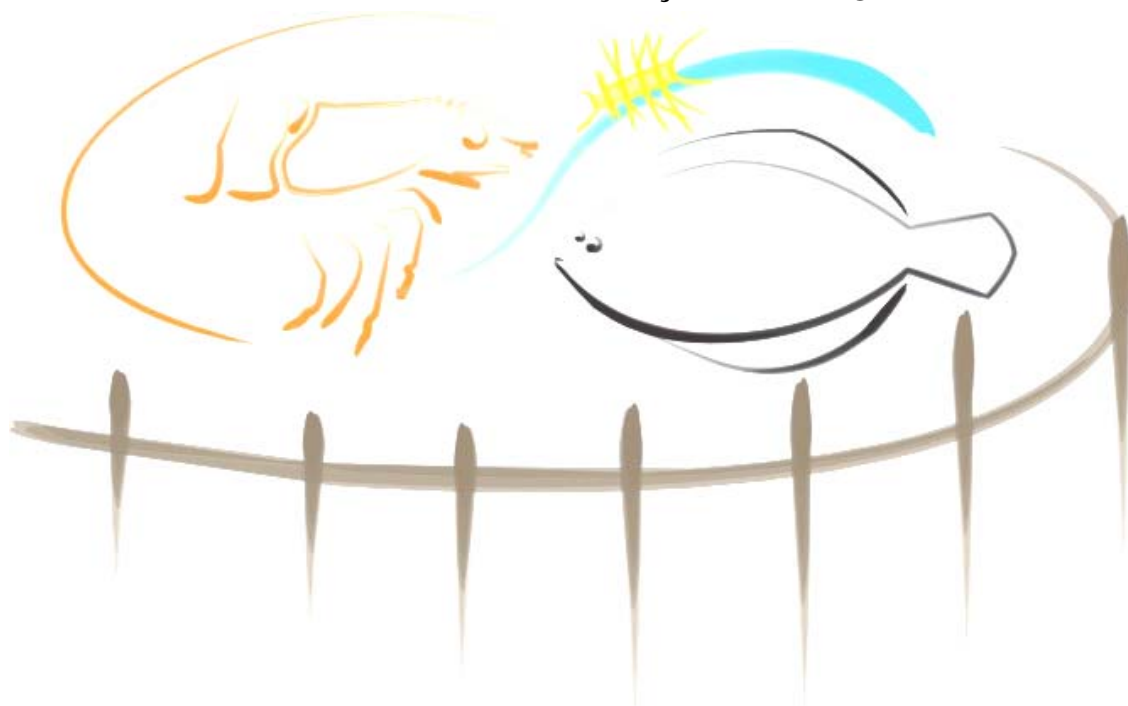


**UNIVERSIDADE FEDERAL DE RIO GRANDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA**



**Formação de flocos microbianos em cultivo do  
camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* e do  
camarão-branco *Litopenaeus vannamei*.**

**Lise Maria Mendes Holanda de Melo Ferreira**

**FURG  
RIO GRANDE, RS.  
2008**

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

**Formação de flocos microbianos em cultivo do  
camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* e do  
camarão-branco *Litopenaeus vannamei*.**

**Lise Maria Mendes Holanda de Melo Ferreira**

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Abreu

Co-Orientador: Prof. Dr. Wilson Wasielesky Junior

Rio Grande – RS – Brasil  
Julho de 2008

## Sumário

<b>Resumo.....</b>	<b>x</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>xii</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>6</b>
<b>3. Material e métodos.....</b>	<b>7</b>
<b>3.1. Desenho experimental.....</b>	<b>7</b>
<b>3.2. Coletas de água e parâmetros físico-químicos da água.....</b>	<b>9</b>
<b>3.2.1. Nutrientes, seston e clorofila a.....</b>	<b>10</b>
<b>3.3. Comunidade microbiana.....</b>	<b>10</b>
<b>3.4. Biometrias.....</b>	<b>11</b>
<b>3.5. Análises estatísticas.....</b>	<b>11</b>
<b>4. Resultados.....</b>	<b>12</b>
<b>4.1. Parâmetros físico-químicos da água.....</b>	<b>12</b>
4.1.1. Temperatura.....	12
4.1.2. Salinidade.....	12
4.1.3. Oxigênio dissolvido.....	12
4.1.4. pH.....	12
4.1.5. Transparência da água (Disco de Secchi).....	15
4.1.6. Sólidos suspensos totais.....	15
4.1.7. Nutrientes.....	15
4.1.7.1. Amônia.....	15
4.1.7.2. Nitrito.....	18
4.1.7.3. Fosfato.....	18
4.1.7.4. Relação Nitrogênio: Fósforo.....	18
4.1.8. Clorofila a.....	20
<b>4.2. Comunidade microbiana.....</b>	<b>21</b>
4.2.1. Bactérias livres.....	21
4.2.2. Bactérias aderidas.....	23
4.2.3. Flagelados.....	26
4.2.4. Ciliados.....	26

<b>4.3. Biometrias.....</b>	<b>28</b>
<b>5. Discussão.....</b>	<b>30</b>
<b>5.1. Perspectivas.....</b>	<b>37</b>
<b>6. Referências bibliográficas.....</b>	<b>38</b>

## Lista de tabelas

- 1 – Quantidade de ração fornecida em gramas por dia para cada tratamento. Tratamentos LV – *Litopenaeus vannamei*; FP – *Farfantepenaeus paulensis* e SC – sem camarão.....9
- 2 – Quantidade de melação fornecida em gramas por dia para cada tratamento. Tratamentos LV – *Litopenaeus vannamei*; FP – *Farfantepenaeus paulensis* e SC – sem camarão.....9
- 3 – Dados de peso inicial, peso final, ganho de peso em gramas ( $\pm$  DP); sobrevivência (%) e fator de conversão alimentar ( $\pm$  DP). .....28

## Lista de figuras

1 - (A), Sistema de aeração das unidades experimentais; (B), Tanque com água em processo de decloração; (C), Tanque com flocos microbianos já formados.....	7
2 - Temperatura da água de cultivo em °C (média ± DP) ao longo do período experimental nos tratamentos LV, FP e SC.....	13
3 - Salinidade da água de cultivo (média ± DP) ao longo do período experimental nos tratamentos LV, FP e SC.....	13
4 - Oxigênio dissolvido na água de cultivo em mg/L (média ± DP) ao longo do período experimental nos tratamentos LV, FP e SC.....	14
5 - pH da água de cultivo (média ± DP) ao longo do período experimental nos tratamentos LV, FP e SC.....	14
6 - Transparência da água de cultivo (disco de Secchi) em cm (média ± DP) ao longo do período experimental nos tratamentos LV, FP e SC.....	16
7 - Sólidos suspensos totais na água de cultivo em g/L (média ± DP) ao longo do período experimental nos tratamentos LV, FP e SC.....	16
8 - Nitrogênio amoniacal total (NAT) na água de cultivo em µM (média ± DP) ao longo do período experimental nos tratamentos LV, FP e SC.....	17
9 - Nitrito na água de cultivo em µM (média ± DP) ao longo do período experimental nos tratamentos LV, FP e SC.....	17
10 - Fosfato na água de cultivo em µM (média ± DP) ao longo do período experimental nos tratamentos.....	19
11 - Gráficos da Razão N:P nos tratamentos ao longo do período experimental nos tratamentos LV,FP e SC.....	19
12 - Clorofila <i>a</i> na água de cultivo em µg/L (média ± DP) ao longo do período experimental nos tratamentos LV, FP e SC.....	20
13 - Gráficos de bactérias livres org/mL (± DP), classificadas pela forma – cocos, bacilos e filamentosas – nos tratamentos ao longo do tempo. (A) Tratamento LV; (B) Tratamento FP e (C) Tratamento SC.....	22
14 - Gráfico Total de bactérias livres org/mL (média ± DP) ao longo do período experimental nos tratamentos LV, FP e SC.....	24

15 - Gráfico do total de bactérias aderidas org/ $\mu\text{m}^2$ (média $\pm$ DP) ao longo do período experimental nos tratamentos LV, FP e SC.....	24
16 - Gráficos de bactérias aderidas org/ $\mu\text{m}^2$ ( $\pm$ DP), classificadas pela forma – cocos, bacilos e filamentosas – nos tratamentos ao longo do tempo. (A) Tratamento LV; (B) Tratamento FP e (C) Tratamento SC.....	25
17 - Flagelados em org/mL (média $\pm$ DP) ao longo do período experimental nos tratamentos LV, FP e SC.....	26
18 - Ciliados menores que 40 $\mu\text{m}$ em org/mL (média $\pm$ DP) ao longo do período experimental nos tratamentos LV, FP e SC.....	27
19 - Ciliados maiores que 40 $\mu\text{m}$ em org/mL (média $\pm$ DP) ao longo do período experimental nos tratamentos LV, FP e SC.....	27
20 - Peso em gramas (média $\pm$ DP) ao longo do tempo nos tratamentos LV, FP e SC.....	29
21 – Fotos de bactérias cocóides presentes no floco microbiano com aumento de 1000x (Foto de L. Godoy).....	34

**Aos meus pais.**



## **Agradecimentos**

Aos meus pais por todo carinho, apoio e confiança na realização de mais um sonho! Meus irmãos e ao meu amado sobrinho, Zé, que nos trouxe muito amor e pelo sorriso mais lindo e cativante. E a toda família, avós, tios, primos... Sem esquecer do meu vovô Holanda (*in memorium*) pelo exemplo de vida. Amo vocês!

Ao Professor Dr. Paulo Cesar Abreu pela orientação, ensinamentos, atenção e paciência, principalmente nessa reta final. E pela oportunidade de ter aprendido um pouco do que é fazer ciência e o quanto isso pode ser fascinante!

Ao Professor Dr. Wilson Wasielesky (Mano), pela co-orientação, conhecimentos e pela sua sempre boa vontade para comigo ‘Piripiri’ durante todo mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura da FURG.

A Estação Marinha de Aquicultura (EMA) e Laboratório do fitoplâncton e microorganismos marinhos (Lab. Fito!) principalmente pelo fornecimento dos juvenis de camarão e todo o material e equipamentos necessários para realização deste trabalho.

Ao CNPq pela bolsa de fomento.

A todos os professores, funcionários e alunos da EMA.

Ao Eduardo Ballester, sempre disposto ajudar, valeu pela força!

Aos amigos: Viviana (Banana), João Sampaio, Shei que foram os primeiros amigos aqui no Cassino. A Diana pelo convívio e amizade dentro e fora da EMA.

Ao Leandro, meu amigo e irmão, por estar sempre presente, pelas discussões e ajuda durante o mestrado, mas principalmente pela amizade.

A todos do Laboratório de fitoplâncton (Família Fitoplâncton!) pela amizade, boa convivência, nossos almoços, momentos de descontração e risadas dando mais leveza aos dias.

A Silvia (Mana gaúcha), Aldo e Stella por terem me acolhido, pelo carinho e amizade. Amo vocês!

As amigas do Piauí, a saudade às vezes dói muito! Obrigada pela força mesmo a distância vocês sempre presentes no meu coração. Amo vocês sem fim!

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

## Resumo

O objetivo do presente trabalho foi verificar se a formação dos flocos microbianos se dá de forma diferente em cultivos intensivos de *Farfantepenaeus paulensis* e *Litopenaeus vannamei* em sistemas heterotróficos sem troca de água (ZEAH). Para isso, procurou-se caracterizar a dinâmica da comunidade microbiana, sua interação com os nutrientes no sistema de cultivo e verificar se o floco microbiano serve como complemento alimentar para estas duas espécies. O experimento consistiu em três tratamentos, com quatro repetições cada: 1) Tratamento SC - sem camarão; 2) Tratamento FP - com o camarão *F. paulensis* e 3) Tratamento LV - com o camarão *L. vannamei*. Todos os tratamentos receberam diariamente uma fertilização orgânica a fim de induzir a formação do floco microbiano, mantendo uma razão C:N de 20:1. Tanques de 300 L (200 L de volume útil) foram povoados com juvenis de *L. vannamei* e *F. paulensis* (0,06 g e 0,07 g respectivamente) em uma densidade de 300 camarões/m<sup>2</sup>. Os nutrientes dissolvidos, peso do seston, clorofila *a* e comunidade microbiana foram analisados através de coletas de água de cada tanque a cada dois dias na primeira semana e depois a cada três dias até o final do período de estudo (35 dias). Os parâmetros de qualidade de água estiveram dentro dos níveis recomendados para o cultivo de camarões peneídeos, não comprometendo seu crescimento e sobrevivência. A presença de espécies distintas de camarões parece influenciar na formação dos flocos microbianos, evidenciado pelos maiores valores de material em suspensão no tratamento LV em comparação com os tratamentos FP e SC. Além disso, observou-se também diferentes concentrações de nutrientes (principalmente fosfato) e distintas relações N:P nos tanques com LV, FP e aqueles sem camarão. Observou-se uma estreita relação entre a quantidade de agregados e a presença de bactérias cocóides aderidas. Estas foram dominantes em LV, onde os valores médios da relação N:P (5,8:1) foram maiores do que nos demais tratamentos. Isto indica que uma relação N:P mais elevada deve favorecer as bactérias cocóides produtoras de muco e que estas participam na formação dos flocos microbianos. O ganho de peso e peso final em LV foi duas vezes maior do que FP. O Fator de Conversão Alimentar (FCA) aparente em LV foi menor do que o observado em cultivos em água clara, o que nos permite inferir que a microbiota dos agregados serviu como alimento suplementar para o *L. vannamei*, o mesmo não acontecendo para *F. paulensis*

devido, provavelmente, às suas elevadas exigências nutricionais ou por seus hábitos alimentares diferentes de *L. vannamei* que parece estar melhor adaptado ao consumo de agregados.

## Abstract

Main objective of this study was to verify if the microbial flocs formation occurs in different ways in cultures of *Farfantepenaeus paulensis* and *Litopenaeus vannamei* reared in heterotrophic systems without water exchange (ZEAH). For this, the microbial community and its interaction with the nutrients in the rearing systems were characterized. It was also verified if the microbial flocs serve as food complement for these two shrimp species. The experiment consisted of three treatments, each one with four replicates: 1) WS treatment - without shrimp, 2) FP treatment - with the shrimp *F. paulensis* and 3) LV treatment - with the shrimp *L. vannamei*. All treatments received a daily organic fertilization in order to induce the microbial flocs formation. The C:N ratios were kept as 20:1 during all experiment. The 300 L tanks, with 200 L of water, were stocked with *L. vannamei* and *F. paulensis* juveniles (0.06g and 0.07g, respectively) at a density of 300 shrimps/m<sup>2</sup>. The dissolved nutrients, weight of seston, chlorophyll *a* and the microbial community were analyzed in water samples that were taken every two days during the first week and every three days, until the end of the experimental period (35 days). The water quality parameters were within the recommended levels for penaeid shrimps cultures, not compromising their growth and survival. Indeed, the presence of different species of shrimp seems to influence the formation of microbial flocs in heterotrophic systems, as indicated by the higher values of suspended matter in the LV in comparison to the FP and WS. Moreover, these treatments presented different concentrations of nutrients (mainly phosphate) and different N:P ratios in the LV, FP and WS tanks. It was observed a close relationship between the quantity of aggregates and the presence of attached coccus bacteria. These bacteria were predominant in the LV, where the mean value of the N:P ratio (5,8:1) was higher than in other treatments. This indicates that the higher N:P ratios promote the growth of mucus producing coccus bacteria, that they participate in the formation of microbial flocs. Shrimp in the LV showed higher weight gain, with final weight twice as big as that of shrimp in the FP tanks. The apparent food conversion ratio (FCR) in the LV was lower than that observed in clear water rearing, what allows us to say that the aggregates microbiota served as a food supplement for *L. vannamei* but not for *F. paulensis* due to, probably, the higher nutritional requirements or different feeding

behavior of *F. paulensis* in comparison to *L. vannamei* that seems to be better adapted for the consumption of aggregates.

