/L. Por esse motivo, as concentrações de carbono e nitrogênio foram ajustadas pela adição de acetato de sódio e cloreto de amônio para uma proporção de 10:1 com concentrações na ordem de 10 mg/L de COT e 1 mg/L de NAT (LEKANG, 2007).

Figura 3. A imagem mostra o material suporte sendo transferido para os biorreatores da etapa de operação.



Fonte: AUTOR

### 2.2.3 Coleta de Dados

Amostras do afluente e do efluente foram coletadas a cada 2 dias nos reservatórios de abastecimento, totalizando 4 pontos. Os parâmetros físico-químicos: oxigênio dissolvido, pH, condutividade, temperatura e salinidade foram monitorados diariamente com o auxílio de uma sonda multiparâmetro (YSI ProPlus®); os sólidos suspensos totais e sólidos suspensos voláteis foram mensurados através do método de gravimetria descrito em APHA (1998), utilizando filtro de fibra de vidro com porosidade de 0,45  $\mu\text{m}$ . Para determinar a amônia, nitrito e nitrato foi usado o método de cromatografia de íons (ASTM, 2003); A alcalinidade foi medida através do método de titulometria (APHA, 1996).

### 2.2.4 Análise do Biofilme

A comunidade microbiana aderida ao material suporte foi caracterizada pelas seguintes análises: sólidos suspensos totais e sólidos suspensos voláteis; respirometria; e análise metagenômica. A análise de sólidos suspensos totais e voláteis (APHA, 1998) aderidos ao biofilme foi realizada para avaliar a massa total de sólidos orgânicos, com metodologia adaptada por ALMADA (2012). O processo de sólidos aderidos foi realizado no início e no fim do experimento, foram coletadas aleatoriamente duas peças de material suporte de cada biorreator. Os materiais suportes foram postos em um frasco com água destilada e submetidas a uma agitação mecânica por 1 minuto. Em seguida, o conteúdo presente no frasco foi filtrado utilizando um filtro de 0,45  $\mu\text{m}$ .

A respirometria foi realizada para estimar o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio e a velocidade de respiração dos microrganismos aeróbios. Foi seguida a metodologia adaptada por SHIZUO (2018), utilizando uma sonda YSI PRO OD foi medida a concentração de oxigênio dissolvido por 120 minutos a cada 5 minutos dentro de cada biorreator. Antes do ensaio, os biorreatores receberam aporte de 1 mg/L de amônio e de 10 mg/L de carbono. Após 1 hora a aeração foi desligada e deu início a análise. Durante o processo a temperatura foi controlada por meio de aquecedores para não interferir na atividade microbiana.

A análise metagenômica foi realizada para caracterizar a diversidade e abundância da comunidade microbiana, em nível de espécie e em termos absolutos (nº de sequências de DNA para cobertura de 10.000 reads) e relativos (%). A identificação de bactérias foi realizada utilizando-se o sequenciamento de alto desempenho das regiões V3/V4 do gene 16S rRNA. O sequenciamento foi realizado no equipamento MiSeq (Illumina Inc., USA), utilizando o kit V2 de 300 ciclos, *single-end*, sem normalização das bibliotecas. As sequências de DNA dos microrganismos foram analisadas através de um pipeline proprietário (Neopropecta Microbiome Technologies, Brasil), considerando no máximo 1% de erro acumulado no sequenciamento. As sequências de DNA identificadas foram comparadas com banco de dados de espécies já caracterizadas e os resultados foram disponibilizados em plataforma digital (Neobiome) para visualização.

As análises de sólidos suspensos e voláteis foram realizadas a cada 6 dias e os aderidos no início e no final do experimento. O ensaio de respirometria foi realizado ao fim do experimento, com uma análise em cada biorreator. As análises metagenômicas foram realizados no início e ao final do experimento, coletando aleatoriamente 2 materiais suportes de cada tratamento.

### **2.2.5 Análise Estatística**

Os compostos nitrogenados foram avaliados através de um modelo misto (*mixed model*), considerando o biorreator (controle e enriquecido) como fator fixo e o tempo como medida repetida (HOWELL, 2013). A interação entre biorreator e tempo foi incluída e quando significativa, foram realizadas comparações par-a-par com correção de Bonferroni. Na ausência de interação entre fatores, os dados dos tratamentos controle e enriquecido foram agrupados e um contraste ortogonal polinomial foi aplicado para identificar a tendência de variação temporal.

O período de medição das concentrações dos compostos foi limitado na análise ao dia em que a concentração atingiu valor zero após o início do experimento. Na análise do nitrito, a concentração medida no biorreator controle nos dois primeiros dias foi anômala e, portanto, foram excluídas do modelo.

O decaimento do oxigênio dissolvido no ensaio de respirometria foi avaliado através de um modelo misto, considerando os tratamentos como fator fixo e o tempo como medida repetida. Foi realizada comparações par-a-par com correção de Benferroni para avaliar diferenças entre as interações.

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no experimento indicam que houve diferença no tempo de maturação entre os diferentes tratamentos. As estratégias adotadas conseguiram chegar no estado estacionário dos compostos nitrogenados em cerca de 30 dias, tendo o tratamento controle atingido a maturação 2 dias antes. Os resultados microbiológicos mostram que o processo de partida adotado nos tratamentos resultou em uma seletividade microbiana, interferindo na diversidade e na abundância bacteriana dos biorreatores. O tratamento controle apresentou uma quantidade de bactérias NOB mais abundantes do que o tratamento enriquecido o que favoreceu a atividade de nitratação nesse tratamento. A partida dos biorreatores desencadeou o processo metabólico de desnitrificação em ambos os tratamentos, o que pôde ser inferido pela presença de grupos de bactérias desnitrificantes como *Gemmobacter sp.* encontrada nos biorreatores.

### 2.3.1 Características físico-químicas do efluente

Os valores de temperatura se mantiveram estáveis ao longo do experimento, com uma média de  $27,30 \pm 0,86$  e  $27,07 \pm 0,67$  °C nos biorreatores controle 1 e 2, respectivamente. O mesmo ocorreu com os biorreatores enriquecidos, no qual tiveram uma média de  $27,37 \pm 0,76$  °C e  $27,17 \pm 0,65$  °C. Os valores máximos não passaram dos 29,3°C nos tratamentos, e os mínimos variaram de 24,7 a 25,8°C, no tratamento controle e enriquecido, respectivamente (Tabela 1).

O oxigênio dissolvido se manteve em todos os tratamentos e permaneceu próximo ao ponto de saturação em todos os biorreatores. O controle teve uma média de 6,97 e 7,24 mg/L e

um desvio de 0,25 e 0,29 nos biorreatores 1 e 2, respectivamente. Nos biorreatores enriquecidos os valores médios foram de 7,27 e 7,26 mg/L e um desvio de 0,27 e 0,31 nos biorreatores 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1. Concentração de temperatura, oxigênio dissolvido, condutividade, salinidade, pH e Alcalinidade nos biorreatores ao longo do experimento.

| Tratamentos                            | Controle 1       | Controle 2       | Enriquecido 1    | Enriquecido 2    |
|--|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Temperatura (°C)                       | 27,39 ± 0,83     | 27,07 ± 0,67     | 27,37 ± 0,76     | 27,17 ± 0,65     |
| OD (mg/L)                              | 6,97 ± 0,25      | 7,24 ± 0,29      | 7,27 ± 0,27      | 7,26 ± 0,31      |
| Condutividade (µS/cm)                  | 1638,51 ± 381,98 | 1620,70 ± 380,83 | 1550,81 ± 412,35 | 1593,21 ± 385,83 |
| Salinidade (‰)                         | 0,79 ± 0,19      | 0,78 ± 0,29      | 0,75 ± 0,20      | 0,77 ± 0,19      |
| pH                                     | 8,71 ± 0,15      | 8,75 ± 0,14      | 8,72 ± 0,15      | 8,74 ± 0,10      |
| Alcalinidade (mg/L CaCO <sub>3</sub> ) | 195,82 ± 56,49   | 196,18 ± 56,02   | 189,18 ± 53,59   | 185,72 ± 47,85   |

