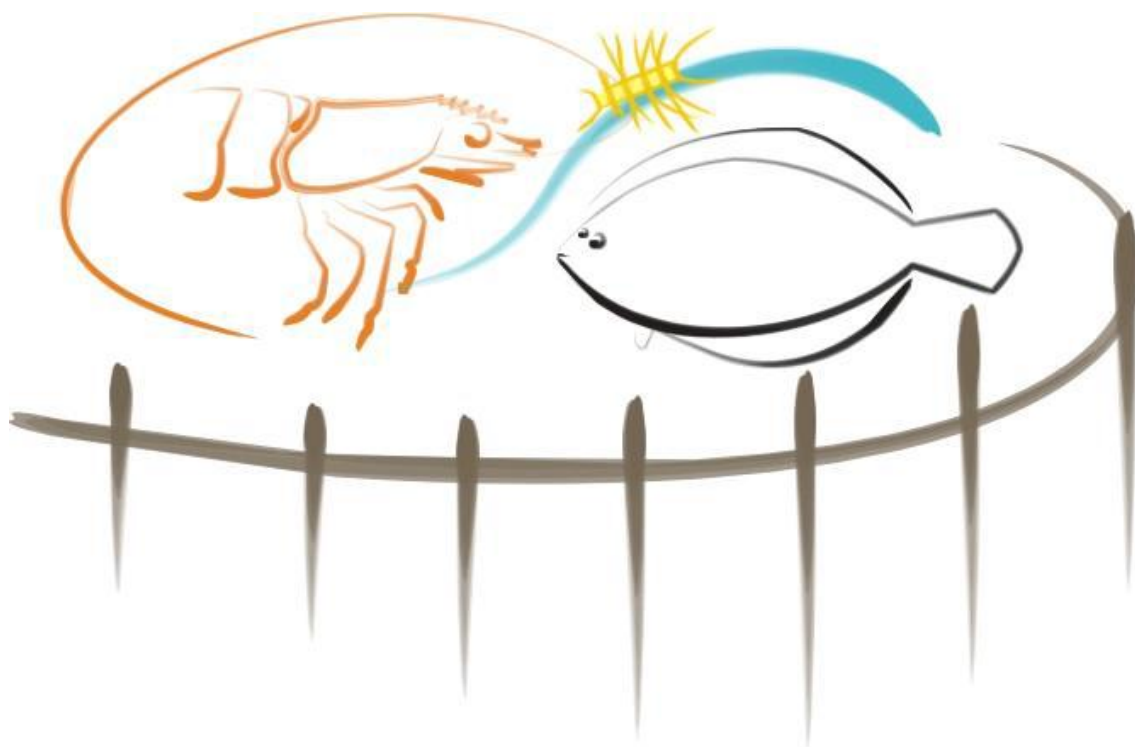




UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA



**EFEITO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NA COMUNIDADE
MICROBIANA PRESENTE EM SISTEMAS DE PRODUÇÃO DO
CAMARÃO *Litopenaeus vannamei* COM BIOFLOCOS.**

RICARDO BESSLER KÖNIG

Rio Grande – RS

Agosto de 2014

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA**

**EFEITO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NA COMUNIDADE
MICROBIANA PRESENTE EM SISTEMAS DE PRODUÇÃO DO
CAMARÃO *Litopenaeus vannamei* COM BIOFLOCOS.**

RICARDO BESSLER KÖNIG

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Aquicultura como parte dos
requisitos para obtenção do
título de Mestre em Aquicultura

Orientador: Prof. Dr. Paulo César Abreu

Co-orientador: Prof. Dr. Wilson Wasielesky Jr.

Rio Grande – RS

Agosto de 2014

Índice

LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	iv
DEDICATÓRIA	v
AGRADECIMENTOS.....	vi
RESUMO GERAL.....	vii
ABSTRACT	viii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
OBJETIVOS.....	3
Geral:.....	3
Específicos:.....	3
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	3
CAPÍTULO 1	6
RESUMO	7
ABSTRACT	8
INTRODUÇÃO	9
MATERIAL E MÉTODOS	11
Local e instalações.....	11
Meio BFT, material biológico e delineamento experimental.....	11
Parâmetros físicos e químicos.....	12
Parâmetros de desempenho zootécnico	12
Microrganismos.....	13
Análise estatística.....	13
RESULTADOS	13
Parâmetros físicos e químicos.....	13
Microrganismos.....	18
Desempenho zootécnico.....	23
DISCUSSÃO	24
CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Média dos parâmetros de qualidade de água no decorrer dos 11 dias de experimento (médias \pm desvios padrão).	14
Tabela 2: Biometria dos camarões utilizados no decorrer dos 11 dias de experimento (médias \pm desvios padrão).	23

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Valores de OD no período de aplicação do H ₂ O ₂ (setas indicam o momento da aplicação de H ₂ O ₂).	15
Figura 2: Variação do pH no decorrer do experimento	15
Figura 3: Concentração de nitrogênio amoniacal total (N-AT) durante o experimento. 16	
Figura 4: Concentração de nitrito no decorrer do experimento	17
Figura 5: Concentração de nitrato no decorrer do experimento	18
Figura 6: <i>Planctonema sp.</i> no aumento de 400x	19
Figura 7: Abundância de <i>Planctonema sp.</i> no decorrer do experimento	19
Figura 8: <i>Oocistis sp.</i> no aumento de 400x	20
Figura 9: Abundância de <i>Oocistis sp.</i> no decorrer do experimento	20
Figura 10: Flagelados no aumento de 400x	21
Figura 11: Abundância de flagelados no decorrer do experimento	21
Figura 12: <i>Euplotes sp.</i> no aumento de 400x	22
Figura 13: Abundância de <i>Euplotes sp.</i> no decorrer do experimento	23

DEDICATÓRIA

*Dedico a todos que de uma
maneira ou de outra me
deram o apoio necessário para
concluir este trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer imensamente ao meu orientador Professor Doutor Paulo Abreu, por ter me suportado e guiado nessa longa jornada juntos. Obrigado pela paciência, dedicação e puxões de orelha de coração.

Agradecer também ao meu co-orientador Professor Doutor Wilson Wasielesky Jr. pelos conselhos e dicas nas horas certas.

Agradecer ao meu amigo Mestre Plínio Furtado pelo apoio e suporte técnico no decorrer do experimento e na finalização do texto.

Ao programa de pós-graduação em Aquicultura, a todos os professores, funcionários e colegas da EMA pela contribuição na minha formação acadêmica.

Ao CNPq pela bolsa de estudos.