## 1. Introdução

Os agregados marinhos, detritos marinhos, flocos microbianos, ou ‘marine snow’ foram definidos por Gilmer (1972) como material amorfo e flocos de detritos, sendo estes abundantes e presentes nas zonas pelágicas de todos os oceanos do mundo. Já Shanks & Edmondson (1990) definiram o “Marine snow”, ou neve marinha, como detritos, partículas minerais, fitoplâncton e microorganismos fracamente ligados por uma matriz orgânica. Os agregados marinhos têm diversas origens e composição variada, incluindo fitoplâncton (particularmente diatomáceas), estruturas alimentares descartadas por alguns organismos do zooplâncton, pelotas fecais e detritos indefinidos (Aldredge & Silver 1988). Nestes agregados os processos de fotossíntese, decomposição, reciclagem de nutrientes e sedimentação da matéria orgânica particulada (MOP) pela coluna d’água são feitos pelos microorganismos (Simon *et al.* 2002). Quanto aos organismos associados aos agregados, ocorre uma sucessão semelhante à de detritos, onde a quantidade e o tipo de microorganismos variam de acordo com a idade da partícula (McCave 1984).

A formação dos flocos microbianos envolve processos físicos, químicos e biológicos. Dentre os fatores físicos estão o cisalhamento (ex. quebra da onda), movimento browniano e diferença de sedimentação das partículas. As diferentes propriedades de cargas elétricas entre partículas é o principal fator químico, enquanto que os fatores biológicos referem-se à produção de exopolímeros transparentes – TEP pelas bactérias e interações tróficas entre os microorganismos. O tamanho e forma dos agregados podem ser alterados não só pelo fluxo de material particulado, mas também pela estrutura trófica, atividade microbiana, efeitos químicos e até mesmo pelas propriedades óticas da coluna d’água (Hietanen 1998).

No processo de agregação, os primeiros momentos são caracterizados pelo crescimento de bactérias principalmente na forma de bacilos (Biddanda 1985), que logo dão lugar a proliferação de outras formas de bactérias que também se utilizam da matéria orgânica dissolvida para seu crescimento. Durante o desenvolvimento das bactérias há a produção de muco aderente que leva ao aumento do tamanho dos flocos pela maior agregação das partículas. Em seguida, ocorre a colonização por protozoários (flagelados, ciliados e formas amebóides), principais predadores das bactérias.

Subsequentemente, há um decréscimo no número de bactérias pelo controle exercido pelos protozoários, o que pode levar uma mudança na morfologia e redução do tamanho dos agregados uma vez que há uma redução na quantidade de muco produzido (Biddanda & Pomeroy 1988). No entanto, as bactérias também podem contribuir para o processo de desagregação através da produção de exoenzimas, utilizadas na decomposição e assimilação de matéria orgânica particulada (Biddanda & Pomeroy 1988, Verdugo *et al.* 2004). A fragmentação dos agregados também é influenciada pela natação de organismos do zooplâncton (ex.: crustáceos) e que estes tem um papel significativo na dinâmica das partículas na coluna d'água independentemente do consumo ou não dessas partículas (Dilling & Alldredge 2000).

A desagregação dos flocos microbianos pela natação e migração dos animais pode alterar o tamanho das partículas disponíveis para os predadores e colonizadores microbianos e reduzir o fluxo de carbono orgânico particulado pela geração de pequenas partículas, as quais sedimentam devagar e residindo por mais tempo na coluna d'água (Dilling & Alldredge 2000).

A formação e sedimentação de agregados microbianos têm grande importância no contexto das mudanças climáticas devido ao aquecimento global, isto porque o fluxo de carbono biogênico nos oceanos depende da remoção do CO<sub>2</sub> dissolvido pelo fitoplâncton, mas sua exportação da zona eufótica para as águas profundas e fundos oceânicos dependem da produção de pelotas fecais pelo zooplâncton e também da sedimentação dos agregados marinhos, num fenômeno conhecido como “Bomba Biológica” (Lalli & Parsons 1993). A alteração do número, tamanho e densidade dos agregados marinhos depende da atividade de diferentes organismos do fitoplâncton, zooplâncton e, principalmente, dos microorganismos que controlam a formação, desagregação, fragmentação e reagrupamento de agregados de sedimentação rápida, sendo responsáveis pela maior ou menor eficiência da “Bomba Biológica” (De La Rocha & Passow 2007).

A questão da origem e destino dos agregados nos oceanos está intimamente ligada às interações tróficas nas teias alimentares macro e microbianas, já que os agregados de bactérias e material particulado inorgânico são mais acessíveis aos consumidores do que as bactérias livres (Pomeroy 1984). Tem sido enfatizada a importância da produção de material extracelular microbiano como fonte de energia e

carbono para os organismos consumidores (Kirchman & Mitchell 1982). Em adição, a transferência direta de macroagregados microbianos na cadeia alimentar pode ser uma via importante para o fluxo de carbono e energia para os níveis tróficos superiores em ambientes aquáticos, a exemplo do que ocorre na “alça microbiana” (Azam *et al.* 1982; Biddanda 1986). Onde os nutrientes tornam-se disponíveis para conversão na forma particulada através da fotossíntese ou via transferência pela produção bacteriana para níveis tróficos superiores como protistas e zooplâncton (Verdugo *et al.* 2004).

Na aquicultura, os agregados microbianos vêm sendo utilizados como fonte alimentar para os organismos cultivados desde o fim da década de 80. Moriarty (1987) já mostrava a necessidade de estudar a cadeia alimentar microbiana e os agregados em viveiros de cultivo devido a sua importância como fonte alimentar para os organismos cultivados. Avnimelech (1999) também ressaltou a importância do potencial de utilização da proteína microbiana como fonte alimentar para peixes e camarões e, que isso depende da habilidade do organismo cultivado de capturar essas bactérias e digerir a proteína microbiana, destacando a problemática de determinar o tamanho mínimo das partículas que podem ser capturadas por esses organismos cultivados.

Mais recentemente, os agregados microbianos vêm sendo empregados em sistemas de cultivos sem troca de água. Os cultivos heterotróficos sem renovação de água (Zero exchange, aerobic, heterotrophic culture systems -ZEAH) baseiam-se na presença de flocos bacterianos, ou agregados microbianos, formados por biota predominantemente aeróbica e heterotrófica. Esses sistemas de cultivo têm se mostrado como uma nova alternativa para produção super-intensiva de camarões, atendendo aos conceitos de uma aquicultura responsável e ambientalmente amigável. Devido à recirculação de água, ocorre um aumento da produtividade e diminuição de efluentes, com conseqüente redução do impacto ambiental (Wasielesky *et al.* 2006).

Os sistemas ZEAH reduzem os riscos de introdução e disseminação de patógenos no ambiente, além de incrementar a dieta dos animais através da produtividade natural presente nos viveiros (McIntosh *et al.* 2000a, Bratvold & Browdy 2001, Moss *et al.* 2001, Weirich *et al.* 2002, Burford *et al.* 2003). Outro fator de suma importância é a utilização de menores teores de proteína bruta nas rações, sendo esta suprida pela proteína microbiana, acarretando a diminuição dos custos e redução da eutrofização da água de cultivo (Browdy *et al.* 2001, Moss 2002, Samocha *et al.* 2004),



ou seja, contribuindo para nutrição dos camarões e para a ciclagem de nutrientes nos tanques de cultivo (McIntosh 2000b).

Para a formação de flocos bacterianos no ambiente de cultivo, são feitas fertilizações orgânicas com altos níveis de carbono, num ambiente fortemente oxigenado (Avnimelech 1999). Samocha *et al.* 2007, demonstraram que a adição de melaço pode ser usada como ferramenta para prevenir o aumento de nitrogênio amoniacal total e nitrito durante as fases de berçário e engorda de camarão-branco, *L. vannamei*, em sistemas de cultivo com troca de água limitada. O balanço de mistura de carbono e nitrogênio com razão C:N de aproximadamente 20:1 são prontamente digeridos pelas bactérias que têm capacidade de síntese protéica a partir de carbono orgânico e amônia (Chamberlain *et al.* 2001). Estudos recentes mostram que os microorganismos, especialmente as bactérias, têm importante função na formação destes agregados microbianos (Arantes 2007, Azim *et al.* 2008, Schryver *et al.* 2008).

Na região sul do Brasil, em função da temperatura mais amena, o cultivo de camarões marinhos esteve direcionado para espécies nativas resistentes a baixa temperatura, como o camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Poersch *et al.* 2006). As vantagens de cultivo desta espécie nativa é a disponibilidade de estoque natural, maior taxa de crescimento em baixa temperatura e melhor aceitação no mercado local. Por outro lado, o camarão-branco *Litopenaeus vannamei* é a espécie mais cultivada no Brasil e no mundo por ser economicamente mais rentável e possuir todo um pacote tecnológico desenvolvido para o cultivo da espécie, como rações específicas, sistemas de cultivo, etc. Porém, a sua sobrevivência e crescimento podem ser limitados pela baixa temperatura no extremo sul do país. O cultivo destas duas espécies em sistemas ZEAH pode ser uma alternativa viável uma vez que os sistemas são montados em estufas, garantindo maior temperatura da água o ano inteiro (McAbee *et al.* 2003, Wasielesky *et al.* 2006). Além disso, os agregados microbianos presentes nos sistemas ZEAH podem representar um importante complemento alimentar, reduzindo significativamente o consumo de ração, bem como a quantidade de proteína utilizada neste alimento artificial (Wasielesky *et al.* 2006, Ballester *et al.* 2008, submetido).

Burford *et al.* (2003), reportaram que mais de 29% do alimento consumido por *L. vannamei* pode ser proveniente de flocos bacterianos presentes no meio heterotrófico (meio onde predominam organismos heterotróficos mantido, principalmente, por meio

de um balanço de carbono/nitrogênio/fósforo), demonstrando, assim, a viabilidade do sistema. Já Burford *et al.* (2004), indicam a necessidade de mais pesquisas para determinar maneiras ótimas de produção da biota natural, principalmente dos flocos microbianos, e otimização de sua composição nutricional. Os mesmos autores também sugeriram mais pesquisas para determinar o papel da biota natural em suprir as exigências nutricionais dos camarões.

Estudos conduzidos por Emerenciano *et al.* (2006) mostraram que a presença dos flocos microbianos não melhorou o desempenho de *F. paulensis* na fase de berçário, sendo necessário reavaliar o potencial dos flocos microbianos no cultivo desta espécie de camarão. Por outro lado, experimentos em sistema “ZEAH” realizados com *L. vannamei* e *F. paulensis* mostraram uma possível diferenciação na composição, tamanho e abundância dos flocos bacterianos nos dois cultivos, indicando que a presença de camarões de diferentes espécies poderia influir na formação dos flocos microbianos (Wasielesky com. pess. 2006).

## 2. Objetivos

Geral:

Verificar se a formação dos flocos microbianos se dá de forma diferente em cultivos de *Farfantepenaeus paulensis* e *Litopenaeus vannamei*.

Específicos:

1) Caracterizar microscopicamente a formação dos flocos microbianos em cultivos de *F. paulensis* e de *L. vannamei*.

2) Verificar a importância da presença de camarões na formação dos flocos microbianos.

3) Verificar a interação entre os nutrientes na água de cultivo e o estabelecimento da comunidade microbiana.

4) Verificar se o floco formado serve como complemento alimentar para estas duas espécies?

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Desenho Experimental

O experimento foi realizado de 03 de fevereiro a 09 de março de 2007, na Estação Marinha de Aquicultura Prof. Marcos Alberto Marchiori – EMA, localizada na praia do Cassino (32°12'S e 51°50'N), município de Rio Grande, RS, Brasil, pertencente à Universidade Federal do Rio Grande – FURG.

Foram utilizados 12 tanques com capacidade de 310L e volume útil de 200L distribuídos em três tratamentos, com quatro repetições cada, da seguinte maneira: 1) Tratamento SC - sem camarão; 2) Tratamento FP - com o camarão *Farfantepenaeus paulensis* e 3) Tratamento LV - com o camarão *Litopenaeus vannamei*; todos os tratamentos tiveram adição de farelo de trigo, melão e ração para induzir a formação do floco microbiano.

A água utilizada no experimento foi proveniente de duas fontes: (1) Água marinha bombeada da orla da praia do Cassino filtrada em filtro de areia e, posteriormente filtrada com filtro cunho de 5 µm de poro; (2) Água doce proveniente da companhia de abastecimento da cidade de Rio Grande, armazenada em tanques com aeração onde permaneciam por 24 horas para decloração e usada posteriormente para repor a água perdida pelo processo de evaporação. Não houve troca de água para manutenção da qualidade da água durante todo o experimento. O sistema de aeração consistiu em um círculo de mangueira transparente de ½ polegada onde foram colocadas cinco pedras porosas (Fig. 1). Estas mangueiras estavam ligadas a canos pvc que por sua vez eram ligados a um soprador central. A aeração intensa foi utilizada para manter os níveis de oxigênio da água e também para suspensão do material particulado.



Figura 1: (A), Sistema de aeração das unidades experimentais; (B), Tanque com água em processo de decloração; (C), Tanque com flocos microbianos já formados.

Os náuplios de *L. vannamei* foram adquiridos do laboratório de produção de larvas e pós-larvas da Aqualíder, situada em Pernambuco – Brasil. Já os náuplios de *F. paulensis* foram produzidos no setor de maturação de camarões da EMA. A larvicultura de ambas as espécies de camarões realizadas na EMA até que as larvas atingiram o peso de 0,06 g e 0,07 g para *L. vannamei* e *F. paulensis*, respectivamente.

Para contribuir na formação dos flocos microbianos, foi feita inicialmente a inoculação das diatomáceas *Thalassiosira weissflogii* e *Chaetoceros muelleri*, na concentração de aproximadamente  $2 \times 10^4$  células/ml de cada espécie. Quando o cultivo de diatomáceas atingiu a fase exponencial de crescimento, fez-se o povoamento dos tanques com camarões e a indução à formação dos flocos microbianos.

O povoamento dos tanques foi feito com juvenis distribuídos aleatoriamente em uma densidade de estocagem de 300 camarões/m<sup>2</sup>. A ração (40% de proteína bruta - Ração Supra) foi oferecida com uma taxa de arraçoamento de 10% da biomassa de camarão, dividida em quatro alimentações diárias (08:00, 11:00, 14:00 e 17:00). Para o tratamento sem camarão (SC) foi oferecida a média da quantidade de ração, melão e farelo de trigo oferecidos aos outros dois tratamentos.

O processo de indução do floco microbiano consistiu na adição de melão, farelo de trigo e a ração, nas unidades experimentais, de tal forma que o somatório de todos os elementos acrescentados geravam uma razão C:N de 20:1. A indução dos flocos era feita diariamente, adicionando os elementos quatro vezes ao dia, juntamente com a ração. Após as análises de biometria, quando era determinada a biomassa dos camarões, foram feitos os ajustes nos valores de ração, melão e farelo de trigo a serem oferecidos até a biometria seguinte. Já para o tratamento SC, sem camarão, foi feita a média dos valores de insumos entre o tratamento LV e FP para quantificar a quantidade que seria colocada nos tanques. As tabelas 01 e 02 (abaixo) mostram a quantidade de melão e ração fornecida por dia ao longo das cinco semanas de experimento, para cada tratamento.