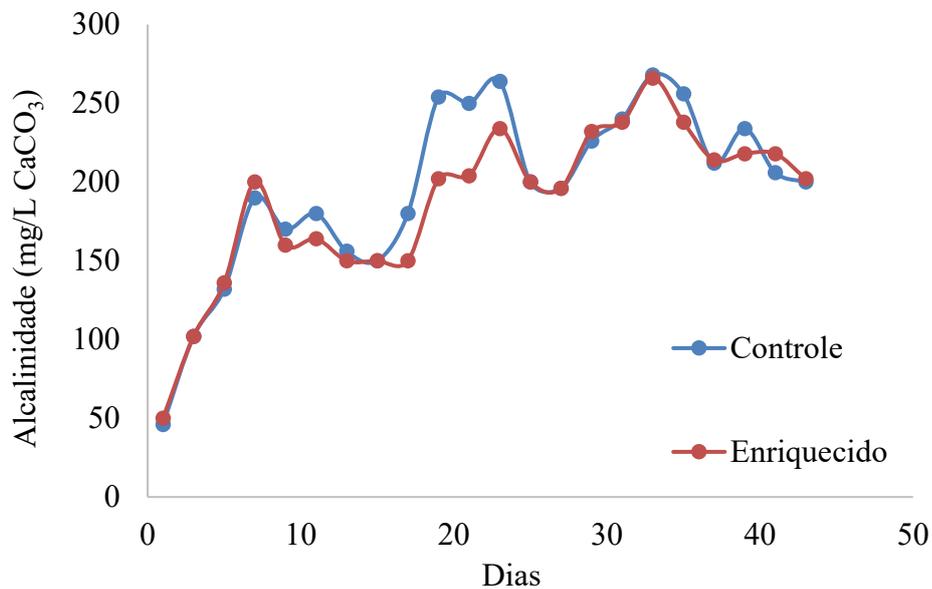
O pH se manteve alcalino em todos os biorreatores, variando de 8,1 a 8,9 e 8,1 a 8,8 nos biorreatores controle 1 e 2, respectivamente. O comportamento foi similar nos biorreatores enriquecidos, no qual os valores variaram de 8,09 a 8,88 no biorreator 1 e de 8,1 a 8,9 no biorreator 2. A escala de pH para a nitrificação foi investigada pelo trabalho de revisão SHARMA e ALBNERS (1977) que indicaram o pH pode ter uma grande variação e tem sua faixa ótima entre 7 e 9 dependendo de cada espécie nitrificante. No pH entre 7,2 e 8,8 as bactérias do gênero *Nitrossomonas* são beneficiadas e em um pH que varia entre 7,2 e 9 as bactérias do gênero *Nitrobacter* são beneficiadas. A faixa ótima de pH pode ser determinada por 3 fatores: ativação e desativação de bactérias nitrificante; efeitos nutricionais ligados a alcalinidade e inibição através de íons livres de amônia e ácido nitroso (CHEN; LING; BLANCHETON, 2006; VILLAVERDE; GARCÍA-ENCINA; FDZ-POLANCO, 1997).

A alcalinidade teve grandes variações nos biorreatores, evidenciado pelos altos valores dos desvios padrões dos tratamentos. O aumento da alcalinidade foi parecido em todos os biorreatores, uma vez que todos foram submetidos as mesmas proporções de acetato de sódio, elemento com características alcalinas utilizado como fonte de carbono no experimento. No início do experimento a alcalinidade estava próxima de 50 mg/L CaCO<sub>3</sub> nos biorreatores do controle e enriquecidos, chegando a cerca de 200 mg/L CaCO<sub>3</sub> no final do experimento, com picos de até 280 mg/L CaCO<sub>3</sub> em alguns biorreatores no decorrer do período experimental (Figura 4).

Em boa parte do experimento a alcalinidade se manteve acima dos 200 mg/L CaCO<sub>3</sub>, uma concentração recomendada por CHEN et al. (2006). Os autores recomendam a alcalinidade em estudos que apresentam troca de água mínima devido a possível estratificação do pH,

alcalinidade e do biofilme. SUMMERFELT et al. (2015) investigou o efeito da alcalinidade na nitrificação, pH e  $\text{CO}_2$  em um RAS de escala semicomercial operado por um MBBR em água salgada. A pesquisa foi realizada com o RAS abastecido com juvenis de salmão do Atlântico e divididos em tratamentos com diferentes concentrações de alcalinidade, 10, 70 e 200 mg/L  $\text{CaCO}_3$ . O estudo indicou que em alcalinidade de 10 mg/L  $\text{CaCO}_3$  houve um maior acúmulo de NAT em relação a concentrações mais elevadas.

Figura 4. Valores médios de alcalinidade durante o processo de operação nos biorreatores controle e enriquecido.

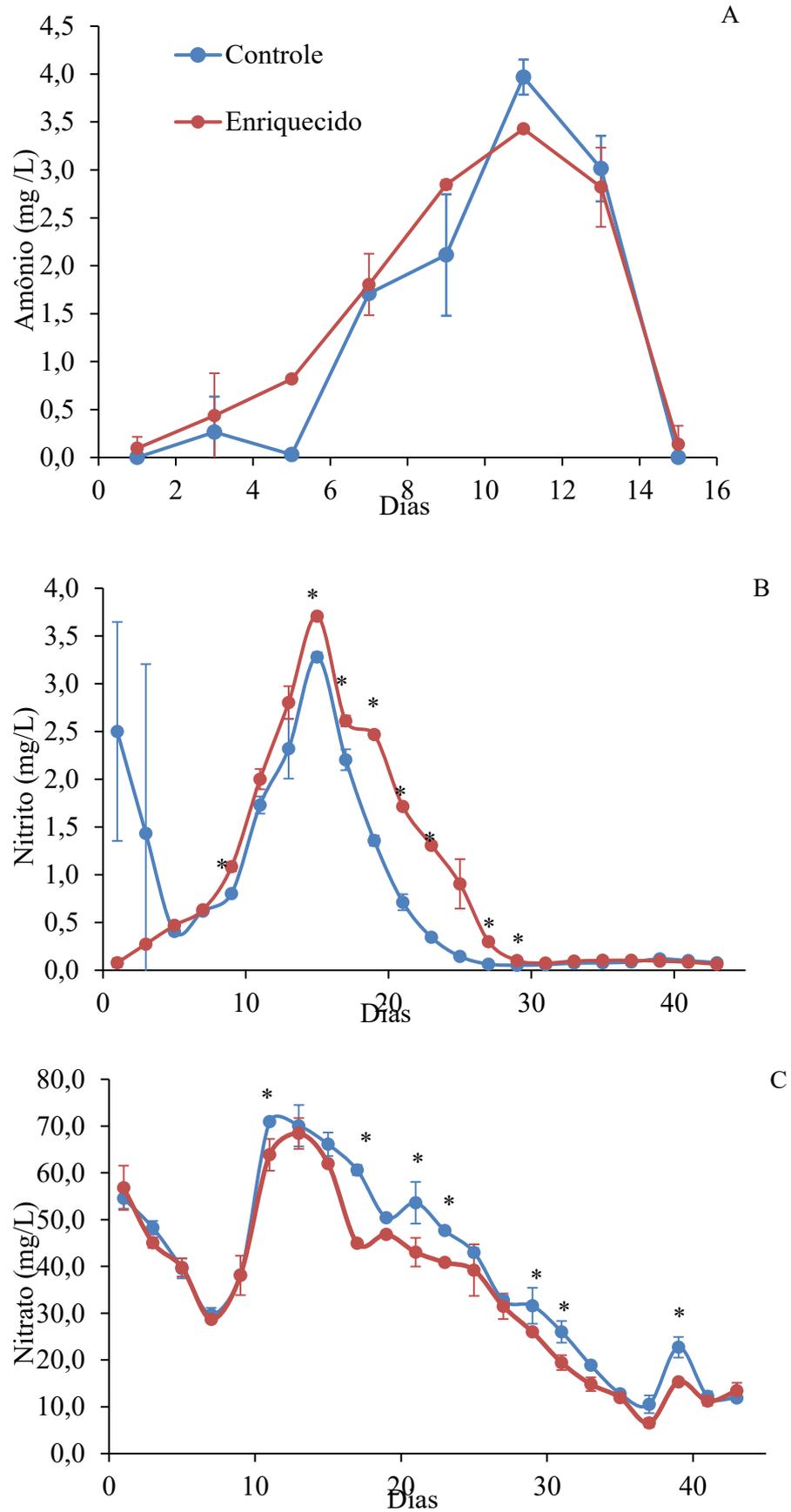


### 2.3.2 Desempenho dos biorreatores

As análises individualizadas dos compostos nitrogenados dos 2 tratamentos e suas respectivas réplicas estão apresentadas na Figura 5A. A etapa de operação ocorreu por 43 dias e foi encerrada quando os parâmetros de amônio e nitrito atingiram estabilidade, valores abaixo de 0,1 mg/L. A concentração de amônio ( $F_{(1;1,945)} = 1,57$ ;  $P > 0,05$ ) não foi influenciada pelo tratamento e nem houve interação entre o biorreator e o tempo ( $F_{(7;7, 404)} = 2,87$ ;  $P > 0,05$ ). Entretanto, a variação temporal foi significativa ( $F_{(7;7, 404)} = 117,46$ ;  $P < 0,05$ ) e o contraste polinomial evidenciou uma tendência cúbica com pico no 11º dia.