Ao Lab. Fito, pela estrutura e atenção dos profissionais que lá trabalham. A ajuda de vocês foi fundamental, amigos (as).

Estação Marinha de Aquicultura - EMA pela infra-estrutura e materiais para a realização do trabalho e ajuda dos profissionais e amigos que lá possuo também.

Agradeço ao apoio da minha noiva Glória De-Zotti, que me ergueu, apoiou e incentivou nos momentos mais difíceis dessa caminhada.

Agradeço a minha família por ter proporcionado as condições para que eu chegasse aqui.

Agradecer a todos os amigos que fizeram dessa caminhada um pouco mais leve e prazerosa.

OBRIGADO!

RESUMO GERAL

A técnica de produção de organismos aquáticos sem renovação de água, com elevadas densidades de estocagem, forte aeração e biota predominantemente aeróbia e heterotrófica, formadora de agregados ou flocos microbianos, foi conhecida como ZEAH (“Zero Exchange Aerobic Heterotrophic culture systems”) e, mais recentemente, denominada como tecnologia de bioflocos (“Biofloc Technology” - BFT). Devido à presença de uma rica comunidade microbiana (microalgas, protozoários e alguns metazoários), os bioflocos apresentam elevados níveis nutricionais. Esta comunidade pode levar, também, ao consumo acelerado de oxigênio, levando rapidamente à morte do organismo produzido. Em casos de emergência causados pela falta de energia elétrica, ou defeito no sistema de aeração, os pesquisadores garantem a sobrevivência dos camarões durante a inoperância do sistema através da aplicação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Entretanto, o H_2O_2 , por ser uma molécula de carga neutra, tem facilidade de atravessar a membrana celular por difusão e, dentro das células, produz a peroxidação de lipídeos e proteínas, afetando a integridade celular. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da aplicação de peróxido de hidrogênio nos microrganismos presentes na criação de *L. vannamei* em meio BFT, caracterizar a comunidade de protozoários por microscopia óptica antes e após a aplicação de peróxido de hidrogênio e estimar o tempo de recuperação desta comunidade após o uso de peróxido por períodos crescentes. Para tal foram testados quatro tratamentos em 12 caixas de 45 L com uma densidade de 300 camarões por metro cúbico, que compunham o Controle, com aeração normal (sem aplicação de H_2O_2) e os tratamentos 12-horas, 24-horas e 48-horas, onde o peróxido ($10\mu L H_2O_2 L^{-1}$) foi aplicado durante estes períodos sempre que necessário para manter os níveis de oxigênio dissolvido acima de $6 mg L^{-1}$. As médias de oxigênio dissolvido não diferiram significativamente, mas na sequência de aplicações podemos identificar algumas variações pontuais. As médias dos parâmetros de qualidade da água foram significativamente diferentes entre o Controle e os demais tratamentos. Os sólidos suspensos totais (SST) foram significativamente maiores no tratamento 12-horas do que nos demais. Verificou-se que a adição de H_2O_2 afetou o processo de nitrificação no sistema BFT e indiretamente afetou os camarões, resultando em um menor desempenho no crescimento e ganho de peso nos tratamentos onde se adicionou peróxido de hidrogênio. Verificou-se, ainda, que houve uma rápida recuperação das bactérias amônio-oxidantes, mas não das nitrito-oxidantes. O fitoplâncton presente no meio de cultivo resistiu bem à aplicação de H_2O_2 , havendo algum efeito somente sobre a Clorófitcea *Planctonema sp.*, onde o controle apresentou maiores abundâncias do que nos tratamentos 24-horas e 48-horas. Após isso ocorreu uma diminuição em sua abundância provavelmente devido à baixa luminosidade causada pela alta concentração de SST. Conclui-se que a adição de peróxido de hidrogênio causa um dano temporário aos microrganismos, especialmente as bactérias nitrificantes, mas este é parcialmente revertido em poucos dias após cessar a aplicação deste elemento. Também não se verificou um efeito acumulativo com a aplicação de peróxido por um tempo maior.

Palavras chave: Peróxido de hidrogênio, microrganismos, bioflocos

ABSTRACT

The production of aquatic organisms without water renewal, with high stocking densities, strong aeration and biota predominantly aerobic and heterotrophic forming aggregates or microbial flakes, is known as ZEAH ("Zero Exchange Aerobic heterotrophic culture systems") or, more recently called as Biofloc Technology (BFT) technology. Due to the presence of a rich microbial community (microalgae, protozoa and some metazoan), the bioflocs have high nutrient levels, but this community may lead to a rapid consumption of dissolved oxygen in emergency cases, caused by energy failure, or defect in the aeration system. In these cases, the researchers ensure the survival of shrimp through the application of hydrogen peroxide (H_2O_2). However, H_2O_2 , as a neutral charge molecule, can easily cross the cell membranes by diffusion and produce lipid and protein peroxidation, affecting cells integrity. Main objectives of this study were to evaluate the effect of hydrogen peroxide on the microorganisms present in the production of *L. vannamei* in a BFT system; to characterize the protozoan community by optical microscopy before and after application of hydrogen peroxide and to estimate the recovery time of this community after the use of H_2O_2 for increasing periods. Four treatments were distributed in twelve 45 L containers with 300 shrimp per cubic meter: a Control treatment, with normal aeration (without application of H_2O_2) and 12h, 24h and 48h treatments, where hydrogen peroxide ($10\mu L H_2O_2 L^{-1}$) was applied whenever necessary to maintain dissolved oxygen levels above $6 mg L^{-1}$. The mean dissolved oxygen did not differ significantly among treatments, but some water quality parameters differed significantly between the control and other treatments. For instance, total suspended solids (TSS) was significantly higher in the 12 h treatment than in the others. The H_2O_2 affected the nitrification process in the BFT system and indirectly affected the shrimp, that showed lower growth and weight gain in treatments with hydrogen peroxide. It was also found that there is a quick recovery of ammonia-oxidizing bacteria, but not of nitrite-oxidizing. Among the phytoplankton the Chlorophycean *Planctonema sp.* was the microalgae that suffered the effect of hydrogen peroxide, with higher abundance in the control than in the 24 hours and 48 hours treatments. The abundance decrease in observed afterwards was probably due to low light caused by high TSS. In conclusion we may say that the addition of hydrogen peroxide caused a temporary damage to the microorganisms, especially the nitrifying bacteria, although this negative effect was reverted few days after the application of this element. No cumulative effect was observed with the application of hydrogen peroxide for longer periods.