Tabela 01: Quantidade de ração fornecida em gramas por dia para cada tratamento. Tratamentos LV – *Litopenaeus vannamei*; FP – *Farfantepenaeus paulensis* e SC – sem camarão.

	Inicial	1ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana	5ª semana
<b>LV</b>	0,84	1,45	2,53	4,22	6,60	9,10
<b>FP</b>	1,00	1,19	1,53	2,61	3,50	4,10
<b>SC</b>	0,93	1,32	2,01	3,41	5,00	6,60

Tabela 02: Quantidade de melão fornecido em gramas por dia para cada tratamento.

	Inicial	1ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana	5ª semana
<b>LV</b>	2,50	4,30	7,70	12,90	20,30	28,00
<b>FP</b>	2,95	3,60	4,60	7,90	10,70	12,60
<b>SC</b>	2,80	4,00	6,10	10,40	15,30	20,30

A quantidade de farelo de trigo oferecida na primeira semana foi de 0,4g para *L. vannamei* e de 0,5g para *F. paulensis* ao passo que, nas semanas seguintes, foi fixado o valor de 0,5g por dia para todos os tratamentos, já que o farelo de trigo funciona basicamente como substrato para a formação do floco.

### 3.2. Coletas de água e medidas de parâmetros físico-químicos da água

Diariamente foram monitorados a salinidade ( $\pm 0,01$ ), temperatura ( $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), pH ( $\pm 0,01$ ) e oxigênio dissolvido ( $\pm 0,01\text{ mg/L}$ ) medidos com o aparelho multiparâmetros YSI 556 MPS (EUA) e a transparência da água com Disco de Secchi. Os nutrientes, peso do seston, clorofila *a* e comunidade microbiana foram analisados na água coletadas de cada tanque a cada dois dias na primeira semana de experimento e depois a cada três dias até o final do período de estudo.

#### 3.2.1. Nutrientes, Seston e Clorofila *a*

O teor de amônia foi analisado de acordo com UNESCO (1983) e as análises de nitrito e fosfato seguiram as metodologias descritas em Strickland & Parsons (1972).

O peso do seston foi determinado por gravimetria a partir da filtração de alíquotas de até 200 mL de água em filtros de fibra de vidro Whatman GF/F. Os filtros foram colocados para secar por aproximadamente 24h, a 60°C, e posteriormente pesados em balança analítica (Sartorius MC1, analytic AC 210 S) com precisão de 0,0001 g para determinação do peso final (AOAC 2000).

A clorofila *a* foi determinada a partir de amostras de 10 a 20 mL da água de cultivo filtrada em filtro de fibra de vidro Whatman GF/F. Os filtros foram colocados em frascos com 10 mL de acetona 90% e deixados no escuro e frio (-18°C) por 24h, para extração da clorofila *a*. A concentração do pigmento foi determinada por meio de fluorímetro Turner TD700 (previamente calibrado), de acordo com a metodologia descrita em Welschmeyer (1994).

### **3.3. Comunidade microbiana**

Para análise da formação de floco e comunidade microbiana foram quantificados e classificados (quando possível) os microorganismos presentes em amostras de água (90 mL) coletadas de cada tanque periodicamente e fixadas em formalina 4%.

Para determinação da abundância de bactérias e flagelados, amostras de 100 a 500 µL de água foram filtradas em filtros de membrana de policarbonato (Nuclepore 0,2 µm de poro e 2,5 mm de diâmetro), previamente escurecidos com Irgalan Black. Os microorganismos foram corados com Laranja de Acridina 1%, na concentração de 1 µg/mL (Hobbie *et al.* 1977). Bactérias e flagelados foram contados no aumento de 1000x em 30 campos escolhidos aleatoriamente, utilizando-se microscópio de epifluorescência, Zeiss AxioPlan, equipado com um conjunto de filtros de luz 487709 (BP3450 - 490; FT 510; LP 520) com magnificação final de 1000x.

Para a contagem de ciliados, alíquotas de 1 a 10 mL das amostras foram colocadas na câmara de sedimentação por 12 à 24h para posterior contagem, utilizando microscópio invertido (Zeiss Axiovert), com magnificação final de 200x e 400x, onde foram contados 30 campos escolhidos aleatoriamente (Utermöhl, 1958).

### **3.4. Biometrias**

A biometria inicial foi feita nos camarões de dois tanques de larvicultura da EMA, onde foi realizado o processo de desenvolvimento larval e pós-larval. Para tal,

foram coletados 50 camarões de cada tanque e pesados individualmente para verificar o peso médio e estimar a biomassa dos camarões que seriam colocados nos tanques experimentais. Posteriormente, a cada semana, 10 camarões eram retirados de cada tanque para verificar o seu peso, estimar seu crescimento e sua biomassa. Dois tanques extras, um com cultivo de *F. paulensis* e outro com *L. vannamei*, foram mantidos durante todo período experimental para reposição dos camarões retirados após as biometrias semanais. Estes tanques extras recebiam a mesma proporção de alimento dos tratamentos como também a indução para a formação do floco microbiano. Ao final do experimento todos os camarões foram pesados e quantificados para análise do crescimento final, sobrevivência, taxa de conversão alimentar aparente (TCA) e taxa de crescimento específico (TCE), de acordo com as seguintes fórmulas:

$$TCA = RF/B_f - B_i$$

Onde, TCA = Fator de conversão alimentar aparente, RF = quantidade de ração fornecida,  $B_i$  = Biomassa inicial,  $B_f$  = Biomassa final.

A taxa de crescimento específico (TCE) dos camarões expressa em %/dia 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.

### 3.5. Análises Estatísticas

Os dados coletados foram submetidos ao teste de normalidade e de homocedasticidade, caso fossem normais e homocedásticos, os dados eram submetidos a teste-t ( $\alpha=0,05$ ). Os dados não-normais foram submetidos à análise não paramétrica, através do teste de Kruskal-Wallis ( $\alpha=0,05$ ) para parâmetros de qualidade de água, e análise não paramétrica (Kolmogorov- Smirnov  $\alpha=0,05$ ) para os dados das biometrias (Sokal & Rohlf 1969).

## 4. Resultados



## **4.1. Parâmetros Físico-químicos da água.**

### 4.1.1. Temperatura

A temperatura média da água nos tratamentos foi de  $23,8 \pm 2,56$  °C, sendo que a maior temperatura registrada foi de 32°C (início do experimento) e a mínima de 18,8 °C (Figura 2). Não houve diferença significativa entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ).

### 4.1.2. Salinidade

A média da salinidade nos tratamentos foi de  $35,6 \pm 2,89$ . O valor máximo de salinidade encontrado ao longo do experimento foi de 41,7 e o mínimo de 29,4. Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos para salinidade. Na Figura 3 pode ser observado que a salinidade se manteve bastante estável ao longo do tempo nos três tratamentos, porém a partir do 20º dia a salinidade diminuiu devido às chuvas nesse período.

### 4.1.3. Oxigênio Dissolvido

O oxigênio dissolvido (OD) apresentou as mesmas oscilações em todos os tratamentos ao longo do tempo (Figura 4), não havendo diferença significativa entre eles ( $p > 0,05$ ). O valor médio de OD entre os três tratamentos foi de  $6,6 \pm 1,16$  mg/L, apresentando concentração máxima de 9,8 mg/L e mínima de 4,1 mg/L.

### 4.1.4. pH

O pH também apresentou tendência similar entre os tratamentos ao longo do tempo, com exceção dos últimos dias de experimento quando o pH dos tratamentos tendeu a diminuir e se diferenciar, com menores valores no tratamento LV, que diferiu significativamente ( $p < 0,05$ ) de FP e SC (Figura 5). A média dos tratamentos foi de  $7,9 \pm 0,1$  com o máximo de 8,2 e o mínimo de 7,5.

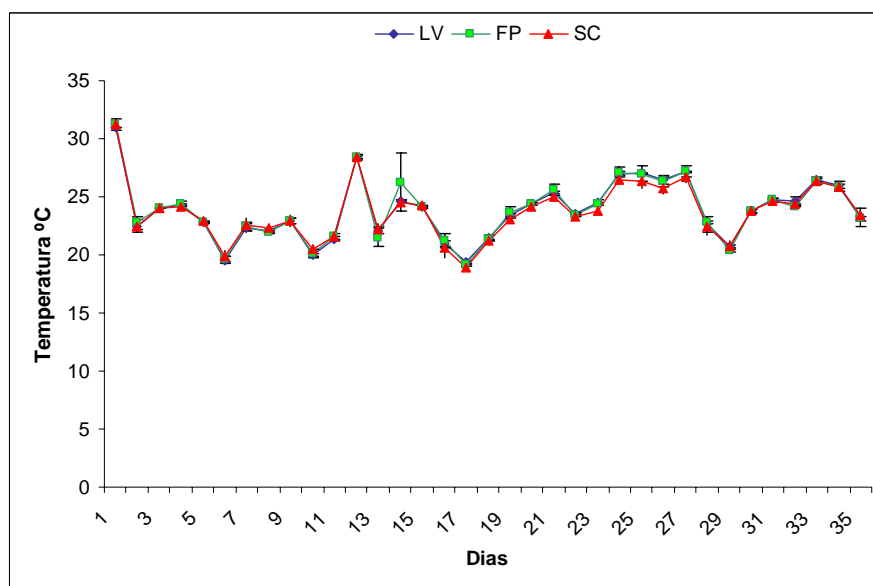


Figura 2: Temperatura da água de cultivo em °C (média ± DP) ao longo do período experimental nos tratamentos LV, FP e SC.

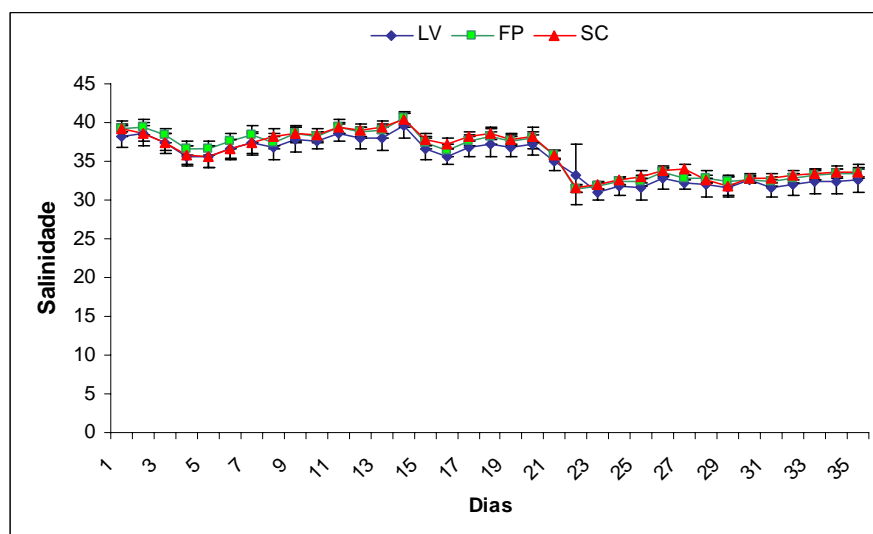


Figura 3: Salinidade da água de cultivo (média ± DP) ao longo do período experimental nos tratamentos LV, FP e SC.

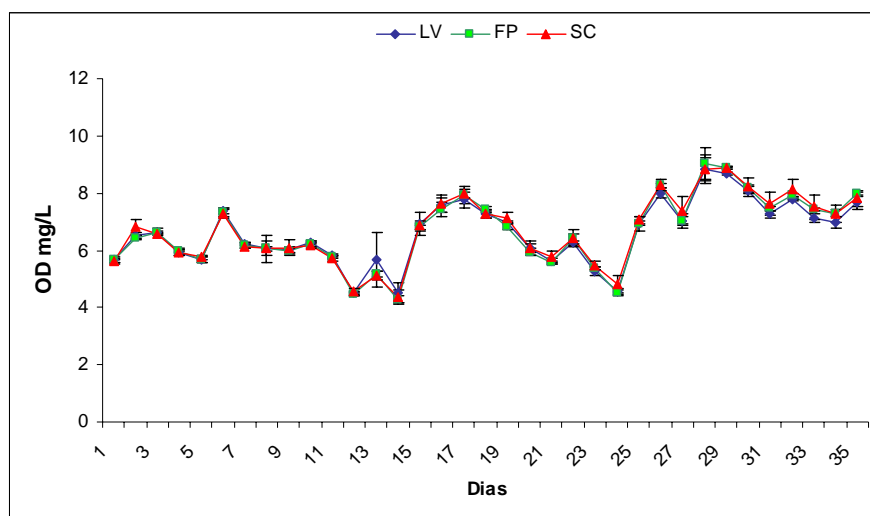


Figura 4: Oxigênio dissolvido na água de cultivo em mg/L (média  $\pm$  DP) ao longo do período experimental nos tratamentos LV, FP e SC.

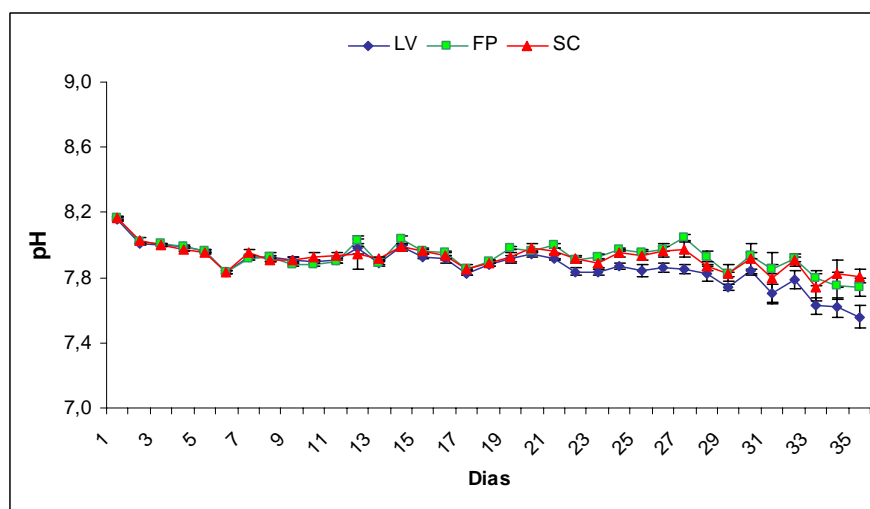


Figura 5: pH da água de cultivo (média  $\pm$  DP) ao longo do período experimental nos tratamentos LV, FP e SC.

#### 4.1.5. Transparência da água (Disco de Secchi)

O tratamento SC apresentou maiores valores de transparência (Figura 6), sendo significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) dos tratamentos LV e FP. O valor médio de transparência da água nos tratamentos foi de  $21,0 \pm 6,12$  cm. O valor máximo de transparência encontrado ao longo do experimento nos tratamentos foi de 36 cm (transparência total) no tratamento SC e o mínimo de 8 cm no tratamento LV.

#### 4.1.6. Sólidos suspensos totais

A média dos valores de sólidos suspensos totais (SST) nos tratamentos foi de  $0,36 \pm 0,05$  g/L. O valor máximo foi de 0,94 g/L no tratamento LV e o mínimo de 0,14 g/L, no tratamento SC. Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ), com menores valores para o tratamento SC em comparação com os tratamentos LV e FP. Os três tratamentos descreveram a mesma tendência até a metade do experimento, depois o tratamento LV aumentou a concentração de SST. O tratamento FP manteve uma estabilidade nos valores de SST ao longo do tempo. Já o tratamento SC, após o 13º dia diminuiu e, posteriormente, aumentou aproximando-se do tratamento FP.

