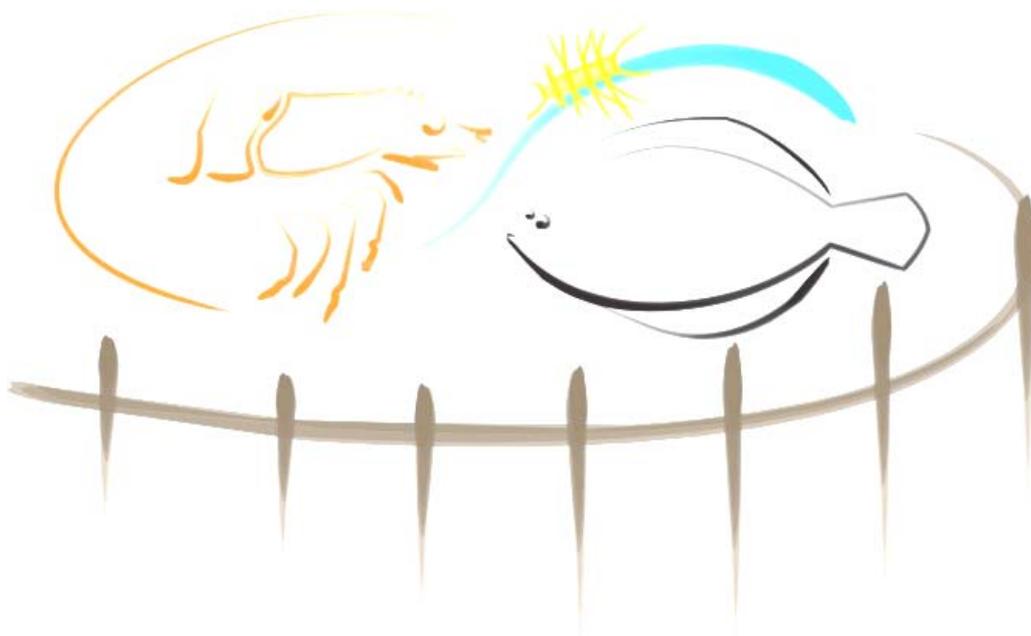




**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA**



**Desempenho do camarão-branco (*Litopenaeus vannamei*)  
cultivado em meio de diatomáceas ou flocos microbianos  
com mínima troca de água.**

**LEANDRO CESAR DE GODOY**

**FURG  
RIO GRANDE, RS.  
2008**

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

**Desempenho do camarão-branco (*Litopenaeus vannamei*)  
cultivado em meio de diatomáceas ou flocos microbianos  
com mínima troca de água.**

Leandro Cesar de Godoy

Dissertação apresentada como parte  
dos requisitos para obtenção do grau de  
mestre em Aquicultura no Programa de  
Pós-Graduação em Aquicultura da  
Universidade Federal do Rio Grande.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Clarisse Odebrecht

Co-Orientador: Prof. Dr. Wilson Wasielesky Junior

Rio Grande - RS - Brasil

Julho, 2008

## ÍNDICE

DEDICATÓRIA .....	iv
AGRADECIMENTOS .....	iv
RESUMO .....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	5
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	6
3.1. Preparação dos meios de cultivo.....	6
3.2. Delineamento experimental .....	9
3.3. Cultivo dos juvenis de <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	10
3.4. Análise dos parâmetros físico-químicos e biológicos da água .....	10
3.5. Caracterização da comunidade microbiana .....	10
3.6. Determinação da composição proximal do material em suspensão e análises de desempenho dos camarões.....	11
3.7. Análises Estatísticas.....	12
4. RESULTADOS .....	13
4.1. Qualidade da água nos meios de cultivo.....	13
4.2. Comunidade microbiana presente na água de cultivo e composição proximal dos flocos microbianos.....	19
4.3. Desempenho dos juvenis de <i>L. vannamei</i> .....	27
5. DISCUSSÃO .....	32
5.1. Parâmetros físico-químicos da água de cultivo .....	32
5.2. Comunidade microbiana presente na água de cultivo .....	38
5.3. Composição proximal dos flocos microbianos.....	42
5.4. Desempenho dos juvenis de <i>L. vannamei</i> cultivados nos diferentes meios.....	44
6. CONCLUSÕES .....	47
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	48
8. PERSPECTIVAS.....	49
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	50
10. ANEXOS .....	59

*Aos meus amados pais Mário e Inez, e minha querida irmã Evelyn*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

Com todo carinho a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Clarisse Odebrecht, pela confiança depositada, atenção, amizade adquirida ao longo desses dois anos de orientação, pelos ensinamentos preciosos que contribuíram para meu crescimento profissional, os quais levarei por toda vida;

Ao Prof. Wilson Wasielesky, pela co-orientação, idéias e importantes sugestões que contribuíram para o desenvolvimento da dissertação;

A Tatiana Martins e Eduardo Ballester, pela grande contribuição durante todo mestrado;

Com muita satisfação e admiração ao Prof. Paulo Cesar Abreu, pelo convívio no laboratório compartilhando experiências e conhecimentos, sempre gentil, atencioso, um exemplo de pesquisador;

A minha amiga Lise Maria, pela amizade conquistada durante o mestrado, trabalhando juntos, aprendendo juntos;

Com enorme carinho a minha amiga de longa data Adriana F. da Silva, pelos sete anos de convivência, paixão em comum pela aqüicultura, sempre juntos desde a graduação compartilhando momentos difíceis, mas principalmente momentos de muita alegria. Hoje irmãos por afinidade, sempre...

Com saudade e muito carinho as minhas amigas Aline Paroliz, Michele Assis e Ellen Mariany, que mesmo estando separados geograficamente continuamos sempre juntos, presentes em pensamento... em coração...

A minha querida professora e amiga Lucimar Pontara, pela amizade conquistada durante a graduação, hoje fortalecida ainda mais. Minha segunda mãe, sempre pronta pra ajudar, opinar, contribuir com sua incrível visão sobre o mundo, sobre a vida...

## RESUMO

O presente estudo teve como objetivo determinar a eficiência de meios contendo diatomáceas ou flocos microbianos e a mistura de ambos, na sobrevivência, crescimento e conversão alimentar de juvenis de camarão-branco (*Litopenaeus vannamei*) em cultivo super-intensivo com mínima troca de água. Durante 30 dias, os camarões com peso médio inicial de  $0,31 \pm 0,10$  g foram cultivados em 12 tanques de 80 L (denominados microcosmos) na densidade de 300 camarões/m<sup>2</sup> em 3 tratamentos com 4 repetições. No tratamento em meio às diatomáceas (MD) a água era proveniente de uma matriz inoculada com as espécies *Thalassiosira weissflogii* e *Chaetoceros muelleri*. No tratamento em meio aos flocos microbianos (MF) a matriz recebia diariamente uma fertilização orgânica mantendo a relação C/N no meio de aproximadamente 17:1. O tratamento mistura (MM) constituiu-se de uma matriz que recebia a água de MF e MD em igual proporção (1:1). Foi utilizado um sistema de recirculação de forma que a água das matrizes era bombeada através de bombas submersas para os respectivos microcosmos, e retornava por gravidade. Foram monitorados os parâmetros de qualidade de água e amostras coletadas a cada 3 dias, foram utilizadas para quantificar e caracterizar a comunidade microbiana presente nos tratamentos. Os parâmetros físico-químicos da água estiveram dentro da faixa recomendada para o bom desempenho da espécie. Os camarões cultivados no MD apresentaram peso final significativamente superior ( $P < 0,05$ ) comparados aos demais meios. A taxa de conversão alimentar foi menor no MD (0,47), não diferindo significativamente de MM e MF (0,76 e 0,80 respectivamente). A sobrevivência foi alta (90 - 97%) e não apresentou diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos. Uma variedade de protozoários, alguns metazoários, microalgas e cianobactérias foram observadas, refletindo a diversidade de níveis tróficos presentes na água de cultivo dos três tratamentos. As cianobactérias filamentosas e principalmente as colônias de cianobactérias cocóides parecem ter grande importância na formação dos flocos microbianos. Os resultados indicam que o alimento natural teve grande importância para o desempenho dos camarões em todos os tratamentos e que as diatomáceas serviram como fonte de nutrientes essenciais que contribuíram significativamente para o melhor desempenho dos camarões no tratamento MD.

## ABSTRACT

This study aimed to determine the efficiency of media containing diatoms or microbial flocs and their mix, on the survival, growth and feed conversion of white-shrimp juveniles (*Litopenaeus vannamei*) reared in a super-intensive system with minimal water exchange. During 30 days, the shrimp with mean initial weight of  $0.31 \pm 0.10$  g were reared in twelve 80L-tanks (denominated microcosm) in a density of 300 shrimps/m<sup>2</sup> on 3 treatments with 4 replicates. In the diatoms media treatment (MD) the water came from a matrix inoculated with *Thalassiosira weissflogii* and *Chaetoceros muelleri*. In the microbial flocs media treatment (MF) the matrix received a daily organic fertilization maintaining the C/N ratio of 17:1, approximately. The mix treatment (MM) consisted of a matrix that received water from the MF and MD, in equal proportion (1:1). Water circulation from the matrixes to their respective microcosm was provided by submerged pumps, and gravity was used for the floe from the microcosms to the matrixes. The parameters of water quality were controlled every day, and water samples were collected every 3 days to quantify and characterize the microbial community in each treatment. The physical and chemical water parameters were within the recommended range for the good performance of the species. The shrimp reared in MD had significantly higher final weight ( $p < 0.05$ ) compared to the others media. The food conversion rate was smaller in MD (0.47), which significantly differed from the MM and MF treatments (0.76 and 0.80 respectively). Survival was high (90 - 97%) and showed no significant difference ( $p > 0.05$ ) between treatments. A variety of protozoans, some metazoans, microalgae and cyanobacteria were observed, reflecting the diversity of trophic levels in the water of the three treatments. The filamentous cyanobacteria and especially the colonies of coccoid cyanobacteria seem to be important in the formation of microbial flocs. The results indicate that natural food was very important for the shrimp performance in all treatments and that the diatoms served as a source of essential nutrients that significantly contributed to the improved performance of shrimp in the MD treatment.

## 1. INTRODUÇÃO

Os grandes avanços na compreensão do percurso dos nutrientes nos sistemas de aquíicultura resultaram de estudos de modelagem dos ecossistemas naturais, delineando o caminho e os mecanismos pelo qual a matéria orgânica é incorporada no ecossistema aquático (Chamberlain *et al.* 2001a).

Nos sistemas convencionais de cultivo, apenas 20 a 30% do carbono, nitrogênio e fósforo do alimento é assimilado pelos peixes e camarões. O restante é perdido como alimento não ingerido e resíduo excretado. Grande parte do nitrogênio sob a forma de amônia é resultante da deaminação de proteínas (Avnimelech 1999). Em sistemas semi-intensivos, a acumulação de amônia raramente é um problema, devido à sua absorção pelo fitoplâncton e bactérias. No entanto, em sistemas intensivos e super-intensivos, o aumento dos níveis de amônia estressa os animais, suprime o crescimento e limita o seu desempenho. Para evitar os efeitos tóxicos da amônia, intervenções tais como a troca de água geralmente são feitas.

Na década de 80 muitos viveiros comerciais de camarão foram operados com taxas de renovação diária de água em torno de 10-15% na tentativa de manter a qualidade da água (Hargreaves 2006). Pesquisas no Centro de Maricultura de Waddell – Carolina do Sul (Sandifer *et al.* 1991, Hopkins *et al.* 1993, Sandifer & Hopkins 1996, Browdy *et al.* 2001) indicaram que a troca da água era ineficaz como meio de controle da qualidade da água. Adicionalmente, a troca da água foi identificada como um importante fator que contribui na disseminação de diversas doenças em áreas de cultivo de camarão. Em consequência, os produtores de camarões reduziram a troca da água tornando-se mais conservadores e eficientes no uso da mesma (Hargreaves 2006). Esta ação também favorece os aspectos de biosegurança e representa uma resposta à pressão de órgãos ambientais quanto ao impacto causado pelos efluentes, contribuindo no controle do tempo de residência da água dos viveiros e levando ao desenvolvimento do sistema *ZEAH* (Zero Exchange, Aerobic, Heterotrophic culture systems).

O *ZEAH* é um sistema de cultivo super-intensivo onde a forte aeração e a troca zero de água permitem a formação de macro-agregados (flocos microbianos), constituídos basicamente por bactérias, protozoários, microalgas, metazoários, exoesqueletos, fezes, restos de organismos mortos, entre outros, predominando uma biota aeróbica e heterotrófica (Schryver *et al.* 2008). Um dos desafios do sistema *ZEAH* é a concepção de uma dieta que sirva tanto para o organismo-alvo do cultivo como para a comunidade microbiana.

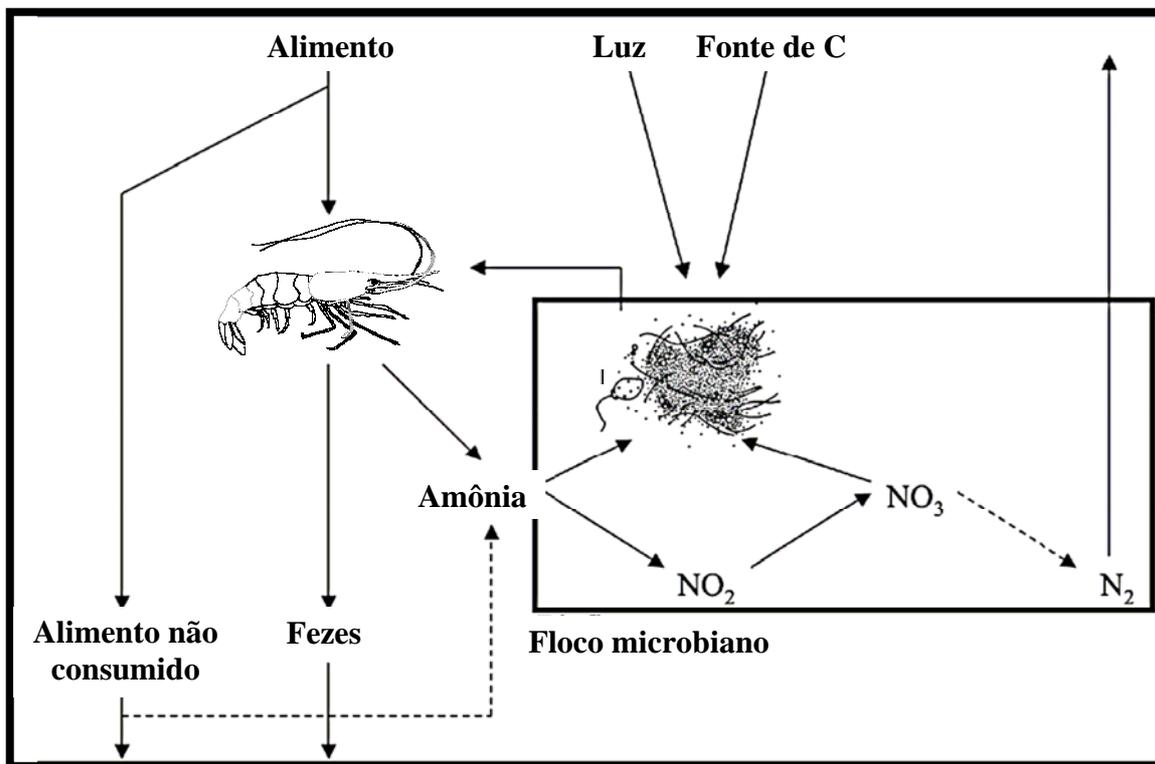
As bactérias heterotróficas têm a notável capacidade de sintetizar proteínas a partir de carbono orgânico e amônia. No entanto, é fundamental que a razão carbono: nitrogênio (C: N) seja adequada para sua utilização. As bactérias são ineficientes na decomposição de material orgânico com elevados níveis de carbono (folhas ou madeira) ou nitrogênio (farelos vegetais com altos níveis protéicos). Misturas balanceadas de carboidratos e nitrogenados com C:N de aproximadamente 20:1 (razão com base no peso) são mais facilmente digeridos (Chamberlain *et al.* 2001a).

Na prática, a maioria das dietas na aquicultura é destinada ao organismo alvo, sem considerar o ambiente de cultivo. Como resultado, a relação C:N é geralmente deficiente para a comunidade microbiana, e o sistema de produção acumula nitrogênio inorgânico.

A suplementação com carbono orgânico para equilibrar a relação C:N permite que as bactérias utilizem amônia em seu processo de crescimento, produzindo proteína bacteriana. Este processo melhora a qualidade da água e fornece uma fonte protéica suplementar (Figura 1). Avnimelech *et al.* (1994) demonstraram que a adição de farelo de trigo (como fonte de carbono) em tanques super-intensivos de tilápia reduziu os níveis de amônia e melhorou a conversão alimentar.

As fontes de carbono orgânico incluem álcoois, açúcares, amidos e fibras. Álcoois e açúcares são de fácil digestão, já carboidratos complexos como grãos de milho e trigo são metabolizados mais lentamente. Entretanto, estes têm a vantagem de proporcionar um substrato para as bactérias aderidas, bem como mantém a liberação de carbono orgânico por mais tempo. Além disso, exigem uma maior síntese de enzimas bacterianas para sua decomposição, as quais podem melhorar a digestão da espécie alvo do cultivo, ao consumir material detritico.

O sistema *ZEAH* reduziu o risco de introdução e disseminação de doenças, proporcionando simultaneamente, benefícios nutricionais da produtividade natural nos viveiros (McIntosh *et al.* 2000, Bratvold & Browdy 2001, Moss *et al.* 2001, Samocha *et al.* 2001, Weirich *et al.* 2002, Burford *et al.* 2003). Alguns dos níveis mais elevados de produção de camarão foram atingidos em sistemas com troca de água reduzida, baseados na comunidade microbiana presente nos flocos suspensos.



**Figura 1.** Ciclo do nitrogênio em cultivos com flocos microbianos. A adição de uma fonte de carbono, juntamente com os resíduos nitrogenados, é convertida em flocos microbianos, que por sua vez podem ser consumidos pelos organismos cultivados. (Adaptado de Crab *et al.* 2007).

Um fator de grande importância nos sistemas ZEAH é a utilização de menor teor de proteína bruta nas rações, sendo esta suprida em parte, pela produção natural associada à formação dos flocos microbianos e ao incremento na produtividade primária. Isso resulta na redução dos custos de produção, além do menor impacto ambiental devido à redução do aporte de nitrogênio e do consumo de componente “farinha de peixe” na dieta.

Burford *et al.* (2004) relataram que até de 29% do alimento consumido pelo camarão *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) pode ser proveniente dos flocos microbianos presentes no meio heterotrófico. Hari *et al.* (2006) relataram que a adição de carboidrato em conjunto com a redução do nível de proteína na dieta, melhorou a sustentabilidade das fazendas de camarão em cultivo extensivo, com o aumento da retenção do nitrogênio na biomassa do camarão cultivado, redução da demanda de proteína da dieta e da concentração de nitrogênio amoniacal potencialmente tóxico.

O alto custo de construção e de operação associado a estes sistemas é geralmente compensado pelo aumento da densidade de estocagem dos camarões. No entanto, o manejo da

produção deve ser mais rigoroso do que em sistemas convencionais, principalmente por que a demanda de oxigênio dissolvido ( $O_2D$ ) na água é extremamente elevada devido a alta densidade de estocagem de camarão e pela demanda da comunidade microbiana presente.

Com o aumento da intensidade do sistema, aumenta também, a importância das bactérias no ciclo de nutrientes, embora os processos do fitoplâncton permaneçam importantes, auxiliando na manutenção da qualidade de água por processos fotossintéticos (Hargreaves, 2006). As microalgas, em específico as diatomáceas, são de grande importância para a manutenção da qualidade da água nos viveiros de cultivo. Além disso, apresentam componentes essenciais à dieta do camarão, como vitaminas e ácidos graxos poliinsaturados (Patil *et al.* 2006).

No sistema *ZEAH* de produção, as características qualitativas e quantitativas da comunidade natural de microorganismos serão influenciadas pelo aumento da predação do camarão, associado com a sua alta densidade de estocagem, e por alterações na qualidade da água devido a entrada de alimento e de resíduos metabólicos. O impacto do camarão na meiofauna e macroinvertebrados foi relatado por Tidwell *et al.* (1997), no entanto, a sua ação como agente de pasteio sobre o fitoplâncton e populações de protozoários heterotróficos é desconhecida (Decamp *et al.* 2007). Existe grande dificuldade para se manter contínua a presença de diatomáceas em meio aos flocos microbianos. A elevada concentração de material em suspensão reduzindo significativamente a entrada de luz, e a competição por nutrientes com a comunidade microbiana provavelmente são os principais fatores relacionados.

Constata-se assim, a existência de lacunas no conhecimento sobre a gerência da produção dos flocos microbianos, sua dinâmica em sistemas intensivos de aquacultura, valor nutricional e efeitos na saúde dos organismos cultivados. Os aspectos microbiológicos, particularmente a caracterização microbiana dos flocos, possível manipulação dessa comunidade e interações entre organismos autotróficos e heterotróficos nesses meios são campos de grande interesse (Crab *et al.* 2007).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral:

Determinar a eficiência do sistema de cultivo em meio de diatomáceas ou flocos microbianos e a mistura de ambos no desempenho de juvenis de *Litopenaeus vannamei*.

### 2.2. Objetivos específicos:

- Avaliar a qualidade da água através de parâmetros físico-químicos dos três meios;
- Determinar a composição proximal do material em suspensão, da ração e dos ingredientes utilizados na fertilização orgânica.
- Quantificar e caracterizar os microorganismos (cianobactérias, protistas autotróficos e heterotróficos, e metazoários) presentes nos três meios de cultivo;
- Avaliar a sobrevivência, ganho de peso, taxa de conversão alimentar e taxa de crescimento específico dos juvenis de *L. vannamei*;

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido nos meses de dezembro de 2006 a janeiro de 2007 no Setor de carcinicultura da Estação Marinha de Aquacultura (EMA/FURG), localizada na Praia do Cassino, município de Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil.

#### 3.1. Preparação dos meios de cultivo

Para a formação dos flocos microbianos foi utilizado um tanque circular (7000 L) com área de fundo de 6,8 m<sup>2</sup> (denominado matriz de flocos, MF), sem renovação de água, repondo-se somente o volume perdido por evaporação. O tanque utilizado para a MF foi equipado de forte aeração localizada no fundo e ao centro, oriunda de um soprador central. Para isso foi utilizado um quadrado de PVC com pedras porosas no seu interior, com o objetivo de gerar micro-bolhas e movimentos circulares no sentido vertical (Cuzon *et al.* 2004). Para auxiliar na ressuspensão do material particulado, foram utilizados “air-lifts” nas laterais.

A água utilizada era proveniente do reservatório da EMA, captada na Praia do Cassino e filtrada em filtro de areia (1 mm). Foram inoculadas as diatomáceas *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) G. Fryxell & Hasle e *Chaetoceros muelleri* Lemmermann provenientes do cultivo realizado no setor de microalgas da EMA (Figuras 2a e 3a), e após 9 dias a matriz foi coberta com sombrite (Figuras 2b e 3b) reduzindo 80% da intensidade luminosa, buscando o favorecimento da comunidade heterotrófica.