Keywords: Hydrogen peroxide, microorganisms, bioflocs

INTRODUÇÃO GERAL

No início dos anos 90, um novo sistema de produção de organismos aquáticos baseado na formação de bioflocos microbianos começou a ser desenvolvido simultaneamente em dois centros de pesquisas: no Waddell Mariculture Center na Carolina do Sul nos EUA e no Instituto de Tecnologia de Israel (Hopkins *et al.* 1993; Avnimelech 2009). Com o sucesso nos experimentos em pequena escala, esta tecnologia foi introduzida em fazendas comerciais em Belize, na América Central e também nos EUA, inicialmente com o nome de (“Zero Exchange Aerobic Heterotrophic culture systems” (ZEAH) e, posteriormente, como “Biofloc Technology System” (BFT) (Avnimelech, 2007; Schryver *et al.*, 2008).

O sistema BFT diminui o uso de água, mitigando a emissão de efluentes e impactos ambientais, aumenta a produção, pois possibilita o aumento nas densidades de estocagem (Browdy *et al.* 2001). Neste sistema, a formação de bioflocos é estimulada pela adição de uma fonte de carbono. Os flocos microbianos consistem de um conglomerado de diferentes microrganismos tais como bactérias, microalgas, protozoários e zooplâncton (Avnimelech 2009). Além disso, o controle do excesso de elementos nitrogenados é feito através da relação carbono/nitrogênio, que promove o crescimento das bactérias heterotróficas e posteriormente através das bactérias autotróficas nitrificantes. Estas bactérias, somadas a outros microrganismos, formam os bioflocos que aparecem no meio aquático em forma de agregados. Os bioflocos são, também, uma importante fonte alimentar alternativa (Wasielesky *et al.* 2006; Ballester *et al.* 2010).

No sistema BFT existe grande demanda de oxigênio dissolvido devido não só à respiração dos camarões, mas principalmente em função da alta densidade dos microrganismos que colonizam os agregados e que também atuam na decomposição da matéria orgânica acumulada (Jiang & Pan, 2005). Desta forma, falhas no sistema de aeração podem causar mortalidades significativas de organismos cultivados em minutos (Vinatea *et al.* 2009). Para o melhor desenvolvimento de organismos aquáticos é recomendado que os níveis de oxigênio dissolvido sejam superiores a $5,0 \text{ mg L}^{-1}$, já que prolongados períodos com concentrações menores que $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ são letais para camarões, embora eles possam sobreviver por curtos períodos de tempo com concentrações de oxigênio inferiores a 1 mg L^{-1} (Van Wyk & Scarpa, 1999). McAbee *et*

al. (2003) sugerem a necessidade de oxigênio suplementar quando os níveis de oxigênio dissolvido ficam abaixo de 4,5 mg L⁻¹.

Por causa das altas concentrações de microrganismos e grandes densidades de organismos produzidos (peixes e camarões), o sistema BFT tem uma necessidade de aeração suplementar para manter o oxigênio dissolvido em níveis elevados. Os processos de nitrificação e assimilação de nitrogênio também consomem oxigênio e reduzem a alcalinidade do sistema (Ebeling *et al.* 2006; Hargreaves, 2006). Para compensar estes problemas os aeradores devem funcionar continuamente, suprindo a demanda de oxigênio na água dos viveiros (Avnimelech *et al.* 2009). Diversos tipos de aeradores podem ser utilizados para manter a concentração de oxigênio dissolvido (OD), entre eles os aeradores de pás “paddlewheels”. Outra fonte de aeração disponível é o sistema de ar difuso, injetando ar no sistema através de um soprador “blower” (Browdy *et al.* 2001). Estudos mais recentes demonstram a utilização de oxigênio líquido como fonte de OD em cultivos em raceways (McAbee *et al.* 2003; Otoshi *et al.* 2009; Samocha *et al.* 2010). O primeiro teste com peróxido de hidrogênio na Estação Marinha de Aquacultura Prof. Marcos Alberto Marchiori (EMA) foi realizado em sistema de águas claras testando a sobrevivência e crescimento de *L. vannamei* em sistemas de águas claras (Izeppi, 2008), logo após Bourg (2009) fez uso de H₂O₂ como fonte de oxigênio dissolvido para a criação de *L. vannamei* em sistemas de bioflocos concluindo que esse método pode ser usado como forma de oxigenar o sistema. Lima *et al.* (2012) concluiu que em casos de emergência, causados pela falta de energia elétrica, ou defeito no sistema de aeração, a sobrevivência dos camarões também pode ser garantida através da aplicação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

Por ser uma molécula de carga neutra, o peróxido de hidrogênio atravessa por difusão as membranas celulares e, dentro das células, produzem a peroxidação de lipídeos e proteínas, afetando a integridade celular. Reichwaldt *et al.* (2012) avaliaram a toxicidade aguda do H₂O₂ em duas espécies de zooplâncton (*Moina sp.* e *Daphnia carinata*) após 48 horas de exposição a diferentes dosagens e concluíram que, apesar do peróxido de hidrogênio reagir rapidamente com a água e matéria orgânica liberando água e oxigênio, este elemento foi letal para as duas espécies, sendo a LC₅₀ de 2,0 e 5,6 mg H₂O₂ L⁻¹, respectivamente. Com relação ao efeito do peróxido de hidrogênio sobre os microrganismos, Schwartz *et al.* (2000) aplicaram doses de 100 mg H₂O₂ L⁻¹ em sistemas de recirculação para peixes e observaram a redução de 80% na remoção da amônia pelas bactérias nitrificantes presentes no biofiltro. Já Pedersen & Pedersen

(2012) verificaram que a comunidade bacteriana que coloniza biofiltros pode colapsar, dependendo da quantidade de matéria orgânica presente no biofiltro e da dose de peróxido de hidrogênio que for aplicada ao sistema de recirculação para controle de ectoparasitas de peixes. Furtado *et al.* (2014) determinaram a LC₅₀ de H₂O₂ para o camarão *L. vannamei* detectando que dosagens acima de 58 µL H₂O₂ L⁻¹ afetaram a sobrevivência dos camarões, este estudo também delimitou o nível de segurança em 29 µL H₂O₂ L⁻¹.

O pequeno número de trabalhos relacionados ao efeito do H₂O₂ sobre os microrganismos formadores do bioflocos motivaram a realização deste trabalho.

OBJETIVOS

Geral:

Avaliar o efeito da aplicação de peróxido de hidrogênio sobre os microrganismos presentes no cultivo de *L. vannamei* com tecnologia de bioflocos.