#### 4.1.7. Nutrientes

##### 4.1.7.1. Amônia

A média dos valores de amônia ( $N-NH^3 + N-NH^4$ ) dos tratamentos foi de  $8,0 \pm 20,0$   $\mu M$ . Ao início do experimento, os valores de nitrogênio amoniacal total (NAT) estavam abaixo dos níveis de detecção da metodologia utilizada. O valor máximo encontrado foi um pico de 76,43  $\mu M$  no tratamento SC, os outros valores mantiveram-se abaixo de 35  $\mu M$ , com o valor mínimo de 1,07  $\mu M$  no tratamento FP no último dia (Figura 7). Não houve diferença significativa entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ).

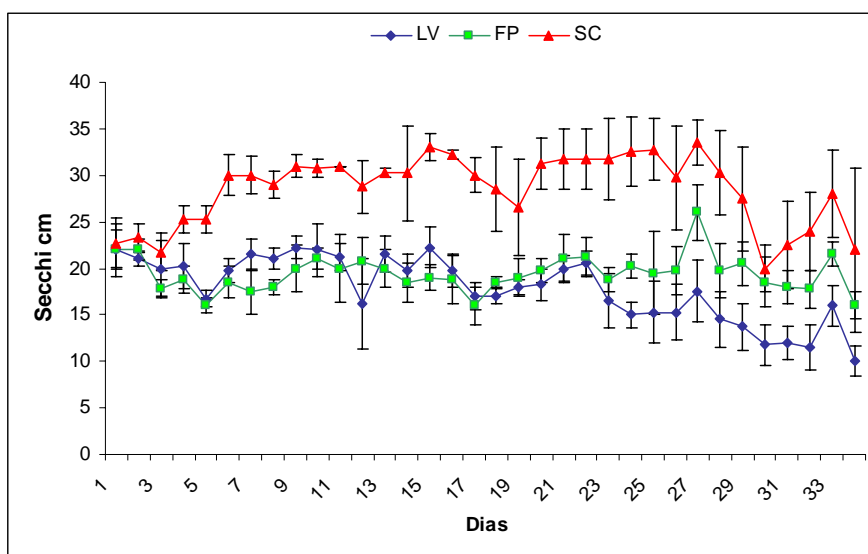


Figura 6: Transparência da água de cultivo (disco de Secchi) em cm (média  $\pm$  DP) ao longo do período experimental nos tratamentos LV, FP e SC.

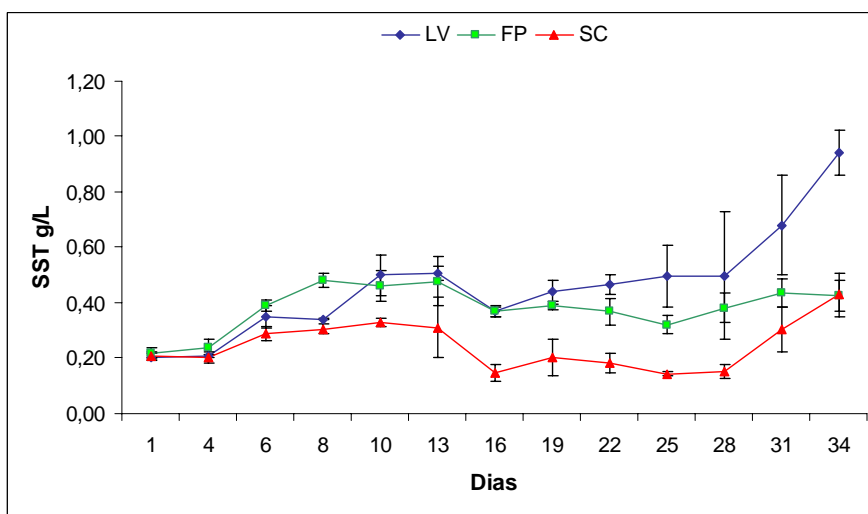


Figura 7: Sólidos suspensos totais na água de cultivo em g/L (média  $\pm$  DP) ao longo do período experimental nos tratamentos LV, FP e SC.

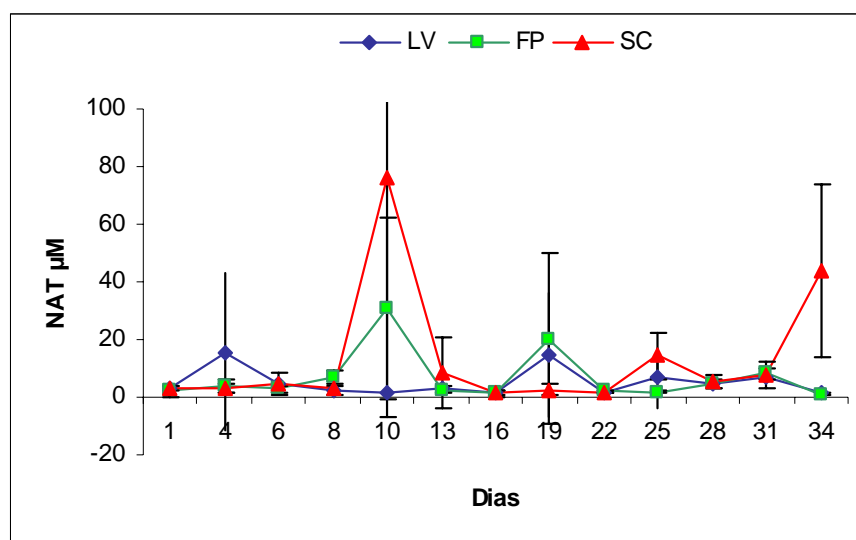


Figura 8: Nitrogênio amoniacal total (NAT) na água de cultivo em  $\mu\text{M}$  (média  $\pm$  DP) ao longo do período experimental nos tratamentos LV, FP e SC.

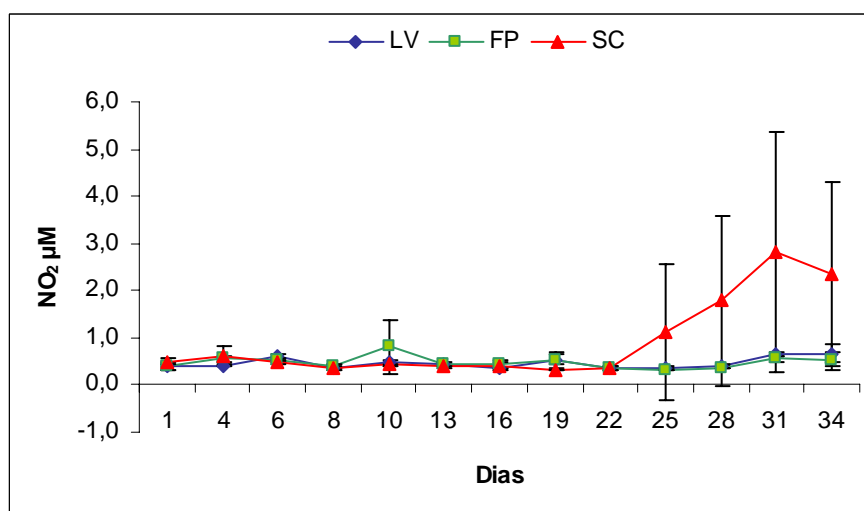


Figura 9: Nitrito na água de cultivo em  $\mu\text{M}$  (média  $\pm$  DP) ao longo do período experimental nos tratamentos LV, FP e SC.

#### 4.1.7.2. Nitrito

A média dos valores de nitrito (N-NO<sup>2</sup>) nos tratamentos foi de  $0,62 \pm 0,77 \mu\text{M}$ , não havendo diferença significativa entre eles ( $p > 0,05$ ). O valor máximo registrado foi de  $5,38 \mu\text{M}$  e o mínimo de  $0,31 \mu\text{M}$  no tratamento SC. A partir do 22º dia de experimento o nível de nitrito aumentou gradativamente no tratamento SC com um pico médio de  $2,82 \mu\text{M}$  ao final do experimento. Os outros valores mantiveram-se abaixo de  $1 \mu\text{M}$  (Figura 8).

#### 4.1.7.3. Fosfato

A média dos valores de fosfato (P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) nos tratamentos foi de  $2,75 \pm 4,74 \mu\text{M}$ . No primeiro dia, a concentração de fosfato no tratamento LV estava abaixo do nível de detecção do método, já para os tratamentos FP e SC o valor foi de  $0,25 \mu\text{M}$ . O valor máximo de fosfato foi de  $18,22 \mu\text{M}$  no tratamento FP seguido de  $16,42 \mu\text{M}$  no tratamento SC no último dia de experimento. Até o 25º dia de estudo os níveis de fosfato se mantiveram abaixo de  $2 \mu\text{M}$  e logo após esse período pode ser observado um aumento na concentração deste elemento nos tratamentos FP e SC, atingindo um máximo de  $18,22 \mu\text{M}$  e mais tarde (no 31º dia) no tratamento LV, chegando a  $6,45 \mu\text{M}$  ao final do experimento neste tratamento (figura 9). A concentração de fosfato de LV diferiu significativamente ( $p < 0,05$ ) dos tratamentos FP e SC.

#### 4.1.7.4. Relação Nitrogênio: Fósforo

A média dos valores da razão nitrogênio: fósforo (razão N:P) foi  $5,80 (\pm 7,0)$ ,  $4,77 (\pm 6,10)$  e  $8,45 (\pm 17,2)$  para os tratamentos LV, FP e SC, respectivamente. Porém desconsiderando o valor do pico do 10º dia ( $64,6$ ), a média da razão N:P no tratamento SC seria de  $3,77 (\pm 3,3)$ . A partir do 22º dia, a razão N:P nos tratamentos FP e SC tenderam a zerar, enquanto que o tratamento LV, se manteve em torno de 5, e caiu nos últimos três dias. Já no tratamento SC, entre o 28º e 31º dias de experimento, a relação N:P estava abaixo de um e, logo após, seus valores elevaram para 2,2 até o 35º dia de experimento. Não houve diferença significativa entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ).

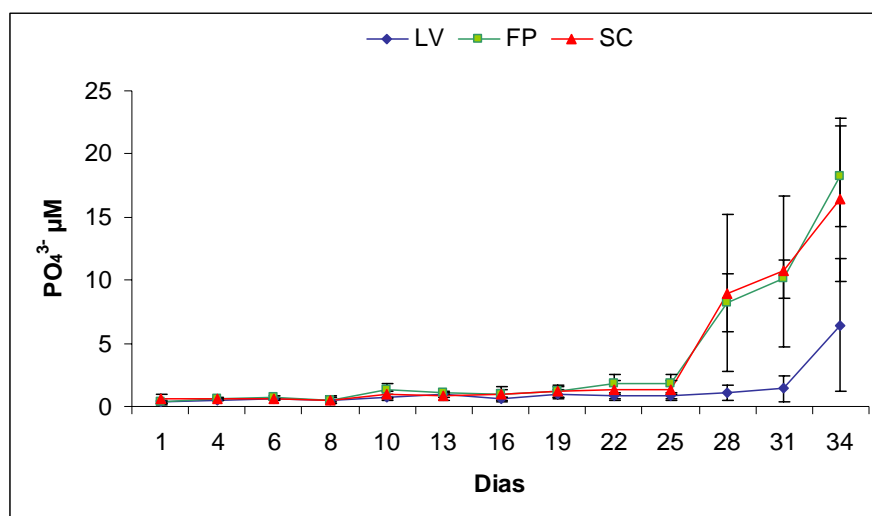


Figura 10: Fosfato na água de cultivo em  $\mu\text{M}$  (média  $\pm$  DP) ao longo do período experimental nos tratamentos.

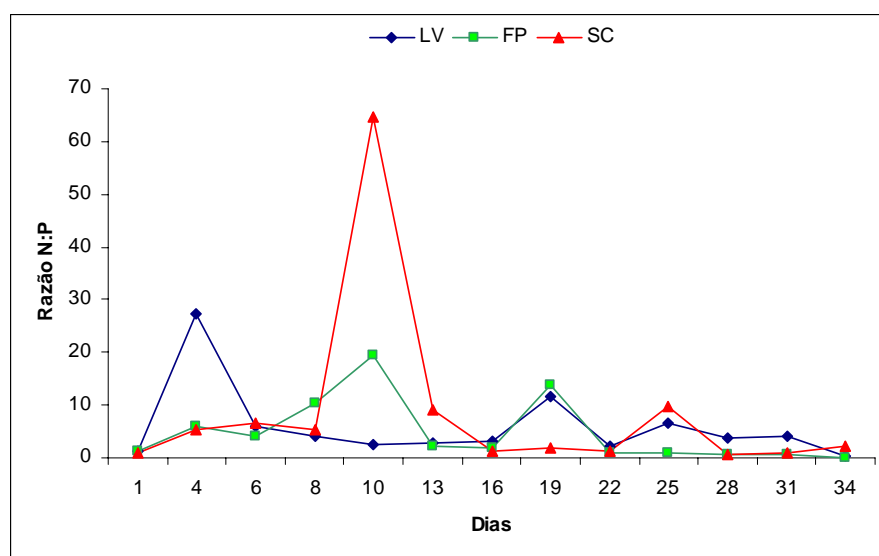


Figura 11: Gráficos da Razão N:P nos tratamentos ao longo do período experimental nos tratamentos LV,FP e SC.



#### 4.1.8. Clorofila *a*

A média de clorofila *a* encontrada nos tratamentos foi de  $114,8 \pm 97,8 \mu\text{g/L}$ . O valor máximo registrado foi de  $323 \mu\text{g/L}$  no tratamento FP no 28º dia de experimento e o valor mínimo encontrado foi de  $3 \mu\text{g/L}$  no tratamento SC no 8º dia de experimento. A figura 12 mostra que no início do período experimental os valores de clorofila foram semelhantes entre os tratamentos decrescendo até o 10º dia, indicando que as diatomáceas inoculadas (*Thalassiosira weissflogii* e *Chaetoceros muelleri*) estavam em senescência. Logo após, a concentração de clorofila *a* nos tratamentos LV e FP aumentaram ao longo do tempo, mas somente as diatomáceas da espécie *Thalassiosira weissflogii* permaneceram até o final do período experimental juntamente com outras espécies provenientes da água captada da orla da praia. Porém, no último dia a clorofila *a* tendeu a cair novamente. Não houve diferença significativa entre os tratamentos LV e FP ( $p > 0,05$ ), apesar de FP ter mantido os níveis de clorofila mais altos. No tratamento SC os níveis de clorofila *a* estiveram sempre abaixo dos outros tratamentos, havendo diferença significativa entre eles ( $p < 0,05$ ). As diatomáceas, que não foram inoculadas, mas estavam presentes nas amostras coletadas eram do gênero *Amphora* e *Cylindrotheca*, principalmente nos tratamentos LV e FP. Outra possibilidade para o aumento dos níveis de clorofila *a* é a presença de colônias de cianobactérias, mais abundantes no tratamento FP do que no LV.