Para o nitrito ( $F_{(12;2,032)} = 128,37$ ;  $P < 0,05$ ) e o nitrato ( $F_{(21;22,265)} = 3,44$ ;  $P < 0,05$ ), a variação temporal diferiu entre os biorreatores. No biorreator enriquecido, a concentração de nitrito foi maior, em grande parte do tempo (Figura 5B). Já o nitrato apresentou maiores concentrações no biorreator controle a partir do 11º dia (Figura 5C).

Figura 5. Concentração de amônio (A), nitrito (B) e nitrato (C) ao longo do experimento, nos biorreatores controle e enriquecido. \* indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos.



O tratamento controle teve um processo de maturação mais rápido do que o enriquecido atingindo o estado estacionário no 27º dia, enquanto o enriquecido atingiu no 29º dia (Figura 6a). O tratamento enriquecido, por sua vez, conseguiu reduzir o pico de redução de amônio em 0,5 mg/L, o que pode estar associado ao processo de enriquecimento contribuindo para uma melhor ativação de bactéria AOB (Figura 6b). Ambos os tratamentos apresentaram uma redução significativa de amônio em torno do 15º dia de experimento, nesse período todos os biorreatores tiveram valores nulos ou próximos de 0.

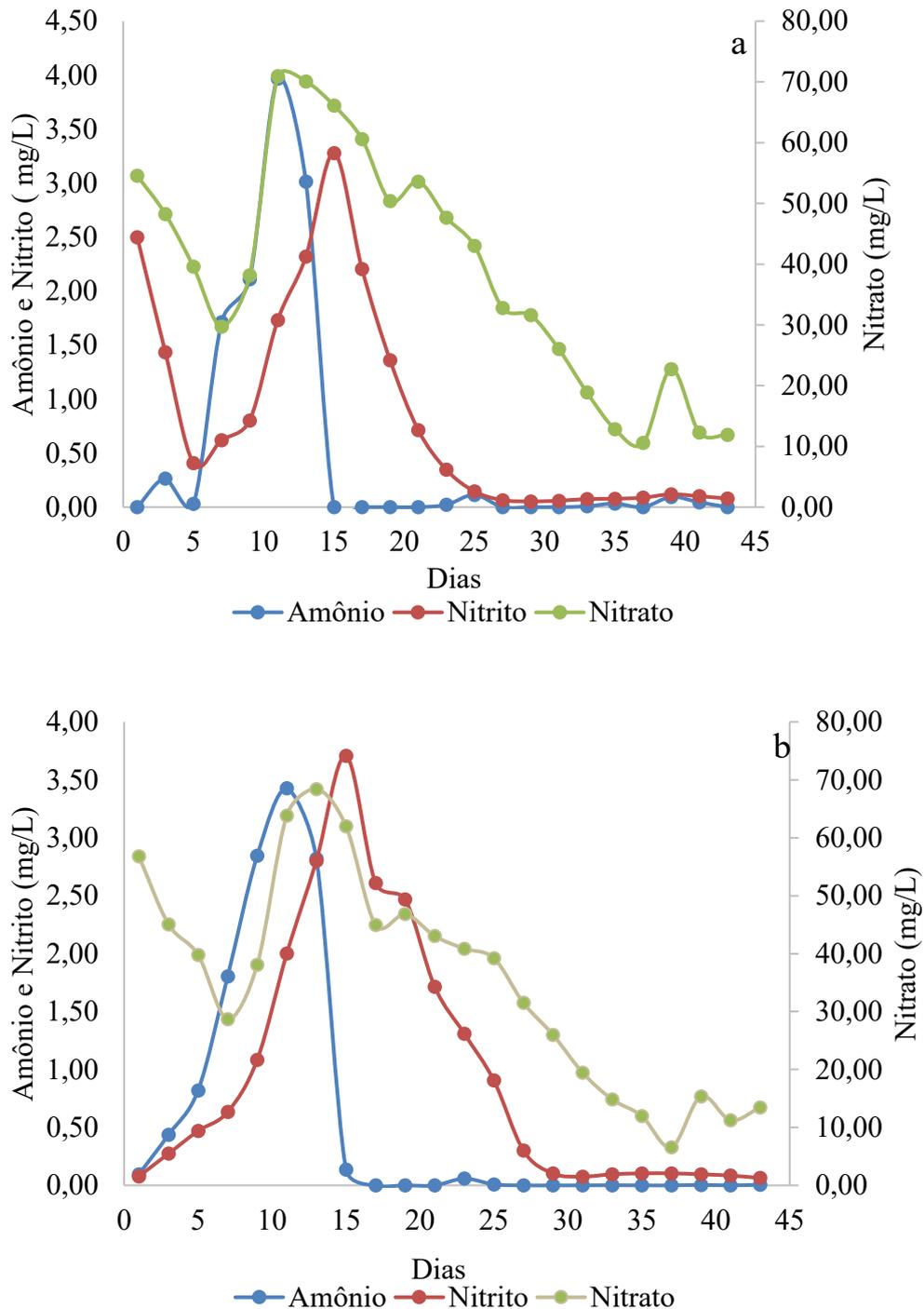
O efuente utilizado no processo de partida dos biorreatores apresentou valores baixos de amônia e elevados nitrito e nitrato, sugerindo que o efuente utilizado apresentava uma atividade nitrificante. Entre o 15º e 17º dia, os biorreatores apresentaram os valores máximos de nitrito. Os biorreatores controle apresentaram uma média de 3,28 mg/L de nitrito nesse período. Enquanto, os biorreatores enriquecidos, apresentaram uma média de 3,71 mg/L.

A diferença no tempo de maturação no tratamento controle pode estar associada ao processo de nitratação, que nesse tratamento foi mais eficiente acelerando a maturação em dois dias. ALBNER et al (2018), verificou que o processo de enriquecimento foi eficiente para a maturação de filtros de areia. Neste trabalho o processo de enriquecimento já havia uma biomassa nitrificante que foi utilizada de um biorreator já maturado, diferentemente do presente estudo onde não foi encontrada bactérias nitrificantes autotróficas no processo de enriquecimento. O autor afirma que a presença de um inóculo nitrificante no processo de enriquecimento é crucial para um bom desempenho dessa estratégia.

LI et al (2019) em seu estudo que verificou diferentes estratégias de aceleração de MBBRs em água salgada, constatou que a estratégia de diminuição gradual do aporte de amônia foi menos eficiente que as demais estratégias. O autor sugere que a falta de bactérias nitrificantes no começo do processo acarretou um desempenho menos eficiente do que a inoculação de bactérias nitrificantes e o aumento progressivo da salinidade.

ZHU et al (2016) investigou a influência da proporção de inóculo bacteriano na formação de novo biofilme e na remoção de nutrientes no tratamento de MBBR de águas residuais marinhas sintéticas RAS. O estudo compreendeu cinco biorreatores paralelos semeados com 0, 1, 5, 10 e 15% de portadores de biofilme maduro de um MBBR estável em grande escala que opera para um RAS de salmão do Atlântico. O estudo indicou que os biorreatores que tiveram as maiores proporções de inóculos conseguiram retirar mais rapidamente a amônia do sistema.

Figura 6. Conversão dos compostos nitrogenados no tramento Controle (a) e Enriquecido (b).



Outro fator que pode ter interferido no êxito do processo de enriquecimento é a falta de certos nutrientes, como nitrito de sódio o que poderia beneficiar bactérias oxidadoras de nitrito. PULKKINEN et al (2018) examinou a viabilidade de usar três adições químicas diferentes com o intuito acelerar a partida em um MBBR instalado em um RAS individual de dez unidades. As estratégias de seu estudo incluíram nitrito de sódio, cana-de-açúcar, cloreto de amônio e partida com águas residuais de truta arco-íris (*O. mykiss*). A eficiência geral de

remoção e o rápido início da nitrificação, foram alcançados uma semana antes usando concentrações de 5 mg / L de cloreto de amônio e nitrito de sódio.