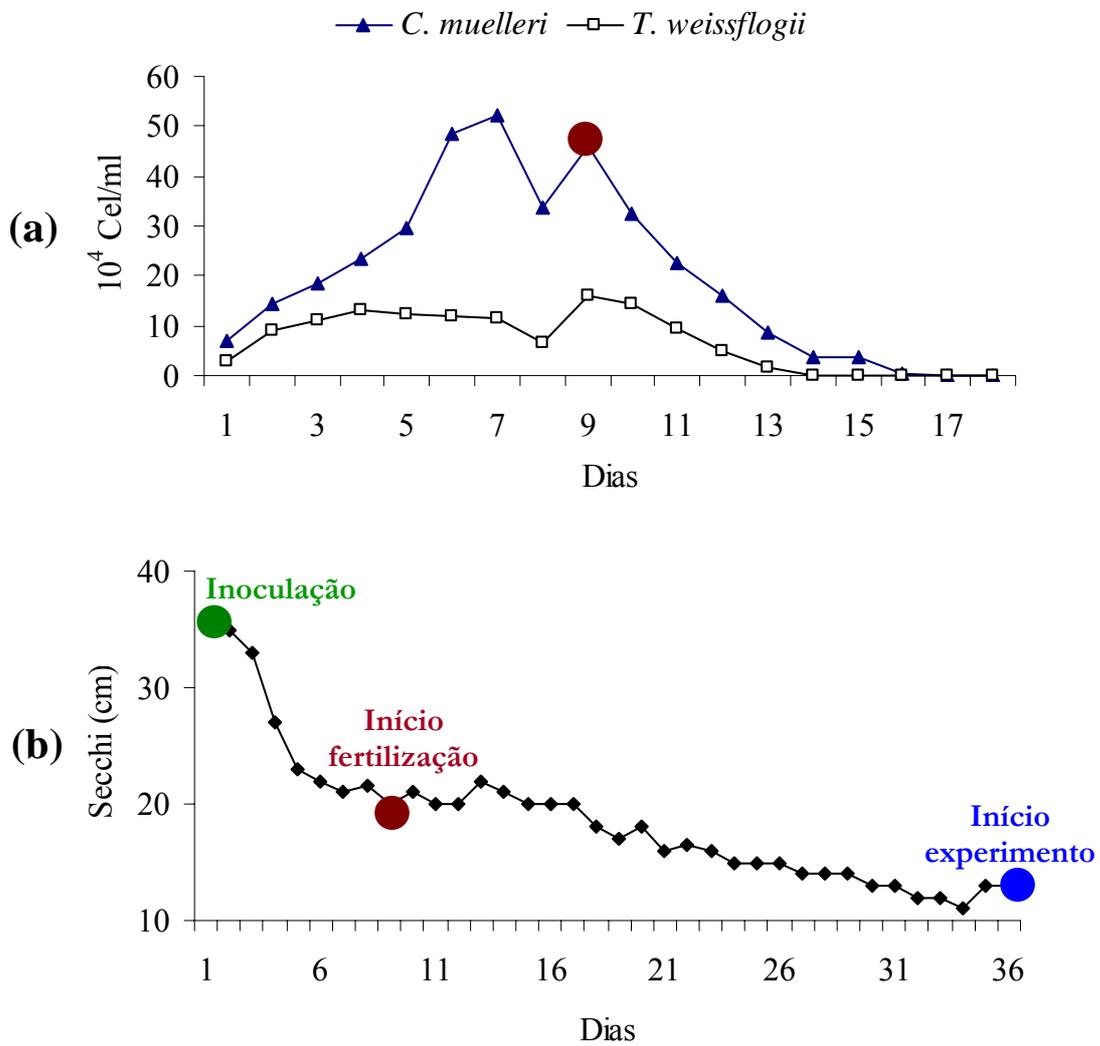
Em seguida a matriz foi povoada com juvenis de *Litopenaeus vannamei* (1,97 ± 0,27 g) na densidade de estocagem de 100 camarões/m<sup>2</sup>, para auxiliarem na formação dos flocos microbianos (Ferreira, em preparação). Os camarões foram alimentados com ração comercial com 40% de proteína bruta na proporção de 5% da biomassa de camarões presente na matriz, fracionada em duas vezes ao dia.

A MF recebeu diariamente uma fertilização orgânica que compreendeu a adição de farelo de trigo (10 g), melão de cana-de-açúcar (210 g) e a própria ração fornecida aos camarões, favorecendo uma relação nominal (em peso) de carbono/nitrogênio (C/N) de aproximadamente 17:1, sendo essa relação mensurada e balanceada de acordo com a composição proximal de cada ingrediente.

Para a matriz diatomáceas (MD) foi utilizado um tanque circular (5000 L), equipado com sistema de aeração conforme descrito anteriormente. Nesta matriz foram inoculadas as mesmas

espécies de diatomáceas (*Thalassiosira weissflogii* e *Chaetoceros muelleri*), e a cada cinco dias todo seu volume era renovado e uma nova inoculação realizada, a fim de manter o meio o mais constante possível.

A matriz mistura (MM) constituiu-se de um tanque (800 L) que recebia a água da matriz de flocos e matriz diatomáceas em igual proporção (1:1) mantendo um volume útil de 600 L, sendo este trocado totalmente a cada três dias. O sistema de aeração foi o mesmo utilizado nas demais matrizes.



**Figura 2.** (a) Concentração de diatomáceas na preparação da matriz de flocos indicando o momento da cobertura com sombrite, povoamento e início da fertilização orgânica. (b) Transparência de Secchi ao longo do período de formação dos flocos microbianos.



**Figura 3.** (a) Inoculação das diatomáceas na matriz de flocos, (b) cobertura da matriz de flocos com sombrite, povoamento com camarões e início da fertilização orgânica, (c) coloração da água da matriz de flocos após 10 dias de fertilização, (d) coloração da água da matriz de flocos após 26 dias de fertilização, considerado os flocos microbianos já formados (observação através da transparência da água utilizando disco de Secchi).

### 3.2. Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três tratamentos: cultivo em meio às diatomáceas (MD), cultivo em meio mistura (MM) e cultivo em meio aos flocos microbianos (MF); com quatro repetições por tratamento. Cada unidade experimental foi constituída de 1 tanque (80 L) de fibra de vidro com área de fundo de 0,33 m<sup>2</sup> (denominado microcosmo). A aeração foi proveniente de um soprador central sendo cada unidade equipada com um círculo (mangueira de 1/2 polegada) com quatro pedras porosas fixo ao fundo. Foi utilizado um sistema de recirculação de forma que a água das matrizes era bombeada através de bombas submersas para os respectivos microcosmos, e retornava por gravidade (Figura 4). O volume total de cada unidade experimental foi recirculado em média 43 vezes/dia.



**Figura 4.** Sistema de recirculação nas unidades experimentais (tanques azuis): a água da respectiva matriz é bombeada até os tanques azuis, retornando por gravidade através de tubos de PVC e calhas.

### **3.3. Cultivo dos juvenis de *Litopenaeus vannamei***

O experimento foi iniciado 26 dias após a fertilização (Figura 2b, 3d), considerando os flocos microbianos formados (observação através da transparência de Secchi).. Cada microcosmo foi estocado com 100 juvenis com peso médio de  $0,31 \pm 0,10$  g atingindo uma densidade de estocagem de 300 camarões/m<sup>2</sup>.

A alimentação foi realizada três vezes ao dia (8, 14 e 19 h) com ração comercial Supra® (42 % de proteína bruta) fornecida em bandejas de alimentação. A ração não consumida pelos camarões foi quantificada toda manhã, sendo separada dos demais resíduos presentes nas bandejas, e seca em estufa a 60°C (até atingir peso constante), obtendo-se o peso seco final. Dessa forma a quantidade de ração fornecida era ajustada e o consumo determinado diariamente.

### **3.4. Análise dos parâmetros físico-químicos e biológicos da água**

Temperatura, pH, salinidade, oxigênio dissolvido e transparência da água (disco de Secchi) foram monitorados diariamente (8 h) em cada matriz através de um aparelho multiparâmetros (modelo YSI® 556 MPS - EUA). A cada três dias foram coletadas amostras para quantificar a concentração de nitrogênio amoniacal total (N-NH<sub>3</sub> + NH<sub>4</sub>) pela metodologia UNESCO (1983), nitrito (N-NO<sub>2</sub>) e fosfato (P-PO<sub>4</sub>) de acordo com Aminot & Chaussepied (1983) e silicato (Si) (Strickland & Parsons 1972). A concentração de clorofila *a* (Chl *a*) e os sólidos suspensos totais (SST) foram avaliados em triplicata com a mesma frequência, respectivamente por fluorimetria (Welschmeyer 1994), e pelo peso dos filtros de fibra de vidro (GF/F 47 mm) antes e após a filtração do material em suspensão (Strickland & Parsons 1972).

### **3.5. Caracterização da comunidade microbiana**

A contagem das diatomáceas inoculadas *Thalassiosira weissflogii* e *Chaetoceros muelleri* foi realizada diariamente (amostragem sempre no mesmo horário – 12 h) em câmara de Neubauer em aumento de 400 vezes. Para a caracterização e contagem de outras diatomáceas, ciliados, flagelados, rotíferos e nematódeos, amostras coletadas a cada três dias foram fixadas em solução de lugol (2%) e levadas à câmara de sedimentação, onde permaneceram por 1 hora para posterior contagem (30 campos escolhidos aleatoriamente),

utilizando microscópio invertido Zeiss Axiovert, equipado com contraste de fase, em magnificação final de 100 e 400 x (Utermöhl 1958). Imagens digitais dos principais organismos foram capturadas utilizando-se uma câmera SPOT Insight QE. Os gêneros de protozoários foram classificados com base na sua motilidade (cílios, flagelos e pseudópodos) e características de hábito alimentar, de acordo com as descrições de Lee *et al.* (1985), Curds (1982), Curds *et al.* (1983) e Carey (1992).

Para as cianobactérias autotróficas do picoplâncton, amostras de 1 ml foram filtradas em membrana escurecida de polycarbonato (Nuclepore – 0,2µm de poro, diâmetro 25 mm). A contagem deu-se pela sua autofluorescência em microscópio de fluorescência Zeiss Axioplan equipado com conjuntos de filtros para excitação por luz verde (546 nm), sendo contados 30 campos escolhidos aleatoriamente em aumento de 1000 vezes, utilizando-se objetiva de imersão.

### **3.6. Determinação da composição proximal do material em suspensão e análises de desempenho dos camarões**

Ao final de 30 dias experimentais foi determinado o ganho de peso (peso final – peso inicial), sobrevivência (número de animais vivos ao final do experimento/total de animais x 100) e conversão alimentar (ração consumida/ganho de peso). A taxa de crescimento específico (TCE) dos camarões expressa em % dia<sup>-1</sup> foi determinada de acordo com a fórmula sugerida por Bagenal & Tesch (1978).

$$TCE(\%d^{-1}) = \left( \frac{\ln W_f - \ln W_i}{t} \right) * 100$$

Onde:  $W_f$  = peso final dos camarões;  $W_i$  = peso inicial dos camarões;  $t$  = tempo em dias.

Amostras da água do MF e MM foram filtradas (100µm) a fim de determinar a composição proximal (umidade, proteína bruta, extrato etéreo, fibra bruta e cinzas) do material em suspensão, conforme AOAC (1995). Essa mesma análise foi efetuada para a ração e

ingredientes utilizados na fertilização orgânica, ambas realizadas no Laboratório de Nutrição Animal da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL/RS).

### **3.7. Análises Estatísticas**

Os valores de desempenho dos camarões nos diferentes tratamentos foram avaliados através da análise de variância (ANOVA,  $\alpha = 0,05$ ) após serem confirmadas a homocedasticidade das variâncias e a normalidade da distribuição dos dados. Para verificar se as diferenças entre as médias dos diferentes tratamentos foram significativas estatisticamente ( $\alpha = 0,05$ ), foi aplicado o teste de Tukey HSD (Sokal & Rohlf 1969). Os parâmetros abióticos de qualidade da água, concentração de Chl *a* e SST foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal Wallis. Todas as análises foram realizadas utilizando o software STATISTICA® versão 7.0.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Qualidade da água nos meios de cultivo

A temperatura da água de cultivo não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos, com grandes oscilações durante o período experimental, variando de 16,57 a 30,17°C (Figura 5a). Os valores de O<sub>2</sub>D, pH e transparência da água (Figuras 5b, 5c e 6a) foram significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) entre todos os três tratamentos, sendo superiores no MD, seguido do MM e do MF (Tabela 1). O MM apresentou salinidade superior comparado aos demais, os quais não diferiram entre si (Figura 6b). A concentração de Chl *a* (Figura 6c) foi superior no MD (553,80 µg/L) apesar de não ter diferido significativamente ( $p > 0,05$ ) do MF (343,30 µg/L).

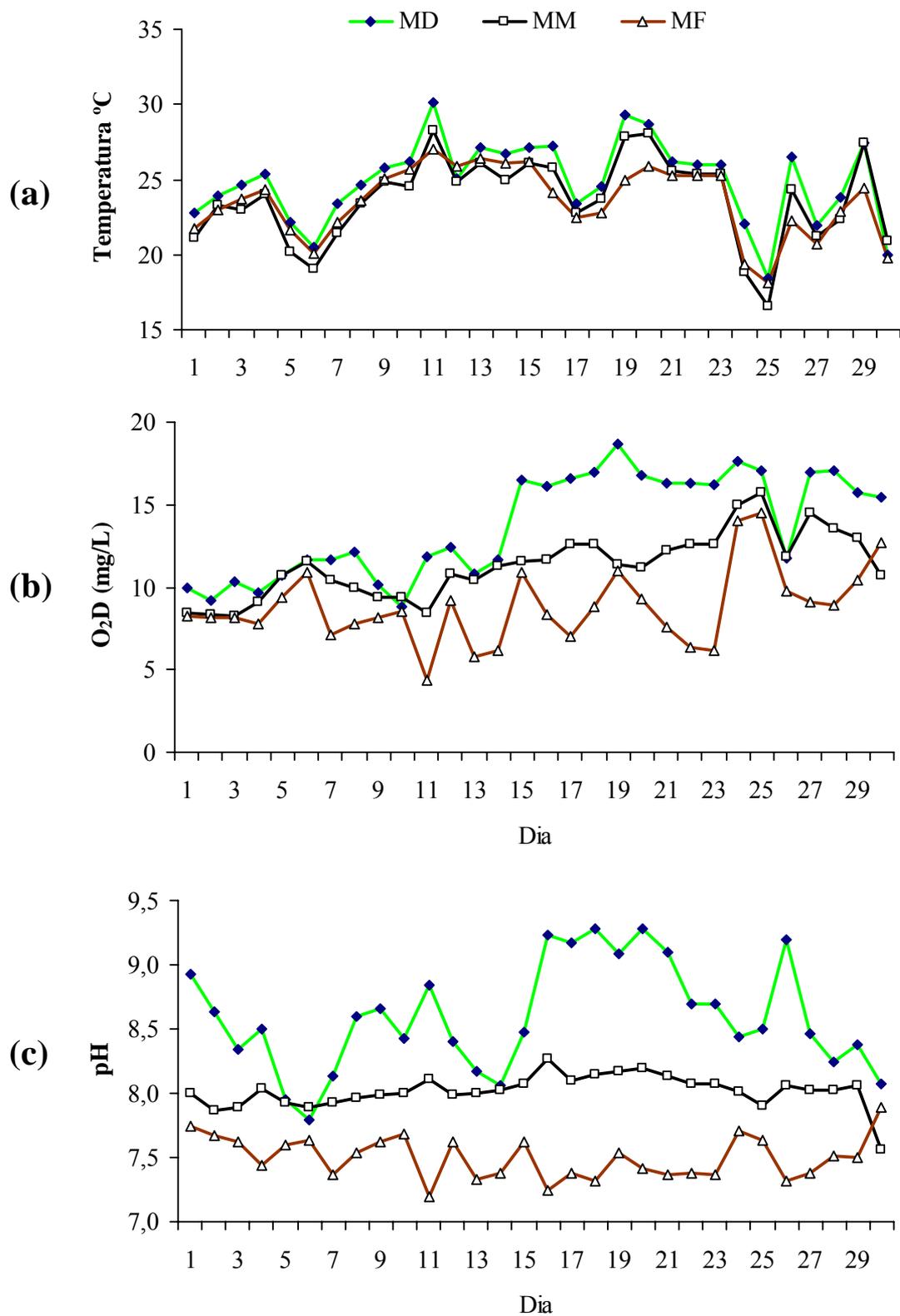
**Tabela 1.** Parâmetros de qualidade da água no cultivo de *L. vannamei* em meio a diatomáceas (MD), meio mistura (MM) e em meio aos flocos microbianos (MF).

Parâmetro	MD	MM	MF
Temperatura (°C)	24,90 ± 2,73 <sup>a</sup>	23,71 ± 2,87 <sup>a</sup>	23,53 ± 2,34 <sup>a</sup>
Oxigênio Dissolvido (mg/L)	13,78 ± 3,12 <sup>a</sup>	11,32 ± 1,96 <sup>b</sup>	8,82 ± 2,30 <sup>c</sup>
pH	8,59 ± 0,42 <sup>a</sup>	8,02 ± 0,13 <sup>b</sup>	7,50 ± 0,16 <sup>c</sup>
Secchi (cm)	30,13 ± 7,86 <sup>a</sup>	22,63 ± 6,94 <sup>b</sup>	11,70 ± 1,91 <sup>c</sup>
Salinidade	37,55 ± 1,08 <sup>b</sup>	39,86 ± 3,08 <sup>a</sup>	37,23 ± 2,76 <sup>bc</sup>
Chl <i>a</i> (µg/L)	553,80 ± 176,51 <sup>a</sup>	247,90 ± 228,32 <sup>bc</sup>	343,30 ± 184,97 <sup>ab</sup>
SST (mg/L)	132,70 ± 103,25 <sup>b</sup>	100,50 ± 84,90 <sup>b</sup>	496,60 ± 132,04 <sup>a</sup>
NAT (mg/L)	0,28 ± 0,51 <sup>a</sup>	0,19 ± 0,37 <sup>ab</sup>	0,02 ± 0,02 <sup>bc</sup>
NO <sub>2</sub> (mg/L)	0,55 ± 0,50 <sup>a</sup>	0,05 ± 0,08 <sup>b</sup>	0,02 ± 0,03 <sup>bc</sup>
PO <sub>4</sub> (mg/L)	0,04 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,03 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,04 ± 0,01 <sup>a</sup>
Si (mg/L)	0,28 ± 0,63 <sup>a</sup>	0,08 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,12 ± 0,20 <sup>a</sup>

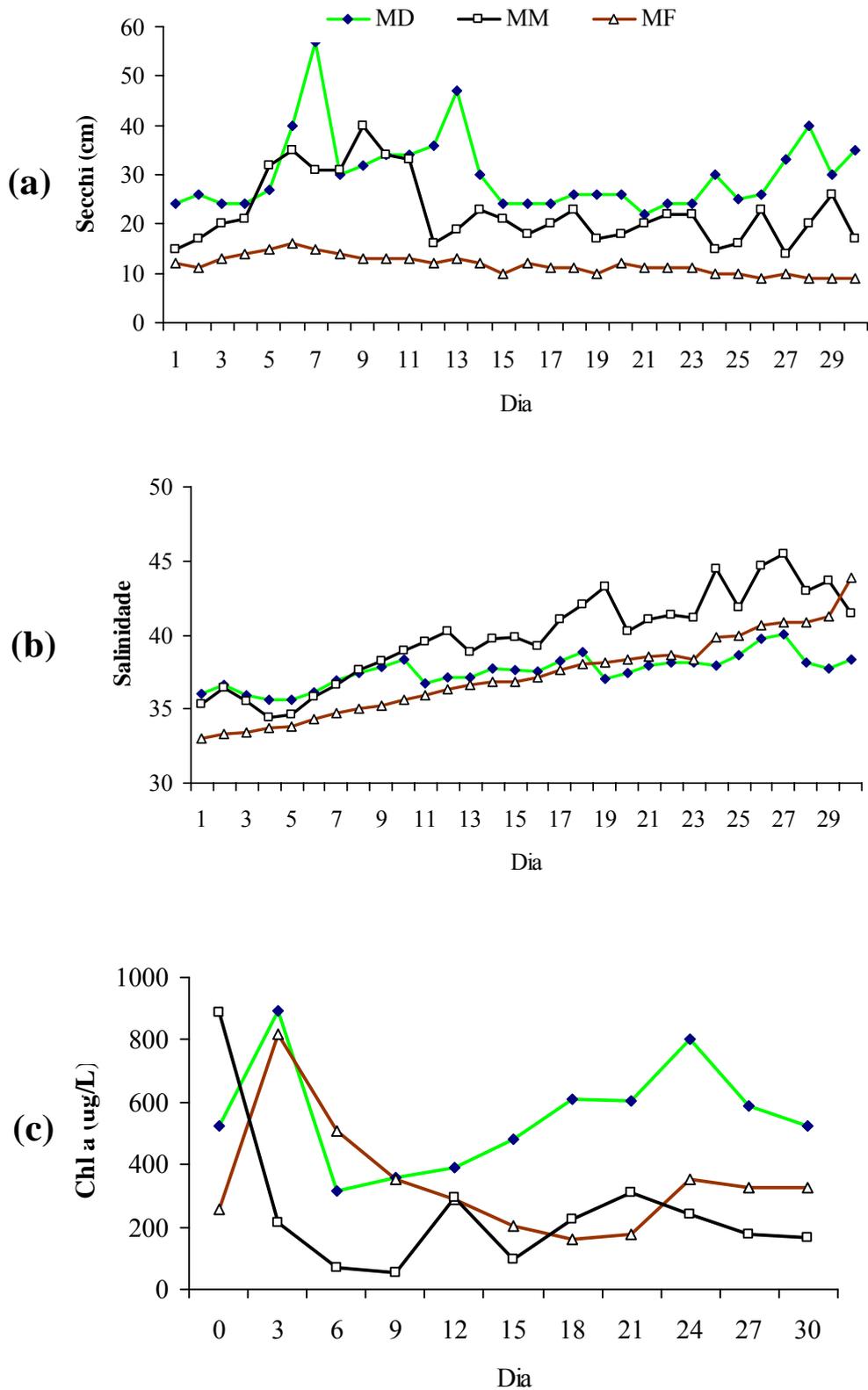
Os dados são médias ± desvio padrão.

NAT: Nitrogênio amoniacal total.

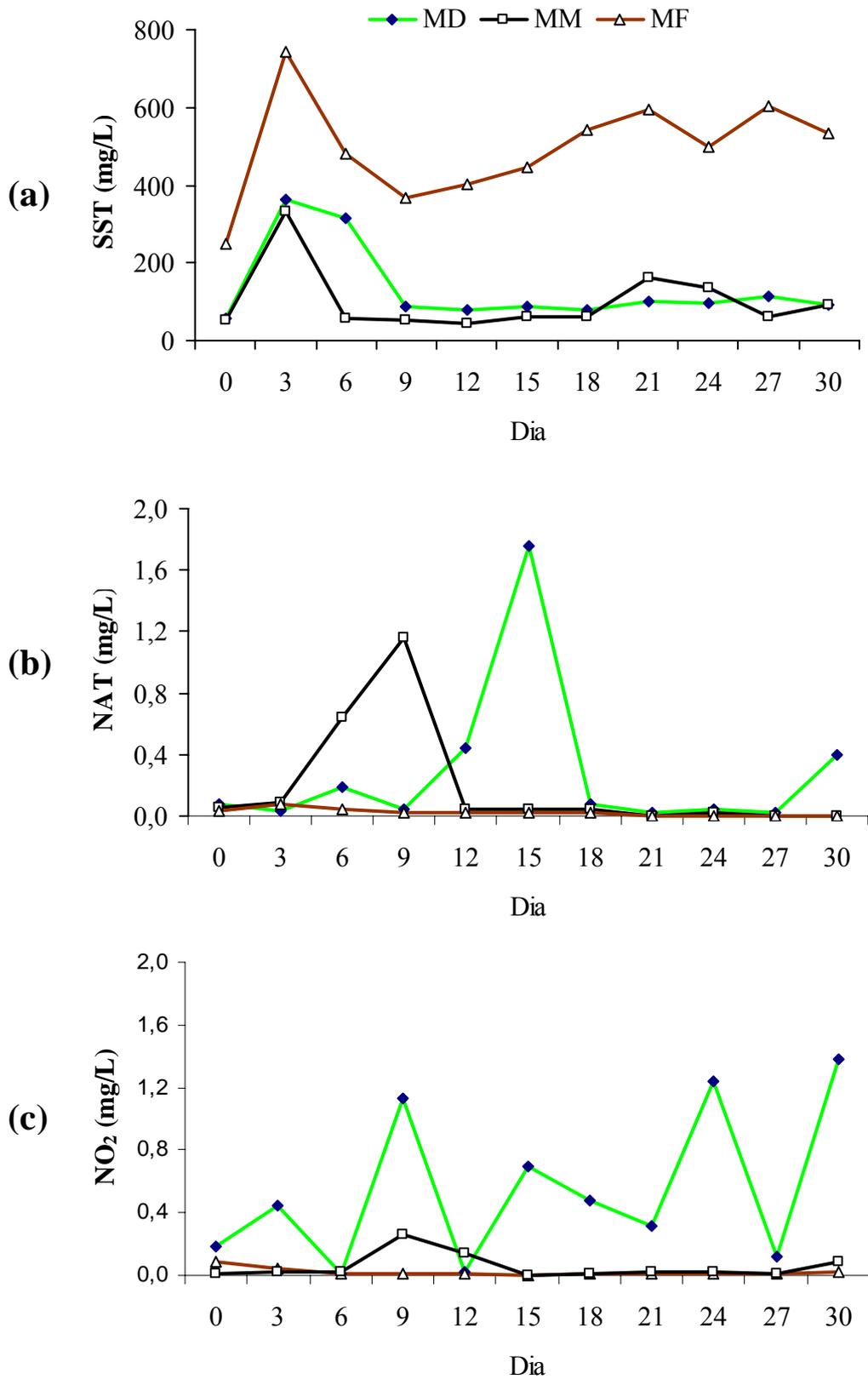
Letras iguais na mesma linha indicam que as médias não diferem significativamente ( $p > 0,05$ ).