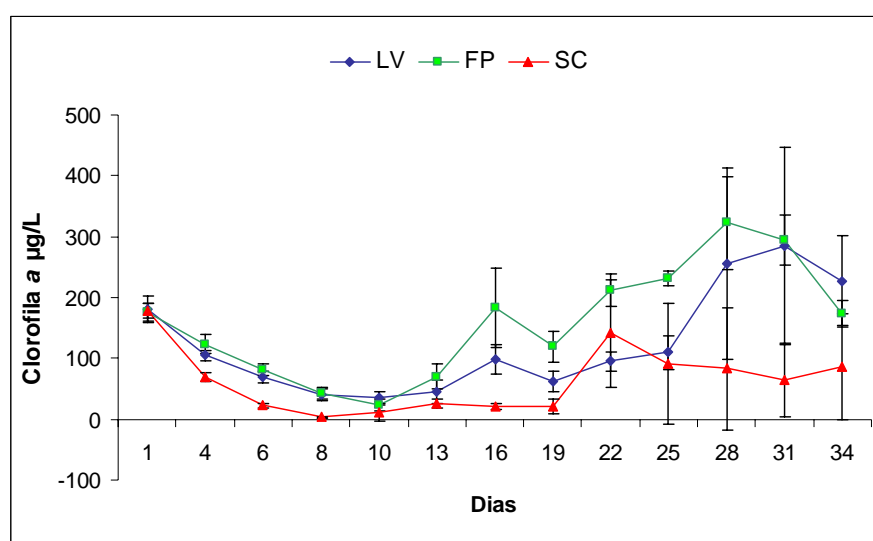


Figura 12 Clorofila *a* na água de cultivo em  $\mu\text{g/L}$  (média  $\pm$  DP) ao longo do período experimental nos tratamentos LV, FP e SC.

## 4.2. Comunidade Microbiana

### 4.2.1. Bactérias Livres

O valor médio do total de bactérias livres foi de  $0,58 \pm 0,72 \times 10^6$  org/mL. O valor máximo foi de  $4,24 \times 10^6$  org/mL no tratamento LV e o valor mínimo de  $0,19 \times 10^6$  org/mL, no tratamento SC (início do experimento). Os três tratamentos apresentaram o mesmo comportamento ao longo do tempo. A partir do 15º dia no tratamento LV o número de organismos permaneceu mais alto em relação aos tratamentos FP e SC. Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos (Fig. 13), mas LV sempre foi mais alto.

A figura 14 mostra os gráficos de bactérias livres ( $10^6$  org/mL  $\pm$  DP), classificadas pela forma – cocos, bacilos e filamentosas – nos tratamentos ao longo do período experimental. Na figura 14A, houve uma tendência em aumentar o número de células ao longo do tempo, principalmente de bactérias cocóides com o valor máximo foi de  $2,19 \times 10^6$  org/mL no dia 30, apresentando um decréscimo no último dia do período de estudo, apresentando menor abundância do que filamentosas.

Na primeira semana de estudo, no tratamento *F. paulensis*, o número de bactérias livres aumentou em todas as formas alcançando um valor máximo de  $1,11 \times 10^6$  org/mL de bactérias cocóides e a partir disso foi decrescendo. Já no último dia de experimento apresentou um pequeno crescimento de bactérias na forma de bacilos ( $0,91 \times 10^6$  org/mL), enquanto as formas de cocos e filamentosas se mantiveram constantes com  $0,58 \times 10^6$  e  $0,34 \times 10^6$  org/mL, respectivamente (Figura 14B).

O valor mínimo de bactérias no tratamento SC (figura 14C) foi de  $0,07 \times 10^6$  org/mL de bactérias cocóides, ao início do período experimental. A figura mostra que o número de bactérias tende a aumentar com a predominância de bactérias na forma de filamentosas e de bacilos com  $1,71 \times 10^6$  e  $1,76 \times 10^6$  org/mL, respectivamente.

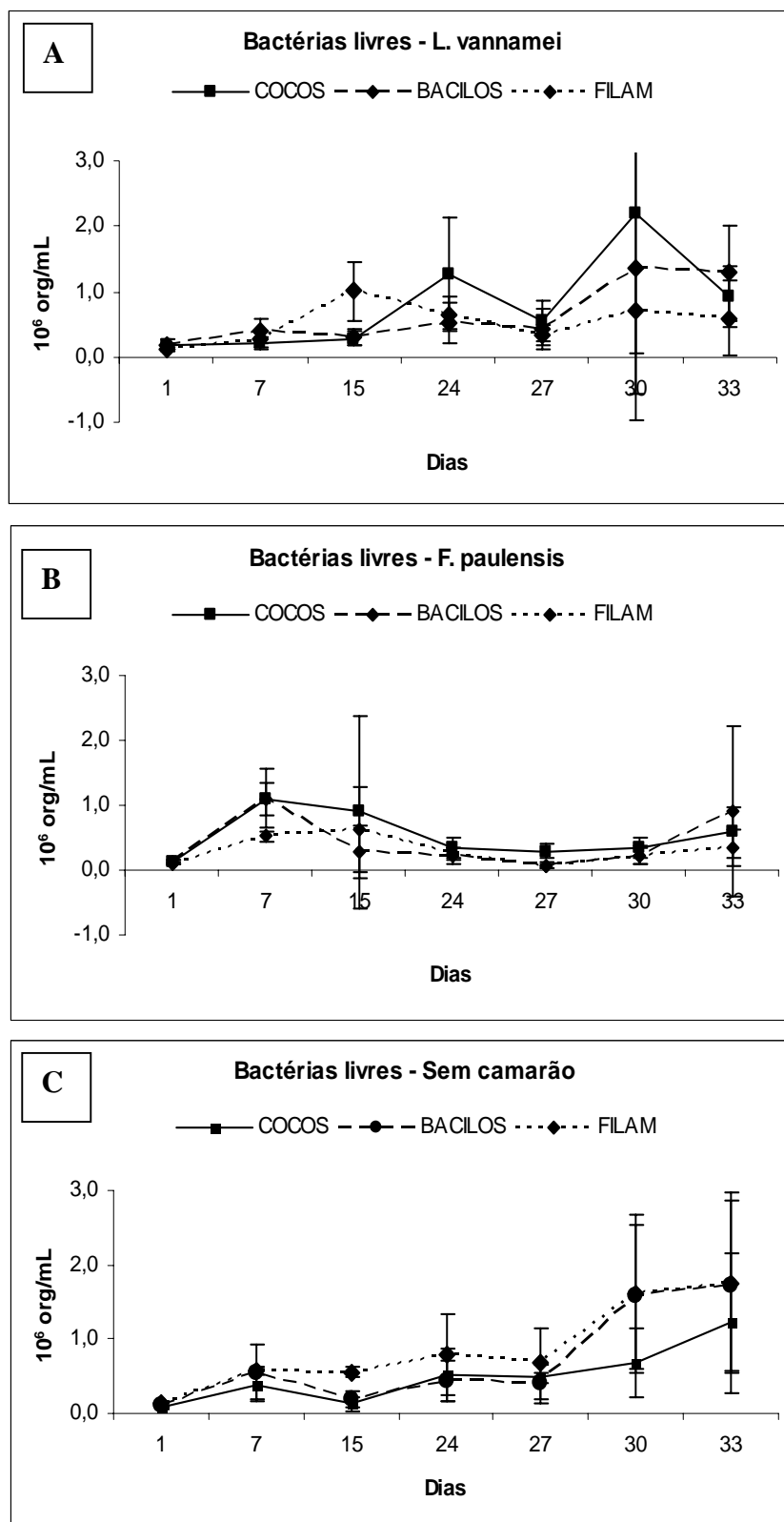


Figura 13: Gráficos de bactérias livres org/mL ( $\pm$  DP), classificadas pela forma – cocos, bacilos e filamentosas – nos tratamentos ao longo do tempo. (A) Tratamento LV; (B) Tratamento FP e (C) Tratamento SC.

#### 4.2.2. Bactérias Aderidas

A média de bactérias aderidas foi de  $0,85 \pm 0,71 \text{ org}/\mu\text{m}^2$ . Na figura 15 observamos que o número de bactérias nos tratamentos LV e FP tende a crescer até o 15º dia de estudo. O tratamento LV, permanece alto até o dia 27 e o tratamento FP tende a cair após o dia 15. Já o tratamento SC, que havia mantido certa constância na quantidade de bactérias, apresentou um crescimento ao final do experimento, chegando a  $4,25 \text{ org}/\mu\text{m}^2$ .

A figura 16 mostra que as formas de bactérias – cocos, bacilos e filamentosas – variam diferentemente nos tratamentos ao longo do tempo. Os tratamentos LV e FP têm o predomínio de formas cocóides aderidas. O valor médio de bactérias no tratamento LV foi de  $1,01 \pm 0,84 \text{ org}/\mu\text{m}^2$ . As bactérias cocóides predominaram durante todo estudo, chegando a um pico máximo de  $2,76 \text{ org}/\mu\text{m}^2$  no 27º dia. As bactérias filamentosas superaram os bacilos até o 15º dia de estudo, quando estes passaram a ser em maior número até o fim do período experimental (Fig. 16 A).

O valor médio de bactérias aderidas no tratamento FP foi de  $0,80 \pm 0,56 \text{ org}/\mu\text{m}^2$ . No início do experimento o número de filamentosas era maior do que o de bacilos, porém, no final eles foram semelhantes. As bactérias cocóides foram predominantes nos agregados durante todo experimento, atingindo o máximo de  $2,29 \text{ org}/\mu\text{m}^2$  no 15º dia (Fig. 16B).

No tratamento SC, o valor médio de bactérias aderidas foi de  $0,73 \pm 0,58 \text{ org}/\mu\text{m}^2$ . As três formas de bactérias apresentaram comportamento semelhante até o 27º dia de estudo; após as bactérias cocóides atingiram  $2,68 \text{ org}/\mu\text{m}^2$ , diferenciando-se dos bacilos e filamentosas que alcançaram aproximadamente  $0,90 \text{ org}/\mu\text{m}^2$  (Fig. 16C).

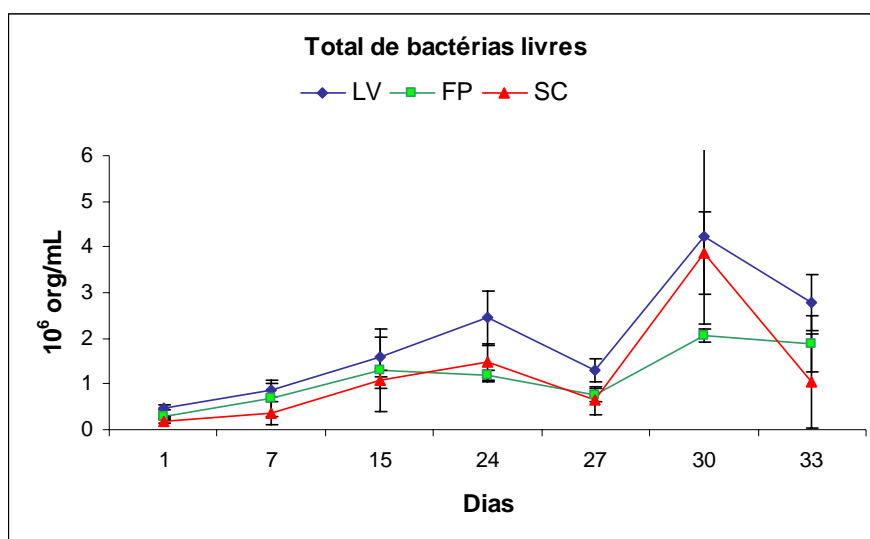


Figura 14: Gráfico Total de bactérias livres org/mL (média  $\pm$  DP) ao longo do período experimental nos tratamentos LV, FP e SC.

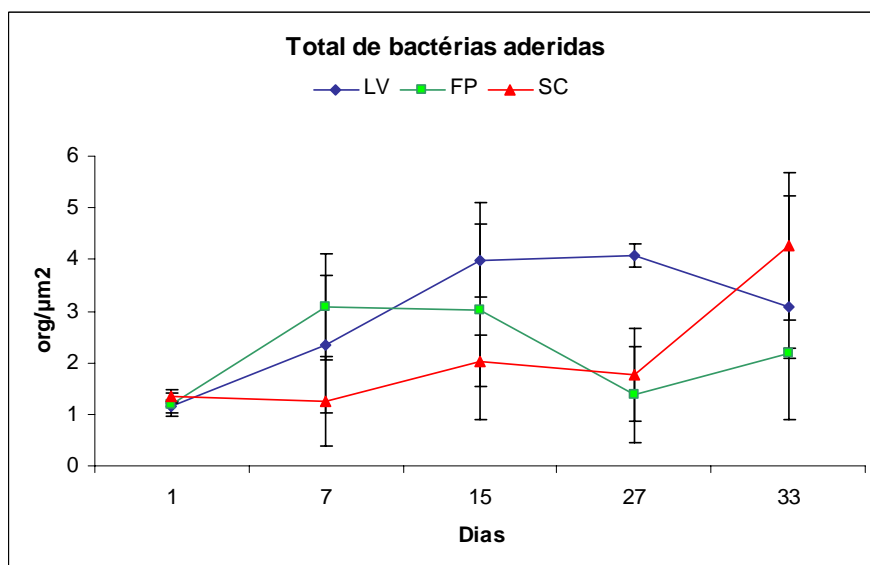


Figura 15: Gráfico do total de bactérias aderidas org/ $\mu\text{m}^2$  (média  $\pm$  DP) ao longo do período experimental nos tratamentos LV, FP e SC.

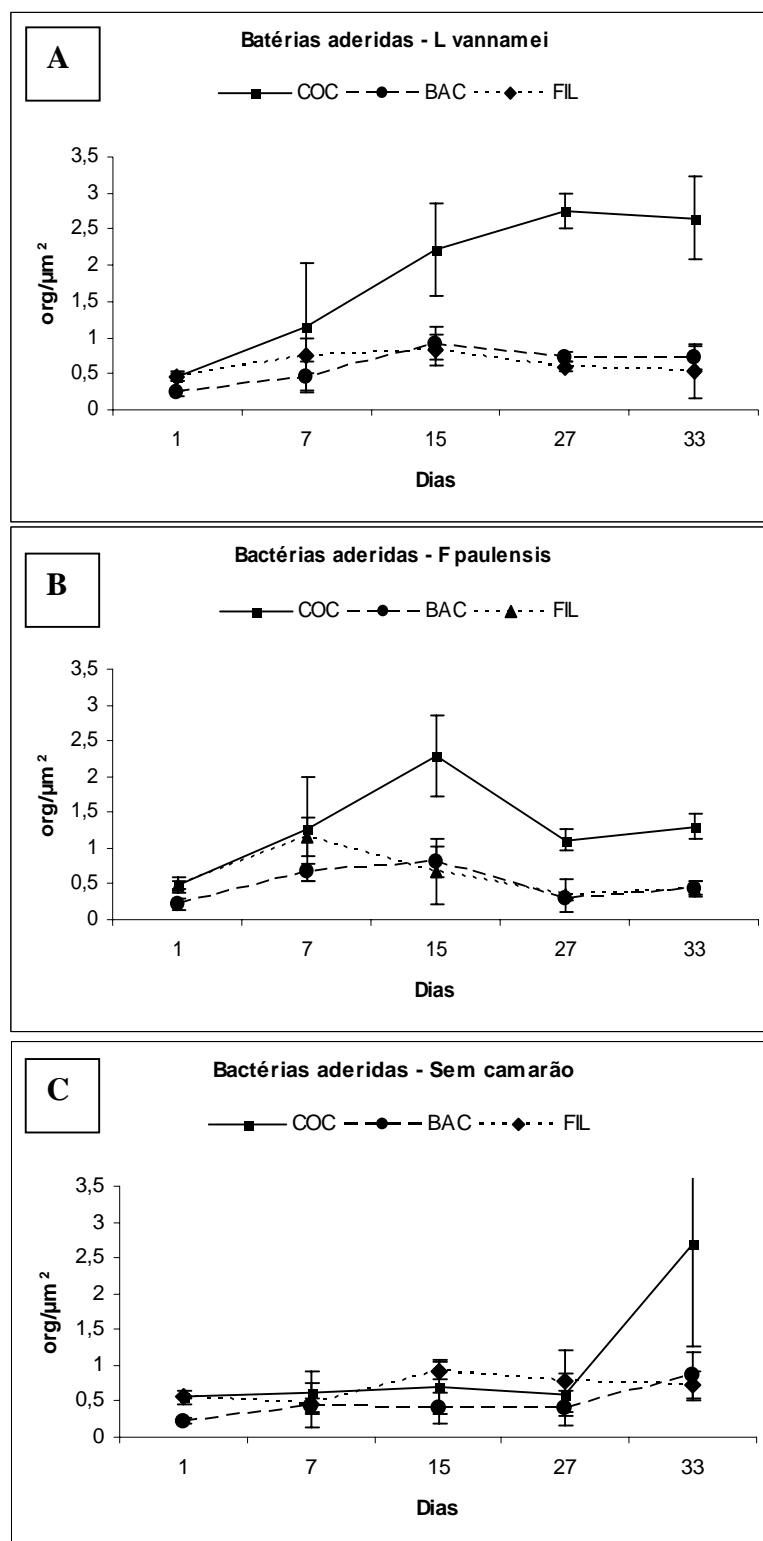


Figura 16: Gráficos de bactérias aderidas  $\text{org}/\mu\text{m}^2$  ( $\pm$  DP), classificadas pela forma – cocos, bacilos e filamentosas – nos tratamentos ao longo do tempo. (A) Tratamento LV; (B) Tratamento FP e (C) Tratamento SC.