O processo de enriquecimento reduziu o pico de amônio no tratamento enriquecido devido as bactérias AOB serem organismos de crescimento lento e terem um metabolismo influenciado pela disponibilidade de substrato. FERREIRA et al (2020) indica que a amônia e o nitrito são necessários para apoiar o rápido desenvolvimento do biofilme para a inicialização do biorreator devido ao rápido estabelecimento de bactérias nitrificantes, o que pode reduzir os picos de amônia e nitrito no sistema.

Os valores de nitrato apresentaram um comportamento similar em todos os biorreatores. Entretanto, o controle apresentou valores maiores na maior parte do tempo, indicando atividade nitrificante mais elevada que o tratamento enriquecido. Além disso, a partir do 18º dia, os valores de nitrato apresentaram decaimento de suas concentrações até o fim do experimento. A presença de uma atividade desnitrificante pode ser corroborada com a observação do aumento da alcalinidade ao longo do experimento, uma vez que um dos resíduos da desnitrificação é a produção de gás carbônico e o consequente aumento da alcalinidade nos biorreatores (ZOPPAS, 2016).

A desnitrificação em biorreatores aeróbios foi relatada no estudo de SCHNEIDER et al. (2007), no qual os autores constataram que o meio com baixas concentrações de  $\text{NH}_3$  e com disponibilidade de nitrato, houve a assimilação por bactérias heterotróficas em reação de desnitrificação aeróbia. A dinâmica do  $\text{NO}_3^-$  foi o oposto do encontrado na maioria processos de biorreatores aeróbios, onde há o acúmulo desse composto (NGO et al., 2017). Em contrapartida, CHEN et al (2021) identificaram que a inoculação de bactérias do gênero *Acinetobacter* e *Paracoccus* em biorreatores MBBR, contribuiu para a atividade de desnitrificação em ambiente aeróbio.

### **2.3.3 Avaliação do biofilme**

#### *2.3.3.1 Sólidos suspensos totais, voláteis e aderidos*

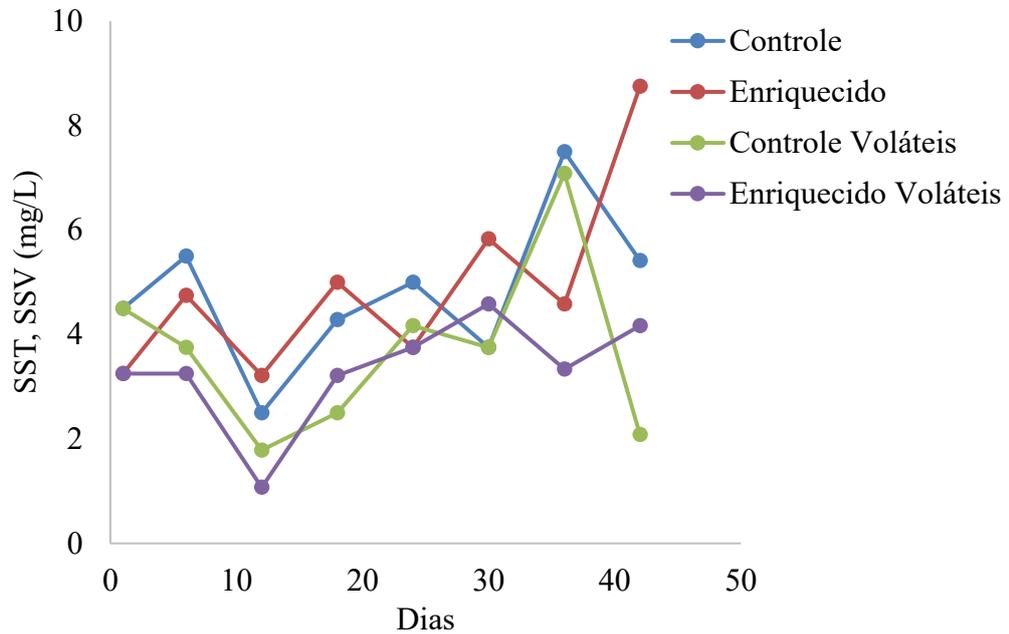
Os resultados das análises de sólidos suspensos apresentaram um comportamento similar em ambos os tratamentos. No início do experimento, o tratamento controle obteve um valor médio de 4,50 mg/L e o tratamento enriquecido apresentou um valor médio de 3,25 mg/L. O tratamento controle teve o pico de concentração no dia 36, atingindo um valor médio de 7,50 mg/L. O tratamento enriquecido apresentou o pico de concentração no 42º dia de

experimento, com um valor de 8,75 mg/L (Figura 7). O comportamento deste parâmetro foi similar em ambos os biorreatores, tendo uma tendência de aumento na concentração ao longo do tempo, mas com picos de concentrações em intervalos intercalados. Esses picos e declínios, possivelmente estão ligados ao aporte de acetato de sódio, uma vez que essa fonte de carbono foi adicionada em intervalos de 7 dias.

Os sólidos suspensos voláteis tiveram valores parecidos com os sólidos suspensos, evidenciando que a maior parte dos sólidos eram de origem orgânica. No início do experimento, os tratamentos tiveram os valores médios iguais aos encontrados nos sólidos suspensos, 4,50 mg/L e 3,25 mg/L, no controle e no enriquecido, respectivamente. No tratamento controle o pico se deu no 36° dia, atingindo uma concentração média de 7,08 mg/L. Diferentemente do encontrado nas concentrações de sólidos suspensos, em que o pico se deu no 42° dia no tratamento enriquecido, a maior concentração foi no 30° dia, no qual foi encontrado o valor médio de 4,58 mg/L.

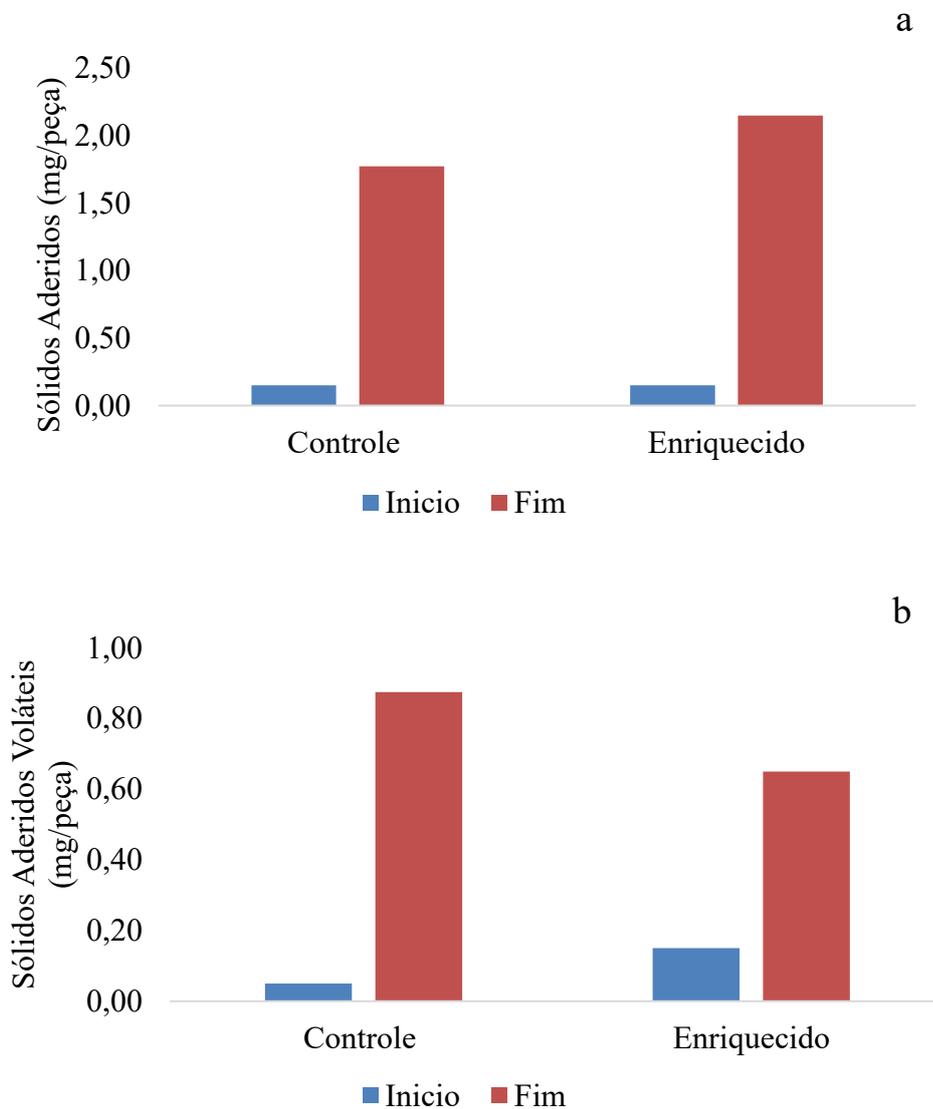
SHITU et al (2022) em seu estudo de revisão relata alguns trabalhos que discutem o efeito de sólidos e da relação C:N na remoção de NAT. Os autores indicam que para se obter nitrificação rápida e estável em águas residuais de RAS, o estabelecimento de razões de C:N abaixo de 3:1 com bom suprimento de oxigênio forneceram um equilíbrio entre bactérias heterotróficas e nitrificantes em MBBR (ROJAS-TIRADO et al., 2019). LI et al. (2019) relataram uma diminuição na abundância de bactérias nitrificantes nos biofilmes após a adição de matéria orgânica particulada (POM) nas águas residuais afluentes do MBBR. Em razões C/N mais elevadas, os desnitrificadores heterotróficos competem com os nitrificadores autotróficos por oxigênio, nutrientes e espaço disponíveis em biofiltros nitrificantes, que eventualmente inibem a nitrificação e aumentam a desnitrificação (NAVADA et al., 2020).