Específicos:

- 1) Caracterizar a comunidade de protozoários por microscopia óptica antes e após a aplicação de peróxido de hidrogênio;
- 2) Estimar o tempo de recuperação desta comunidade após o uso de peróxido por períodos crescentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Avnimelech, Y. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. *Aquaculture* 264, 140–147, 2007.
- Avnimelech, Y. Biofloc technology - A practical guide book. *The World Aquaculture Society*, Baton Rouge, 2009.
- Ballester, E., Abreu, P., Cavalli, R., Emerenciano, M., De Abreu, L., Wasielesky Jr, W. Effect of practical diets with different protein levels on the performance of *Farfantepenaeus paulensis* juveniles nursed in a zero exchange suspended microbialflocs intensive system. *Aquacult. Nutr.* 16, 163–172, 2010.
- Boyd, C.E. Pond Water Aeration System. *Aquacultural Engineering*, v. 18, p. 29 – 40, 1998.

- Bourg C. T., Wasielesky, W.J. Uso do peróxido de hidrogênio como fonte de oxigênio dissolvido na água para o cultivo de camarões marinhos em sistema de bioflocos. *Trabalho de conclusão de curso de Oceanologia*, 2009.
- Boyd, C.E. Overview: mechanical pond aeration. *Global Aquaculture Advocate*, v.8, p. 59-60, 2008b.
- Browdy, C.L., Bratvold, D., Stokes, A.D., McIntosh, R.P. Perspectives on the application of closed shrimp culture systems. In: Browdy, C.L., Jory, D.E. (Eds.), *The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture*, Aquaculture, 2001, Baton Rouge, USA. *The World Aquaculture Society*, pp. 20–34, 2001.
- Ebeling, J.M., Timmons, M.B., Bisogni, J.J. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic control of ammonia-nitrogen in aquaculture production systems. *Aquaculture* 257, 346–358, 2006.
- Furtado, P. S., Serra, F. P., Poersch, L. H., & Wasielesky Jr, W. Acute toxicity of hydrogen peroxide in juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in biofloc technology systems. *Aquaculture International*, 22(2), 653-659. 2014.
- Hargreaves, J.A. Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. *Aquacul. Eng.* 34, 344–363, 2006.
- Hopkins, J.S., Hamilton, R.D., Sandifer, P.A., Browdy, C.L., Stokes, A.D. Effect of water exchange rate on production, water quality, effluent characteristics and nitrogen budgets of intensive shrimp ponds. *J. World Aquacult. Soc.* 24, 304–320, 1993.
- Izeppi, E. M., Wasielesky, W.J. Sobrevivência e crescimento do camarão *Litopenaeus vannamei* em água clara com peróxido de hidrogênio. *Trabalho de conclusão de curso de Oceanologia*, 2008.
- Jiang, L., Pan, L. Effect of dissolved oxygen on immune parameters of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 18: 185-188, 2005.
- Lima, J.P.V., Brito, L.O., Costa, W.M., Costa, W.M., Olivera, G.A. Utilização de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) no incremento de oxigênio dissolvido em cultivo de *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Pesquisa Agropecuária Pernambucana*, v. 17, 2012.
- McAbee, B.J., C.L. Browdy, R.J. Rhodes, Stokes, A.D. The use of greenhouse-enclosed race-way systems for the superintensive production of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in the United States. *Glob. Aquac. Advoc.* 6, 40-43, 2003.

- Otoshi, C.A., Tang, L.R., Moss, D.R., Arce, S.M., Holl, C.M., Moss, S.M. Performance of Pacific White Shrimp, *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*, cultured in biosecure, superintensive, recirculating aquaculture systems. In: Browdy C.L. and Jory D.E. (eds) *The Rising Tide – Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Farming, World Aquaculture 2009. The World Aquaculture Society*, Baton Rouge Louisiana USA, 2009.
- Pedersen, L.F., Pedersen, P.B. Hydrogen peroxide application to a commercial recirculating aquaculture system. *Aquacultural Engineering* 46, p40-46, 2012.
- Ray, A.J., Shuler, A.J., Leffler, J.W., Browdy, C.L. Microbial ecology and management of biofloc systems. In: Browdy, C.L., Jory, D.E. (Eds.), *The Rising Tide. Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Farming. World Aquaculture Society*, Baton Rouge, Louisiana, USA, pp. 255–266, 2009.
- Reichwaldt, E.S., Zheng, L., Barrington, D.J., Ghadouani, A. “Acute Toxicological Response of *Daphnia* and *Moina* to Hydrogen Peroxide.” *J. Environ. Eng.*, 138(5), 607-611 2012.
- Samocha, T.M., Wilkenfeld, J.S., Morris, T.C., Correia, E.S., Hanson, T. Intensive raceways without water exchange analyzed for White shrimp culture. *Glob. Aquac. Advoc.* 13, 22–24, 2010.
- Schryver, P., Crab, R., Defoirdt, T., Boon, N., Verstraete, W. The basics of bio-flocs technology: the added value for aquaculture. *Aquaculture* 277, 125-137, 2008.
- Schwartz, M.F., Bullock, G.L., Hankins, J.A., Summerfelt, S.T., Mathias, J.A. Effects of selected chemo-therapeutants on nitrification in fluidized-sand biofilters for cold water fish production. *International Journal of Recirculating Aquaculture* 1, 61–81, 2000.
- Van Wyk, P., Scarpa, J. Water quality requirements and management, in: Van Wyk, P., Davis-Hodgkins, M., Laramore, R., Main, K., Mountain, J., Scarpa, J. (Eds.) *Farming marine shrimp in recirculating freshwater systems. Florida Department of Agriculture and Consumer Services*, Tallahassee, Florida, p.128, 1999.
- Vinatea, L., Gálvez, A.O., Venero, J., Leffler, J., Browdy, C. Oxygen consumption of *Litopenaeus vannamei* juveniles in heterotrophic medium with zero water exchange. *Pesq. agropec. bras.* 44, (5) 534-538, 2009.
- Wasiolesky, W.J., Atwood, H.I., Stokes, A., Browdy, C.L. Effect of natural production in brown water super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 258, 396–403, 2006.

CAPÍTULO 1

EFEITO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NA COMUNIDADE MICROBIANA PRESENTE EM SISTEMAS DE PRODUÇÃO DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei* COM BIOFLOCOS.

Ricardo Bessler König^{1,2}, Plínio Furtado¹, Wilson Wasielesky Jr.¹ & Paulo César Abreu¹

¹ Instituto de Oceanografia – Universidade Federal do Rio Grande – FURG. Cx. Postal 474, 96201-900 – Rio Grande – RS – Brasil.