#### 4.2.3. Flagelados

O número médio de flagelados ao longo do tempo nos tratamentos foi de  $71 \pm 112 \times 10^3$  org/mL, decrescendo ao longo do tempo nos três tratamentos; o valor máximo foi de  $278 \times 10^3$  org/mL no tratamento LV ao início do experimento. E mínimo ( $10 \times 10^3$  org/mL) foi observado no tratamento SC no 15º dia, e a partir disso, mantiveram aproximadamente a mesma quantidade até o final do experimento (Fig. 17).

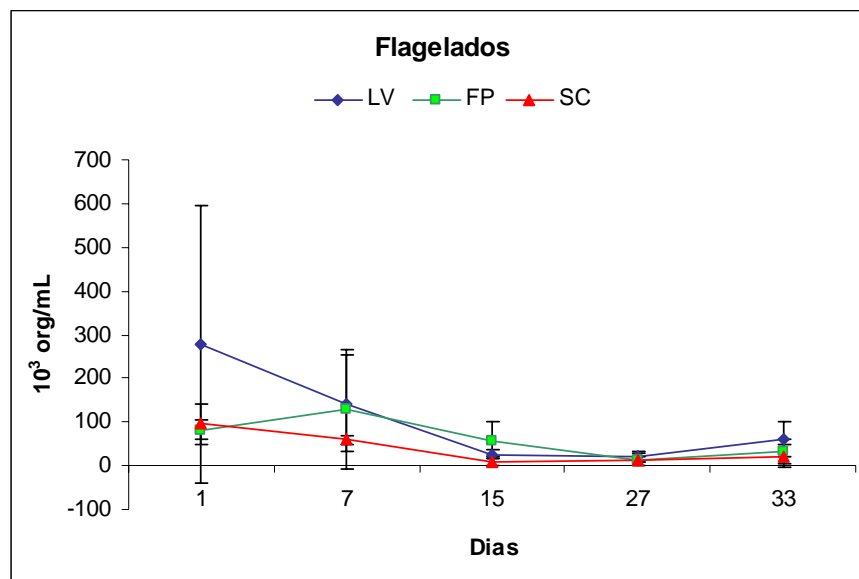


Figura 17: Flagelados em org/mL (média  $\pm$  DP) ao longo do período experimental nos tratamentos LV, FP e SC.

#### 4.2.4. Ciliados

O valor médio de ciliados menores que  $40\mu\text{m}$  nos tratamentos foi de  $57,1 \pm 58,5$  org/mL. Na figura 18 podemos observar que os tratamentos LV e FP apresentaram a mesma tendência até o 30º dia de estudo, porém o tratamento LV teve um aumento brusco chegando a 178 org/mL nos últimos 3 dias, enquanto que o tratamento FP manteve-se constante. Já o tratamento SC, apresentava o menor número de organismos ( $4$  org/mL) no primeiro dia, cresceu até o 24º dia e manteve-se constante até o fim do experimento.

O valor médio de ciliados maiores que  $40\mu\text{m}$  foi de  $14,4 \pm 23,9$  org/mL, com um valor mínimo, ao início do experimento, de aproximadamente  $0,1$  org/mL nos tratamentos. Ao longo do experimento o número de ciliados aumentou nos três tratamentos atingindo o valor máximo  $68,2$  org/mL em SC (Figura 19).

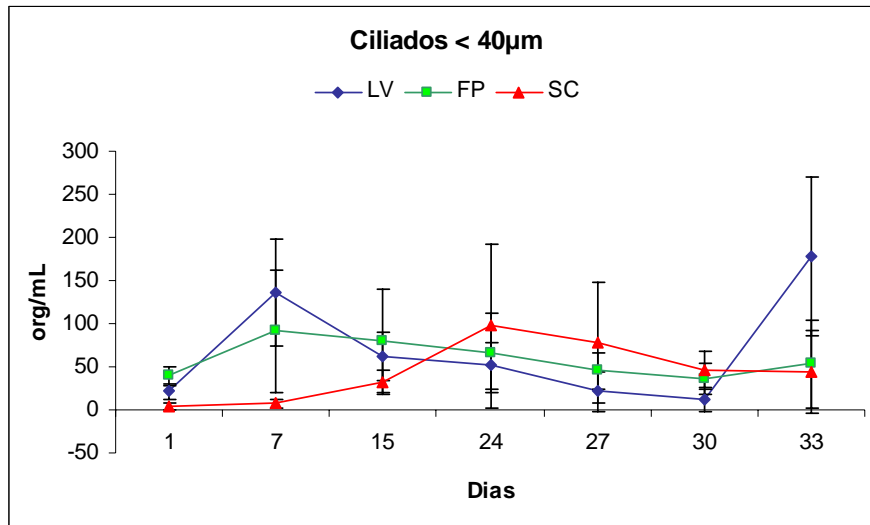


Figura 18: Ciliados menores que 40µm em org/mL (média ± DP) ao longo do período experimental nos tratamentos LV, FP e SC.

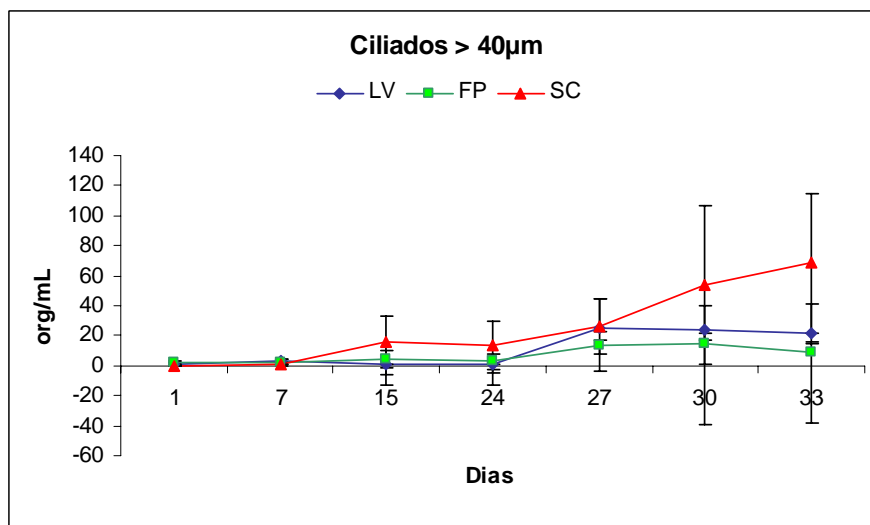


Figura 19: Ciliados maiores que 40µm em org/mL (média ± DP) ao longo do período experimental nos tratamentos LV, FP e SC.



### 4.3. Biometrias

A tabela 03 mostra os dados de sobrevivência, peso inicial e final, ganho de peso, TCA e TCE dos tratamentos LV e FP. As taxas de sobrevivência dos tratamentos LV e FP foram de 94,9% e de 92,4%, respectivamente. O peso inicial (g) dos camarões no tratamento LV foi de 0,06 g e de FP foi de 0,07 g, não havendo diferença significativa entre eles ( $p>0,05$ ). No tratamento LV o peso final foi maior ( $1,03 \pm 0,37$ ) do que o tratamento FP ( $0,43 \pm 0,17$ ), havendo diferença significativa entre eles ( $p<0,05$ ). O ganho de peso ( $P_f - P_i$ ) também foi maior no tratamento LV (0,97 g) do que no tratamento FP (0,36 g). A taxa de conversão alimentar (TCA) foi menor no tratamento LV (1,09) do que no tratamento FP (1,61). Quanto a taxa de crescimento específico – TCE – verificou-se um crescimento mais rápido nos camarões presentes no tratamento LV (8,2%/dia), significativamente maior do que em FP (5,2%/dia). Na Figura 20, podemos observar a variação do peso dos camarões, em gramas, ao longo do período experimental, onde os camarões do tratamento LV começam a crescer quase o dobro dos camarões do tratamento FP a partir do 24º dia de estudo. Houve diferença significativa entre os tratamentos LV e FP na biometria feita no 24º dia de experimento ( $p<0,05$ ).

Tabela 3: Dados de peso inicial, peso final, ganho de peso em gramas ( $\pm$  DP), sobrevivência (%), Taxa de Conversão Alimentar - TCA ( $\pm$  DP) e Taxa de Crescimento Específico – TCE ( $\pm$  DP). Letras diferentes = diferença significativa.

	<b>LV</b>	<b>FP</b>
Sobrevivência (%)	94,9 ( $\pm 5,6$ )	92,4
Peso inicial (g)	0,06 ( $\pm 0,06$ )	0,07 ( $\pm 0,07$ )
Peso final (g)	1,03 ( $\pm 0,37$ ) <sup>a</sup>	0,43 ( $\pm 0,17$ ) <sup>b</sup>
Ganho de Peso ( $P_f - P_i$ )	0,97	0,36
TCA	1,09 ( $\pm 0,15$ )	1,61 ( $\pm 0,04$ )
TCE (%)	8,2( $\pm 0,24$ ) <sup>a</sup>	5,2( $\pm 0,19$ ) <sup>b</sup>

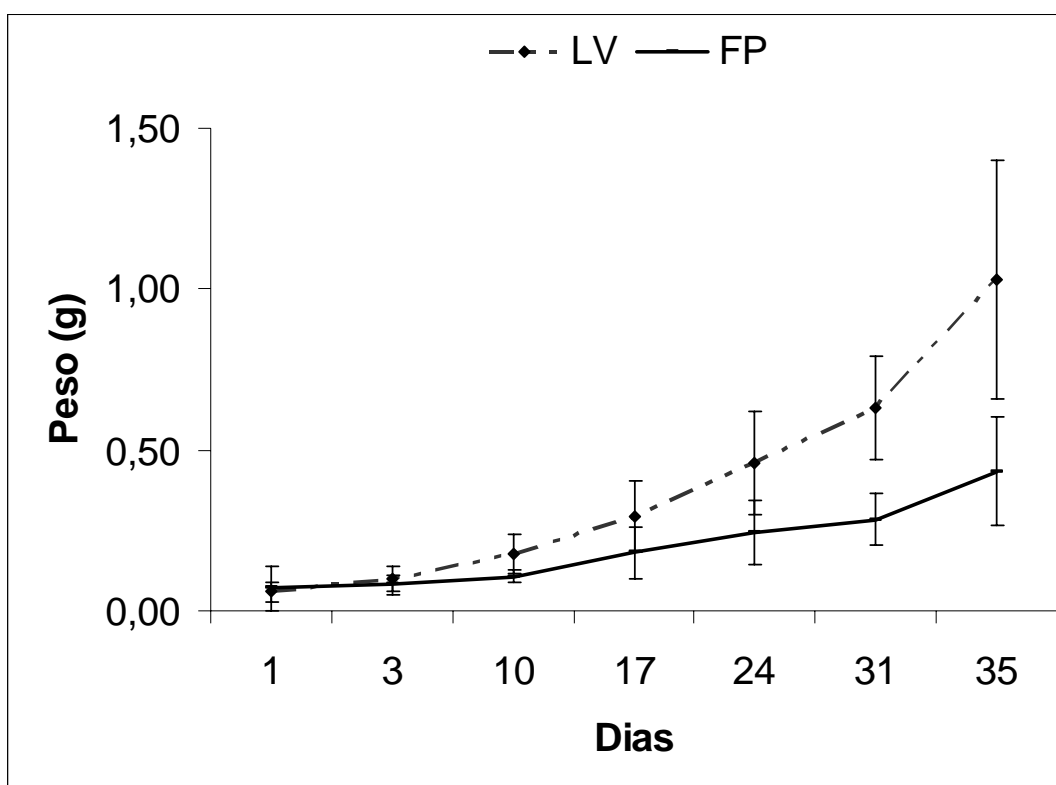


Figura 20: Peso em gramas (média  $\pm$  DP) ao longo do tempo nos tratamentos LV, FP e SC.

## 5. Discussão

A presença de camarões de espécies distintas parece influenciar na formação dos flocos microbianos em ambientes de cultivo heterotrófico intensivo, como evidenciado pelos valores diferenciados de material em suspensão (SST) nos três tratamentos (Fig. 7). Além disso, observou-se também diferentes concentrações de nutrientes (principalmente fosfato) e distintas relações N:P (Figs 10 e 11) nos tanques com *Litopenaeus vannamei* (LV), *Farfantepenaeus paulensis* (FP) e aqueles sem camarão (SC). No tratamento SC, os níveis elevados de fosfato deveram-se unicamente à decomposição da ração, que foi colocada diariamente nos tanques. Já no tratamento FP, os camarões parecem não ter absorvido o fósforo proveniente da ração consumida, fazendo com que os valores de fosfato sejam semelhantes aos do tratamento SC. As baixas concentrações de fosfato na água do tratamento LV na maior parte do tempo indicam que o camarão-branco tem maior capacidade de retenção de fósforo em sua biomassa. Por outro lado, os baixos níveis de fosfato medidos até o 25º dia de experimento em todos os tratamentos resultaram, principalmente, da absorção deste elemento pelos microorganismos presentes nos tanques.

A principal fonte de nitrogênio e fósforo nos sistemas de cultivo provém da decomposição da ração não ingerida (lixiviação) e das excretas dos organismos cultivados (Barak *et al.* 2003). No caso do camarão, a excreção é realizada pelas brânquias, glândulas antenais e fezes. A maior parte do nitrogênio inorgânico é proveniente da excreção do camarão realizada através das brânquias (amônia) e glândulas antenais (uréia). Nas fezes e ração não ingerida além de nitrogênio inorgânico, também é liberado nitrogênio orgânico como aminas primárias dissolvidas, entre outros (Burford & Williams 2001). Com relação ao fósforo, a excreção deste elemento se dá por meio das fezes (fósforo não digerido) ou da urina (fósforo absorvido) sendo que, neste último caso, ocorre a eliminação do fósforo excedente que foi metabolizado, mas não utilizado para o crescimento do camarão (Hardy & Gatlin 2002).