Figura 7. Concentração média de sólidos suspensos totais (a) e voláteis (b) ao longo do experimento nos tratamentos controle e enriquecido.



Os sólidos aderidos ao material suporte apresentou um aumento expressivo quando comparado o início e o fim do experimento (Figura 8). O tratamento controle iniciou com 0,15 g/peça e ao fim do experimento chegou a 1,78 mg/peça. O tratamento enriquecido teve um valor médio de 0,15 mg/peça e ao final obteve 2,15 mg/peça. Os resultados dos sólidos voláteis foram diferentes entre os dois tratamentos. O controle obteve um valor médio de 0,87 mg/peça enquanto o enriquecido obteve 0,65 mg/peça ao fim do experimento, o que indica que o tratamento controle tinha uma carga orgânica maior aderida ao material suporte.

Figura 8. Concentração de sólidos suspensos (a) e voláteis (b) aderidos no material suporte no início e no fim do experimento nos tratamentos controle e enriquecido.



### 2.3.3.2 *Respirometria*

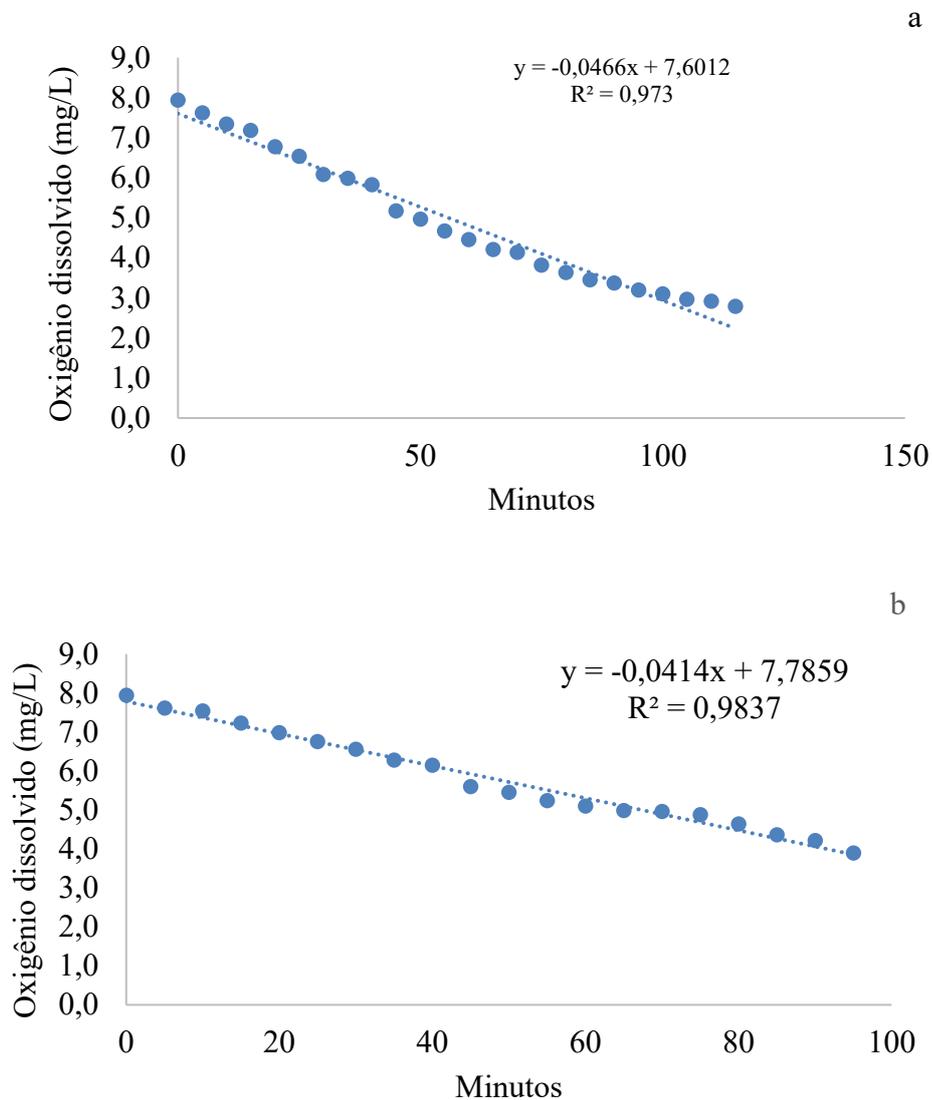
O teste de respirometria foi realizado para verificar o decaimento da concentração de oxigênio dissolvido e estimar indiretamente a dinâmica dos microrganismos aeróbios dentro de cada biorreator. A concentração de oxigênio dissolvido não foi influenciada pelo tratamento ( $F_{(1;2,225)} = 7,019$ ;  $P > 0,05$ ), no entanto o modelo estatístico mostrou que houve diferenças no decaimento do oxigênio dissolvido ao longo do tempo ( $F_{(23;24,257)} = 39,849$ ;  $P < 0,05$ ). O oxigênio dissolvido apresentou um decaimento mais rápido até os 90 minutos, após isso, o decaimento se manteve mais homogêneo até chegar nos 115 minutos, nos quais apresentaram as menores concentrações em todos biorreatores. Os pontos mínimos registrados no tratamento

controle foram 2,88 e 2,70 nos biorreatores 1 e 2, respectivamente. No tratamento enriquecido, foram de 3,69 e 3,11, nos biorreatores 1 e 2, respectivamente (Figura 9).

SHIZUO et al (2018) verificou no ensaio de respirometria realizado em sistemas de recirculação, que o processo de respiração teve um aumento a medida que se aumentou o aporte de amônia no sistema, conseguindo inferir na quantidade de biomassa degradada por substancias orgânicas. Um estudo de SPANJERS et al. (1996) mostraram que a linearidade é normalmente observada neste processo. Demonstrando que há uma correlação entre o substrato e demanda de oxigênio, conforme suportado no presente ensaio.

GERNAEY et al. (2001) usou a respirometria para comparar o consumo de oxigênio em lodos ativados com diferentes concentrações de matéria orgânica, e encontraram uma relação linear constante entre inclusão do substrato e oxigênio consumo, o que corroborou com os presentes resultados, viabilizando a aplicabilidade de testes de respirometria para avaliar as características de água de sistemas de aquicultura com base no microbioma.

Figura 9. Concentração de oxigênio dissolvido durante o ensaio de respirometria nos biorreatores controle (a) e enriquecido (b).



### 2.3.3.3 Característica microbiológica dos biorreatores

A fim de caracterizar a abundância de espécies microbianas aderidas aos materiais suportes dos MBBRs foram realizadas análises metagenômicas no início e no fim do experimento. Os resultados mostraram a abundância e a diversidade de espécies bacterianas nos biofilmes de cada tratamento. No início, o tratamento controle apresentou 7.266 seqüências de DNA, com total de 59 espécies diferentes. O tratamento enriquecido apresentou o mesmo número de espécies do controle, porém com uma abundância de 11.099 seqüências de DNA. Ao fim do experimento, o tratamento controle teve aumento na abundância, totalizando 8.972 seqüências, e diminuição de diversidade microbiana, passando para 49 espécies encontradas.