² ricardobkonig@gmail.com

RESUMO

A técnica de produção de organismos aquáticos sem renovação de água, com elevadas densidades de estocagem, forte aeração e biota predominantemente aeróbia e heterotrófica, formadora de agregados ou flocos microbianos, foi conhecida como ZEAH (“Zero Exchange Aerobic Heterotrophic culture systems”) ou, mais recentemente, denominada como tecnologia de bioflocos (“Biofloc Technology” - BFT). Devido à presença de uma rica comunidade microbiana (bactérias, protozoários e alguns metazoários), os bioflocos apresentam elevados níveis nutricionais. Esta comunidade pode levar, também, ao consumo acelerado de oxigênio, levando rapidamente à morte do organismo produzido. Em casos de emergência causados pela falta de energia elétrica, ou defeito no sistema de aeração, os pesquisadores garantem a sobrevivência dos camarões durante a inoperância do sistema através da aplicação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Entretanto, o H_2O_2 , por ser uma molécula de carga neutra, tem facilidade de atravessar a membrana celular por difusão e, dentro das células, produzem a peroxidação de lipídeos e proteínas, afetando a integridade celular. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da aplicação de peróxido de hidrogênio nos microrganismos presentes na criação de *L. vannamei* em meio BFT, caracterizar a comunidade de protozoários por microscopia ótica antes e após a aplicação de peróxido de hidrogênio e estimar o tempo de recuperação desta comunidade após o uso de peróxido por períodos crescentes. Para tal foram testados quatro tratamentos em 12 caixas de 45 L com uma densidade de 300 camarões por metro cúbico, que compunham o Controle, com aeração normal (sem aplicação de H_2O_2) e os tratamentos 12-horas, 24-horas e 48-horas, onde a aeração foi desligada durante o período de horas indicado no tratamento e o peróxido ($10\mu L H_2O_2 L^{-1}$) foi aplicado sempre que necessário para manter os níveis de oxigênio dissolvido acima de $6 mg L^{-1}$. As médias de oxigênio dissolvido não diferiram significativamente, mas na seqüência de aplicações podemos identificar algumas variações pontuais. As médias dos parâmetros de qualidade da água se diferenciaram significativamente entre o Controle e os demais tratamentos. SST foi significativamente maior no tratamento 12-horas que nos demais. Verificou-se que a adição de H_2O_2 afetou o processo de nitrificação no sistema BFT e indiretamente afetou os camarões, resultando em um menor desempenho no crescimento e ganho de peso nos tratamentos onde se adicionou peróxido de hidrogênio. Verificou-se, ainda, que houve uma rápida recuperação das bactérias amônio-oxidantes, mas não das nitrito-oxidantes. O fitoplâncton presente no meio de cultivo resistiu à aplicação de H_2O_2 , havendo algum efeito somente sobre a Clorófitica *Planctonema sp.*, onde o controle apresentou maiores abundâncias do que nos tratamentos 24-horas e 48-horas. Após isso ocorreu uma diminuição em sua abundância provavelmente devido a baixa luminosidade causada pela alta concentração de SST. Os protozoários foram afetados pelo uso de H_2O_2 , principalmente os flagelados. Conclui-se que a adição de peróxido de hidrogênio causa um dano temporário aos microrganismos, especialmente as bactérias nitrificantes, mas este é parcialmente revertido em poucos dias após cessar a aplicação deste elemento. Também não se verificou um efeito acumulativo com a aplicação de peróxido por um tempo maior.

Palavras chave: Peróxido de hidrogênio, microrganismos, bioflocos

ABSTRACT

The production of aquatic organisms without water renewal, with high stocking densities, strong aeration and biota predominantly aerobic and heterotrophic forming aggregates or microbial flakes, was known as ZEAH ("Zero Exchange Aerobic heterotrophic culture systems") or, more recently called as Biofloc Technology (BFT) technology. Due to the presence of a rich microbial community (bacteria, protozoa and metazoa some), the bioflocs have high nutrient levels, but this community may lead to a rapid consumption of dissolved oxygen in emergency cases, caused by energy failure, or defect in the aeration system. In these cases, the researchers ensure the survival of shrimp through the application of hydrogen peroxide (H_2O_2). However, H_2O_2 , as a neutral charge molecule, can easily cross the cell membranes by diffusion and produce lipid and protein peroxidation, affecting cells integrity. Main objectives of this study were to evaluate the effect of hydrogen peroxide on the microorganisms present in the production of *L. vannamei* in a BFT system; to characterize the protozoan community by optical microscopy before and after application of hydrogen peroxide and to estimate the recovery time of this community after the use of H_2O_2 for increasing periods. Four treatments were distributed in twelve 45 L containers with 300 shrimp per cubic meter: a Control treatment, with normal aeration (without application of H_2O_2) and 12h, 24h and 48h treatments, where hydrogen peroxide ($10\mu L H_2O_2 L^{-1}$) was applied whenever necessary to maintain dissolved oxygen levels above $6 mg L^{-1}$. The mean dissolved oxygen did not differ significantly among treatments, but some water quality parameters differed significantly between the control and other treatments. For instance, SST was significantly higher in the 12 h treatment than in the others. The H_2O_2 affected the nitrification process in the BFT system and indirectly affected the shrimp, that showed lower growth and weight gain in treatments with hydrogen peroxide. It was also found that there is a quick recovery of ammonia-oxidizing bacteria, but not of nitrite-oxidizing. Among the phytoplankton the Chlorophycean *Planctonema sp.* was the microalgae that most suffered the effect of hydrogen peroxide, with higher abundance in the control than in the 24 hours and 48 hour treatments. The abundance decrease in observed afterwards was probably due to low light caused by high TSS. Protozoa were affected by the use of H_2O_2 , especially flagellates. In conclusion we may say that the addition of hydrogen peroxide caused a temporary damage to the microorganisms, especially the nitrifying bacteria, although this negative effect was reverted few days after the application of this element. No cumulative effect was observed with the application of hydrogen peroxide for longer periods.

Keywords: Hydrogen peroxide, microorganisms, bioflocs

INTRODUÇÃO

A técnica de produção de organismos aquáticos sem renovação de água, com altas densidades de estocagem, forte aeração e biota predominantemente aeróbia e heterotrófica, formadora de agregados ou flocos microbianos, foi conhecida como ZEAH (“Zero Exchange Aerobic Heterotrophic culture systems”) ou, mais recentemente, denominada como tecnologia de bioflocos (“Biofloc Technology” - BFT) (Avnimelech, 2007; Schryver *et al.*, 2008).