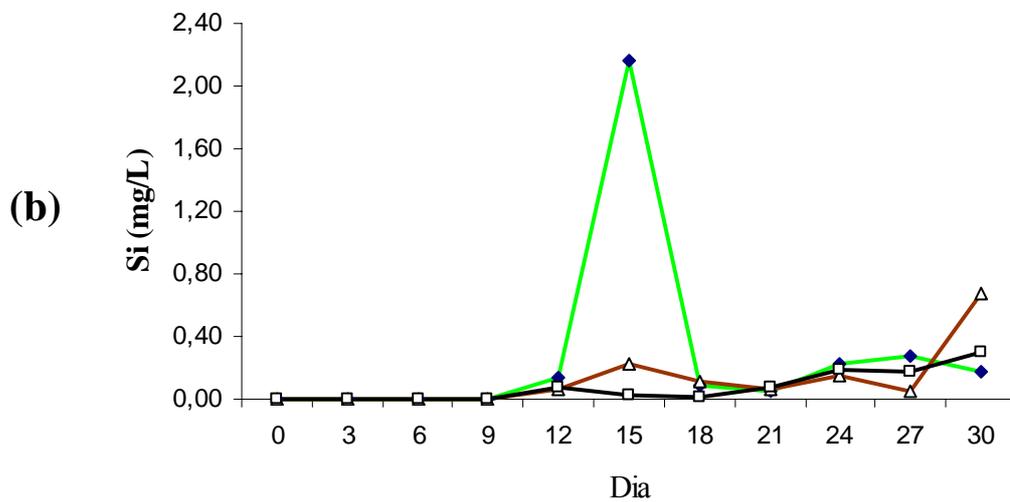
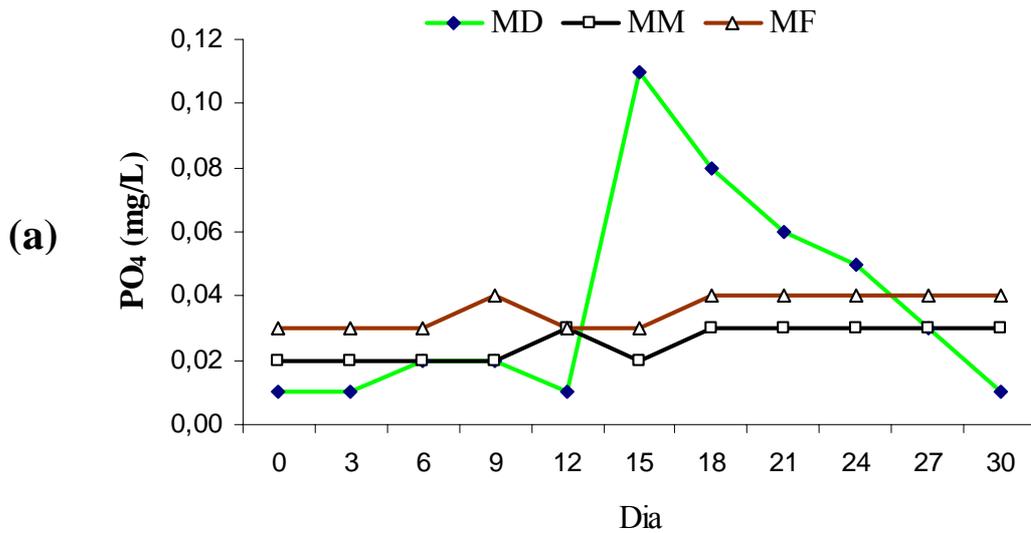
**Figura 5.** Valores de (a) temperatura, (b) O<sub>2</sub>D e (c) pH da água no cultivo de *L. vannamei* em meio a diatomáceas (MD), meio mistura (MM) e em meio aos flocos microbianos (MF) ao longo do período experimental.



**Figura 6.** Valores de (a) transparência da água (disco de Secchi), (b) salinidade e (c) Chl *a* na água de cultivo de *L. vannamei* em meio a diatomáceas (MD), meio mistura (MM) e em meio aos flocos microbianos (MF) ao longo do período experimental.



**Figura 7.** Valores de (a) sólidos suspensos totais (SST), (b) nitrogênio amoniacal total (NAT) e (c) NO<sub>2</sub> na água de cultivo de *L. vannamei* em meio a diatomáceas (MD), meio mistura (MM) e em meio aos flocos microbianos (MF) ao longo do período experimental.

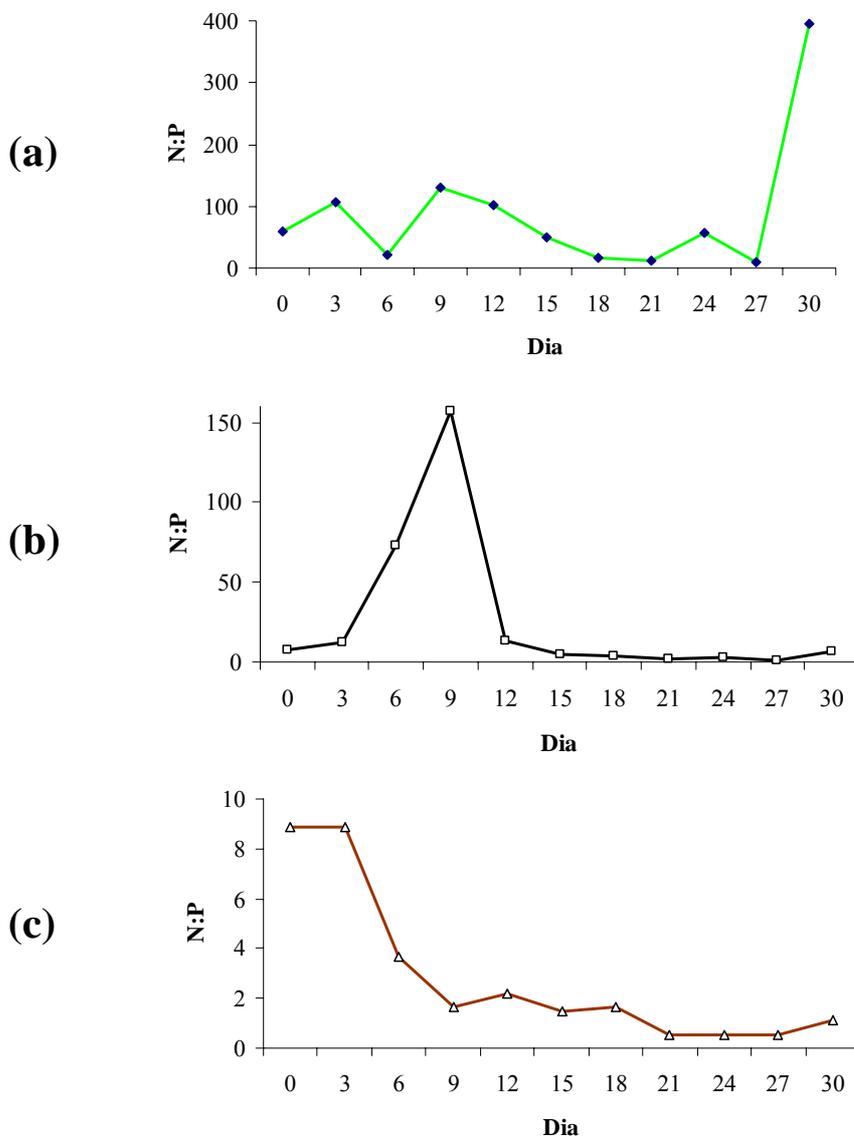


**Figura 8.** Valores de (a) fosfato e (b) silicato na água de cultivo de *L. vannamei* em meio a diatomáceas (MD), meio mistura (MM) e em meio aos flocos microbianos (MF) ao longo do período experimental.

A concentração de SST foi significativamente superior no MF, não diferindo entre os demais meios (Figura 7a). Em relação aos compostos nitrogenados, a concentração de nitrogênio amoniacal total (NAT) foi superior no MD (Figura 7b), entretanto não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) quando comparada ao MM, o qual não diferiu do MF (Tabela 1). A concentração de nitrito também foi superior ( $p < 0,05$ ) no MD, não apresentando diferença entre

MM e MF (Figura 7c). Não houve diferença significativa na concentração de fosfato e silicato (Figuras 8a e 8b) entre os meios de cultivo.

O MD foi o tratamento que apresentou maior relação nitrogênio/fósforo (N:P) ao longo do experimento (com base no número atômico), seguido do MM (média de 87:1 e 26:1 respectivamente). O MF apresentou no início do experimento uma relação N:P de 9:1 (Figura 9), porém a partir do 3º dia ocorreu uma queda significativa nesta relação, chegando ao final do experimento em 1/1 (média 3/1).



**Figura 9.** Relação N:P ( $\mu\text{M}$ ) na água de cultivo de juvenis de *L. vannamei* em meio de diatomáceas (a), meio mistura (b) e em meio de flocos microbianos (c) durante o período experimental.

## 4.2. Comunidade microbiana presente na água de cultivo e composição proximal dos flocos microbianos

Uma variedade de protozoários e alguns organismos da meiofauna foram observados, refletindo a diversidade de níveis tróficos presentes na água de cultivo dos três tratamentos (Tabela 2).

Os protistas autotróficos foram representados na sua totalidade por microalgas diatomáceas. Além das duas espécies inoculadas (*T. weissflogii* e *C. muelleri*) foram observadas diatomáceas penadas *Cylindrotheca closterium* e *Amphora* cf. *sabiniana* em todos os tratamentos. Enquanto no MD e MM houve a predominância de *C. muelleri*, seguido de *T. weissflogii*, no MF a predominância foi de *Amphora* cf. *sabiniana*. (Figura 10).

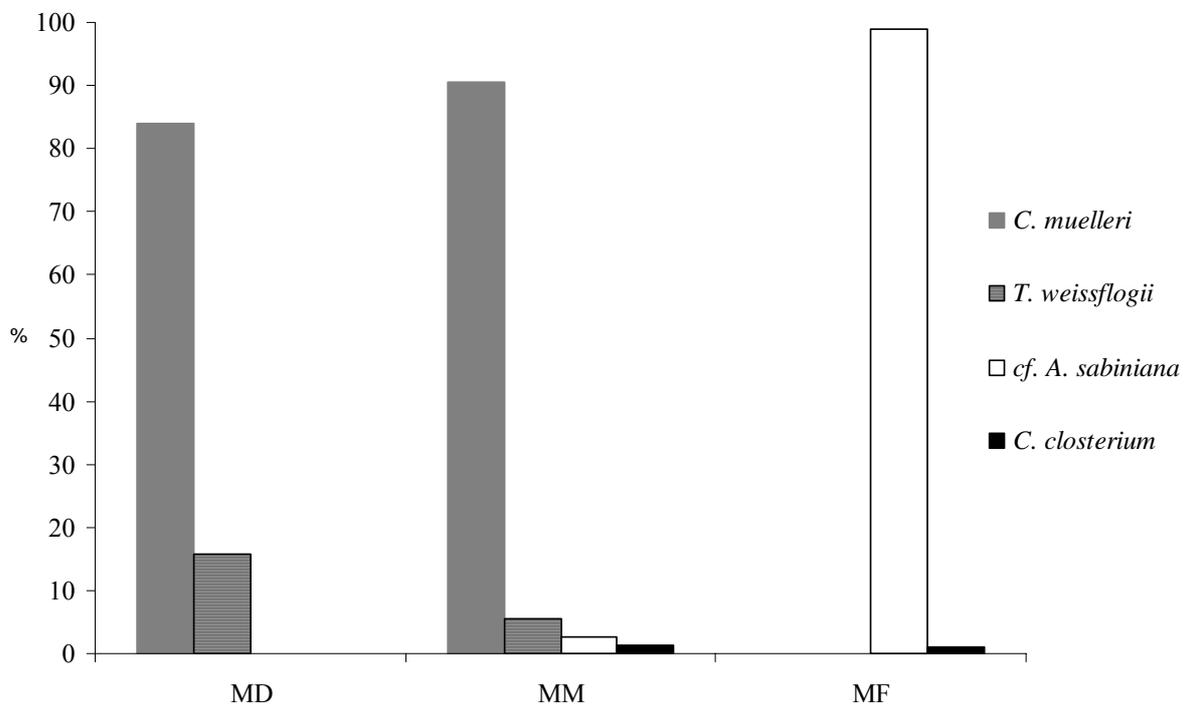
O MD apresentou menor diversidade de microorganismos heterotróficos (Figura 11a), sendo composto apenas por ciliados da ordem Scuticociliatida e o dinoflagelado *Oxyrrhis marina* (Dujardin 1841). *O. marina* foi o microorganismo dominante no MD por um período significativo (Figura 12a) chegando a representar 94% dos protistas heterotróficos presentes nesse meio, sofrendo uma redução em seguida, sendo acompanhada pelo aumento da população de ciliados.

**Tabela 2.** Comunidade microbiana presente na água do meio diatomáceas (MD), meio mistura (MM) e em meio de flocos microbianos (MF).

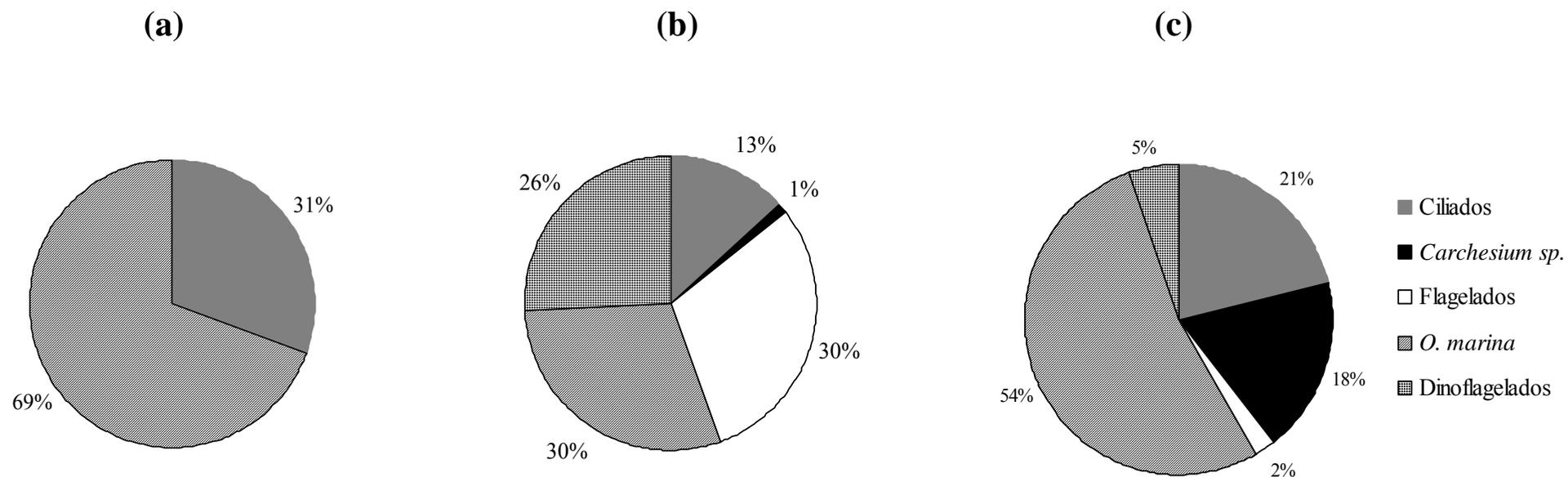
<b>Táxon</b>	<b>MD</b>	<b>MM</b>	<b>MF</b>
<b>Diatomáceas (10<sup>5</sup> cel/L)</b>			
<i>Amphora</i> cf. <i>sabiniana</i> (21 µm)	1,14 (0 – 4,30)	11,82 (0,43 – 28,37)	73,13 (16 – 140,97)
<i>Cylindrotheca closterium</i> (80 µm)	1,32 (0 – 5,16)	2,53 (0 – 15,04)	0,78 (0 – 3,87)
<i>Chaetoceros muelleri</i> (5 µm)	3512 (1250 - 5750)	887 (150 – 2850)	A
<i>Thalassiosira weissflogii</i> (12 µm)	637 (0 – 1200)	69 (0 – 400)	A
<b>Cianobactérias (10<sup>6</sup> cel/L)</b>			
Colônias cocóides	A	3,82 (0,69 – 13,67)	49,19 (21,28 – 66,80)
Subfamília Pseudanabaenoideae (25 – 100 µm)	9,74 (1,63 - 33,14)	32,42 (14,38 - 54,22)	0,11 (0,00 - 0,90)
Subfamília Heteroleibleinioideae (50 – 150 µm)	0,01 (0,00 - 0,09)	1 (0,04 - 4,13)	5,8 (0,17 - 18,65)
Cocóides autotróficas do picoplâncton (2 µm)	1,95 (0,41 - 4,45)	2,54 (1,70 - 4,10)	4,39 (1,93 - 9,35)
<b>Protistas heterotróficos (10<sup>5</sup> org/L)</b>			
Ciliados (15 µm)	6,59 (0,43 – 12,25)	11,50 (0,86 – 37,39)	16,87 (0 – 35,24)
Colônias <i>Carchesium</i> sp. (45 µm)	A	0,43 (0 – 2,58)	4,35 (0 – 23,64)
<i>Acineta</i> sp. (33 µm)	A	A	0,43 (0 – 2,15)
Flagelados (10 µm)	A	19,07 (3,87 – 39,97)	1,07 (0 – 3,44)
<i>Oxyrrhis marina</i> (25 µm)	41,26 (1,29 – 180,95)	29 (0 – 63,18)	62,05 (0 – 123,35)
Demais dinoflagelados (15 – 30 µm)	A	15,80 (6,45 – 37,39)	2,10 (0 – 7,74)
Amebóides (30 – 50 µm)	A	0,00 (0 – 0,01)	0,02 (0 – 0,08)
<b>Metazoários (10<sup>4</sup> org/L)</b>			
Rotíferos (120 µm)	A	1,12 (0 – 4,71)	10,17 (0,57 – 32,67)
Nematódeos (80 – 350 µm)	A	0,25 (0 – 0,71)	0,79 (0,10 – 1,57)
<b>Não identificado (10<sup>4</sup> cel/L) (15 µm)</b>	A	A	2,96 (0 – 10,19)

A = Ausente. Os dados são médias (mínimo – máximo).

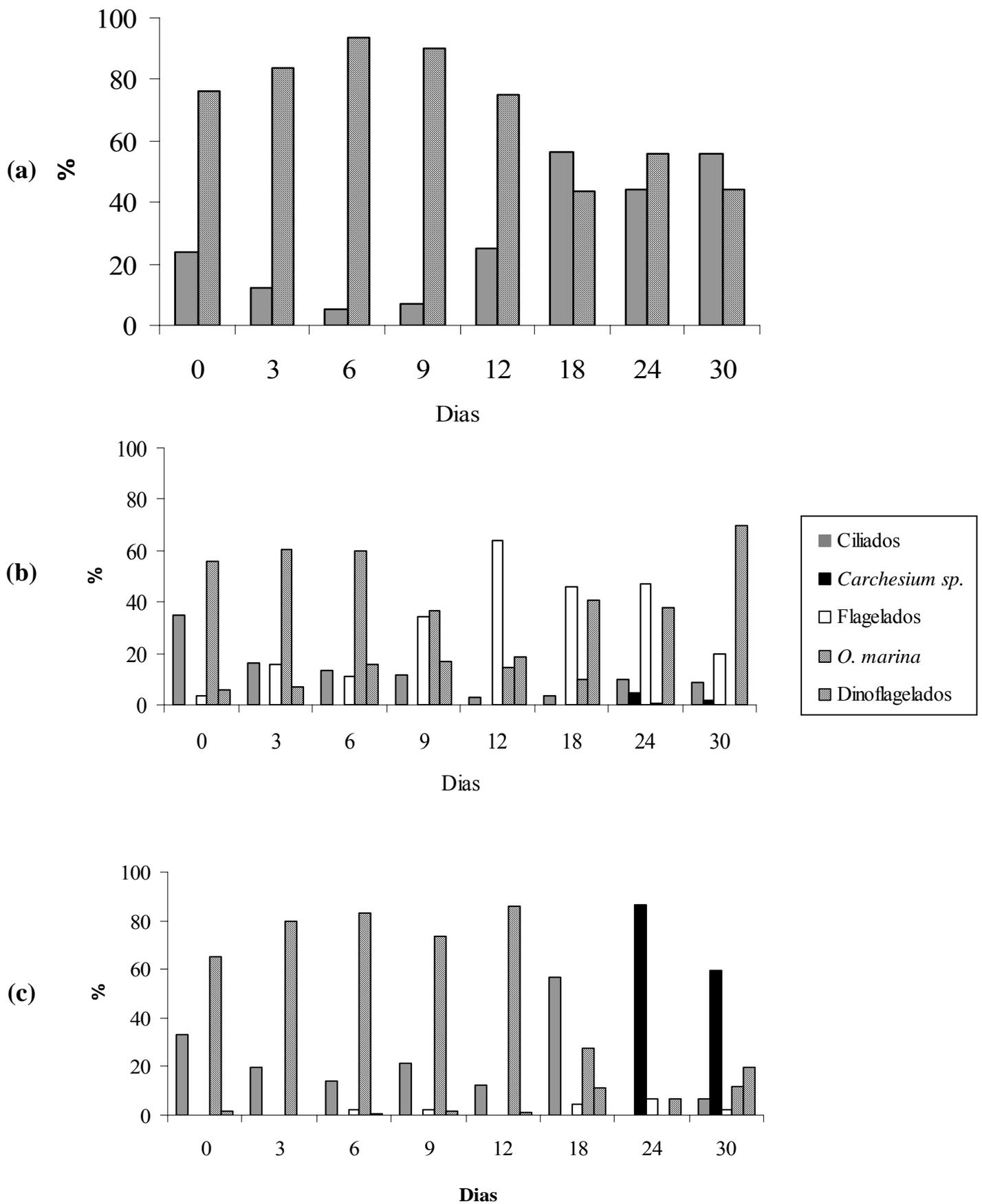
O MM apresentou maior diversidade de protistas heterotróficos comparado ao MD (Figura 11b). Além de ciliados da ordem Scuticociliatida e o dinoflagelado *O. marina*, foram observadas colônias de ciliados *Carchesium*, organismos amebóides (raramente observados) e a presença significativa de outros dinoflagelados e flagelados (Família Bodonidae). Dentre os dinoflagelados, os gêneros *Gyrodinium* e *Protoberidinium* foram predominantes e algumas vezes, foi observada a presença de um dinoflagelado atecado não identificado. *O. marina* mostrou-se dominante por um período de tempo (Figura 12b), em seguida sofreu uma redução gradativa de sua população e flagelados e dinoflagelados passaram a ser os dominantes no meio mistura.