Os biorreatores enriquecidos apresentaram queda na abundância e na diversidade bacteriana, apresentando 8.657 sequências e 46 espécies diferentes.

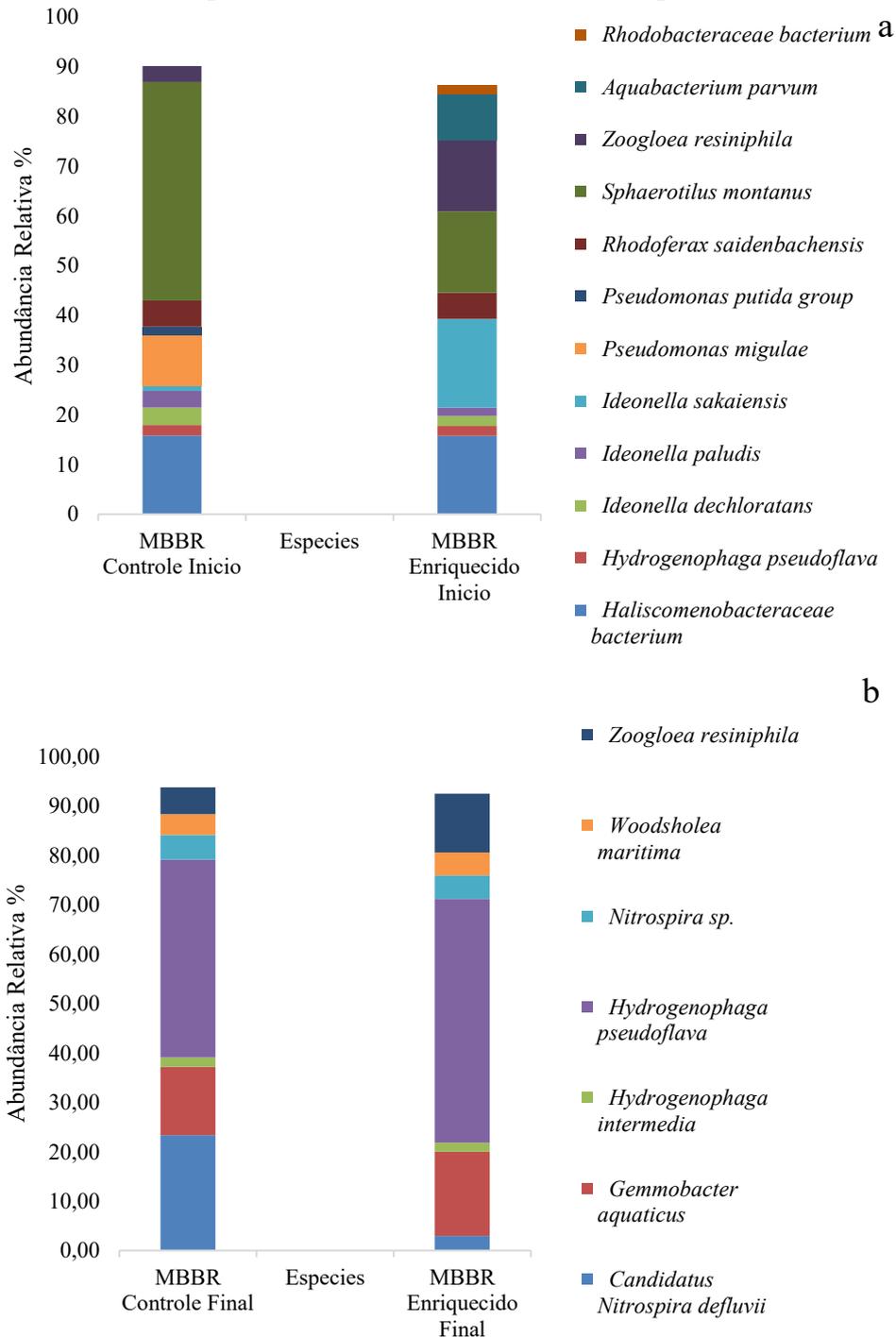
A composição do biofilme no início do experimento se mostrou similar nos dois tratamentos, no entanto apresentou diferenças em termos de abundância entre as espécies (Figura 10a). O tratamento enriquecido teve como espécies mais abundantes: *Ideonella sakaiensis* (17,80%), *Sphaerotilus montanus* (16,35%), *Haliscomenobacteraceae bacterium* (15,72%) e *Zoogloea resiniphila* (14,32%). Essas 4 espécies representaram mais de 60% da composição do biofilme desse tratamento. No tratamento controle as espécies *Sphaerotilus montanus*, *Haliscomenobacteraceae bacterium* e *Pseudomonas pigulae* foram as mais abundantes, representando 43,90%, 15,79% e 10,28% da composição do biofilme, respectivamente.

No início do experimento foi encontrado a espécie *Rhodobacteraceae bacterium*, gênero composto por espécie de bactérias heterotróficas que atuam na nitrificação (ZHOU et al., 2007). Ao fim da etapa de enriquecimento foi constatado que o NAT decaiu 1,71 mg/L no biorreator 1 e 1,88 mg/L no biorreator 2, indicando uma possível atividade nitrificante nessa etapa. No trabalho de LIU et al (2021), os autores identificaram que bactérias heterotróficas nitrificantes atuaram ativamente no processo de nitrificação e tiveram uma maior adesão no material suporte testado em um MBBR em escala de bancada.

Ao fim do experimento, a microbiota dos biorreatores se tornou mais heterogênea e com a presença de bactérias nitrificantes (Figura 10b). Ambos os tratamentos apresentaram uma composição do biofilme bastante similar em termos de diversidade, no entanto algumas espécies se apresentaram mais abundantes do que outras. A espécie *Candidatus Nitrospira defluvii*, responsável por atuar no processo de nitrificação, se tornou mais abundante no tratamento controle onde representou 23% da composição do biofilme, enquanto o tratamento enriquecido apresentou apenas 3%. A espécie *Nitrospira* sp., também responsável por atuar no processo de nitrificação, teve resultados parecidos nos dois experimentos, representando cerca de 5% do biofilme.

Encontrado em menores níveis as espécies *Nitrospira japonica* e *Nitrosomonas ureae*, que também atuam no processo de nitrificação, representando 0,25% e 0,02% no tratamento controle, e 0,47% e 0,10% no tratamento enriquecido, respectivamente. O gênero *Nitrosomonas* é conhecido por ter bactérias responsáveis por oxidar amônia e sua presença é limitada pela quantidade de NAT disponível no meio (FERREIRA, 2000; MARTINS et al., 2019). A baixa concentração desse tipo de bactéria pode estar relacionada a disponibilidade de NAT no sistema que foi trabalhado com concentrações baixas em função do volume dos biorreatores.

Figura 10. Abundância relativa das espécies encontradas no início (a) no fim (b) do experimento nos tratamentos controle e enriquecido.



O meio físico-químico favoreceu o crescimento da espécie *Nitrospira defluvii*, uma vez que essa espécie tem um crescimento ótimo em temperaturas de 28° C a 32° C e com concentrações baixas de nitrito (USHIKI et al., 2017; SPIECK, 2006). A espécie tem um papel importante na redução de nitrito, sendo caracterizada como uma espécie NOB (WEGEN, 2019). O processo de enriquecimento pode ter prejudicado o crescimento dessa espécie nos

biorreatores enriquecidos, uma vez que algumas espécies do gênero *Nitrospira* podem ter sua atividade prejudicada quando expostas a meios que contenham amônia livre (USHIKI, 2017).

USHIKI et al. (2017) investigaram a tolerância de espécies do gênero *Nitrospira* quando expostas as concentrações de amônia livre. Neste estudo, os autores descobriram que a espécie *Nitrospira sp* ND1 teve sua atividade inibida quando exposta a contração de 0,85 mg/L de NH<sub>3</sub>, enquanto a espécie *Nitrospira Japonica* teve sua inibição quando exposta a concentração de 4,3 mg/L de NH<sub>3</sub>. Os autores sugerem que a amônia livre no meio é um importante fator para a competição e seleção de espécies no nicho ecológico de *Nitrospira*.