Devido à presença de uma rica comunidade microbiana (microalgas, protozoários e alguns metazoários), os bioflocos apresentam elevados níveis de proteínas, aminoácidos e minerais, que podem suplementar a nutrição do camarão produzido (Burford *et al.* 2004, Avnimelech 2007). Além disso, comunidades microbianas aeróbicas, presentes em altas densidades auxiliam na redução das altas concentrações de compostos nitrogenados tóxicos, como amônia e nitrito, melhorando a qualidade da água e transformando o nitrogênio dissolvido em proteína microbiana, reciclando resíduos e melhorando a eficiência alimentar do sistema (Crab *et al.*, 2007).

Para o melhor desenvolvimento de organismos aquáticos é recomendado que os níveis de oxigênio dissolvido sejam superiores a 5,0 mg L⁻¹ já que prolongados períodos com concentrações menores que 2,0 mg L⁻¹ são letais para camarões embora eles possam sobreviver por curtos períodos de tempo com concentrações de oxigênio inferiores a 1 mg L⁻¹ (Van Wyk & Scarpa, 1999). McAbee *et al.* (2003) sugerem a necessidade de oxigênio suplementar quando os níveis de oxigênio dissolvido ficarem abaixo de 4,5 mg L⁻¹. No sistema BFT existe grande demanda de oxigênio dissolvido devido não só da respiração dos camarões, mas principalmente em função da alta densidade dos microrganismos que colonizam os agregados e que também atuam na decomposição da matéria orgânica acumulada (Jiang & Pan, 2005). Desta forma, falhas no sistema de aeração podem causar mortalidades significativas de organismos cultivados em minutos (Vinatea *et al.* 2009). Visto a importância do oxigênio nestes sistemas, são necessários mecanismos de emergência que mantenham os níveis de oxigênio toleráveis para a espécie, caso ocorra uma queda de energia elétrica.

O sistema mais utilizado para garantir altos níveis de oxigênio dissolvido no sistema BFT (indoor) é o de difusores de ar posicionados no fundo dos tanques. Esses difusores podem ser pedras porosas, ou canos micro-perfurados, que são alimentados

por bombas de ar ou sopradores. Já no sistema BFT (outdoor) os aeradores do tipo “paddlewheels” são os mais comumente utilizados (Boyd 1998, 2008b).

Em casos de emergência, causados pela falta de energia elétrica, ou defeito no sistema de aeração, os pesquisadores garantem a sobrevivência dos camarões através da aplicação do peróxido de hidrogênio (Lima *et al.*, 2012). Entretanto, por ser uma molécula de carga neutra, o H_2O_2 tem facilidade de atravessar a membrana celular por difusão e, dentro das células, reagir com metais de transição liberando oxigênio e o radical hidroxila que, em concentrações elevadas, podem induzir a peroxidação de lipídeos e proteínas, afetando a integridade celular (Abele-Oeschger *et al.*, 1997; Halliwell *et al.*, 1998). Reichwaldt *et al.* (2012) avaliaram a toxicidade aguda do H_2O_2 em duas espécies de zooplâncton (*Moina sp.* e *Daphnia carinata*) após 48 horas de exposição a diferentes dosagens, e concluíram que apesar do peróxido de hidrogênio reagir rapidamente com a água e matéria orgânica, e liberar água e oxigênio, este elemento foi letal para as duas espécies, sendo a LC_{50} de 2,0 e 5,6 mg $H_2O_2 L^{-1}$, respectivamente.

Com relação ao efeito do peróxido de hidrogênio sobre os microrganismos, Schwartz *et al.* (2000) aplicaram doses de 100 mg $H_2O_2 L^{-1}$ em sistemas de recirculação para peixes e observaram uma redução de 80% na remoção de amônia no biofiltro. Já Pedersen & Pedersen (2012) verificaram que a comunidade bacteriana que coloniza biofiltros pode colapsar dependendo da quantidade de matéria orgânica presente no biofiltro, e da dose de peróxido de hidrogênio que for aplicada ao sistema de recirculação para controle de ectoparasitas de peixes.

No entanto, não se conhece claramente o efeito do peróxido de hidrogênio sobre os microrganismos formadores dos bioflocos e qual a capacidade de recuperação dessa comunidade microbiana após a aplicação desta substância. Como visto, o peróxido de hidrogênio pode, por um lado salvar camarões e peixes em cultivos BFT mas por outro lado, este pode ser extremamente letal para os microrganismos aquáticos e outros metazoários que compõem os bioflocos.

Considerando que o sistema BFT é dependente da comunidade microbiana para a manutenção da qualidade de água e melhoria do desempenho zootécnico do organismo produzido, foram avaliados neste estudo os efeitos do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) sobre a comunidade de microbiana presente no cultivo superintensivo de camarões no sistema BFT.

MATERIAL E MÉTODOS

Local e instalações

O experimento teve duração de onze dias e foi realizado na Estação Marinha de Aquacultura Prof. Marcos Alberto Marchiori (EMA), do Instituto Oceanográfico da Universidade Federal do Rio Grande, Localizada na praia do Cassino, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil

Meio BFT, material biológico e delineamento experimental

O meio com bioflocos utilizado para o experimento foi obtido da produção de camarões-branco *Litopenaeus vannamei*. Não houve renovação de água no decorrer do experimento, mas devido ao incremento dos níveis de nitrogênio amoniacal total (N-AT) acima de 1 mg L^{-1} , foram realizadas fertilizações com melaço de cana de açúcar sempre que necessário para reduzir os níveis deste elemento nitrogenado (Avnimelech, 1999).

Os animais utilizados durante o experimento tinham peso médio de $5,51 \pm 1,05 \text{ g}$. Cada tratamento foi realizado em caixas de polietileno (área de fundo de $0,22 \text{ m}^2$) contendo 45 litros de meio BFT e 15 camarões, em uma densidade de 333 camarões/m^3 . Os camarões foram alimentados duas vezes por dia, as 08:00 e as 17:00 horas, com ração comercial (Centro Oeste Rações S.A.- Brasil) com 38% de proteína bruta e 8% de lipídeos na formulação distribuída manualmente na coluna d água. A taxa de alimentação seguiu as recomendações de Jory *et al.* (2001). Quando os níveis de N-AT ultrapassaram a margem de segurança de 1 mg L^{-1} a alimentação foi suspensa no período da tarde em todos os tratamentos. A concentração do H_2O_2 era 35 volumes.