**Figura 10.** Proporção (%) das diatomáceas presentes na água de cultivo de juvenis de *L. vannamei* em meio de diatomáceas (MD), meio mistura (MM) e em meio de flocos microbianos (MF).



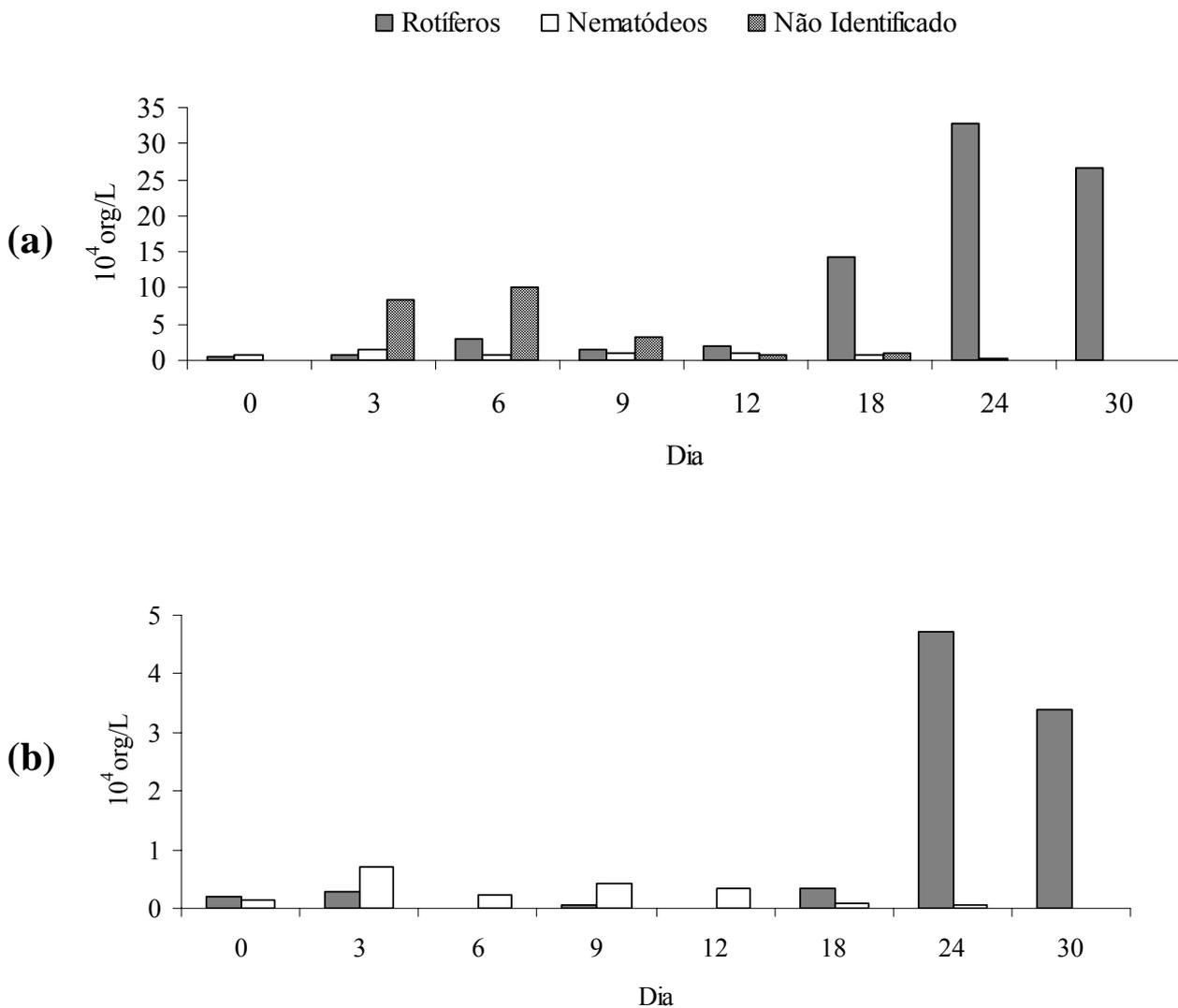
**Figura 11.** Contribuição relativa média da concentração de protistas heterotróficos na água de cultivo de juvenis de *L. vannamei* em meio de diatomáceas (a), meio mistura (b) e em meio de flocos microbianos (c) durante o período experimental.



**Figura 12.** Contribuição relativa e sucessão de protistas heterotróficos na água de cultivo de juvenis de *L. vannamei* em meio de diatomáceas (a), meio mistura (b) e em meio de flocos microbianos (c) durante o período experimental.

A maior diversidade de microorganismos no MF foi devido, além dos microorganismos já relacionados, à presença de ciliados *Acineta* em alguns momentos do período experimental (Tabela 2). Como nos demais meios, *O. marina* também foi o protista heterotrófico dominante nesse tratamento por um período, com o aumento significativo dos ciliados do gênero *Carchesium* no final (Figura 12c).

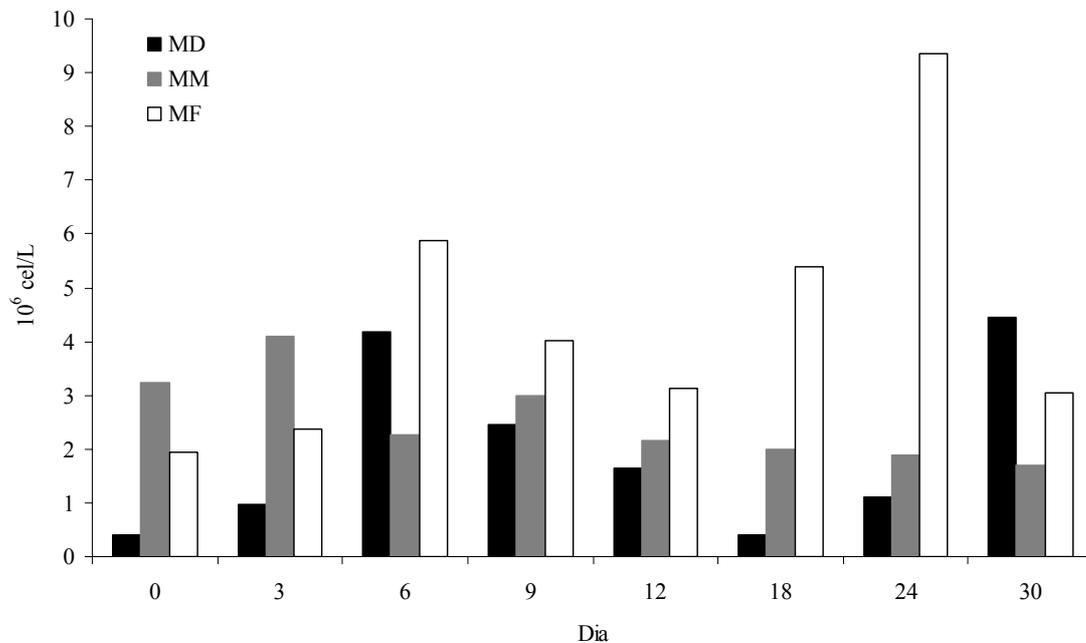
Entre os metazoários, rotíferos e nematódeos foram freqüentemente observados na água de cultivo exceto no MD, onde permaneceram ausentes durante todo período experimental (Figura 13).



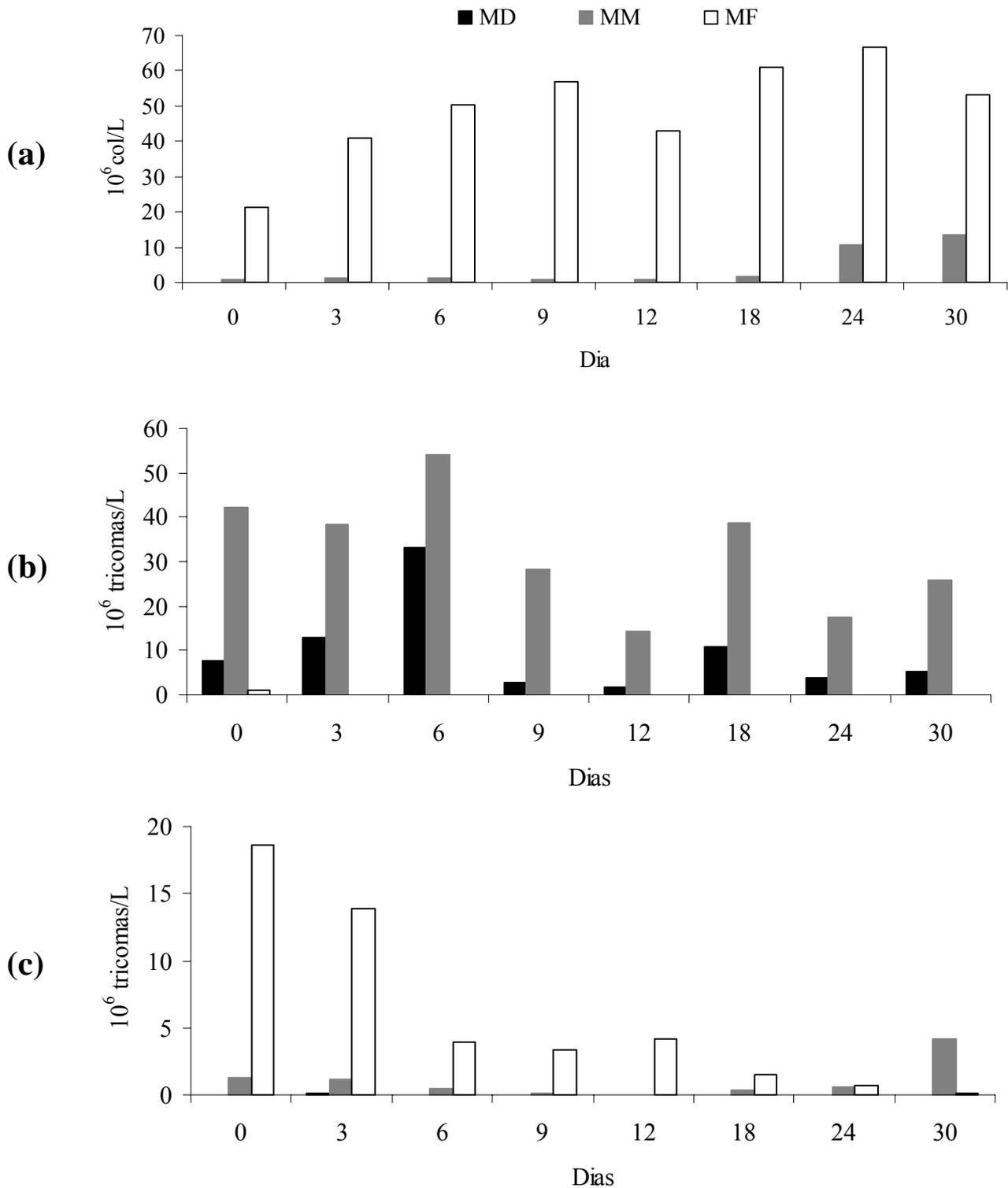
**Figura 13.** Metazoários presentes na água de cultivo de juvenis de *L. vannamei* em meio aos flocos microbianos (a) e meio mistura (b) durante o período experimental.

As cianobactérias autotróficas do picoplâncton (cocóides <math>< 2\mu\text{m}</math>) estiveram presentes na água de todos os tratamentos, com maior abundância no MF, apresentando em média  $4,39 \times 10^6$  células  $\text{L}^{-1}$  (Figura 14). As colônias de cianobactérias cocóides foram muito abundantes em MF ( $49,19 \times 10^6$  colônias  $\text{L}^{-1}$ ), estavam presentes em MM enquanto que em MD elas não foram observadas (Figura 15a).

As cianobactérias filamentosas presentes na água de cultivo pertencem à Família Pseudanabaenaceae. Duas subfamílias foram identificadas (Komárek & Anagnostidis 2005). A subfamília Pseudanabaenoideae caracteriza-se por apresentar tricomas retos e finos (máximo  $1 \mu\text{m}$  de diâmetro), sem bainha ou envolto por bainha muito fina (incolor e homogênea). Bainhas finas e indistintas se desenvolvem excepcionalmente em alguns gêneros, normalmente sob condições de estresse. Esta subfamília esteve presente com maior frequência no MM, apresentando menor frequência no MD e praticamente ausente no MF (Figura 15b). A outra subfamília identificada, Heteroleibleinioideae apresenta tricomas de maior diâmetro (até  $3\mu\text{m}$ ) que a descrita anteriormente, crescem intensamente, são heteropolares com uma das extremidades aderida ao substrato. Essa subfamília não foi encontrada no MD e raramente observada no MM. Já no MF apresentou elevada concentração no início do experimento com redução gradativa ao longo do tempo (Figura 15c).



**Figura 14.** Cianobactérias autotróficas do picoplâncton presentes na água do cultivo de *L. vannamei* em meio de diatomáceas (MD), meio mistura (MM) e em meio de flocos microbianos (MF) durante o período experimental.



**Figura 15.** Colônias de cianobactérias cocóides (a), cianobactérias filamentosas da subfamília Pseudanabaenoideae (b) e cianobactérias filamentosas da subfamília Heteroleibleinioidae (c) presentes na água do cultivo de *L. vannamei* em meio a diatomáceas (MD), meio mistura (MM) e em meio aos flocos microbianos (MF) durante o período experimental.

A análise de composição proximal dos flocos microbianos mostrou elevados valores de cinzas e um conteúdo lipídico (extrato etéreo) muito baixo (Tabela 3). A composição proximal da ração utilizada confirmou os valores declarados no rótulo pelo fabricante.

**Tabela 3.** Percentual de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), extrativo não nitrogenado (ENN), fibra bruta (FB) e cinzas do material em suspensão do meio mistura (FMM) e do meio flocos (FMF), da ração comercial (RC) e dos ingredientes utilizados para fertilização orgânica.

Ingredientes	MS	PB	EE	ENN*	FB	Cinzas
FMF	72,65	18,00	0,17	5,17	1,71	47,60
FMM	79,34	18,63	0,10	8,54	1,98	50,09
RC Rótulo	88,00 (mín)	40,00 (mín)	8,00 (mín)	NI	5,00 (máx)	16,00 (máx)
RC LNA	90,50	41,55	12,39	19,07	3,90	13,59
F. trigo	86,86	15,48	2,01	54,15	10,34	4,88
Melaço	60,26	6,21	0,17	39,32	0,44	14,12

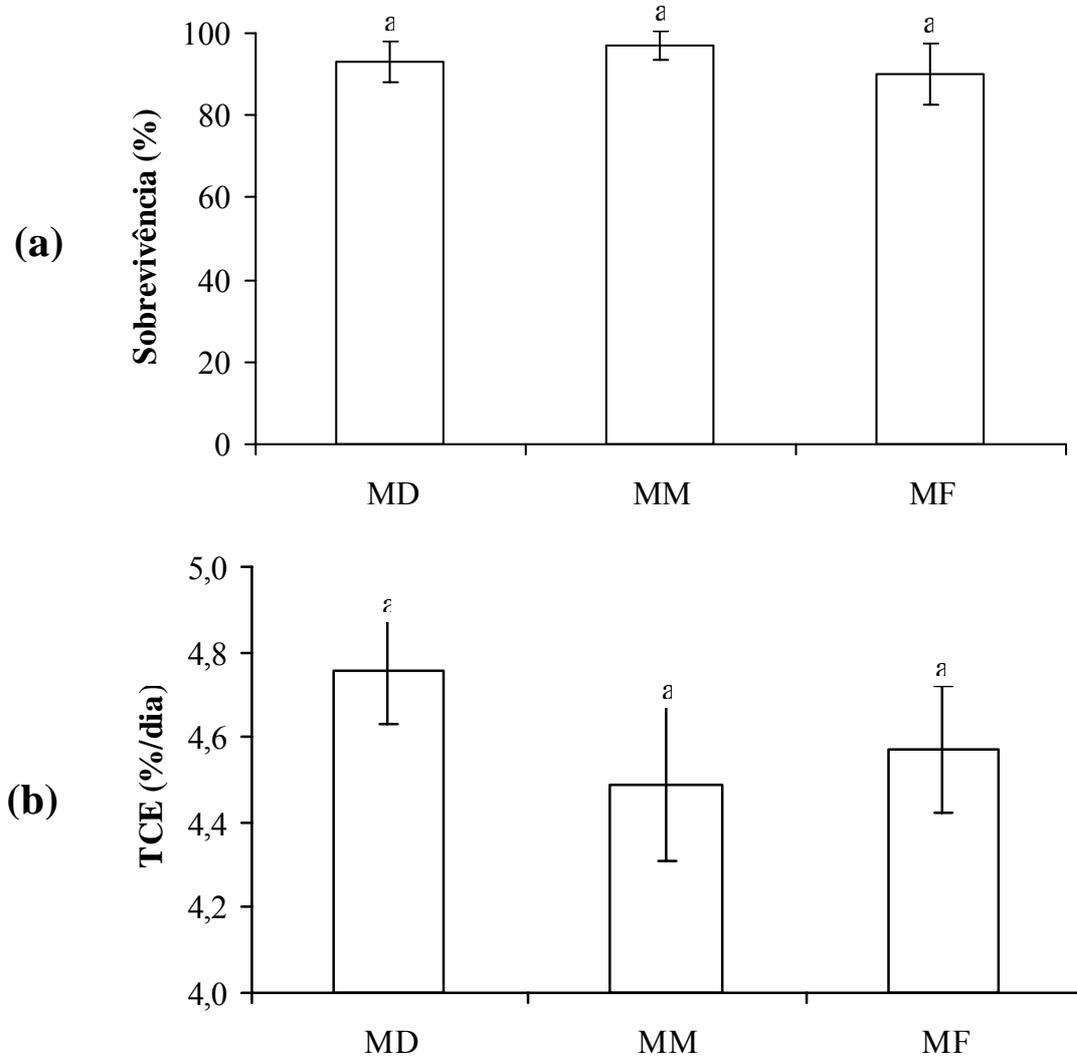
\*Estimado por diferença [MS – (PB + EE + FB + Cinzas)]

NI = Não informado

(mín) Quantidade mínima declarada pelo fabricante; (máx) Quantidade máxima declarada pelo fabricante.

#### 4.3. Desempenho dos juvenis de *L. vannamei*

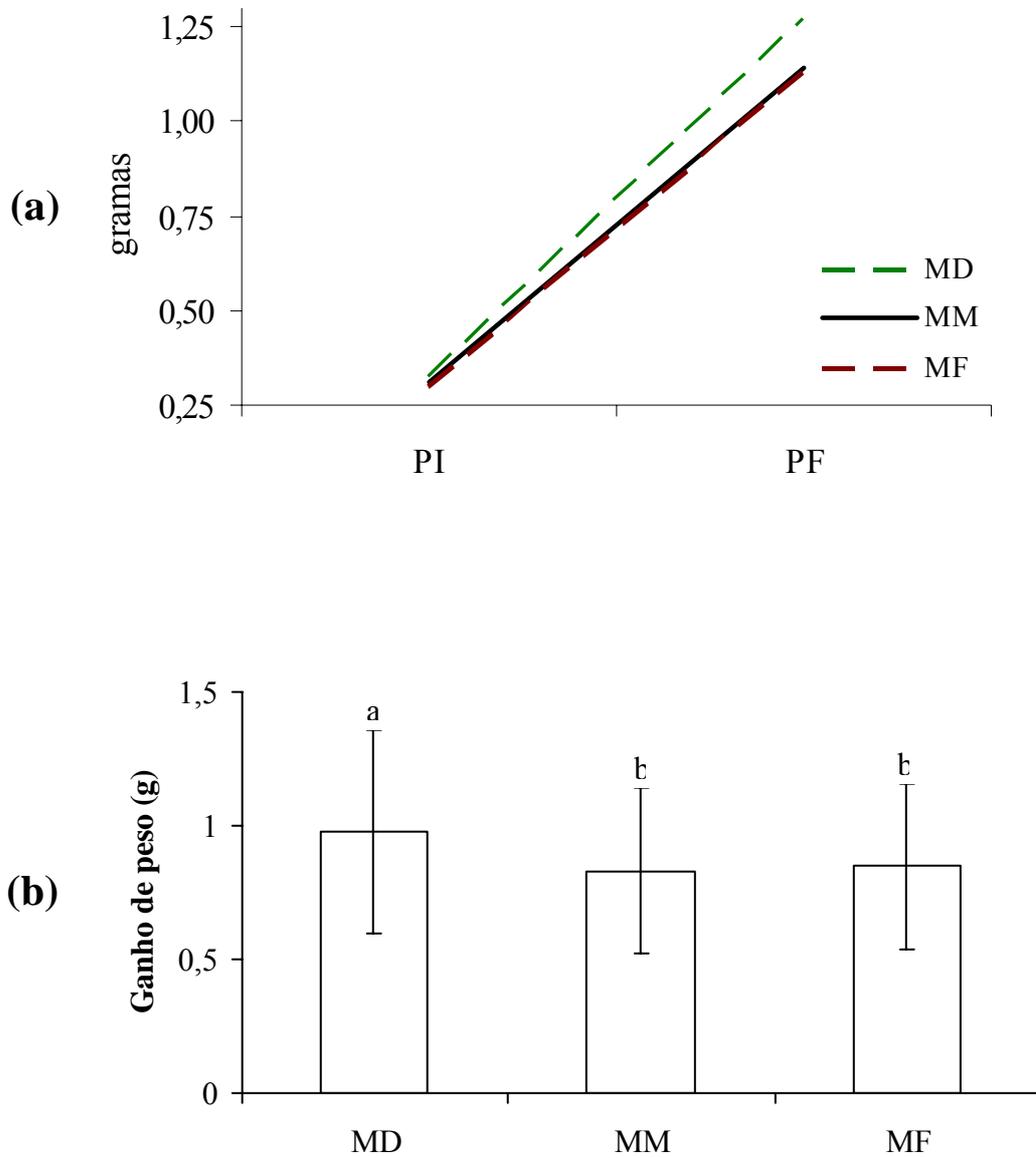
A sobrevivência média dos camarões não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos, variando de 90 a 97% (Figura 16a). Da mesma forma a taxa de crescimento específico (Figura 16b) não diferiu significativamente entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ), entretanto o maior crescimento diário no tratamento MD (4,75 % dia<sup>-1</sup>) ao final de 30 dias fez com que os juvenis de *L. vannamei* cultivados neste tratamento apresentassem peso final significativamente superior ( $p < 0,05$ ) comparados aos camarões cultivados nos demais meios (Figura 17). Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) para esse parâmetro entre os camarões cultivados em MM e MF (Figura 18) demonstrando maior ganho de peso no MD.



**Figura 16.** (a) Sobrevivência e (b) taxa de crescimento específico (média  $\pm$  DP) dos juvenis de *L. vannamei* cultivados em meio de diatomáceas (MD), meio mistura (MM) e em meio de flocos microbianos (MF). Letras iguais indicam que as médias não diferem significativamente ( $p > 0,05$ ).