A maior parte das bactérias encontradas pertencem ao filo *Proteobacteria* e *Nitrospirae*. Esse resultado coincide com o encontrado no estudo de LI et al. (2019), em que a maioria das bactérias do biofilme aderido pertenceu ao filo *Proteobacteria*. Os autores sugerem que as bactérias desse grupo são encontradas em abundância em biofilmes maduros devido a sua alta propriedade adesiva. O biofilme aderido nos biorreatores maduros foi composto por bactérias K estrategistas, como as espécies do grupo *Nitrospira* (USHIKI, 2017). As bactérias desse grupo são extremamente benéficas para peixes, como é relatado no trabalho de ATTRAMADAL et al. (2014). Nesse estudo, os autores observaram que as larvas da espécie *Gadus morhua L* cultivadas em sistemas de recirculação com biofiltros colonizados com bactérias K estrategistas tiveram uma taxa de sobrevivência 72% maior do que aqueles cultivados em sistema de fluxo contínuo.

O decaimento do NO<sub>3</sub>- e a possível atividade de desnitrificação pode ter ocorrido pelas bactérias do gênero *Gemmobacter*, conhecida por ser uma bactéria desnitrificante encontrada em ambientes anóxicos. A presença desse tipo de bactéria indica que entre o material suporte e o biofilme possa ter sido gerado pequenas áreas de baixas concentrações de oxigênio. Algo similar foi relatado no estudo de LIU et al. (2019), no estudo foi testado dois tipos de material suporte em MBBR's operando em concentrações de oxigênio dissolvido entre 2,5 mg/L e 0,75 mg/L. Os autores observaram que o gênero *Gemmobacter* foi encontrado em abundância no sistema junto com outras bactérias desnitrificantes.

Além disso, foi verificado a presença do gênero *Flavobacterium* no início da etapa de operação com biomassa pequena de cerca de 0,04% em ambos biorreatores. Esse gênero é caracterizado por terem bactérias desnitrificantes aeróbias que podem ter reduzido o nitrato nos primeiros 7 dias operação no qual foi observado um decaimento expressivo do nitrato (CHENG, 2018; LIU, 2019). No entanto, o processo de operação acabou diminuindo sua sobrevivência, o que pode ser considerado algo benéfico para aquicultura uma vez que esse tipo de bactéria

causa danos para saúde dos peixes (DONATI et al., 2021; KALATZIS et al., 2016; KAZIMIERCZAK et al., 2019).

## 2.4 CONCLUSÃO

O tratamento controle teve um processo de maturação mais rápido do que o enriquecido devido o processo de nitratação ter sido mais eficiente. No entanto, o processo de enriquecimento demonstrou a redução de até 0,5 mg/L de amônio nos biorreatores durante o período de maturação, indicando que o enriquecimento teve um papel positivo na ativação de bactérias AOB mas um efeito menos satisfatório no crescimento de bactérias NOB. O design do sistema, o material suporte e a metodologia utilizada no processo de maturação, possivelmente promoveu atividade desnitrificante nos biorreatores, indicando a possibilidade de nitrificação e desnitrificação simultânea em biorreatores do tipo MBBR.

Em relação a microbiota presente nos biorreatores, o processo de maturação desencadeou um processo de seletividade microbiana, no qual foi observado o decaimento da diversidade encontrada no início e no fim do experimento. Além disso, foi possível observar que o gênero *Nitrospira* foi o segundo mais abundante no sistema ao final do experimento, principalmente no biorreator controle, o que corrobora com o êxito no processo de conversão de nitrito ter sido mais apurado nesse tratamento. Outro fator, foi a presença de bactérias do gênero *Gemnobacter* que atuam no processo de desnitrificação, terem sido encontradas proporções elevadas em ambos os tratamentos, o que indica que o declínio de nitrato do sistema pode ter advindo de uma atividade desnitrificante.

O estudo concluiu que o processo de maturação de MBBR utilizando  $\text{NH}_4\text{Cl}$  no enriquecimento foi mais lento que o tratamento sem o enriquecimento. No entanto, ambos os tratamentos tiveram uma velocidade de maturação satisfatória, levando menos de 30 dias. O que se pode constatar que o uso de meios sintéticos como  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e acetato de sódio como fontes de C:N associado ao efluente de *Pimelodus Maculatus* durante o processo de partida, tiveram um benefício importante no tempo de maturação.

## REFERÊNCIAS

- ALBERS, C. N. et al. Bioaugmentation of rapid sand filters by microbiome priming with a nitrifying consortium will optimize production of drinking water from groundwater. **Water Research**, v. 129, p. 1–10, 2018.
- ALMADA, R. B. Avaliação de reatores de leito móvel com biofilme (MBBR) em série para de diferentes efluentes de refinaria de petróleo visando ao reuso industrial. Rio de Janeiro, RJ. (Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro/COPPE). 2012.
- ARANA, L. V. **Princípios Químicos da Qualidade da Água em Aquicultura - uma revisão para peixes e camarões**Livro, 1997.
- ATTRAMADAL, K. J. K. et al. RAS and microbial maturation as tools for K-selection of microbial communities improve survival in cod larvae. **Aquaculture**, v. 432, p. 483–490, 2014.
- BADIOLA, M.; MENDIOLA, D.; BOSTOCK, J. Recirculating Aquaculture Systems (RAS) analysis: Main issues on management and future challenges. **Aquacultural Engineering**, v. 51, p. 26–35, 2012.
- CHEN, S.; LING, J.; BLANCHETON, J. P. Nitrification kinetics of biofilm as affected by water quality factors. **Aquacultural Engineering**, v. 34, n. 3, p. 179–197, 2006.
- CHEN, X. et al. Response of wastewater treatment performance, microbial composition and functional genes to different C/N ratios and carrier types in MBBR inoculated with heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria. **Bioresource Technology**, v. 336, n. April, p. 125339, 2021.
- DONATI, V. L. et al. Phage-Mediated Control of *Flavobacterium psychrophilum* in Aquaculture: In vivo Experiments to Compare Delivery Methods. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. March, p. 1–16, 2021.
- FERREIRA, E. S.; IPIRANGA, R. I-121 - Cinética Química E Fundamentos Dos Processos De. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, n. 1, p. 1–25, [s.d.].
- FERREIRA, G. S. et al. Strategies for ammonium and nitrite control in *Litopenaeus vannamei* nursery systems with bioflocs. **Aquacultural Engineering**, v. 88, 2020.
- GERNAEY, A.K., PETERSEN, B., OTTOY, J.P., VANROLLEGHEM, P. Activated sludge monitoring with combined respirometric–titrimetric measurements. **Water Res.** 35 (5),1280–1294. 2001.
- HEINEN, J. M.; HANKINS, J. A.; ADLER, P. R. Water quality and waste production in a recirculating trout- culture system with feeding of a higher-energy or a lower-energy diet. **Aquaculture Research**, v. 27, n. 9, p. 699–710, 1996.
- HILLABY, B.A., AND D.J. RANDALL. Acute ammonia toxicity and ammonia excretion in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Journal of Fisheries Research Board of Canada** 36: 621-

629. 1979.

JIANG, W. et al. Temporal bacterial community succession during the start-up process of biofilters in a cold-freshwater recirculating aquaculture system. **Bioresource Technology**, v. 287, n. March, 2019.

KALATZIS, P. G. et al. Isolation and characterization of two lytic bacteriophages,  $\phi$ st2 and  $\phi$ grn1; Phage therapy application for biological control of vibrio alginolyticus in aquaculture live feeds. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1–18, 2016.

KAZIMIERCZAK, J. et al. Complete genome sequences of Aeromonas and Pseudomonas phages as a supportive tool for development of antibacterial treatment in aquaculture. **Virology Journal**, v. 16, n. 1, p. 1–12, 2019.

LEKANG, Odd Ivar. **Aquaculture Engineering**. 2nd Edition. [S. l.]: Wiley, 2007.

LI, C. et al. Fast start-up strategies of MBBR for mariculture wastewater treatment. **Journal of Environmental Management**, v. 248, n. July, p. 109267, 2019.

LIU, T. et al. Simultaneous nitrification and denitrification in continuous flow MBBR with novel surface-modified carriers. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 42, n. 23, p. 3607–3617, 2021.

MARTINS, G. DE O. et al. Cultivo de bactérias nitrificantes a partir do biofilme de filtro biológico aerado submerso tratando esgoto. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 10, n. 6, p. 77–91, 2019.

NAVADA, S. et al. A salty start: Brackish water start-up as a microbial management strategy for nitrifying bioreactors with variable salinity. **Science of the Total Environment**, v. 739, p. 139934, 2020.

PEREIRA, L.P.F; MERCANTE, C. T. A amônia nos sistemas de criação de peixes e seus efeitos sobre a qualidade da água. Uma revisão. **B. Inst. Pesca, São Paulo**, 31(1): 81 - 88, 2005, v. 31, n. 1, p. 81–88, 2005.