O experimento foi executado com quatro tratamentos, em triplicata:

- 1) Controle, cultivo de camarão sem aplicação de H_2O_2 ;
- 2) 12 h - Aplicação de doses de $10 \mu\text{L H}_2\text{O}_2 \text{ L}^{-1}$ na água de cultivo pelo período de 12 horas;
- 3) 24 h - Aplicação de doses de $10 \mu\text{L H}_2\text{O}_2 \text{ L}^{-1}$ na água de cultivo pelo período de 24 horas;
- 4) 48 h - Aplicação de doses de $10 \mu\text{L H}_2\text{O}_2 \text{ L}^{-1}$ na água de cultivo pelo período de 48 horas.

A partir da coleta inicial de água para medição de parâmetros e contagem dos microrganismos a aeração mecânica foi desligada nos tratamentos 12h, 24h e 48h. As aplicações de H₂O₂ foram feitas, sempre que necessário, para manter o cultivo no nível de oxigenação acima de 4,5 mg L⁻¹, como sugere Vinatea *et al.* (2010). A dose de 10µL H₂O₂ L⁻¹ foi escolhida de acordo com o nível de segurança encontrado por Furtado *et al.* (2014).

Parâmetros físicos e químicos

A temperatura do ar da sala experimental foi ajustada em 30°C por meio de climatizador, e a temperatura da água foi mantida em 28°C. O fotoperíodo da sala experimental adotado foi de 12C/12E, com iluminação artificial de intensidade de 500 lux na superfície da água. A aeração foi provida por meio de uma mangueira com pedra porosa alocada em cada caixa com o intuito de promover a oxigenação da água e a suspensão do material particulado na coluna d'água.

As determinações de temperatura, pH e oxigênio foram realizadas diariamente pela manhã e pela tarde, com auxílio de pH-metro digital e oxímetro portátil. A salinidade foi verificada diariamente com refratômetro óptico.

As concentrações de amônia total (NAT) (NH₃ + NH₄⁺) e nitrito (N-NO₂⁻) foram mensuradas diariamente, conforme metodologias preconizadas pela UNESCO (1983) e Bendschneider & Robinson (1952), respectivamente. A alcalinidade e o nitrato (N-NO₃) foram analisados no início e final do experimento, seguindo a metodologia proposta por APHA (1998) e Aminot & Chaussepied (1983), respectivamente. Os sólidos suspensos totais (mg L⁻¹) foram determinados no início e fim do experimento por gravimetria, mediante filtragem de alíquotas de 20 mL de água em filtros de fibra de vidro GF 50-A (AOAC, 2000).

Parâmetros de desempenho zootécnico

Foram realizadas biometrias no início e no final do estudo, onde todos os indivíduos de cada tratamento foram pesados usando balança de precisão (±0,01g SD Marte[®]) para determinar o ganho de peso dos camarões (g): (peso médio final - peso médio inicial). No final do período de estudo todos os camarões foram contados para a

determinação da taxa de sobrevivência (%): $[(n^{\circ} \text{ final de camarões} / n^{\circ} \text{ inicial de camarões}) \times 100]$.

Microrganismos

Para caracterização e quantificação da comunidade microbiana presentes no meio BFT foram coletadas amostras de água de cada caixa nos períodos informados anteriormente. As amostras foram fixadas em formalina 4% e Lugol neutro, mantidas em frascos âmbar para posterior contagem e identificação de grupos de microrganismos presentes. As coletas de água para contagem dos microrganismos foram realizadas nos tempos: 0 hora, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 120 horas, 144 horas, 168 horas, 192 horas, 216 horas e 240 horas.

Para contagem de ciliados (20-200 μm), flagelados (2-20 μm) e microalgas (diatomea cêntrica, penada) foi utilizado o microscópio invertido Zeiss Axiovert com magnificação de 200 x, onde alíquotas de 0,5 mL de amostra foram colocadas em câmara de sedimentação e os organismos contados em 50 campos aleatórios (Utermohl, 1958). Os microrganismos foram enquadrados em grupos diferenciados por tamanho. Todas as contagens foram realizadas no Laboratório de Ecologia do Fitoplâncton e de Microrganismos Marinhos da FURG.

Análise estatística

Depois de verificada a homocedasticidade e normalidade dos dados, foi realizada a análise de variância de uma via (ANOVA) para verificar a existência de diferença significativa entre os dados obtidos. Quando detectada diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$), o teste de Tukey (Sokal and Rohlf, 1969) de comparação de médias foi utilizado. Os valores percentuais foram transformados ($\arcsin^{y^{0.5}}$) antes de serem analisados (Triola, 1999).

RESULTADOS

Parâmetros físicos e químicos

A temperatura e a salinidade se mantiveram estáveis no decorrer de todo o experimento (Tabela 1). As médias de oxigênio dissolvido não diferiram significativamente, mas na seqüência de aplicações podemos identificar as grandes variações pontuais (Fig. 1). As médias dos parâmetros de qualidade da água como Alcalinidade, Nitrogênio amoniacal, Nitrito e Nitrato apresentaram diferenças significativas entre o controle e os tratamentos. Os sólidos suspensos totais foram significativamente diferentes no tratamento 12-horas que nos demais.

Tabela 1: Parâmetros de qualidade de água no decorrer dos 11 dias de experimento (média \pm desvio padrão).

Parâmetros	Controle	12-horas	24-horas	48-horas
Temperatura (°C)	28,83 \pm 0,40	28,60 \pm 0,39	28,40 \pm 0,32	28,38 \pm 0,25
Salinidade	31,00 \pm 1,00	31,00 \pm 1,00	31,00 \pm 1,00	31,00 \pm 1,00
OD (mg L ⁻¹)*	6,12 \pm 0,08	6,47 \pm 0,29	6,41 \pm 0,18	6,45 \pm 0,41
pH	8,02 \pm 0,01	8,01 \pm 0,01	8,07 \pm 0,01	7,93 \pm 0,02
Alcalinidade (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	115,00 \pm 0,00 ^a	132,50 \pm 2,50 ^b	131,66 \pm 1,44 ^b	130,00 \pm 0,00 ^b
N-AT (mg L ⁻¹)**	0,03 \pm 0,02 ^a	1,04 \pm 0,26 ^b	1,11 \pm 0,32 ^b	1,53 \pm 0,44 ^b
Nitrito (mg L ⁻¹)	0,40 \pm 0,03 ^a	1,25 \pm 0,31 ^b	1,18 \pm 0,46 ^b	1,23 \pm 0,36 ^b
Nitrato (mg L ⁻¹)	42,51 \pm 3,01 ^a	34,53 \pm 0,30 ^b	33,15 \pm 0,08 ^b	33,45 \pm 0,30 ^b
SST (mg L ⁻¹ ***)	1493,3 \pm 47,5 ^b	1596,6 \pm 16,2 ^a	1525,8 \pm 38,7 ^b	1456,6 \pm 65,6 ^b
Fosfato (mg L ⁻¹)	1,66 \pm 3,01	1,76 \pm 3,01	1,94 \pm 3,01	2,16 \pm 3,01

Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos (p<0,05)

* Oxigênio dissolvido, ** Nitrogênio amoniacal total, *** Sólidos suspensos totais

O fosfato apresentou uma queda de sua concentração inicial (1,94 mg L⁻¹) nos tratamentos Controle, 24-horas e 48-horas, onde o valor mínimo foi registrado no tratamento Controle 1,38 mg L⁻¹. Ao contrário dos demais, o tratamento 12-horas teve um acréscimo na concentração de fosfato chegando ao valor máximo de 2,38 mg L⁻¹.