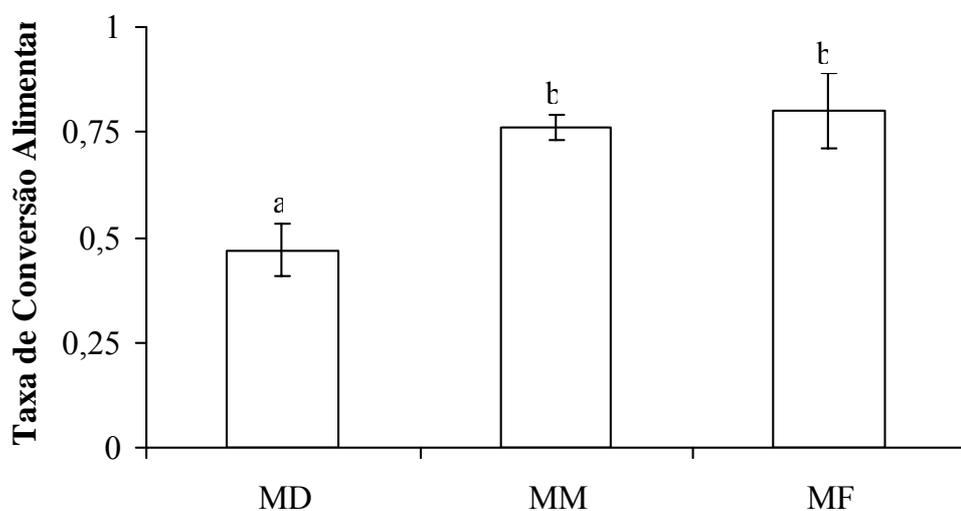


**Figura 17.** Juvenis de *L. vannamei* cultivados em meio às diatomáceas. Observe a coloração verde intenso apresentada pelo hepatopâncreas.



**Figura 18.** (a) Peso inicial (PI), peso final (PF) e (b) ganho de peso (média  $\pm$  DP) dos juvenis de *L. vannamei* cultivados em meio a diatomáceas (MD), meio mistura (MM) e em meio aos flocos microbianos (MF). Letras iguais indicam que as médias não diferem significativamente ( $p > 0,05$ ).

Os camarões cultivados em MD consumiram uma menor quantidade da ração fornecida (79 %) em comparação aos cultivados em MM e MF (87 %). A taxa de conversão alimentar foi significativamente menor no MD (0,47), não diferindo significativamente entre MM e MF (0,76 e 0,80 respectivamente) (Figura 19).



**Figura 19.** Taxa de conversão alimentar (média ± DP) dos juvenis de *L. vannamei* cultivados em meio de diatomáceas (MD), meio mistura (MM) e em meio de flocos microbianos (MF). Letras iguais indicam que as médias não diferem significativamente ( $p > 0,05$ ).

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Parâmetros físico-químicos da água de cultivo

A temperatura é um dos fatores mais importantes que controlam o crescimento dos camarões marinhos. Wyban *et al.* (1995) relataram que juvenis de *L. vannamei* (3,9 g) tiveram o crescimento reduzido em temperatura de 23°C, comparado à mesma classe de tamanho cultivado em 27 e 30°C. Portanto, a temperatura média durante o experimento (24°C) desfavoreceu que os camarões expressassem seu máximo potencial de crescimento. A temperatura também é de grande importância para o metabolismo microbiano. Wilen *et al.* (2000) constataram que defloculação ocorreu em baixa temperatura (4°C) em comparação com temperaturas mais elevadas (18-20°C), provavelmente devido a uma diminuição da atividade microbiana nos flocos.

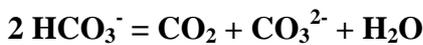
A temperatura da água no sistema ZEAH não é um fator que pode ser facilmente ajustado sem implicar em custos adicionais consideráveis, especialmente nos viveiros ao ar livre (Schryver *et al.* 2008). Na maioria dos casos, as condições climáticas determinam a temperatura de operação e assim, as espécies que podem ser cultivadas. Durante os últimos anos pesquisadores desenvolveram novos métodos de produção de camarão em estufas fechadas com sistemas de raceway (Browdy & Moss 2005). Tal estratégia mantém a temperatura da água mais elevada e possibilita produzir camarão o ano todo (Wasielesky *et al.* 2006).

Um leve aumento na salinidade dos três meios foi observado ao longo do experimento, provavelmente devido ao processo de evaporação da água nos tanques (Figura 6b). Decamp *et al.* (2003) avaliando o efeito da salinidade (9, 18 e 36) no desempenho de juvenis de *L. vannamei* não observaram efeito na sobrevivência dos camarões, entretanto o peso final foi significativamente afetado, obtendo melhores resultados na salinidade 36. Dessa forma a salinidade dos diferentes meios no presente trabalho esteve adequada para o bom desempenho da espécie em questão.

Os meios de cultivo apresentaram diferença significativa na concentração de O<sub>2</sub>D, sendo mais elevada (supersaturação) no MD devido à atividade fotossintética das microalgas e menor no MF devido à maior respiração pela comunidade microbiana. Entretanto, os valores de O<sub>2</sub>D mantiveram-se sempre elevados durante todo período experimental não comprometendo o

desempenho dos camarões. Burford *et al.* (2003) avaliaram a dinâmica de nutrientes no cultivo super-intensivo de *L. vannamei* em viveiros com troca zero, utilizando ração à base de grãos e adição de melão como fonte de carbono. O acompanhamento nictemeral (a cada 30 minutos por 24 hr) da concentração de O<sub>2</sub>D foi realizado periodicamente mostrando que no período da tarde a água dos viveiros apresentou concentrações elevadas de O<sub>2</sub>D chegando a 10 mg/L.

A diferença nos valores de pH entre os três meios foi nítida (MD → MM → MF) com redução média de 0,5 (meia unidade de pH) de um meio para o outro (Figura 5c). O pH foi mais elevado no MD devido ao processo de fotossíntese realizado pelas microalgas. Para realizar tal processo, as microalgas usam o CO<sub>2</sub> (dióxido de carbono) do sistema de equilíbrio HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (bicarbonato) da seguinte maneira:



À medida que o CO<sub>2</sub> é removido, a reação avança para a direita da equação e o CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> (carbonato) se acumula. A hidrólise do CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> ocorre de acordo com a seguinte reação:



Quando o H<sup>+</sup> é usado na hidrólise do CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, uma maior quantidade de água deve dissociar-se para manter a constante de equilíbrio da água. Como resultado, existe mais OH<sup>-</sup> e menos H<sup>+</sup> do que quando a fotossíntese se iniciou. Dessa maneira, o pH aumenta à medida que a fotossíntese remove CO<sub>2</sub> da água (Esteves 1998).

Já no MF a comunidade microbiana (bactérias, protozoários, metazoários, etc) interfere no pH geralmente reduzindo-o. Isso ocorre devido aos intensos processos de decomposição e respiração através dos quais há liberação de CO<sub>2</sub>, que por hidrólise origina ácido carbônico e íons de hidrogênio, conforme pode ser observado na equação:



O pH do MF sofreu pequenas variações no decorrer do experimento (Figura 5c) permanecendo sempre próximo a neutralidade, mostrando haver um equilíbrio entre os processos de respiração (principalmente pela comunidade microbiana) e fotossíntese realizada pela presença significativa de diatomáceas penadas (*Amphora cf. sabiniana*) e cianobactérias.

Mesmo apresentando diferenças significativas entre os tratamentos, o pH manteve-se na faixa considerada adequada para o bom desempenho de camarões peneídeos (Cohen *et al.* 2005). Wasielesky *et al.* (2006) avaliando o efeito da produção natural no cultivo super-intensivo de camarões em sistema ZEAH registraram pH de 7,65 na água de cultivo, valor esse muito semelhante ao observado no presente experimento para o MF. A densidade de estocagem

parece ser outro fator que interfere diretamente no pH do meio heterotrófico. Decamp *et al.* (2007) observaram que o aumento da densidade de estocagem (50, 75 e 100 camarões/m<sup>2</sup>) refletiu na queda do pH ao longo do cultivo (8,11; 7,97 e 7,79 respectivamente) de *L. vannamei* devido a maior entrada de alimento associada ao rápido acúmulo do material em suspensão e metabólitos no sistema.

As diatomáceas penadas presentes no MF são oriundas da praia do Cassino (local de captação da água) que, ao encontrarem um ambiente favorável (rico em nutrientes), se desenvolveram de forma expressiva e provavelmente foram responsáveis pela elevada concentração de Chl *a* (343,30 µg/L) nesse meio, não diferindo estatisticamente do MD. Apesar de a acetona não ser sempre eficiente na extração de Chl *a* de cianobactérias (Wetzel & Likens 1991), o grande número destas no MF também deve ter contribuído para as elevadas concentrações de Chl *a*.

Burford *et al.* (2003) observaram concentrações médias de Chl *a* que variaram de 134,29 a 435,10 µg/L em viveiros de camarão operados no sistema ZEAH. Os grupos de fitoplâncton dominantes foram dinoflagelados e nanoflagelados autotróficos e cianobactérias, sendo inexpressiva a presença de diatomáceas. No estudo realizado por Decamp *et al.* (2007) as concentrações de Chl *a* na água de cultivo variaram de 373 a 509 µg/L e, ao fracionar a Chl *a* de acordo com as classes de tamanho, observaram que o microfítoplâncton (>10 µm) teve maior participação que o nanofítoplâncton (<10 µm) nesse resultado, e a proporção de Chl *a* na fração de tamanho >200 µm aumentou no decorrer do cultivo.

O MF foi o que apresentou menor transparência (11,70 cm, disco de Secchi), evidenciando uma maior quantidade de material floculado nesse tratamento e sua relação direta com a maior concentração de SST (Figuras 6a e 7a). McIntosh *et al.* (2000) relataram valores de transparência de 13,84 cm (disco de Secchi) e SST de 260 mg/L no cultivo de *L. vannamei* sem troca de água utilizando um suplemento bacteriano comercial. No entanto, a adição do suplemento bacteriano não interferiu significativamente nos parâmetros aqui discutidos. Valores de SST próximos ao encontrado nesse experimento foram observados por Avnimelech (2007) em viveiros de tilápia (*Oreochromis mossambicus*) na presença dos flocos microbianos.

A concentração de O<sub>2</sub>D na água da maioria dos sistemas de aquicultura é controlada muito mais pela atividade de algas e bactérias do que pela espécie alvo do cultivo (Chamberlain *et al.* 2001a). No sistema ZEAH o manejo dos viveiros é realizado de forma a reduzir ou eliminar a troca de água, com isso maiores cargas de material orgânico em suspensão

acumulam na água e como resultado a demanda biológica de oxigênio aumenta. Dessa forma cuidados especiais devem ser tomados com relação à taxa de aeração nesse sistema, a qual deve ser elevada. Além da oxigenação, os aeradores devem ser utilizados com a finalidade de misturar a água do viveiro e evitar zonas anaeróbicas no sedimento, que gerariam produtos tóxicos como o nitrito, ácido sulfídrico e metano. Isto é particularmente importante em sistemas de água salgada, onde a abundância de sulfato favorece a produção de ácido sulfídrico em condições anaeróbicas (Chamberlain *et al.* 2001a). McIntosh (2000) indica que velocidades da água entre 10 a 20 cm/s são necessárias para manter o material orgânico em suspensão nos viveiros intensivos de camarão.

As concentrações de nitrogênio amoniacal total e nitrito sofreram maiores variações no MD (Figura 7b e 7c), provavelmente devidas periódicas trocas da água da matriz acompanhada de nova inoculação de diatomáceas. Além de provocar alterações no pH do meio, as trocas podem trazer resíduos dos compostos nitrogenados utilizados na fertilização do cultivo das microalgas. Entretanto em todos os tratamentos, as concentrações de amônia e nitrito permaneceram abaixo dos níveis de segurança nas salinidades observadas, determinados para a espécie (Lin & Chen 2001, Lin & Chen 2003). O *L. vannamei* parece ser mais tolerante a amônia que as outras espécies de camarões (Decamp *et al.* 2007).

Durante todo período experimental, a concentração de amônia e nitrito foi baixa, principalmente no MF, provavelmente devido ao estabelecimento de uma comunidade microbiana que, através da energia do carboidrato presente no melaço adicionado, utilizou estas fontes de nitrogênio para formar sua biomassa.

A redução do nitrogênio inorgânico pela manipulação da relação carbono/nitrogênio é um potencial método de controle para sistemas de aquicultura. Esse controle é induzido através da adição de carboidrato no sistema, tornando possível uma maior absorção do nitrogênio presente na água pelos microorganismos e a síntese de proteína microbiana (Avnimelech 1999). O aspecto mais importante desse processo é a potencial utilização da proteína microbiana como fonte de alimento para os peixes e camarões cultivados. Segundo Avnimelech (1999) a utilização da proteína microbiana depende da habilidade do animal em capturar o floco e sua capacidade de digerir e utilizar essa fonte de alimento.

Além da remoção dos compostos nitrogenados via incorporação na biomassa microbiana, altas taxas de nitrificação também ocorrem em sistemas heterotróficos. Uma comunidade nitrificante ativa garante que a amônia tóxica e o nitrito sejam rapidamente

oxidados a nitrato, que é relativamente inofensivo ao camarão (Holl *et al.* 2006, Boyd 2007a). Vários trabalhos avaliando a qualidade da água no cultivo de camarões em sistema ZEAH relatam baixas concentrações de nitrogênio amoniacal e de nitrito no meio (McIntosh *et al.* 2000, Burford *et al.* 2004, Wasielesky *et al.* 2006).

Kuhn *et al.* (2008) realizaram um experimento em escala laboratorial onde o efluente de uma fazenda comercial de tilápia recebeu tratamento biológico, e os flocos microbianos produzidos a partir desse tratamento foram fornecidos como alimento suplementar no cultivo de camarões marinhos. Os resultados mostraram excelente qualidade da água de cultivo, com baixas concentrações de NAT (0,05 mg/L) e de nitrito (0,02 mg/L), elevada sobrevivência e taxa de crescimento específico dos camarões.

A concentração de fosfato manteve-se baixa em todos os tratamentos, comparada a outros trabalhos realizados em meio heterotrófico (McIntoshi *et al.* 2000, Burford *et al.* 2003, Casillas-Hernández *et al.* 2007). O fósforo é um nutriente essencial que regula o crescimento do fitoplâncton em viveiros de aquicultura. A oferta de fósforo é naturalmente pequena em relação à sua exigência pelo fitoplâncton. O fitoplâncton de água doce normalmente concentra mais fósforo do que qualquer outro nutriente essencial, já o fitoplâncton marinho normalmente concentra mais nitrogênio que fósforo (Boyd 2007b).

Em viveiros de aquicultura, fertilizantes fosfatados são comumente aplicados, para estimular o crescimento do fitoplâncton e aumentar a disponibilidade do alimento natural para os organismos cultivados. A alimentação diária também pode contribuir no fornecimento de fósforo para o meio, entretanto concentração alta em demasia pode provocar florações excessivamente densas e levar à redução de O<sub>2</sub>D durante a noite.

Em viveiros escavados, os íons fosfato são rapidamente seqüestrados pelo sedimento de forma a reduzir substancialmente sua concentração na coluna d'água (Boyd 2007b). Por isso em viveiros com fundo revestido e sistemas fechados de recirculação espera-se um acúmulo de fosfato ao longo do cultivo, o que não foi observado nesse experimento, sendo as baixas concentrações de fosfato provavelmente resultantes de uma ativa absorção por parte das bactérias, cianobactérias e fitoplâncton presentes nos meios.

Muitos microorganismos são capazes de reter ou liberar nutrientes inorgânicos nos ecossistemas aquáticos, mas as bactérias heterotróficas são as únicas envolvidas em ambos os processos. Segundo Kirchman (2000) as bactérias heterotróficas necessitam reter e liberar nutrientes inorgânicos porque a razão elementar da matéria orgânica usada para promover o seu

crescimento muitas vezes difere da biomassa bacteriana, por este motivo há a necessidade de assimilação ou regeneração de elementos para manter um estado estacionário da composição elementar. O fitoplâncton por outro lado, jamais precisa excretar nutrientes inorgânicos porque tem a capacidade de ajustar a fixação de CO<sub>2</sub> de acordo com a disponibilidade de nutrientes e, portanto, é capaz de manter sua composição elementar no estado estacionário.

As bactérias heterotróficas são responsáveis por uma grande fração da absorção do ortofosfato (P<sub>i</sub>) nos oceanos e em água doce (Kirchman 1994). A percentagem média de absorção do fosfato atribuída às bactérias é de 60% tanto em água doce como marinha, variando de acordo com a diversidade do ecossistema analisado. Os poucos estudos corrigindo para a absorção do fitoplâncton encontraram uma menor fração (24 – 46%) de absorção de P<sub>i</sub> atribuída às bactérias heterotróficas (Kirchman 2000).

As diatomáceas se diferenciam das demais microalgas por apresentar parede celular constituída de sílica, sendo a disponibilidade de silicato um fator crucial para determinar seu crescimento e manutenção no meio aquático (Escaravage & Prins 2002). Apesar de não diferir significativamente entre os meios, a concentração de silicato sempre se manteve superior no MD, o que já se esperava devido o uso de silicato de sódio no cultivo das microalgas.

Estudando o ciclo biogeoquímico dos nutrientes que compõe a matéria, através da análise do plâncton, Redfield *et al.* (1963) obtiveram uma razão atômica para os principais elementos da matéria orgânica. A média desta razão é considerada representativa para a biomassa como um todo, e está disposta na razão C:N:Si:P de 106:16:16:1, proporcionando uma base estequiométrica para a avaliação da proporção geral dos principais nutrientes presentes na água do mar.

Considerando as concentrações de nitrogênio amoniacal e nitrito, fosfato e silicato (em µM) a razão N:Si:P na água dos tratamentos MD (6:8:1), MM (6:3:1) e MF (0,7:4:1) comparada a razão de Redfield mostra que o fosfato não foi limitante para as microalgas em nenhum dos meios. Segundo Lalli & Parsons (1993) a constante de meia saturação (K<sub>n</sub>) para absorção de fosfato é 0,5 µM, confirmando que a concentração de fosfato não foi limitante para o crescimento do fitoplâncton em nenhum dos meios. Com exceção do MD, a concentração de silicato pode ser considerada limitante nos demais meios, estando abaixo da K<sub>n</sub> indicada (5 µM) para sua absorção.

## 5.2. Comunidade microbiana presente na água de cultivo

O dinoflagelado heterotrófico *Oxyrrhis marina* exerceu grande influência sobre a comunidade microbiana. Em condições ideais de temperatura (22 – 23°C) e pH (8 – 10), ambas presentes em todos os meios, pode apresentar uma taxa de divisão de até 2,2 vezes/dia (Droop 1959), alimentando-se fagotróficamente de bactérias, algas, ciliados e flagelados heterotróficos, além de nutrientes dissolvidos (Arndt *et al.* 2000). O flagelo transversal que é usado para capturar suas presas possui projeções pilosas que parecem ter a função de selecionar partículas (Hansen *et al.* 1996), o que lhe dá capacidade de distinguir entre espécies alimentares.

É evidente a dominância de *O. marina* no MD, que parece estar predando sobre a população de ciliados da ordem Scuticociliatida (Figura 12a). Esses ciliados de natação livre são bacterívoros (Kirchman 2000) e sua população foi controlada durante todo período experimental pela presença de *O. marina*. As observações ao microscópio mostraram que *O. marina* predava também sobre as diatomáceas em todos os meios.

Os protozoários ciliados são amplamente distribuídos e desempenham um importante papel no fluxo energético dos ecossistemas aquáticos como predadores de bactérias, algas, fungos, e como fonte de alimento para metazoários e larvas de peixes e camarões (Nagano & Decamp 2004). São fontes de ácidos graxos altamente insaturados (HUFAs), esteróides e contém uma alta concentração intracelular de aminoácidos livres. Segundo Decamp & Nagano (2001) o conteúdo de lipídios neutros dos ciliados da ordem Scuticociliatida consiste de 29% de esteróides, 53% destes sendo colesterol. Além disso, a abundância e diversidade de ciliados têm sido utilizadas como indicadores da qualidade da água e dinâmica de ecossistemas (Decamp *et al.* 1999).

A maior diversidade de microorganismos no MM comparado ao MD é resultante da água proveniente do MF utilizada para sua formação. Os bodonídeos biflagelados de vida livre presentes neste tratamento se associam a agregados (flocos), são bacterívoros (Ruppert *et al.* 2005) e geralmente não se alimentam de partículas muito maiores que 5 µm (Arndt *et al.* 2000). A partir do 9º dia de experimento, com a redução de *O. marina*, a população de flagelados bodonídeos cresceu rapidamente, indicando um momento de transição no qual outros dinoflagelados começaram a preda sobre os flagelados (evidenciado do 18º ao 30º dia). Mesmo após a brusca redução de *O. marina*, a população de ciliados permaneceu baixa provavelmente pela troca do seu predador, agora os dinoflagelados *Gyrodinium* e

*Protoperidinium*. Esses dinoflagelados fagotróficos (a digestão ocorre em vacúolos fagocíticos) consomem principalmente diatomáceas e ciliados, que em muitos casos, podem ser maiores que o predador (Sleigh 2000). *O. marina* parece não preda sobre os demais dinoflagelados.

Na última semana de experimento em MM, registrou-se a presença de ciliados do gênero *Carchesium*, colonial, sésil, que se fixa por meio de um pedúnculo com contração em espiral. O pedúnculo é ramificado e, localizados nas suas extremidades, estão os zoóides em forma de sino invertido. A contração do pedúnculo se dá por meio de um mionema descontínuo, o que permite cada ramo da colônia ter contração independente (Curds 1983). Através de movimento de filtração, esse ciliado ingere material em suspensão e principalmente bactérias. Provavelmente se desenvolveu no MF (presença detectada nos mesmos dias), sendo transportado para o MM no momento de sua formação. Os amebóides raramente apareceram no meio mistura, com insignificante presença detectada no 3º e 6º dia.

*O. marina* também foi dominante no MF, assim como nos demais meios. Essa dominância permaneceu até o 12º dia, com declínio a partir do 18º dia, levando ao aumento da população de ciliados da ordem Scuticociliatida.

Em pesquisas realizadas nos últimos anos, foi dada maior atenção à presença do grande número de ciliados em sistemas intensivos de produção (Bratvold *et al.* 1999) e a sua importância na dieta de larvas de camarões (Thompson *et al.* 1999). Decamp *et al.* (2007) relataram que os ciliados podem atingir concentrações extremamente elevadas (6000 células/ml) em sistemas ZEAH, com flutuações na abundância refletindo o impacto da salinidade da água, interações dinâmicas entre os ciliados, e os seus diversos papéis no âmbito do sistema de produção. Decamp *et al.* (2006) avaliando os protozoários e a comunidade da meiofauna que habitam os filtros (remoção de partículas e nitrificação) utilizados na produção intensiva de camarões, encontraram a mesma ordem (taxonômica) de ciliados de natação livre presentes neste experimento.

Os ciliados com capacidade de se aderir a substratos ou superfícies, como os representantes do gênero *Carchesium*, manifestaram-se no MF somente no final do período experimental. Essa observação também é descrita por Decamp *et al.* (2007), onde a sucessão de grupos ecológicos em sistema ZEAH mostrou uma tendência de ciliados de natação livre serem dominantes nas fases iniciais, e de ciliados raspadores e aderidos aparecendo somente após a segunda semana de produção.

Além de *Carchesium*, outro gênero de ciliado pedunculado com capacidade de se aderir a substratos esteve presente no MF, *Acineta*, um membro dos suctórios, sésil e destituído de cílios. *Acineta* possui tentáculos rígidos que irradiam do corpo (captura de presas), sendo considerado um predador que se alimenta inclusive de outros ciliados (Ruppert *et al.* 2005). A presença de ciliados pedunculados da subclasse Suctoria parece ser uma característica comumente observada em cultivos intensivos de camarões (Decamp *et al.* 2006, 2007).

As amebas atecadas de vida livre apareceram no MF somente na última semana. Duas formas diferentes de amebas estiverem presentes: (1) lobópodes: com pseudópodos largos e arredondados com ponta obtusa, típicos de amebas maiores; e (2) filópodes: com pseudópodos estreitos, algumas vezes ramificados, típicos de amebas pequenas (Ruppert *et al.* 2005). Os organismos amebóides são heterotróficos e se alimentam de pequenos organismos tais como bactérias, algas, diatomáceas, ciliados, flagelados e até mesmo de pequenos metazoários como rotíferos e nematódeos. Essas amebas são tipicamente associadas a superfícies no seu estado ativo de alimentação, e podem ingerir bactérias em taxas relativamente elevadas, em locais onde ciliados e metazoários não atuam (Decamp *et al.* 2006).