A excreção de fosfato pelos camarões depende não só da quantidade deste elemento, mas também da forma na qual é oferecido nas rações (Hua *et al.* 2006). Os ingredientes da ração contribuem com quantidades diferentes de fósforo orgânico. As

formas de fósforo orgânico e inorgânico apresentam diferentes ‘dinâmicas’ no sistema de cultivo devido às diferenças de solubilidade na água e de assimilação pelo camarão (Montoya *et al.* 2000). Por exemplo, a utilização do elemento fitato de fósforo, presente nas sementes de plantas utilizadas como fonte de proteína em rações (ex. soja), não é facilmente digerível pela maioria dos organismos cultivados, havendo a necessidade de adição de uma enzima, a fitase, para melhorar a absorção do fósforo pelo organismo cultivado (Davis *et al.* 1993; Hardy & Gatlin 2002).

Tem sido reportada uma ampla variação no requerimento de fósforo na dieta para a obtenção do melhor crescimento do camarão. A concentração ideal deste elemento pode variar entre 0,3 e 2% na dieta de diferentes espécies de camarões peneídeos (Hardy & Gatlin 2002). Porém, níveis excedentes de fósforo na dieta podem afetar negativamente a digestibilidade e absorção deste elemento (Rodehutschord *et al.* 2000; Sugiura *et al.* 2000). Além disso, verificou-se que a excreção de fósforo em *Penaeus monodon* aumentou proporcionalmente com o aumento de fósforo na dieta enquanto que os níveis de excreção excederam os níveis de fósforo corporal no camarão alimentado com dietas suplementadas com fósforo acima de 1,5% (Ambasanakr *et al.* 2006).

A maioria das rações de camarões marinhos no Brasil são produzidas utilizando a farinha de peixe como principal fonte protéica. A farinha de peixe tem grande quantidade de fósforo devido ao carbonato de fósforo presente nos ossos e escamas dos peixes. Cavalli *et al.* (2004) mostraram que a farinha de peixe não é a melhor fonte de proteína para o camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis*, tendo esse apresentado a menor taxa de crescimento quando alimentado com esta fonte protéica, em comparação com rações formuladas com farinhas de lula e mexilhão. Abe *et al.* 2008, em uma dieta com 60% de substituição de farinha de peixe por farelo de soja proporcionou maiores taxa de crescimento específico e peso final para as pós-larvas de *F. paulensis*. É possível então, que a ração fornecida em nosso estudo (Ração Supra, formulada especificamente para *L. vannamei* com 1,5 % de P) não seja adequada para *F. paulensis* no que se refere às concentrações, forma e digestibilidade do fósforo havendo, por isso, maior eliminação deste elemento pela excreção do camarão.

Foi estimado que 13% do fósforo disponibilizado na forma de alimento é incorporado a biomassa de camarões peneídeos, sendo que o resto contribui para

eutrofização da água de cultivo (Peñaflorida 1999). Entretanto, para o camarão *L. vannamei*, Velasco *et al.* (1998) verificaram, através de uma análise de balanço de massa, que esta espécie pode absorver até 23% do fósforo disponível na ração. Esta maior absorção de fósforo está diretamente relacionada aos altos níveis de crescimento apresentado por este camarão. Em nosso estudo o ganho de peso e peso final de *L. vannamei* foi duas vezes maior do que o de *F. paulensis*.

Em função dos fatos apresentados anteriormente pode-se supor que as maiores concentrações de fosfato obtidas nos tanques contendo o camarão *Farfantepenaeus paulensis* decorreram da absorção parcial deste elemento disponível na ração que não é a mais adequada para esta espécie de camarão peneídeo, seja pelos níveis inadequados de fósforo ou pela forma com que este é adicionado a ração (não informado pelo fabricante). Por outro lado, o baixo nível de fósforo nos tanques de *Litopenaeus vannamei* pode ter resultado da melhor absorção deste elemento presente em uma ração formulada especificamente para esta espécie. Além disso, o desempenho zootécnico excepcional de *L. vannamei* com elevado crescimento e significativo ganho de peso indica que grande parte do fósforo consumido foi assimilado em biomassa formada.

Tendo-se determinado quais motivos levaram às possíveis diferenças nas concentrações e proporções de nutrientes (relações N:P) nos três tratamentos, resta discutir de que forma isso pode ter contribuído para a maior ou menor quantidade de agregados microbianos nos diferentes tanques. Sabe-se que as bactérias são responsáveis por grande parte da incorporação do nitrogênio e fósforo em ambientes tanto de água doce como salgada e que estas levam vantagem na competição por nutrientes com o fitoplâncton e cianobactérias, tendo maior capacidade de assimilação de nutrientes devido a sua maior relação superfície/volume (Kirchman 2000). A clorofila *a* (Fig. 12) medida nos tanques de cultivo foi bastante elevada, mas mostrou um incremento substancial a partir do 15º dia com o aumento de cianobactérias que se beneficiaram principalmente das maiores quantidades de fósforo na água.

As bactérias têm menor relação C:N:P do que o fitoplâncton devido à maior quantidade de ácidos nucléicos. Goldman *et al.* (1987) encontrou uma razão molar C, N e P de 45:9:1 para bactérias, consideravelmente menor do que a razão molar de Redfield 106:16:1 para o fitoplâncton (Lalli & Parsons 1993). Porém, o conteúdo de C:N:P das

bactérias pode variar entre os táxons e, além disso, as condições de crescimento também podem afetar sua composição elementar.

Observando-se os gráficos de sólidos em suspensão (Fig. 7) e de bactérias aderidas (Fig. 16) vê-se que existe uma estreita relação entre a quantidade de agregados e a presença de bactérias cocóides. As bactérias cocóides aderidas foram dominantes no tratamento LV. Deve-se ressaltar que neste tratamento os valores médios da relação N:P foram maiores (5,8:1) do que nos demais tratamentos, onde a relação N:P foi, em média, menor do que 5:1, indicando que a relação N:P mais elevada favorece as bactérias cocóides. Note-se que nos últimos dias de experimento, houve aumento significativo na concentração de  $\text{NH}_4^+$  e, conseqüentemente, na relação N:P no tratamento SC, havendo também um aumento no número de bactérias cocóides e na concentração de SST, chegando a se aproximar de FP (Figs. 7, 8, 9, 11 e 16). Estes fatos reforçam a hipótese de que a maior relação N:P favorece as bactérias cocóides e que estas participam na formação dos flocos microbianos. Não foi verificada qualquer relação entre a quantidade de agregados microbianos e a abundância de bactérias livres (Figs. 7, 13 e 14), indicando que este grupo de bactérias não deve ter grande participação no processo de formação dos agregados microbianos nos sistemas de cultivo.

É conhecido o fato que algumas espécies de bactérias produzem grandes quantidades de exopolissacarídeos transparentes (“Transparent Exopolisaccharids –TEP”). Mas a liberação de TEP não depende somente das espécies, mas também do estado fisiológico das células e condições ambientais (Passow & Aldredge 1995). Berman & Passow (2007), observam que em ambientes aquáticos, TEP são os principais iniciadores do biofilme em superfícies naturais e artificiais. Os TEPs apresentam alto nível de aderência facilitando, por isso, a agregação de partículas. Além disso, Stoderegger (1999) observou que o carbono orgânico dissolvido (COD) capsular produzido pelas bactérias coagulam partículas de exopolímeros em condições de grande turbulência. Os mesmos autores evidenciaram que as bactérias liberam altas quantidades de exopolímeros, os quais sofrem coagulação espontânea levando à formação de partículas visíveis.

Algumas microfotografias feitas com material de nosso estudo mostram bactérias cocóides envoltas em grande quantidade de muco (Figura 21). Sendo assim,

pode-se dizer que aumento da relação N:P dos tanques favoreceu as bactérias cocóides produtoras de muco e que este fato levou a formação de maior quantidade de agregados nos tanques contendo o camarão *Litopenaeus vannamei*.

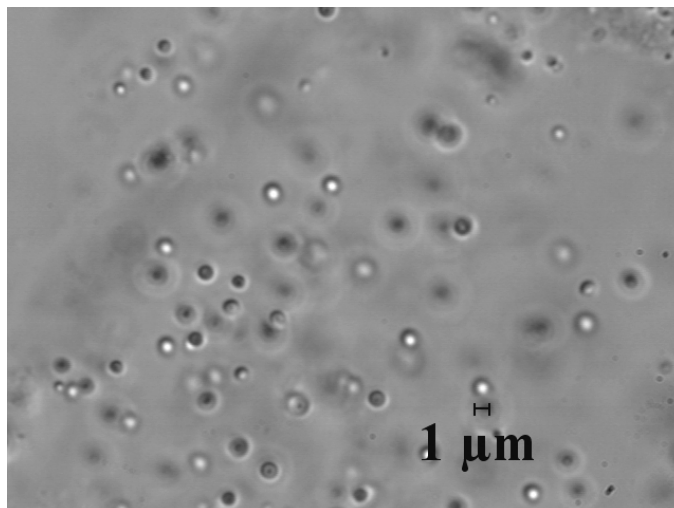


Figura 21: Fotos de bactérias cocóides presentes no floco microbiano com aumento de 1000x (Foto de L. Godoy).

A formação dos agregados é um processo complexo que envolve interações físicas, químicas e biológicas entre as partículas. Nos primeiros dias há o crescimento de bactérias que se utilizam da matéria orgânica dissolvida para seu crescimento. Durante o desenvolvimento das bactérias há a produção de muco (TEP) que facilita o aumento do tamanho das partículas. Em seguida, ocorre o crescimento de protozoários (flagelados, ciliados e microorganismos amebóides), principais predadores das bactérias. Esses consomem as bactérias e estruturas aderidas, levando ao rompimento da integridade dos agregados pela sua atividade de predação, o que contribuiria para a ruptura dos agregados e diminuição de seu tamanho (Biddanda & Pomeroy 1988).

Em nosso estudo verificou-se uma relação inversa entre a abundância de flagelados e de ciliados maiores de 40 μm (Figuras. 17 e 19) e também uma relação inversa entre flagelados e bactérias livres (Figs. 13 e 17) indicando uma possível sucessão de predação entre estes diferentes grupos de microorganismos. Não foi verificada qualquer relação de predação entre as bactérias aderidas e seus prováveis predadores (flagelados e ciliados). Apesar da existência de interações tróficas entre os microorganismos nos tanques de cultivo, não se pode dizer que estas interações tenham

contribuído para a maior, ou menor, quantidade de agregados nos diferentes tratamentos. Por outro lado, foi possível ver o efeito da predação dos camarões sobre os ciliados nos tratamentos LV e FP, pois nestes os ciliados estiveram presentes em menor abundância do que no tratamento SC. É possível, portanto, que a menor quantidade de agregados no tratamento SC tenha resultado de um efeito cascata, onde a maior abundância de ciliados tenha levado à diminuição de bactérias cocóides. Por outro lado, os camarões predando sobre os ciliados reduziriam a pressão de predação sobre as bactérias produtoras de muco num típico controle “Top-Down” (Carpenter & Kitchell 1993).

Com relação ao quarto objetivo deste estudo, isto é, comparação do efeito dos flocos microbianos no crescimento de *L. vannamei* e *F. paulensis*, verificou-se que os valores de salinidade, OD e pH estiveram dentro dos níveis recomendados para o cultivo de camarões peneídeos, exceto a temperatura, que pode ter comprometido o crescimento do camarão-branco que ainda assim apresentou maior crescimento do que o camarão-rosa. Da mesma forma, os valores encontrados para nitrogênio na forma de amônia e de nitrito se apresentaram abaixo dos níveis tóxicos para as duas espécies. Como resultado destas boas condições de cultivo a sobrevivência das duas espécies de camarão foi elevada. Entretanto, o ganho de peso e peso final do tratamento LV foi duas vezes maior do que FP.

O camarão-rosa, *F. paulensis*, é considerado onívoro oportunista com tendência a carnívoro. No entanto, quando comparado a *L. vannamei*, *F. paulensis* tem hábito alimentar mais carnívoro (Lemos *et al.* 2004). Peixoto *et al.* (2003) comparando o cultivo em viveiros, com troca de água, de *L. vannamei* e de *F. paulensis* na região Sul do Brasil, obtiveram resultados significativos de sobrevivência, crescimento e TCA de *L. vannamei* em relação a *F. paulensis*. Turkmen (2005), avaliando o desempenho de duas espécies de camarão, uma omnívora, *Penaeus semisulcatus*, e outra carnívora, *Penaeus japonicus*, obtiveram melhor desempenho zootécnico de *P. semisulcatus*, com valores de 82%, 0,103 g/dia, 4,27 e 3,28 %dia<sup>-1</sup> em relação a *P. japonicus* com valores de 59,3%, 0,039 g/dia, 6,43 e 4,12 %dia<sup>-1</sup> para sobrevivência, crescimento, TCA e TCE, respectivamente. Ressaltando que nesse estudo os parâmetros de qualidade de água, exceto a salinidade que pode ter afetado o crescimento de *P. semisulcatus*, estavam favoráveis para o cultivo das duas espécies. Todavia a espécie onívora, *P. semisulcatus*,



devido ao seu menor requerimento protéico, atingiu peso final mais elevado do que a espécie carnívora *P. japonicus*. Assim como em nosso estudo *L. vannamei* obteve melhor desempenho zootécnico do que *F. paulensis* (Tabela 3), embora o desempenho do camarão-rosa também tenha sido satisfatório, em comparação com outros estudos realizados com esta espécie, para sistemas com troca de água (Peixoto *et al.* 2003) e sem troca de água (Emerenciano *et al.* 2006, Ballester *et al.* 2007, 2008).

De acordo com a taxa de crescimento específico (TCE), verifica-se que *L. vannamei* apresentou quase o dobro da capacidade de crescimento diário do que *F. paulensis* (Tabela 3), ressaltando mais uma vez a maior capacidade de assimilação dos nutrientes desta espécie em sua biomassa. Wyban *et al.* (1995) observaram que a TCE de *L. vannamei* de 2,52 e 4,19% $\text{dia}^{-1}$ , em sistemas abertos, em temperatura de 23°C e 27°C, respectivamente. Kuhn *et al.* 2008, demonstrou que a oferta de ração e adição de flocos microbianos, como fonte alimentar suplementar, melhora o crescimento e a TCE de *L. vannamei*. Tacon *et al.* 2002, em cultivo de *L. vannamei* em sistemas ZEAH encontrou TCE de até 4,43% $\text{dia}^{-1}$ . Chama a atenção o fato de que em nosso estudo, utilizando o mesmo sistema de cultivo, os valores de TCE encontrados por nós foram duas vezes maiores do que aqueles determinados por Tacon *et al.* (2002), sugerindo que diferenças no manuseio do sistema ZEAH podem ainda resultar em maiores ganhos de peso de *L. vannamei*.