PULKKINEN, J. T. et al. Startup and effects of relative water renewal rate on water quality and growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in a unique RAS research platform. **Aquacultural Engineering**, v. 82, n. May, p. 38–45, 2018.

REJISH KUMAR, V.J. et al. Molecular characterization of the nitrifying bacterial consortia employed for the activation of bioreactors used in brackish and marine aquaculture systems. **International Biodeterioration & Biodegradation**, [s. l.], v. 78, p. 74–81, 2013.

ROALKVAM, I. et al. Comparison of active biofilm carriers and commercially available inoculum for activation of biofilters in marine recirculating aquaculture systems (RAS). **Aquaculture**, v. 514, n. February 2019, p. 734480, 2020.

ROJAS-TIRADO, P. et al. Microbial dynamics in RAS water: Effects of adding acetate as a biodegradable carbon-source. **Aquacultural Engineering**, v. 84, p. 106–116, 2019.

RUSTEN, B. et al. Design and operations of the Kaldnes moving bed biofilm reactors. **Aquacultural Engineering**, v. 34, n. 3, p. 322–331, 2006.

SHITU, A. et al. Recent advances in application of moving bed bioreactors for wastewater treatment from recirculating aquaculture systems: A review. **Aquaculture and Fisheries**, v. 7, n. 3, p. 244–258, 2022.

SHIZUO, M. et al. Aquacultural Engineering Synthetic fibre as biological support in freshwater recirculating aquaculture systems (RAS). **Aquacultural Engineering**, v. 82, n. June, p. 56–62, 2018.

SUMMERFELT, S. T. et al. Effects of alkalinity on ammonia removal, carbon dioxide stripping, and system pH in semi-commercial scale water recirculating aquaculture systems operated with moving bed bioreactors. **Aquacultural Engineering**, v. 65, p. 46–54, 2015.

SPANJERS, H., VANROLLEGHEM, P., OLSSON, G., DOLDT, P. Respirometry in control of the activated sludge process. **Water Sci. Technol.** 34 (3-4), 117–126. 1996.

TAKEUCHI, T. **Application of Recirculating Aquaculture Systems in Japan**. [s.l: s.n.].2017.

TEMPERATURE, L. crossm Low Temperature and Neutral pH Define “ Candidatus. v. 85, n. 9, p. 1–10, 2019.

TIMMONS, M. B.; EBELING, J. M. **Recirculating Aquaculture 2nd Edition**. [s.l: s.n.] 2010.

URBINATI, E.C., P.C.F. CARNEIRO. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. Sociedade Brasileira de Aquicultura Aquática. p. 173-193. 2004.

USHIKI, N. et al. Nitrite oxidation kinetics of two Nitrospira strains: The quest for competition and ecological niche differentiation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 123, n. 5, p. 581–589, 2017.

VAN KESSEL, M. A. H. J. et al. Complete nitrification by a single microorganism. **Nature**, v. 528, n. 7583, p. 555–559, 2015.

VILLAVERDE, S.; GARCÍA-ENCINA, P. A.; FDZ-POLANCO, F. Influence of pH over nitrifying biofilm activity in submerged biofilters. **Water Research**, v. 31, n. 5, p. 1180–1186, 1997.

ZHOU, Q. et al. Screening and characterization of bacteria that can utilize ammonium and nitrate ions simultaneously under controlled cultural conditions. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 103, n. 2, p. 185–191, 2007.

ZHU, S. et al. The effects of different seeding ratios on nitrification performance and biofilm formation in marine recirculating aquaculture system biofilter. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 14, p. 14540–14548, 2016.

ZOPPAS, F. M.; BERNARDES, A. M.; MENEGUZZI, Á. Parâmetros operacionais na

remoção biológica de nitrogênio de águas por nitrificação e desnitrificação simultânea.  
**Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 21, n. 1, p. 29–42, 2016.

## REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- AHMED, N.; TURCHINI, G. M. Recirculating aquaculture systems (RAS): Environmental solution and climate change adaptation. **Journal of Cleaner Production**, v. 297, p. 126604, 2021.
- AAKRA, Å.. Diversity of chemoautotrophic ammonia-oxidizing bacteria based on phylogenetic analyses. **Ås: UMB**. 1 b. 2000.
- ARANA, L. V. **Princípios Químicos da Qualidade da Água em Aquicultura - uma revisão para peixes e camarões** Livro, 1997.
- ATTRAMADAL, K. J. K. et al. RAS and microbial maturation as tools for K-selection of microbial communities improve survival in cod larvae. **Aquaculture**, v. 432, p. 483–490, 2014.
- BOCK, E., KOOPS, H.-P., MÖLLER, U. C. & RUDERT, M.). A new facultatively nitrite oxidizing bacterium, &lt;i&gt;Nitrobacter vulgaris sp. nov. **Arch Microbiol**, 153 (2): 105-110. 1990.
- CAMPBELL, N. A. & REECE, J. B. Biology. Seventh Edition ed.: **Pearson Education**, Inc. Cummings, B. 1231 pp.2005.
- CARMINATI, H. B. Modelagem e Otimização de Sistemas MBBR para Tratamento de Efluentes.n (Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química) 2016.
- CHAIN, P., LAMERDIN, J., LARIMER, F., REGALA, W., LAO, V., LAND, M., HAUSER, L., HOOPER, A., KLOTZ, M., NORTON, J., et al. Complete genome sequence of the ammonia-oxidizing bacterium and obligate chemolithoautotroph *Nitrosomonas europaea*. **J Bacteriol**, 185 (9): 2759-73. 2003.
- DRØNEN, K. et al. Microbial colonization and community stability in a marine post-smolt RAS inoculated with a commercial starter culture. **Aquaculture Reports**, [s. l.], v. 20, p. 100745, 2021.
- EHRICH, S., BEHRENS, D., LEBEDEVA, E., LUDWIG, W. & BOCK, E. (). A new obligately chemolithoautotrophic, nitrite-oxidizing bacterium,&lt;i&gt;Nitrospira moscoviensis sp. nov. and its phylogenetic relationship. **Arch Microbiol**, 164 (1): 16-23. 1995.
- FAO. World aquaculture 2015: a brief overview, by Rohana Subasinghe. **FAO Fisheries and Aquaculture Circular No. 1140**. Rome. 35 pp. 2017.
- FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture **FAO Fisheries and Aquaculture Sustainability in action**. Rome.244 pp. 2020.

FAO. Regional review on status and trends in aquaculture development in Asia-Pacific, by Sena S. de Silva and Derun Yuan. **FAO Fisheries and Aquaculture Circular No. 1232/6**. Rome, Italy. 2021.

FAO. World aquaculture 2020: a brief overview, by Devin M. Bartley. **FAO Fisheries and Aquaculture Circular No. 1233**. Rome, Italy. 2022.

GAO, XIAO-QIANG et al. Impact of nitrite exposure on plasma biochemical parameters and immune-related responses in *Takifugu rubripes*. **Aquatic Toxicology**, [s. l.], v. 218, p. 105362, 2020.

GUO, Qing et al. The roles of porous coral sands in initial enrichment of ammonia-oxidizing bacteria. **TheScientificWorldJournal**, [s. l.], v. 7, p. 525–532, 2007.

KOOPS, H.-P. & POMMERENING-RÖSER, A. Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. **FEMS Microbiology Ecology**, 37 (1): 1-9. 2001.

MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., STAHL, D. A., CLARK, D. P. & BROCK, T. D. The Nitrifying Bacteria. In Brock biology of microorganisms, pp. 509-510. Boston, Mass.: **Pearson**. 2012.

MANJU, N. J. et al. Immobilization of nitrifying bacterial consortia on wood particles for bioaugmenting nitrification in shrimp culture systems. **Aquaculture**, [s. l.], v. 294, n. 1–2, p. 65–75, 2009.

MALONE, R. Recirculating Aquaculture Tank Production Systems: A Review of Current Design Practice. **Southern Regional Aquaculture Center**, USA. 2013.

MARKANDE, Anoop R. et al. Effective remediation of fish processing waste using mixed culture biofilms capable of simultaneous nitrification and denitrification. **Journal of Basic Microbiology**, [s. l.], v. 56, n. 9, p. 1046–1050, 2016.

MAYA ERNA, N. et al. Screening, Identification and Immobilization of Ammonia Oxidizing Bacterial Consortium Collected from Mangrove Areas and Shrimp Farms. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 73–81, 2013.

PEIXE BR. Anuário brasileiro da piscicultura PEIXE BR 2021. **Associação brasileira da piscicultura**. São Paulo, Brasil. 2021.