A população de rotíferos tornou-se maior na última semana de experimento. Os rotíferos são reportados como eficientes predadores de ciliados (Decamp *et al.* 2007). Burford *et al.* (2003) encontraram um número significativo de ciliados, pequenos flagelados (<10µm) heterotróficos e cianobactérias em viveiros de camarão operados no sistema ZEAH, observando a pastagem do fitoplâncton por rotíferos e algumas espécies de ciliados.

As observações ao microscópio tornaram evidente a participação das cianobactérias na formação dos flocos microbianos, sendo que no início do experimento a relação N:P de 9:1 favoreceu a predominância das cianobactérias filamentosas da subfamília Heteroleibleinioideae (um emaranhado de tricomas). Essas cianobactérias desapareceram com a queda da relação N:P ao longo do tempo (limitação do N), provavelmente devido (em parte) a constante entrada de água no MF para reposição do volume retirado e destinado à formação do MM. Nesta fase, as colônias de cianobactérias cocóides aumentaram seu número consideravelmente. Esses organismos apresentam uma razão superfície/volume (S/V) maior em comparação as cianobactérias filamentosas, assegurando-lhes uma melhor eficiência na absorção de nutrientes, e também vantagem em situações de escassez de nutrientes nitrogenados. Recentes pesquisas (Foster *et al.* 2006) têm demonstrado que as cianobactérias cocóides podem ter a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico mesmo na ausência de heterocitos. Essas colônias de

cianobactérias parecem produzir grande quantidade de uma mucilagem aderente, aparentemente de grande importância na estruturação dos flocos microbianos.

A matéria particulada na coluna d'água consiste de organismos vivos, partículas inorgânicas e detritos. Sua agregação é um processo complexo e envolve interações físicas, químicas e biológicas entre as partículas. Os mecanismos exatos e os métodos de “engenharia microbiana” para a formação dos flocos são ainda desconhecidos (Schryver *et al.* 2008). Sabe-se que uma superfície aderente é formada pela síntese de exopolissacarídeos bacterianos, reforçando ainda mais a agregação (Vandevivere & Kirchman 1993).

Segundo Schryver *et al.* (2008), os principais componentes que podem ser encontrados no interior da matriz do floco são as substâncias poliméricas extracelulares. Essas estruturas formam uma matriz que incorpora as células microbianas, e desempenham um papel importante junto aos componentes dos flocos. Os microagregados formados se chocam entre si formando macroagregados.

Em ambientes de aquicultura, a intensidade da mistura imposta pelo equipamento de aeração utilizado irá determinar o estado de equilíbrio entre a taxa de agregação e a taxa de quebra, definindo o tamanho do floco (Chaignon *et al.* 2002, Spicer & Pratsinis 1996). Entretanto, a degradação biológica, incluindo o consumo pelo zooplâncton ou nécton e decomposição pelos microorganismos em algumas ocasiões, pode ser o fator mais importante que regula o tamanho do agregado (Alldredge *et al.* 1990). No sistema ZEAH o tamanho do floco é uma característica importante, tendo em vista que a qualidade de alimento para diferentes espécies aquícolas também depende do tamanho das partículas (Garatun-Tjeldsto *et al.* 2006). Segundo Avnimelech (2007) o consumo dos flocos microbianos pelos organismos cultivados depende mais provavelmente da espécie e hábitos alimentares, incluindo o tamanho e densidade dos flocos.

As florações de cianobactérias também formam agregados (Hoppe 1981). As perdas por predação são reduzidas uma vez que os predadores têm acesso dificultado devido à forma e tamanho das cianobactérias (filamentos, colônias e especialmente, agregados) (Haney 1987). Como resultado, os agregados de cianobactérias são rapidamente colonizados por bactérias e protozoários, tornando-se sítios de desenvolvimento biológico, especialmente de atividade microbiana (Young 2006).

As células jovens e saudáveis do fitoplâncton raramente revelam qualquer colonização bacteriana. Com o avanço da idade, as células começam a se agregar e rapidamente tornam-se

propensas a aderência dos microorganismos. Os sítios preponderantes para colonização bacteriana são as células inativas ao longo dos filamentos, de preferência envolvidas por mucilagem (Grossart *et al.* 1998) e regiões polares de heterocitos nas colônias de cianobactérias, capazes de fixação de nitrogênio. A população bacteriana serve como fonte de alimento para protozoários, sustentando um complexo microecossistema.

A pastagem dos agregados por peixes, camarões e zooplâncton é um atalho importante na cadeia alimentar, transferindo carbono orgânico para altos níveis tróficos mais eficientemente do que através da alça microbiana (Grossart *et al.* 1998).

### **5.3. Composição proximal dos flocos microbianos**

O teor médio de proteína bruta dos flocos microbianos (18,3%) esteve abaixo dos valores encontrados na literatura (McIntosh *et al.* 2000, Tacon *et al.* 2002, Wasielesky *et al.* 2006). O conteúdo protéico de diferentes flocos microbianos analisados por Ju *et al.* (2008) variou de 26 a 42%. Os autores observaram que os níveis de aminoácidos essenciais (AAE) nas amostras de floco foram aproximadamente a metade do total de aminoácidos, sugerindo que esse material pode servir como uma boa fonte suplementar de AAE para o camarão. No referido trabalho, o perfil de AAE das amostras de floco foi semelhante ao da dieta formulada.

McIntosh *et al.* (2000) relatou que os aminoácidos nos flocos microbianos foram adequados no conteúdo de lisina e arginina, mas deficientes em metionina para satisfazer as exigências nutricionais do camarão. Em geral, as proteínas microbianas tendem a ser deficientes em aminoácidos sulfurados, embora elas sejam menos deficientes do que as proteínas de algas, leveduras e de fungos superiores (Tacon *et al.* 2002).

O baixo teor protéico dos flocos nesse experimento pode estar relacionado com a malha utilizada (100 µm) para concentrar o material em suspensão. Essa malha pode ter permitido a passagem de microorganismos, causando perdas e talvez subestimando o resultado.

O elevado teor de cinzas parece ser comum aos flocos microbianos. Tanto McIntosh *et al.* (2000) como Tacon *et al.* (2002) encontraram elevados níveis de cinzas (média de 26,5 e 30,2% respectivamente) nos flocos suspensos. Os flocos microbianos provenientes do cultivo de juvenis de *L. vannamei* em sistema ZEAH analisados por Wasielesky *et al.* (2006) apresentaram 44,85% de cinzas. Ju *et al.* (2008) encontraram níveis de cinzas variando de 18,3

a 40,7%. Essa variação se deu principalmente as diferenças na salinidade da água, a densidade de estocagem e o tempo de formação dos flocos.

Os elevados níveis de cinzas revelam que a matéria mineral é representativa nos flocos microbianos. A análise de minerais (Tacon *et al.* 2002) indicou que os flocos são ricos em fósforo bem como cálcio, potássio, magnésio, entre outros. Grande parte desta composição mineral pode estar ligada a bactérias em forma orgânica biodisponível (Chamberlain *et al.* 2001b). A baixa concentração de fosfato na água de cultivo indica que provavelmente houve uma significativa incorporação pela comunidade microbiana e microalgas. Outros minerais além do fosfato podem estar sendo incorporados pela microbiota, e juntamente com as frústulas das diatomáceas, refletem neste elevado nível de cinzas nos flocos microbianos. Velasco *et al.* (1999) sugerem que os níveis dietéticos de fósforo podem ser reduzidos nestes sistemas, devido à reciclagem.

As análises de lipídios dos flocos revelam resultados muito diferentes na literatura. McIntosh *et al.* (2000) encontrou níveis elevados (12,5%) enquanto Tacon *et al.* (2002), Wasielesky *et al.* (2006) e Ju *et al.* (2008) encontraram valores baixos (0,61; 0,49 e 1,2 – 2,3%) respectivamente. Provavelmente a composição microbiana das células nos flocos suspensos deve variar muito em função de microorganismos específicos e das condições ao qual são cultivados.

Segundo Chamberlain *et al.* (2001b) uma razão C:N de 10:1 ou menos favorece o desenvolvimento de bactérias com alto conteúdo protéico, e a razão C:N mais alta favoreça o acúmulo de lipídios em algas, leveduras e fungos. Isto implica que a composição microbiana pode ser manipulada de alguma forma para maximizar seu valor nutricional.

Além da variação na composição microbiana dos flocos, as metodologias de coleta e análises físico-químicas muitas vezes diferem entre si. No caso específico desse experimento, a extração do conteúdo lipídico foi realizada utilizando hexano como solvente. O hexano é comumente empregado na extração da matéria graxa de diversos produtos, no entanto parece não ser tão eficiente na extração do conteúdo lipídico dos flocos microbianos. Alguns estudos (em andamento) realizados com flocos microbianos produzidos na EMA têm demonstrando que o éter de petróleo parece ser muito mais eficiente na extração do conteúdo lipídico dos flocos.

Embora os flocos microbianos apresentem elevado valor nutricional, eles não são ideais como única fonte de alimento. Em sistemas de cultivo em altas densidades de estocagem, os

flocos atuam como um complemento nutricional sendo necessário à suplementação com dieta formulada (Chamberlain *et al.* 2001b, Azim *et al.* 2008).

#### **5.4. Desempenho dos juvenis de *L. vannamei* cultivados nos diferentes meios**

A alta sobrevivência de *L. vannamei* observada, mostra que todos os meios forneceram condições favoráveis para a espécie, nestas condições experimentais. Elevadas sobrevivências têm sido relatadas em vários trabalhos realizados em sistema ZEAH (Gómez-Jiménez *et al.* 2005, Wasielesky *et al.* 2006, Kuhn *et al.* 2008).

A taxa de crescimento específico dos camarões (4,49 a 4,75 % dia<sup>-1</sup>) foi superior a encontrada por Tacon *et al.* (2002) para juvenis de *L. vannamei* cultivados em sistema sem renovação de água, que variou de 3,35 a 4,43% dia<sup>-1</sup>. Avnimelech (1999), Moss *et al.* (2001), Tacon *et al.* (2002), Cuzon *et al.* (2004), Hari *et al.* (2006) e Samocha *et al.* (2007) demonstraram que o crescimento do camarão é reforçado quando cultivado em meio aos flocos microbianos. Em muitos casos, a relação C:N foi ajustada pela redução do teor protéico da ração ou pela adição de uma fonte de carbono para promover o crescimento da comunidade heterotrófica.

Durante todo período experimental uma maior frequência de mudas foi observada no tratamento MD. O ganho de peso superior no MD traz a tona alguns aspectos. A caracterização da comunidade microbiana permitiu concluir que a diversidade e abundância de microorganismos no MD foram inferiores aos demais meios, sendo superior apenas nas duas espécies de diatomáceas, *Thalassiosira weissflogii* e *Chaetoceros muellerii*. Provavelmente essas diatomáceas tiveram uma significativa participação no melhor desempenho dos camarões, também evidenciado quando observamos que os camarões cultivados em MD consumiram menos ração (79% da ração fornecida) do que os camarões dos tratamentos MM e MF (87%). O consumo de ração nos remete diretamente a avaliar a taxa de conversão alimentar (TCA) em cada tratamento.

A conversão alimentar é uma taxa de extrema importância na atividade de aquicultura, uma vez que os custos com alimentação geralmente chegam a representar até 60% do custo total da produção. Nesse contexto, buscaram-se melhores taxas de conversão à medida que se profissionaliza uma atividade que produz 2,5 milhões de toneladas de camarão por ano, com custos de aproximadamente 3 bilhões de dólares apenas com alimentação (FAO 2007). Um

rígido controle técnico se faz necessário para que a ração fornecida ao organismo cultivado seja eficientemente convertida em biomassa.

Os camarões apresentaram excelente TCA, com destaque para os cultivados em MD (0,47) que demonstraram um ganho de peso significativamente superior (17%) e consumiram menor quantidade de ração comparado aos tratamentos MM e MF. Wasielesky *et al.* (2006) relataram TCA próxima de 1,00 para *L. vannamei* cultivado em sistema ZEAH. No estudo realizado por Moss & Moss (2004) os juvenis de *L. vannamei* cultivados em berçário intensivo com utilização de substratos artificiais atingiram uma TCA de 0,73 que foi atribuída ao alimento natural (bactérias aderidas, microalgas e protozoários) associado aos substratos.

A TCA associada ao ganho de peso e consumo da ração torna clara a significativa participação das microalgas (*C. muelleri* e *T. weissflogii*) como fonte de alimento para os juvenis de *L. vannamei* no MD, uma vez que eram os únicos componentes que diferiam em presença e quantidade em relação aos demais meios.

As microalgas são amplamente utilizadas nas larviculturas tanto para manter a qualidade da água nos tanques de cultivo e como fonte de alimento, devido ao seu valor nutricional e à capacidade de sintetizar e acumular grande quantidade de PUFA's da série ômega-3. A importância de microalgas como fonte de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA's) foi recentemente avaliada por Patil & Gislerød (2006), que detectaram uma estabilidade lipídica superior nas microalgas em comparação com os tradicionais PUFA's. Isto se dá porque as microalgas são naturalmente ricas em carotenóides antioxidantes e vitaminas, e pelo fato de que seus lipídios são bioencapsulados pela parede celular.

*Chaetoceros muelleri* é uma microalga rica em nutrientes essenciais para as larvas de camarão e comumente utilizada nas larviculturas, juntamente com *Thalassiosira weissflogii* (Brown *et al.* 1997). Na maioria dos estudos, as diatomáceas são utilizadas durante a fase de larvicultura e pouquíssimos são realizados envolvendo as fases pós-larvicultura. Análises da composição proximal realizadas por Jaime-Ceballos *et al.* (2006) demonstram que o *C. muelleri* apresenta teor protéico e de lipídios totais de 43,11% e 21,48%, respectivamente.

Moss & Pruder (1995) conduziram um experimento para comparar os efeitos da água do viveiro com a remoção seletiva de partículas sobre o crescimento de juvenis de *L. vannamei*. As partículas foram removidas pela passagem da água através de uma série de filtros mecânicos e de carbono ativado. Na presença de partículas suspensas entre 0,5 µm e 5 µm, o camarão aumentou as taxas de crescimento em 53% sobre as taxas atingidas em água clara, e as

partículas maiores que 5 µm promoveram um crescimento adicional de 36%. Nesse estudo, quase a metade do carbono orgânico particulado na água do viveiro estava na forma de diatomáceas cêntricas e penadas, as quais foram um importante item na dieta dos camarões. Segundo os autores, as fezes dos camarões continham grande quantidade de frústulas vazias, entretanto não ficou claro se elas foram ingeridas vivas ou como componentes de um agregado.

De acordo com Moss (2000) as diatomáceas são facilmente digeríveis pelo camarão devido o seu baixo conteúdo de fibra. Os camarões peneídeos são conhecidos por consumirem diatomáceas no ambiente natural como em viveiros de aquicultura. Jaime-Ceballos *et al.* (2006) utilizando hepatopancreatina como reagente, determinaram que a digestibilidade (*in vitro*) da proteína de *C. muelleri* chega a 94% para pós-larvas de camarão.

O experimento de alimentação realizado por Moss (1994) mostrou que os juvenis de *L. vannamei* podem sobreviver e crescer em um monocultivo de diatomácea como única fonte de alimento. No referido estudo, os camarões alimentados com *Chaetoceros* sp. cresceram mais e exibiram concentrações de ácidos nucleicos e razão RNA/DNA praticamente idênticas aos valores encontrados nos camarões não alimentados e cultivados em água proveniente de um cultivo intensivo rico em agregados microbianos.

Os resultados indicam que o alimento natural teve grande importância no desempenho dos camarões em todos os tratamentos e que as diatomáceas serviram como fonte de nutrientes essenciais que contribuíram significativamente para o maior ganho de peso e conversão alimentar no MD.

## 6. CONCLUSÕES

Os parâmetros físico-químicos da água dos três meios mantiveram-se adequados para o bom desempenho da espécie, com elevada sobrevivência em todos os tratamentos.

A diversidade de microorganismos apresentou-se diferente entre cada tratamento, sendo maior em meio aos flocos microbianos e menor em meio às diatomáceas. As colônias de cianobactérias cocóides parecem ter grande importância na formação dos flocos microbianos, sendo que essa participação provavelmente está intimamente relacionada com a relação N/P do meio. Deve-se buscar uma maior padronização das metodologias de coleta e análises físico-químicas dos flocos microbianos entre os pesquisadores para que os resultados possam ser mais bem comparados entre si.

O alimento natural teve grande importância para o desempenho dos camarões em todos os tratamentos e as diatomáceas serviram como fonte de nutrientes essenciais que contribuíram significativamente para o melhor desempenho no tratamento MD. Os resultados apontam a importância das diatomáceas e a necessidade de analisarmos com maiores detalhes o meio de cultivo predominantemente autotrófico. Por ser uma excelente fonte de alimento para o camarão, a utilização de diatomáceas pode reduzir os custos com ração, além do processo de fotossíntese poder contribuir na redução dos custos com aeração durante o dia.

Pesquisas devem ser conduzidas no intuito de tentar manter constante a presença das diatomáceas no meio de cultivo sem a necessidade de realizar inoculações sucessivas, como também avaliar a sua capacidade de suprir a demanda de oxigênio dos organismos cultivados através da fotossíntese.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A tecnologia dos flocos microbianos oferece a possibilidade de manter uma boa qualidade da água utilizando a troca zero nos sistemas de aquicultura. No entanto, o valor que os flocos microbianos acrescentam para a aquicultura é determinado principalmente pelo seu potencial de produzir alimento *in situ* para os organismos cultivados (Schryver *et al.* 2008). Atualmente, a maior parte dos compostos essenciais necessários na alimentação de organismos aquáticos é obtida de farinhas e óleos de peixe, devido à sua ótima qualidade nutricional (Watanabe 2002). Isto representa uma forma não-sustentável (Naylor *et al.* 2000) de produção de alimentos (captura no oceano para produzir farinha) que pode ser resolvida com a produção de nova biomassa a partir de subprodutos do cultivo (resíduos metabólicos, fezes e nutrientes lixiviados da ração, etc.) fornecendo uma fonte renovável de nutrientes para camarão (Ju *et al.* 2008).

No estágio atual de conhecimento, os flocos não substituem completamente os alimentos tradicionais, mas podem diminuir substancialmente os custos de produção no cultivo de camarão. A alimentação suplementar é necessária principalmente em sistemas com altas densidades de estocagem. Neste caso, os custos adicionais relacionados com a aeração, precisam ser compreendidos em relação aos sistemas convencionais, e serem desenvolvidos com um design prático que possibilite a gestão do sistema (Azim *et al.* 2008).

Atualmente, as pesquisas estão centradas principalmente na remoção de nutrientes da água e não tanto sobre os aspectos de composição microbiana e nutricional. Uma boa compreensão dos mecanismos envolvidos na formação dos flocos microbianos e sua possível manipulação são áreas a serem investigadas.

## **8. PERSPECTIVAS**

- 1** - Testar outras espécies de microalgas (diatomáceas cêntricas e penadas) tanto em monocultivo como associadas aos flocos microbianos;
  
- 2** - Manter constante a presença das diatomáceas em meio aos flocos microbianos sem a necessidade de sucessivas inoculações;
  
- 3** - Analisar do floco “*in vivo*” para verificar detalhadamente as interações entre os microorganismos ali presentes;
  
- 4** - Verificar o papel das cianobactérias na formação dos flocos microbianos
  
- 5** - Utilizar a metodologia de isótopos estáveis para verificar a contribuição de cada alimento no desempenho dos camarões

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLDREDGE, AL, TC GRANATA, CC GOTSCHALK & TD DICKEY. 1990. The physical strength of marine snow and its implications for particle disaggregation in the ocean. *Limnol. Oceanogr.* 35: 1415 - 1428.
- AMINOT, A & M CHAUSSEPIED. 1983. Manuel des analyses chimiques em milieu marin. Brest: CNEXO. 395p.
- AOAC. 1995. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists.* Arlington, 1995. v. 2, cap.35, p.1-30.
- ARNDT, H, D DIETRICH, B AUER, EJ CLEVEN, T GRÄFENHAN, M WEITERE & AP MYLNIKOV. 2000. Functional diversity of flagellates in aquatic ecosystems. In: LEADBEATER, BSC & JC GREEN (ed.). *The Flagellates.* Systematics Association. New York, chap. 12: 240-268.
- AVNIMELECH, Y, M KOCHVA & S DIAB. 1994. Development of controlled intensive aquaculture systems with a limited water exchange and adjusted carbon to nitrogen ratio. *Bamidgeh*, 46: 119-131.
- AVNIMELECH, Y. 1999. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture*, 176, 227-235.
- AVNIMELECH, Y, 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. *Aquaculture* 264: 140-147.
- AZIM, ME, DC LITTLE & JE BRON. 2008. Microbial protein production in activated suspension tanks manipulating C:N ratio in feed and the implications for fish culture. *Bioresource Technology*, 99: 3590-3599.
- BAGENAL, TB & FW TESCH. 1978. Age and growth, in Bagenal, T.B. (ed.), *Methods for the assessment of fish production in fresh waters.* *IBP Handbook*, n.3.
- BOYD, CE. 2007a. Nitrification important process in aquaculture. *Global Aquaculture Advocate.* May/June, 64-66.
- BOYD, CE. 2007b. Phosphorus: Key to phytoplankton management. *Global Aquaculture Advocate.* July/August, 62-64.
- BRATVOLD, D, J LU & CL BROWDY. 1999. Disinfection, microbial community establishment and shrimp production in a prototype biosecure pond. *J. World Aquac. Soc.*, 30: 422-432.

- BRATVOLD, D & CL BROWDY. 2001. Effects of sand and vertical surfaces (Aquamats™) on production, water quality and a microbial ecology in an intensive *Litopenaeus vannamei* culture system. *Aquaculture*, 195: 81-94.
- BROWDY, CL, D BRATVOLD, AD STOKES & RP MCINTOSH. 2001. Perspectives on the application of closed shrimp culture systems. In: Browdy, CL & DE Jory. (Eds.), *The New Wave, Proceedings of the special session on sustainable shrimp culture, Aquaculture. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA.* p. 20-34.
- BROWDY, C.L & SM MOSS. 2005. Shrimp culture in urban, superintensive closed systems. In: Costa Pierce, B.A. (Ed.), *Urban Aquaculture. Blackwell Science, Oxford UK,* pp. 173-186.
- BROWN, MR, SW JEFFREY, JK VOLKMAN & GA DUNSTAN. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* 151: 315-331.
- BURFORD, MA, PJ THOMPSON, RH BAUMAN & DC PEARSON. 2003. Nutrient and microbial dynamics in high-intensive, zero-exchange shrimp ponds in Belize. *Aquaculture* 219: 393-411.
- BURFORD, MA, PJ THOMPSON, RH BAUMAN & DC PEARSON. 2004. The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensive, zero-exchange system. *Aquaculture* 232: 525-537.
- CAREY, PG. 1992. Marine interstitial ciliates. Chapman & Hall, London. 351p.
- CASILLAS-HERNÁNDEZ, R, H NOLASCO-SORIA, T. GARCÍA-GALANO, O CARRILLO-FARNES & F PÁEZ-OSUNA. 2007. Water quality, chemical fluxes and production in semi-intensive Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) culture ponds utilizing two different feeding strategies. *Aquacultural Eng.*, 36: 105-114.
- CHAIGNON, V, BS LARTIGES, AE SAMRANI & C MUSTIN. 2002. Evolution of size distribution and transfer of mineral particles between flocs in activated sludges: an insight into floc exchange dynamics. *Water Res.*, 36: 676- 684.
- CHAMBERLAIN, G, Y AVNIMELECH, R P MCINTOSH & M VELASCO. 2001a. Advantages of Aerated Microbial Reuse Systems with balanced C:N. I: Nutrient transformation and water quality benefits. *Global Aquaculture Advocate*. April. 53-56.
- CHAMBERLAIN, G, Y AVNIMELECH, R P MCINTOSH & M VELASCO. 2001b. Advantages of aerated microbial reuse systems with balanced C:N. II: Composition and nutritional value of organic detritus. *Global Aquaculture Advocate*. June, 22-24.