Sabe-se que a espécie *L. vannamei* utiliza os flocos microbianos como fonte de alimento suplementar melhorando a taxa de conversão alimentar (TCA) (Bratvold & Browdy 2001, Moss & Moss 2004, Wasielesky *et al.* 2006). A TCA aparente no tratamento LV ( $1,09 \pm 0,15$ ) foi menor do que valores medidos em cultivos em água clara (somente ração), o que nos permite corroborar a hipótese que a biota nos tanques de cultivo serviu como fonte alimentar suplementar para o cultivo de *L. vannamei*. Porém para o tratamento FP, a TCA do camarão-rosa ( $1,61 \pm 0,04$ ) foi semelhante às de cultivos de *F. paulensis* em sistemas de água clara. Peixoto *et al.* (2003) encontrou TCA de *F. paulensis* de 1,71. Estes resultados surpreendem uma vez que Abreu *et al.* (2007) estudando o consumo de microorganismos por *F. paulensis* no biofilme de sistemas de cultivo através da técnica de isótopos estáveis mostrou que os microorganismos podem representar até 70% do consumo de nitrogênio e 50% do consumo de carbono necessários ao crescimento deste camarão. Tais diferenças encontradas entre o consumo

de microorganismos presentes no biofilme e em floco microbianos pode ser resultado de hábitos alimentares diferenciados de *F. paulensis*. Por outro lado, cultivos de *F. paulensis* realizados em um sistema em meio a flocos microbianos, mostrou que os níveis de proteína de ração podem ser significativamente reduzidos (de 40 para 30% de proteína bruta) sem diferença significativa nos resultados de sobrevivência, crescimento e FCA (Ballester *et al.* 2008 submetido).

### **5.1. Perspectivas**

Os resultados obtidos neste estudo nos indicam que a manipulação das quantidades e proporções de N e P no meio de cultivo pode aumentar a qualidade do floco microbiano. Em futuros estudos deve-se testar quais as relações N:P mais beneficiam o crescimento das bactérias cocóides no sistema e, conseqüentemente, a quantidade de flocos microbianos. Deve-se também avaliar os efeitos de fertilizações com diferentes elementos nitrogenados como amônia e uréia, sobre a microbiota e também sobre o desempenho dos camarões, uma vez que amônia e nitrito são tóxicos para os camarões peneídeos (VanWyk & Scarpa 1999).

Devem-se empreender esforços no sentido de se identificar as espécies de bactérias produtoras de muco através de técnicas de biologia molecular. O isolamento e cultivo destas bactérias poderão representar uma importante ferramenta na produção de agregados marinhos nos sistemas de cultivo intensivo e heterotrófico.

Seria interessante testar a formação de agregados com diferentes espécies de microalgas produtoras de muco, ou ainda espécies do fitoplâncton que estimulam as bactérias a formar muco e por conseqüência flocos microbianos e verificar quais seus efeitos sobre a qualidade de água do meio e desempenho dos camarões.

Deve-se verificar qual o papel das cianobactérias na comunidade microbiana, se servem como fonte alimentar para os organismos cultivados já que elas estão presentes em abundância nos flocos microbianos.

Para o camarão-rosa, *Farfantepenaeus paulensis*, que não possui uma ração apropriada, seria interessante a possível manipulação dos nutrientes para diminuir os teores de fósforo e induzir a formação de uma comunidade microbiana que sirva como suplemento alimentar, já que o floco formado neste estudo não mostrou ser atrativo ou capaz de suprir as necessidades nutricionais desta espécie.

## 6. Referências bibliográficas

- ABREU, PC, ELC BALLESTER, C ODEBRECHT, WJ WASIELESKY, RO CAVALLI, W GRANÉLI & AM ANÉSIO. 2007. Importance of biofilm as food source for shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*) evaluated by stable isotopes (d13C and d15N). *J Exp Mar Biol Ecol.*, 347: 88–96.
- ABE MP, CN FROES, C PRENTICE-HERNÁNDE, WJ WASIELESKY & RO CAVALLI. 2008. Substituição da farinha de peixe por farelo de soja em dietas práticas para o camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*). *Ciência Rural*, 38: 219-224.
- ALLDREDGE, AL & MW SILVER. 1988. Characteristics, dynamics and significance of marine snow. *Prog. Oceanogr.*, 20: 41–82.
- AMBASANAKR, S, A ALI & JS DAYAL. 2006. Effect of dietary phosphorus on growth and its excretion in tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Asian Fisheries Society*, 19: 1–96. (abstract).
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2000. Official Methods of Analysis of AOAC, 16ed., Patricia Cunniff (editora), Washington, DC.
- ARANTES, RF. 2007. O efeito da relação Carbono-Nitrogênio sobre a comunidade microbiana no cultivo super-intensivo de *Litopenaeus vannamei* sem renovação. Florianópolis, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, 39p.
- AVNIMELECH, Y. 1999. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture*, 176: 227–235.
- AZAM, F. 1982. Measurement of growth of bacteria in the sea and the regulation of growth by environmental conditions. In: Hobbie, J., Williams, P. J., Le B. (eds.) Heterotrophic activity in the sea. Plenum Press, in press.
- 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.
- BALLESTER, LEC, WJ WASIELESKY, RO CAVALLI & PC ABREU. 2007. Nursery of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* in cages with artificial substrates: Biofilm composition and shrimp performance. *Aquaculture*, 269: 355–362.

- BALLESTER, LEC, PC ABREU, RO CAVALLI, M EMERENCIANO, L ABREU & WJ WASIELESKY. 2008. Effect of practical diets with different protein levels on the performance of *Farfantepenaeus paulensis* juveniles nursed in a zero exchange suspended microbial flocs intensive system. *Aquaculture Nutrition*, 1–39. Submetido.
- BARAK, Y, E CYTRYN, I GELFAND, M KROM & J VAN RIJN. 2003. Phosphorus removal in a prototype, recirculating aquaculture system. *Aquaculture*, 220: 313–326.
- BERMAN, T, & U PASSOW. 2007. Transparent Exopolymer Particles (TEP): an overlooked factor in the process of biofilm formation in aquatic environments. *Nature Precedings*, 1–13.
- BIDDANDA, BA. 1985. Microbial synthesis of macroparticulate matter. *Mar Ecol Prog Ser.*, 20: 241–251.
- BIDDANDA, BA. 1986. Structure and function of marine microbial aggregates. *Oceanol. Acta.*, 9: 209–211.
- BIDDANDA, BA & LR POMEROY. 1988. Microbial aggregation and degradation of phytoplankton-derived detritus in seawater. I. Microbial succession. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 42: 79–88.
- 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.
- BURFORD, MA & KC WILLIAMS. 2001. The fate of nitrogenous waste from shrimp feeding. *Aquaculture*, 198: 79–93.
- 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.

- CHAMBERLAIN, G, Y AVNIMELECH, R P MCINTOSH & M VELASCO. 2001. Advantages of Aerated Microbial Reuse Systems with balanced C:N. I: Nutrient transformation and water quality benefits. *Global Aquaculture Advocate*. April. 53-56.
- CARPENTER, SR & JE KITCHELL. 1993. The tropic cascade in lakes. (ed. Cambridge University press), New York. 385p.
- CAVALLI, RO, S ZIMMERMANN & RC SPECK. 2004. Growth and feed utilization of the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* fed diets containing different marine protein sources. *Ciência Rural*, 34: 891–896.
- DAVIS, DA, AL LAWRENCE & DM GATLIN. 1993. Response of *Penaeus vannamei* to dietary calcium, phosphorus and calcium: phosphorus ratio. *J. World Aquacult. Soc.*, 24: 504–515.
- DE LA ROCHA, CL & U PASSOW. 2007. Factors influencing the sinking of POC and the efficiency of the biological carbon pump. *Deep-Sea Research II*, 54: 639–658.
- DILLING, L, & AL ALLDREDGE. 2000. Fragmentation of marine snow by swimming macrozooplankton: A new process impacting carbon cycling in the sea. *Deep-Sea Research I*, 47: 1227–1245.
- EMERENCIANO, MGC, WJ WASIELESKY, RB SOARES, EC BALLESTER & EM IZEPPI, RO CAVALLI. 2006. Crescimento e sobrevivência do camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) na fase de berçário em meio heterotrófico. *Acta Sci. Biol. Sci.*, 29: 1–7.
- GILMER, RW. 1972. Free-floating mucus webs: a novel feeding adaptation for the open sea. *Science*, 176: 1239–1240.
- GOLDMAN, JC, DA CARON & MR DENETT. 1987. Regulation of gross growth efficiency and ammonium regeneration in bacteria by substrate C:N ratio. *Limnol. Oceanogr.*, 32:1239–1252.
- HARDY, RW & D GATLIN. 2002. Nutritional strategies to reduce nutrient losses in intensive aquaculture. In: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México. p. 23–34.
- HIETANEN, S. 1998. Literature on microbiology of aggregates originating from phytoplankton blooms. *Meri.*, 37: 37–44.

- HOBBIE, JE, RL DALEY & S JASPER. 1977. Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33: 1225–1228.
- HUA, K & DP BUREAU. 2006. Modelling digestible phosphorus content of salmonid fish feeds. *Aquaculture*, 254: 455–465.
- KIRCHMAN, D & R MITCHELL. 1982. Contribution of particle bound bacteria to total microheterotrophic activity in five ponds and two marshes. *Appl. Environ. Microb.*, 43: 200–209.
- KIRCHMAN, DL. 2000. Uptake and regeneration of inorganic nutrients by marine heterotrophic bacteria. In: Kirchman, DL. *Microbial Ecology of the oceans* (ed. by Kirchman, DL.), Wiley-Liss, USA, Chap. 9, 261-288.
- 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.
- LEMO, D, A NAVARRETE DEL TORO, JH CÓRDOVA-MURUETA, F GARCIA-CARREÑO. 2004. Testing feeds and feed ingredients for juvenile pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis*: *in vitro* determination of protein digestibility and proteinase inhibition. *Aquaculture*, 239: 307-321.
- MCABEE, BJ, CL BROWDY, RJ RHODES & AD STOKES. 2003. The use of greenhouse-enclosed raceway systems for the super-intensive production of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in the United States. *Global Aquaculture Advocate*, 6 (4).
- MCCAIVE, IN. 1984. Size spectra and aggregation of suspended particles in the deep ocean. *Deep-Sea Research I*, 31: 329–352.
- MCINTOSH, D, TM SAMOCHA, ER JONES, AL LAWRENCE, DA MCKEE, S HOROWITZ & A HOROWITZ. 2000a. The effect of a commercial bacterial supplement on the high-density culturing of *Litopenaeus vannamei* with a low-protein diet in an outdoor tank system and no water exchange. *Aquacultural Engineering*, 21: 215–227.
- MCINTOSH, RP. 2000b. Changing paradigms in shrimp farming: V. Establishment of heterotrophic bacterial communities. *Global Aquaculture Alliance*. December, 52–54.

- MONTOYA, RA, AL LAWRENCE, WE GRAND & M VELASCO. 2000. Simulation of phosphorus dynamics in an intensive shrimp culture system: effects of feed formulations and feeding strategies. *Ecological Modelling*, 129: 131–142.
- MORIARTY, DJW. 1987. Methodology for determining biomass and productivity of microorganisms in detrital food webs. In: D.J.W. Moriarty and R.S.V. Pullin, Editors, *Detritus and Microbial Ecology in Aquaculture, ICLARM Conference Proceedings 13*, International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila, Philippines, pp. 4–31.
- 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 World Aquaculture Society*, Baton Rouge, USA, pp. 1–19.
- MOSS, SM. 2002. Dietary importance of microbes and detritus in Penaeid shrimp aquaculture. In: *Microbial Approaches to Aquatic Nutrition within Environmentally Sound Aquaculture Production Systems*. (Lee, C.S. & O'Bryen, P. Eds.). World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA, pp. 1–18.
- 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.
- PASSOW, U & AL ALLDREDGE. 1995. Aggregation of a diatom bloom in a mesocosm: the role of transparent exopolymer particles (TEP). *Deep-Sea Research II*, 42: 99–109.
- PEIXOTO, S. W WASIELESKY & L LOUZADA. 2003. Comparative analysis of pink shrimp, *Farfantepenaeus paulensis*, and Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, culture in extreme southern Brazil. *Journal of Applied Aquaculture*, 14: 1–18, (In press).
- PEÑAFLORES, VD. 1999. Interaction between dietary levels of calcium and phosphorus on growth of juvenile shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 172: 281–289.
- POERSCH, L, RO CAVALLI, WJ WASIELESKY, JP CASTELLO & SRM PEIXOTO. 2006. Perspectivas para o desenvolvimento dos cultivos de camarões marinhos no estuário da Lagoa dos Patos, RS. *Ciência Rural*, 36: 1337–1343.

- POMEROY, LR. 1984. Significance of microorganisms in carbon and energy flow in marine ecosystems. In: *Current perspectives in microbial ecology*, (ed. MJ Klug and CA Reddy) Am. Soc. Microbiol., Washington, DC, 405-411.
- RODEHUTSCORD, M, Z GREGUS, E PFEFFER. 2000. Effect of phosphorus intake on faecal and non-faecal phosphorus excretion in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the consequences for comparative phosphorus availability studies. *Aquaculture*, 188: 383–398.
- SAMOCHA, TM, S PATNAIK, RL GANDY. 2004. Heterotrophic intensification of pond shrimp production. Book of abstract of Fifth International Conference on Recirculating Aquaculture, Roanoke, Virginia, USA. p. 22–25.
- SAMOCHA, TM, S PATNAIK, M SPEED, A-M ALI, JM BURGER, V ALMEIDA, Z AYUB, M HARISANTO, A HOROWITZ & DL BROCK. 2007. Use of molasses as carbon source in limited discharge nursery and growth-out systems for *Litopenaeus vannamei*. *Aquacultural Engineering*, 36: 184–191.
- 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.
- SHANKS, AL & EW EDMONDSON. 1990. The vertical flux of metazoans (holoplankton, meiofauna, and larval invertebrates) due to their association with marine snow. *Limnol. Oceanogr.*, 35: 455–463.
- SIMON, M, H-P GROSSART, B SCHWEITZER & H PLOUG. 2002. Review microbial ecology of organic aggregates in aquatic ecosystems. *Aquat Microb Ecol.*, 28: 175–211.
- SOKAL, RR & FJ ROHLF. 1969. Biometry. Principle and practices of statistics in biological research. W. H. Freeman & Co., 776p.
- STODEREGGER, KE & GJ HERNDL. 1999. Production of exopolymer particles by marine bacterioplankton under contrasting turbulence conditions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 189: 9–16.
- STRICKLAND, JDH & TR PARSONS. 1972. A practical handbook of seawater analysis. Ottawa: Fishery Research Board Canada, 310p.
- SUGIURA, S, J BABBITT, F DONG & R HARDY. 2000. Utilization of fish and animal by-product meals in low-pollution feeds for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquac. Res.*, 31: 585–593.



- 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.
- TURKMEN, G. 2005. The first test shrimp culture results from Izmir-Turkey. In: Conference on International Agricultural Research for Development. Tropentag. Stuttgart-Hohenheim. October, 3p.
- 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.
- VAN WYK, P & J SCARPA. 1999. Water Quality Requirements and Management. In: Van Wyk, P., et al. (Eds.), *Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems*. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Tallahassee, pp. 140–162.
- VELASCO, M, AL LAWRENCE & WH NEILL. 1998. Effects of dietary phosphorus level and inorganic source on survival and growth of *Penaeus vannamei* postlarvae in zero-water exchange culture tanks. *Aquat. Living Resour.* 11: 29–33.
- VERDUGO, P, AL ALLDREDGE, F AZAM, D KIRCHMAN, U PASSOW & P SANTSCHI. 2004. The oceanic gel phase: a bridge in the DOM-POM continuum. *Marine Chemistry*, 92:67–85.
- 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.
- 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.
- WYBAN, J, WA WALSH & DM GODIN. 1995. Temperature effects on growth rate and feed conversion of the Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*, 138: 267–279.