- COHEN, JM, TM SAMOCHA, JM FOX, RL GANDY & AL LAWRENCE. Characterization of water quality factors during intensive raceway production of juvenile *Litopenaeus vannamei* using limited discharge and biosecure management tools. *Aquacultural Eng.*, 32: 425-442.
- CRAB R, Y AVNIMELECH, T DEFOIRDT, P BOSSIER & W VERSTRAETE. 2007. Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture* 270: 1-14.
- CURDS, CR. 1982. British and other freshwater ciliated Protozoa. Part I. Ciliophora: Kinetofragminophora. Cambridge University Press, Cambridge. 387 p.
- CURDS, CR, MA GATES & D MCL ROBERTS. 1983. British and other freshwater ciliated Protozoa. Part II. Ciliophora: Olygohymenophora and Polyhymenophora keys and notes for the identification of the free-living genera. Cambridge University Press, Cambridge. 475 p.
- CUZON, G, A. LAWRENCE, G. GAXIOLA, C. ROSAS & J. GUILLAUME. 2004. Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in pounds. *Aquaculture*, 235: 513-551.
- DECAMP, OE, A WARREN & R SÁNCHEZ. 1999. The role of ciliated protozoa in subsurface flow wetlands and their potential as bioindicators. *Water Sci. Technol.* 40: 91-98.
- DECAMP, OE & N NAGANO. 2001. Live Protozoa: Suitable live food for larval fish and shrimp? *Global Aquaculture Advocate*. October, 28-29.
- DECAMP, OE, J CODY, L CONQUEST, G DELANOY & AGJ TACON. 2003. Effect of salinity on natural community and production of *Litopenaeus vannamei* (Boone), within experimental zero-water Exchange culture systems. *Aquaculture Res.*, 34: 345-355.
- DECAMP, OE, CA OTOSHI & SM MOSS. 2006. Protozoans and meiofauna inhabiting a bead filter: A preliminary investigation of their role as potential bioindicators of shrimp production system health. *J. World Aquac. Soc.*, 37: 481-489.
- DECAMP, OE, L CONQUEST, J CODY & I FORSTER. 2007. Effect of shrimp stocking density on size-fractionated phytoplankton and ecological groups of ciliated protozoa within zero-water exchange shrimp culture systems. *J. World Aquac. Soc.*, 38: 395-406.
- DROOP, M.R. 1959. A note on some physical conditions for cultivating *Oxyrrhis marina*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 38: 599-604.

- ESCARAVAGE, V & TC PRINS. 2002. Silicate availability, vertical mixing and grazing control of phytoplankton blooms in mesocosms. *Hydrobiologia*, 484: 33-48.
- ESTEVEES, FA. 1998. Fundamentos de limnologia. 2. ed. Rio de Janeiro: Ed. Interciência. 602 p.
- FAO. 2007. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Fisheries and Aquaculture Department. The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA) 2006.
- FOSTER, RA, EJ CARPENTER & B BERGMAN. 2006. Unicellular cyanobionts in open ocean dinoflagellates, radiolarians, and tintinnids: Ultrastructural characterization and immuno-localization of phycoerythrin and nitrogenase. *J. Phycol.* 42: 453-463.
- GARATUN-TJELDSTO, O, H OTTERA, K JULSHAMN & E AUSTRENG. 2006. Food ingestion in juvenile cod estimated by inert lanthanide markers - effects of food particle size. *Ices J. Mar. Sci.* 63: 311-319.
- GROSSART, HP, T BERMAN, M SIMON & K POHLMANN. 1998. Occurrence and microbial dynamics of macroscopic organic aggregates (lake snow) in Lake Kinneret, Israel, in fall. *Aquat. Microb. Ecol.* 14: 59-67.
- GÓMEZ-JIMÉNEZ, S, ML GONZÁLEZ-FÉLIX, M PEREZ-VELAZQUEZ, DA TRUJILLO-VILLALBA, IR ESQUERRA-BRAUER & R BARRAZA-GUARDADO. 2005. Effect of dietary protein level on growth, survival and ammonia efflux rate of *Litopenaeus vannamei* (Boone) raised in a zero water exchange culture system. *Aquacult. Res.*, 36: 834-840.
- HANEY, JF. 1987. Field studies of zooplankton - cyanobacteria interactions. *NZ J. Mar. Freshw. Res.* 21: 467-475.
- HANSEN, FC, HJ WITTE & J PASSARGE. 1996. Grazing in the heterotrophic dinoflagellate *Oxyrrhis marina*: size selectivity and the preference for calcified *Emiliania huxlyi* cells. *Aquat. Microb. Ecol.*, **10**: 307-313.
- HARGREAVES, JA. 2006. Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. *Aquacultural Eng.*, 34: 344-363.

- HARI, B, BM KURUP, JT VARGHESE, JW SCHRAMA & MCJ VERDEGEM. 2006. The effect of carbohydrate addition on water quality and the nitrogen budget in extensive shrimp culture systems. *Aquaculture* 252: 248-263.
- HOLL, CM, CJ TALLAMY & SM MOSS. 2006. Varied microbes important to recirculating aquaculture systems. *Global Aquaculture Advocate*, 9: 38-39.
- HOPPE, HG. 1981. Blue-green algae agglomeration in surface water: a microbiotope of high bacterial activity. *Kieler Meeresforsch*, Sonderh. 5: 291-303.
- JAIME-CEBALLOS, BJ, HERNÁNDEZ-LLAMAS A, GARCIA-GALANO T & VILLARREAL H. 2006. Substitution of *Chaetoceros muelleri* by *Spirulina platensis* meal in diets for *Litopenaeus schmitti* larvae. *Aquaculture* 260: 215-220.
- JU, ZY, I FORSTER, L CONQUEST, W DOMINY, WC KUO & FD HORGAN. 2008. Determination of microbial community structures of shrimp floc cultures by biomarkers and analysis of floc amino acid profiles. *Aquacult. Res.*, 39: 118-133.
- KIRCHMAN, D. L. 1994. The uptake of inorganic nutrients by heterotrophic bacteria. *Microb. Ecol.*, 28: 255-271.
- KIRCHMAN, DL. 2000. Uptake and regeneration of inorganic nutrients by marine heterotrophic bacteria. In: KIRCHMAN, DL (ed.). *Microbial ecology of the oceans*. Wiley-Liss, Canada. Chap 9: 261-288.
- KOMÁREK J & K ANAGNOSTIDIS. 2005. Cyanoprokaryota 2. Teil/ 2nd Part: Oscillatoriales. - In: B BÜDEL, L KRIENITZ, G GÄRTNER & M SCHAGERL. (eds): *Süßwasserflora von Mitteleuropa* 19/2, Elsevier/Spektrum, Heidelberg, 759 p.
- KUHN, DD, GD BOARDMAN, SR CRAIG, GJ FLICK-JR & E MCLEAN. 2008. Use of microbial flocs generated from tilapia effluent as a nutritional supplement for shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in recirculating aquaculture systems. *J. World Aquac. Soc.*, 39: 72-82.
- LALLI, C & T PARSONS. 1993. *Biological Oceanography: an Introduction*. Oxford, Butterworth & Heinemann Ltd. 301 p.
- LEE, JJ, SH HUTNER & EC BOVEE. 1985. *An illustrated guide to the protozoa*. Society of Protozoologists, Lawrence, Kansas, USA. 409 p.
- LIN, Y & J CHEN. 2001. Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* Boone juveniles at different salinity levels. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 259: 109-119.

- LIN, Y & J CHEN. 2003. Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels. *Aquaculture*, 224: 193-201.
- MCINTOSH, BJ, TM SAMOCHA, ER JONES, AL LAWRENCE, DA MCKEE, S HOROWITZ & A HOROWITZ. 2000. The effect of a bacterial supplement on the high-density culturing of *Litopenaeus vannamei* with low-protein diet on outdoor tank system and no water exchange. *Aquacultural Eng.*, 21: 215-227.
- MOSS, SM. 1994. Growth rates, nucleic acid concentrations, and RNA/DNA ratios of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei* Boone, fed different algal diets. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 182: 193-204.
- MOSS, SM & GD PRUDER. 1995. Characterization of organic particles associated with rapid growth in juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei* Boone, reared under intensive culture conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 187: 175-191.
- MOSS, SM. 2000. Dietary importance of microbes and detritus in penaeid shrimp aquaculture. In: C.S. Lee and P. O'Bryen, Editors, Microbial Approaches to Aquatic Nutrition within Environmentally Sound Aquaculture Production Systems, *World Aquaculture Society*, Baton Rouge, LA (2000), pp. 1-18.
- MOSS, SM, BJ ARGUE, CA OTOSHI, FRO CALDERON & AGJ TACON. 2001. Greening of the blue revolution: Efforts toward environmentally responsible shrimp culture. In: Browdy, C.L., Jory, D.E. (Eds.), The new wave, proceedings of the special session on sustainable shrimp culture. *The Word Aquaculture Society*, Baton Rouge, USA, pp. 1-19.
- MOSS, KK & SM MOSS. 2004. Effects of artificial substrate and stocking density on the nursery production of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J. World Aquac. Soc.*, 35: 536-542.
- NAGANO, N & O DECAMP. 2004. Ingestion of a ciliated protozoa by first-feeding larval stage of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquaculture Res.*, 35: 516-518.
- NAYLOR, RL, RJ GOLDBURG, JH PRIMAVERA, N KAUTSKY, MCM BEVERIDGE, J CLAY, C FOLKE, J LUBCHENCO, H MOONEY & M TROELL. 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature*, 405: 1017-1024.
- PATIL, V & HR GISLERØD. 2006. The importance of omega-3 fatty acids in diet. *Curr Sci* 90: 908-909.

- REDFIELD, AC, BH KETCHUM & FA RICHARDS. 1963. The influence of organisms on the composition of seawater. In: Hill, MN, Editor. *The sea* Vol. 2, Interscience, New York, p. 26-77.
- RUPPERT, EE, RS FOX & RD BARNES. 2005. Zoologia dos invertebrados : uma abordagem funcional-evolutiva. 7ª. Ed. São Paulo, Roca Ltda. 1145 p.
- SAMOCHA, TM, A LAWRENCE, CR COLLINS, CR EMBERSON, JL HARVIN & PMV WYK. 2001. Development of integrated, environmentally sound, inland shrimp production technologies for *Litopenaeus vannamei*. In: Browdy, CL & DE Jory. (Eds.), The New Wave, Proceedings of the special session on sustainable shrimp Culture, Aquaculture. *The World Aquaculture Society*, Baton Rouge, USA, p. 64-75.
- SAMOCHA, TM, S PATNAIK, M SPEED, A ALI, JM BURGER, RV ALMEIDA, Z AYUB, M HARISANTO, A HOROWITZ & DL BROCK. 2007. Use of molasses as carbon source in limited discharge nursery and grow-out systems for *Litopenaeus vannamei*. *Aquacult. Eng.*, 36: 184-191.
- SANDIFER, PA, AD STOKES & JS HOPKINS. 1991. Further intensification of pond shrimp culture in South Carolina. In: Sandifer, PA. (Ed.), Shrimp Culture in North America and the Caribbean. Advances in World Aquaculture, vol. 4. *The World Aquaculture Society*, Baton Rouge, LA, p. 84-95.
- SANDIFER, PA & JS HOPKINS. 1996. Conceptual design of a sustainable pond-based shrimp culture system. *Aquacult. Eng.*, 15: 41-52.
- SCHRYVER, PD, R Crab, T Defoirdt, N Boon & W Verstraete. 2008. The basics of bio-flocs technology: The added value for aquaculture. *Aquaculture*, 277: 125-137.
- SLEIGH, MA. 2000. Trophic strategies. In: LEADBEATER, BSC & JC GREEN (ed.). The Flagellates. Systematics Association. New York, chap. 8: 147-165.
- SOKAL, RR & FJ ROHLF. 1969. Biometry. Principle and practices of statistics in biological research. W. H. Freeman & Co., 776p.
- SPICER, PT & SE PRATSINIS. 1996. Shear-induced flocculation: the evolution of floc structure and the shape of the size distribution at steady state. *Water Res.*, 30: 1049-1056.
- STRICKLAND, JDH. & TR PARSONS. 1972. A practical handbook of seawater analysis. Ottawa: Fishery Research Board Canada, 310p.

- TACON, AGJ, JJ CODY, LD CONQUEST, S DIVAKARAN, IP FORSTER & OE DECAMP. 2002. Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. *Aquacult. Nutr.*, 8: 121-137.
- THOMPSON, FL, PC ABREU, RO CAVALLI. 1999. The use of microorganisms as food source for *Penaeus paulensis* larvae. *Aquaculture*, 174:139-153.
- TIDWELL, JH, SD COYLE, CD WEBSTER, JD SEDLACEK, PA WESTON, WL KNIGHT, LR D'ABRAMO, WH DANIELS & MJ FULLER. 1997. Relative prawn production and benthic macroinvertebrate densities in unfed, organically fertilized, and fed pond systems. *Aquaculture*, 149: 227-242.
- UNESCO. 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring. Manual and Guides 12, Intergovernmental Oceanographic Commission. Paris, France.
- UTERMÖHL, H. 1958. Zur vervollkommnung der quantitativen phytoplankton methodik. *Int. Ver. Theor. Angew. Limnol*, 9: 1-38.
- VANDEVIVERE, P & DL KIRCHMAN. 1993. Attachment stimulates exopolysaccharide synthesis by a bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 3280-3286.
- VELASCO, M, AL LAWRENCE & FL CASTILLE. 1999. Effect of variations in daily feeding frequency and ration size on growth of shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone), in zero-water exchange culture tanks. *Aquaculture* 179: 141-148.
- WASIELESKY, WJ, HI ATWOOD, A STOKES, CL BROWDY. 2006. Effect of natural production in brown water super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 258: 396-403.
- WATANABE, T. 2002. Strategies for further development of aquatic feeds. *Fish. Sci.* 68: 242-252.
- WEIRICH, CR, CL BROWDY, D BRATVOLD, BJ MCABEE & AD STOKES. 2002. Preliminary characterization of a prototype minimal exchange super-intensive shrimp production system. Proceedings of the IVth International Conference on Recirculating Aquaculture. Virginia Tech University, Blacksburg, Virginia, USA, p. 255-270.
- WELSCHMEYER, NA. 1994. Fluorometric analysis of chlorophyll a in the presence of chlorophyll b and pheopigments. *Limnol. Oceanogr.*, 39: 1985-1992.
- WETZEL, RG & GE LIKENS. 1991. *Limnological Analyses*. New York, Springer -Verlag. 391p.

- WILEN, BM, JL NIELSEN, K KEIDING & PH NIELSEN. 2000. Influence of microbial activity on the stability of activated sludge flocs. *Colloid Surf. B.* 18: 145-156.
- WYBAN, J, WA WALSH & DM GODIN. 1995. Temperature effects on growth, feeding rate and feed conversion of the Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture* 138: 267-279.
- YOUNG, KD. 2006. The selective value of bacterial shape. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70: 660-703.

## **10. ANEXOS**

**FOTOMICROGRAFIAS CARACTERIZANDO A COMUNIDADE MICROBIANA  
PRESENTE NA ÁGUA DE CULTIVO.**

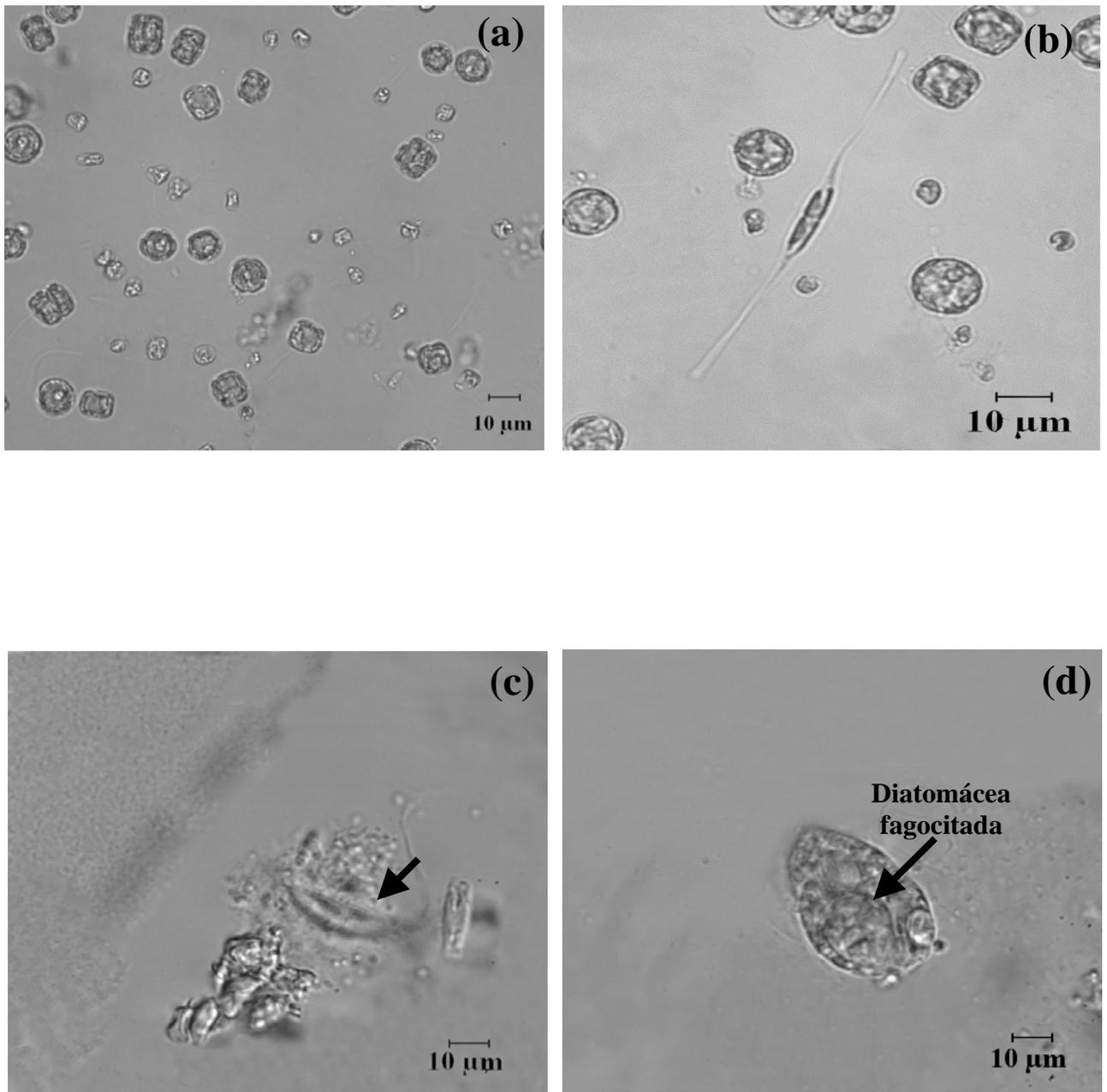


Figura 20. (a) Diatomáceas *Thalassiosira weissflogii* e *Chaetoceros muelleri* (400 x), (b) Diatomácea *Cylindrotheca closterium* (400 x), (c) Diatomácea *Amphora* cf. *sabiniana* envolta por mucilagem (1000 x), (d) Dinoflagelado *Oxyrrhis marina* fagocitando microalgas (1000 x).

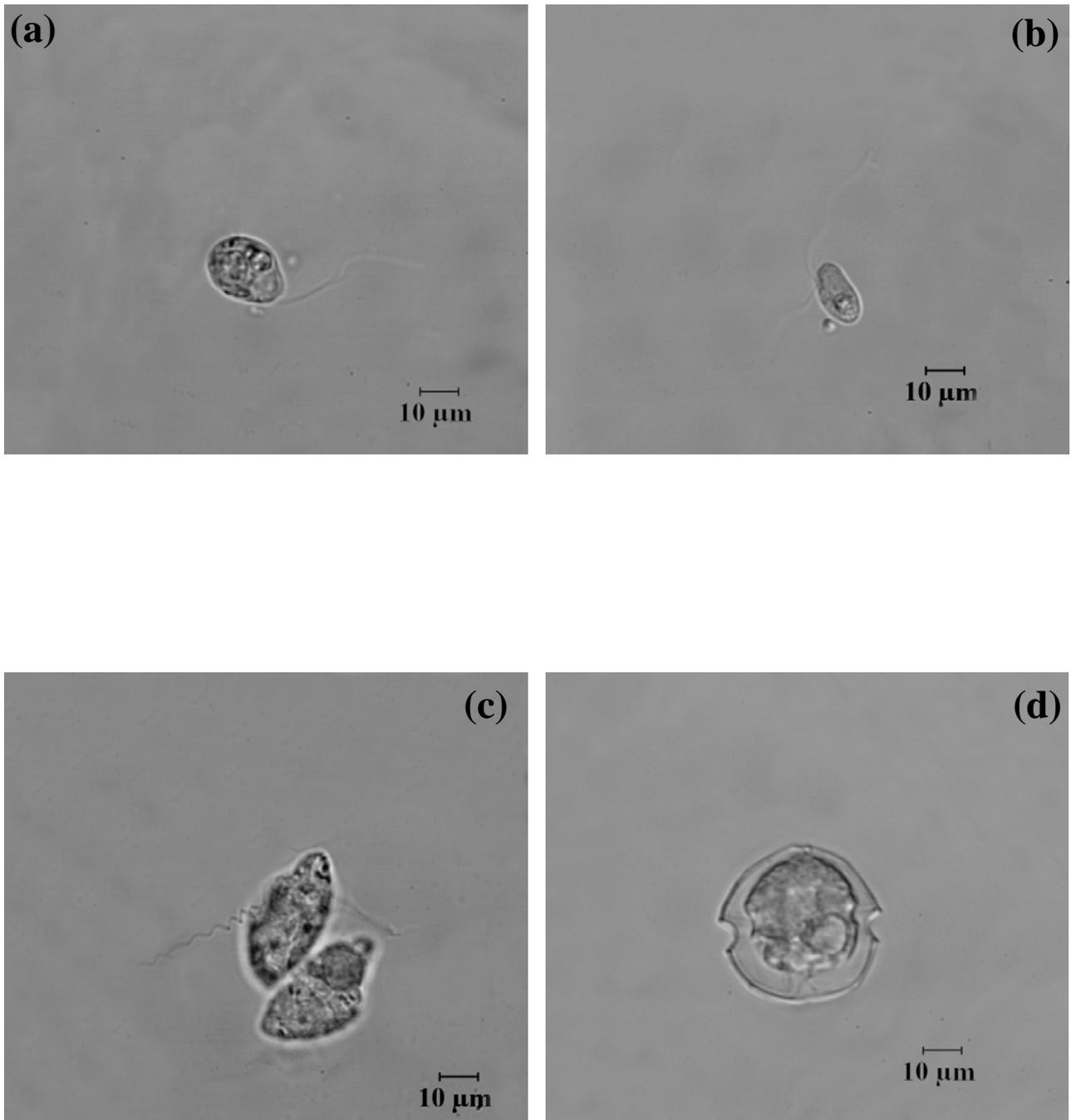
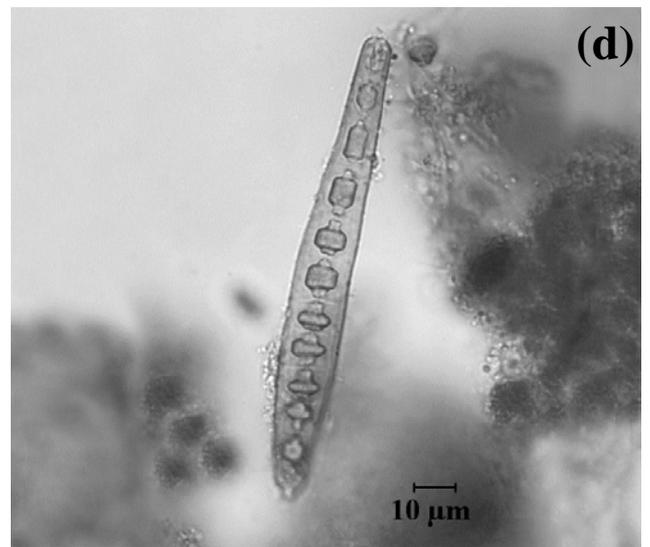
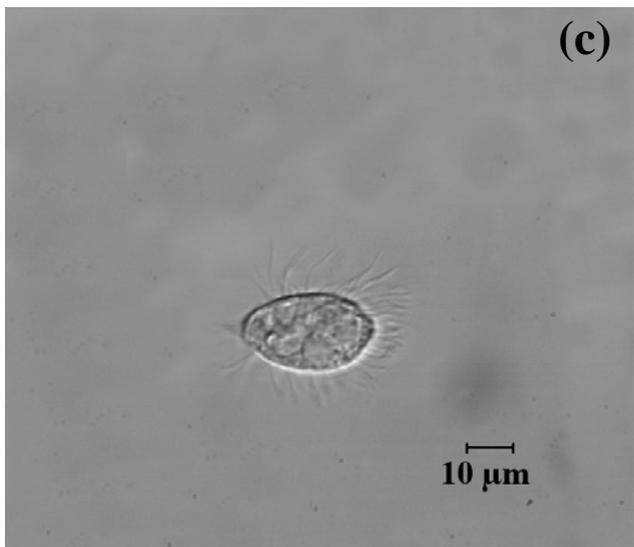
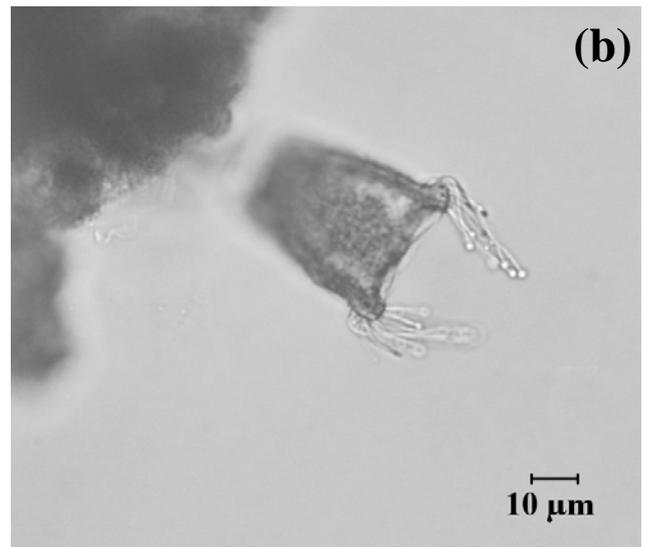
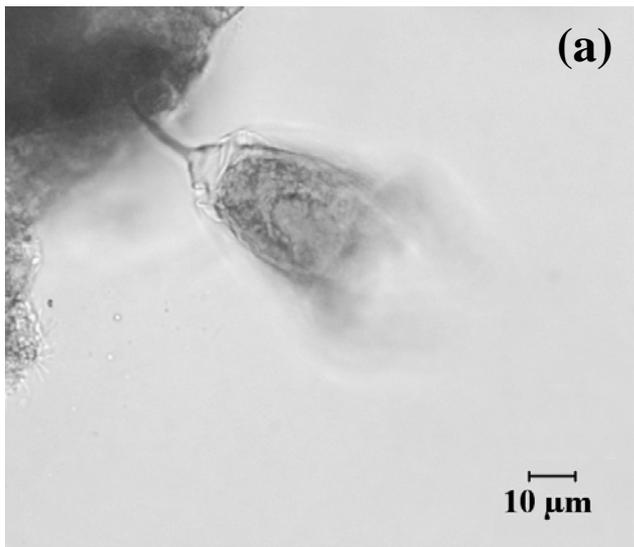
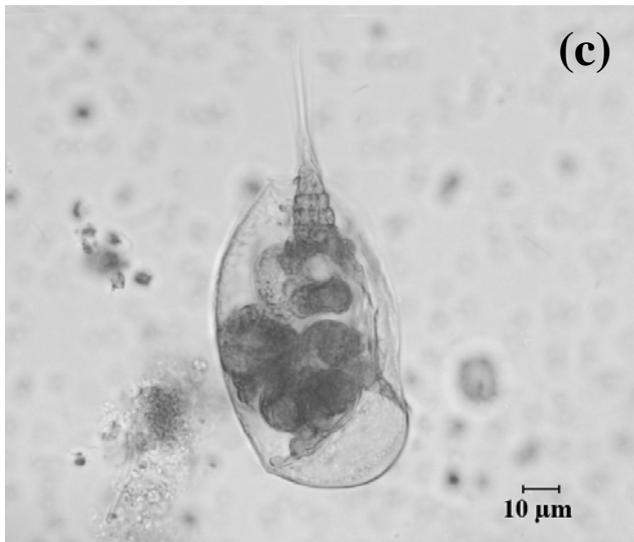
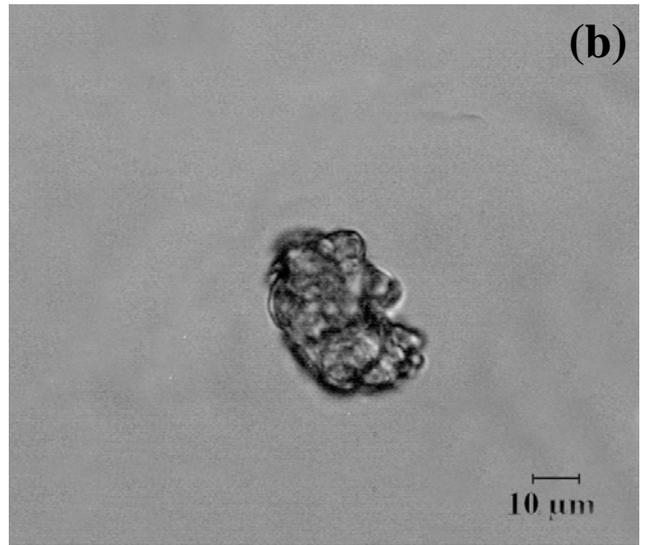
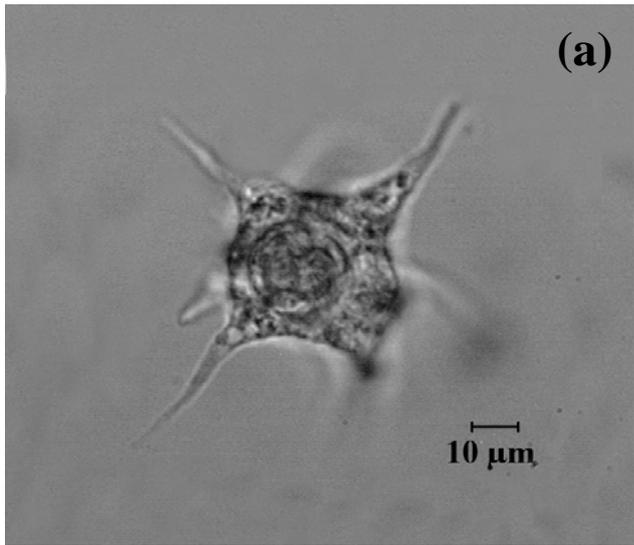


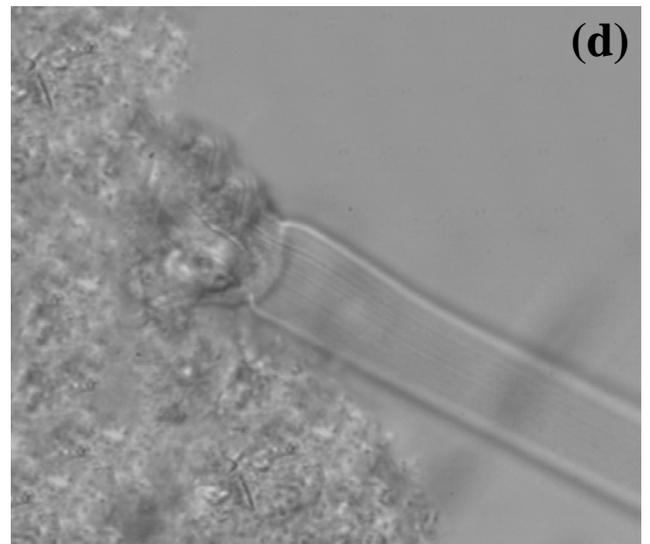
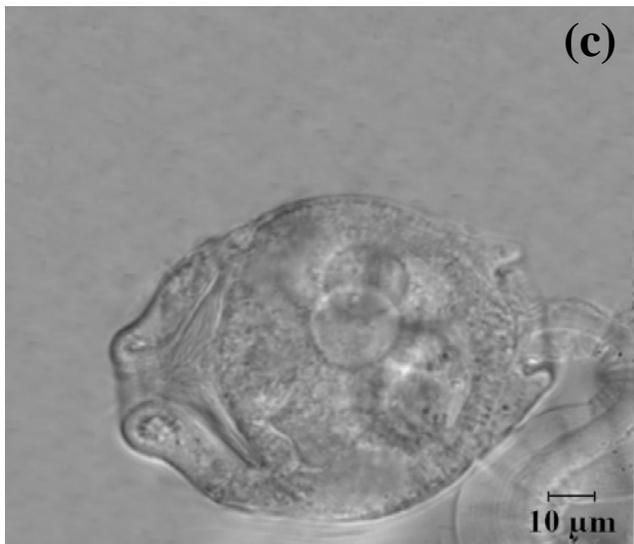
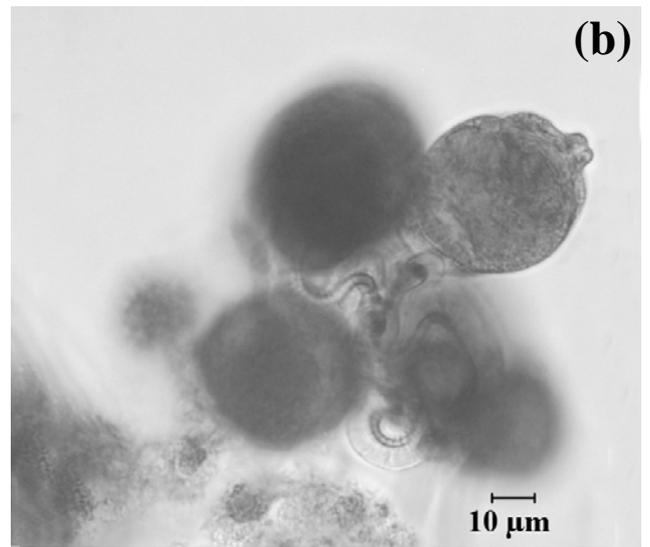
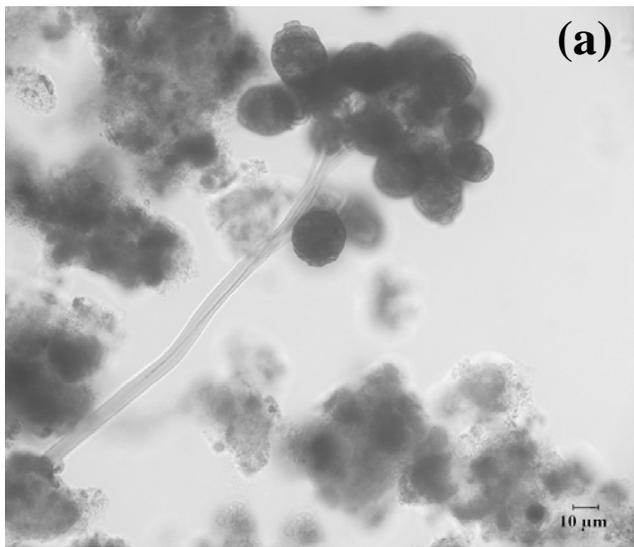
Figura 21. (a) Flagelado Bodonídeo, e (b) visualização dos dois flagelos, (c) Dinoflagelado *Oxyrrhis marina* exibindo seus flagelos, (d) Dinoflagelado tecado cf. *Protoperidinium*. (1000 x).



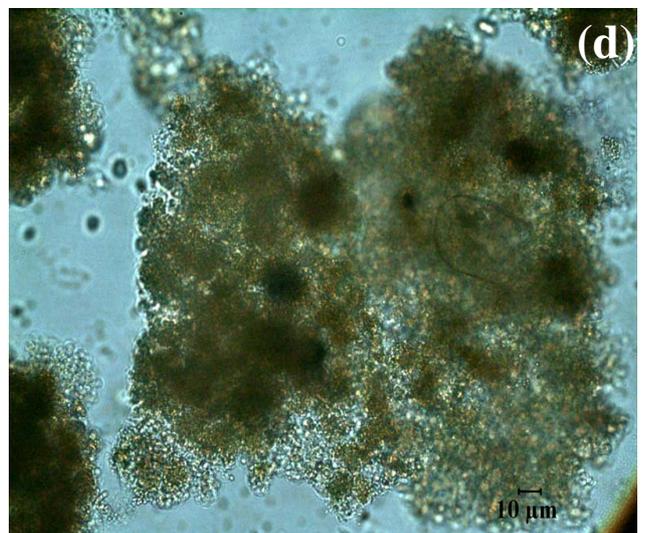
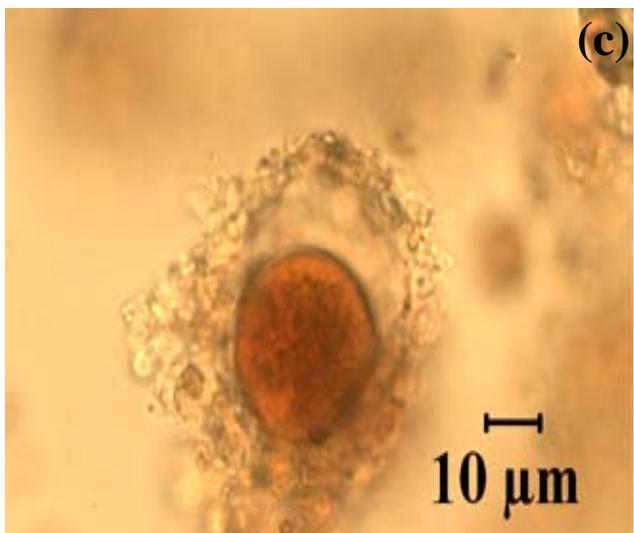
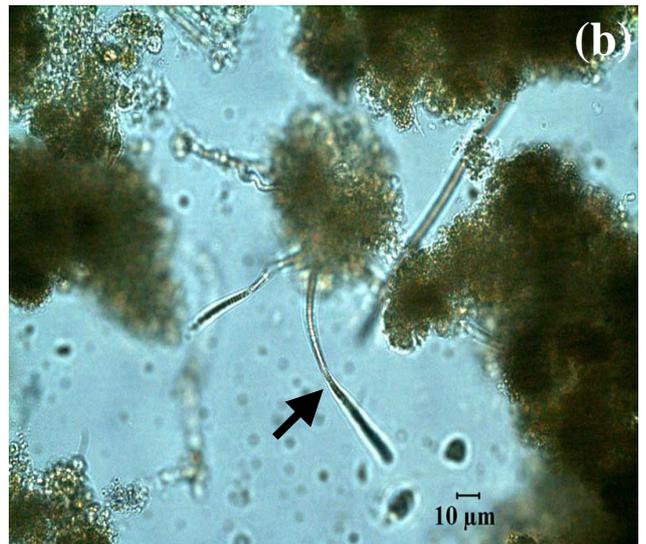
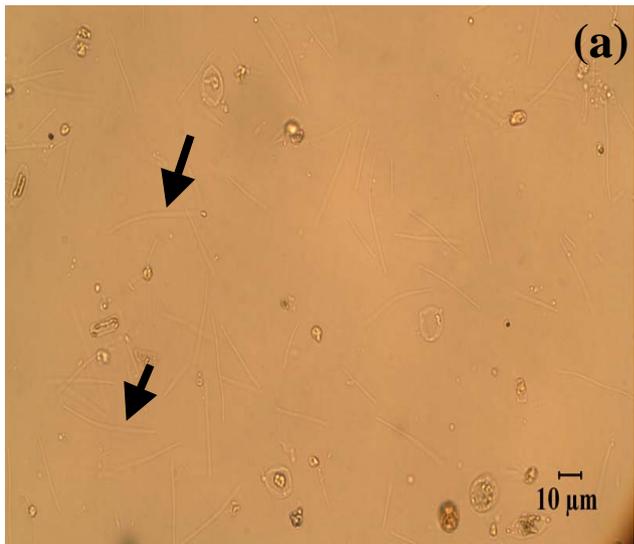
**Figura 22.** (a) Ciliado *Acineta* sp. evidenciando detalhe do pedúnculo de fixação ao floco microbiano, e (b) detalhe dos cílios modificados em forma de tentáculos (400 x), (c) ciliado da família Scuticociliatida (1000 x), (d) esporo de fungo em meio aos flocos microbianos (400 x).



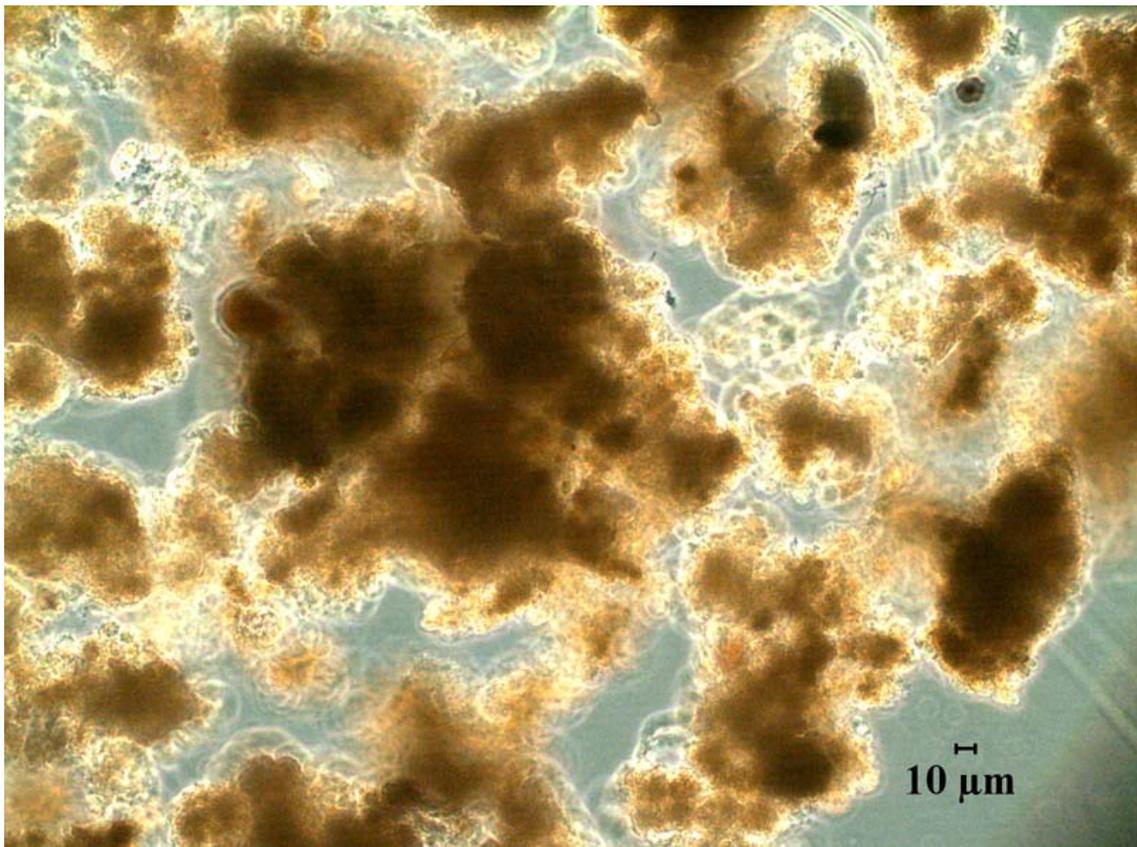
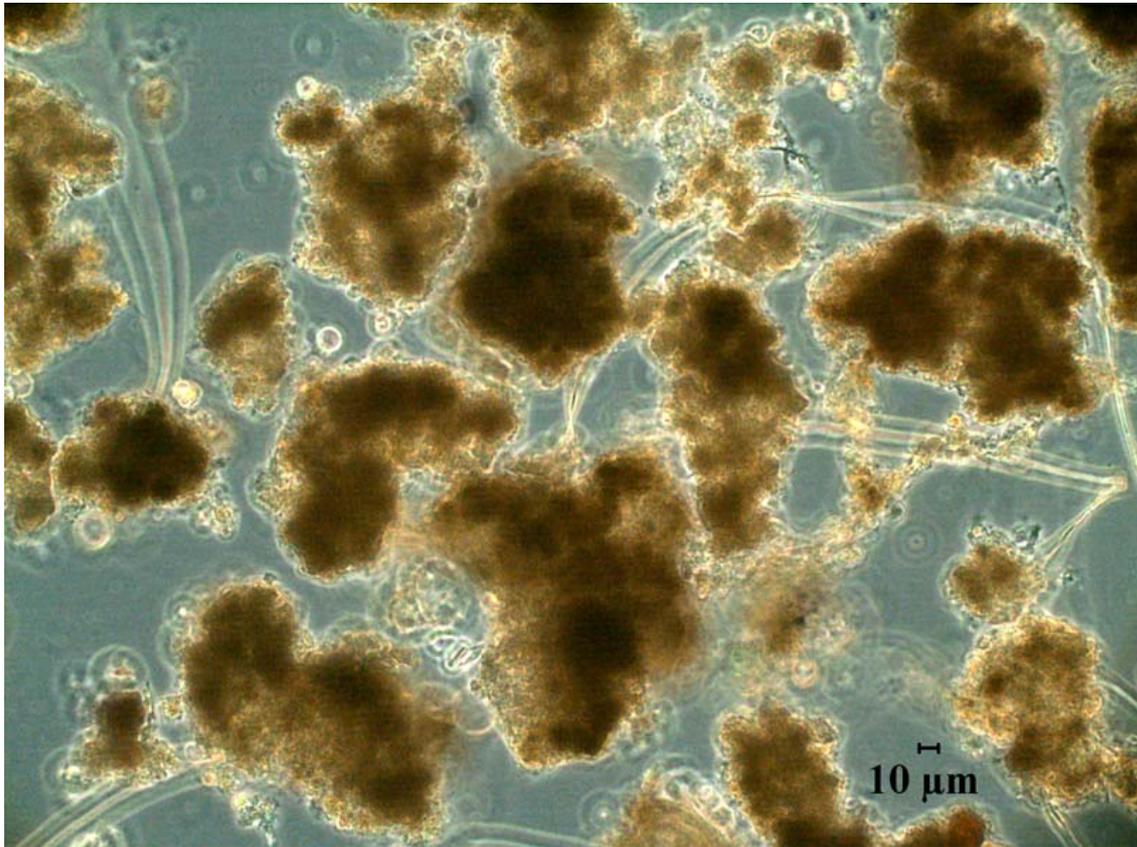
**Figura 23.** (a) Ameba atecada com filópodes, (b) ameba atecada com lobópodes (1000 x), (c) rotífero, (d) nematódeo (400 x).



**Figura 24.** (a) Colônia de *Carchesium*, (b) detalhe do pedúnculo ramificado com contração em espiral (400 x), (c) zoóide localizado na extremidade do pedúnculo, (d) detalhe do pedúnculo aderido ao floco microbiano (1000 x).



**Figura 25.** (a) Cianobactérias filamentosas da subfamília Pseudanabaenoideae – tricomas finos e retos, (b) cianobactérias filamentosas da subfamília Heteroleibleinioideae – tricomas maiores (400 x), (c) organismo não identificado presente em meio aos flocos microbianos, (d) colônias de cianobactérias cocóides (400 x).



**Figura 26.** Flocos microbianos presentes no tratamento MF (400 x).