A temperatura se manteve estável em todos os tratamentos e seu valor mínimo foi de 27,7 °C no tratamento 24-horas e o máximo foi 29,6 °C no Controle. A temperatura não se diferenciou significativamente nos tratamentos durante o experimento. A salinidade foi medida no início e fim do experimento sendo 30 e 32 respectivamente, não apresentando diferenças significativas entre os tratamentos.

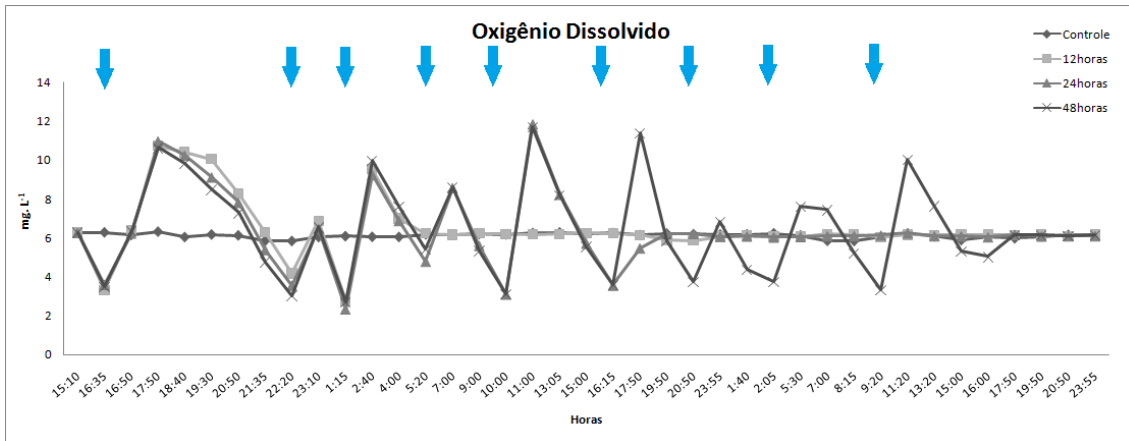


Figura 1: Valores de OD no período de aplicação do H₂O₂ (setas indicam o momento da aplicação de H₂O₂)

Na figura 1 são apresentados os níveis de oxigênio dissolvido nos diferentes tratamentos ao longo do estudo, onde as setas indicam as aplicações do H₂O₂. Os valores máximos de OD foram 11,85 mg L⁻¹ às 11:00 do segundo dia de experimento no tratamento 24-horas e o valor mínimo também foi no tratamento 24-horas com 2,34 mg L⁻¹ a 01:00 do segundo dia.

O pH se manteve estável no Controle, porém nos tratamentos onde houve adição de peróxido, ocorreu uma queda significativa nas primeiras 24-horas em todos eles e que se estendeu por mais um dia no tratamento 48-horas. O valor mínimo de pH foi encontrado no segundo dia de experimento no tratamento 48-horas 6,56 e o maior valor também foi no tratamento 48-horas 8,15 no final do experimento (Fig. 2).

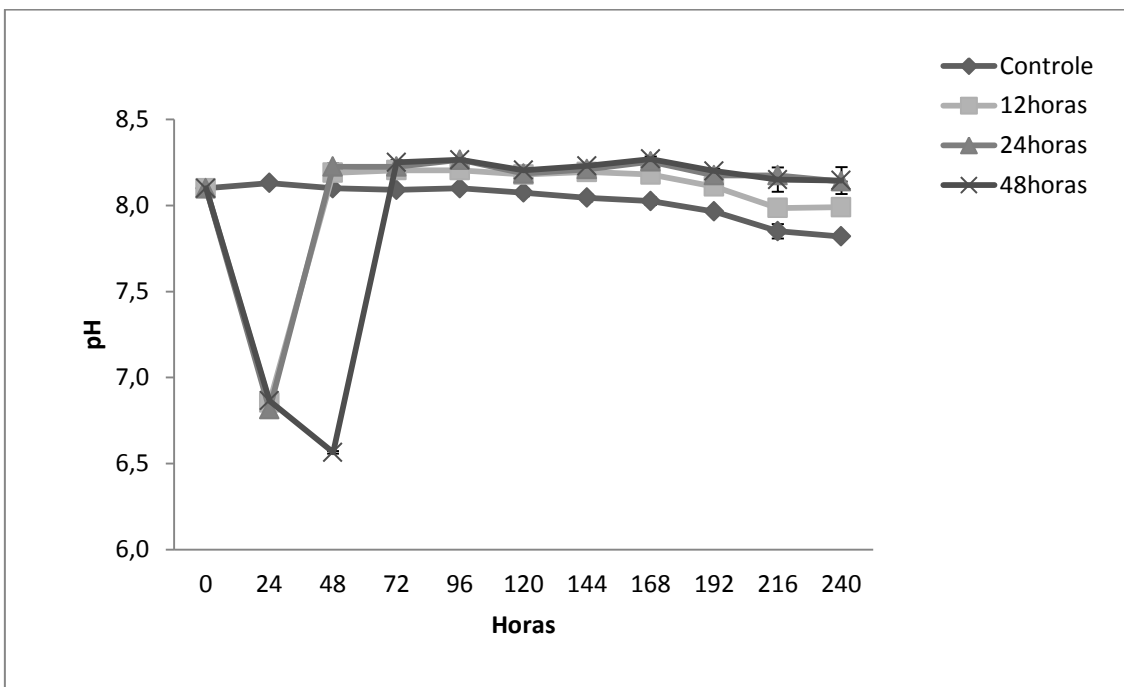


Figura 2: Variação do pH no decorrer do experimento

A alcalinidade foi medida no início e fim do experimento, o menor valor foi registrado no final no tratamento Controle (100 mg L⁻¹) e o maior valor ocorreu no

tratamento 12-horas (135 mg L^{-1}). O Controle se diferenciou significativamente dos demais tratamentos.

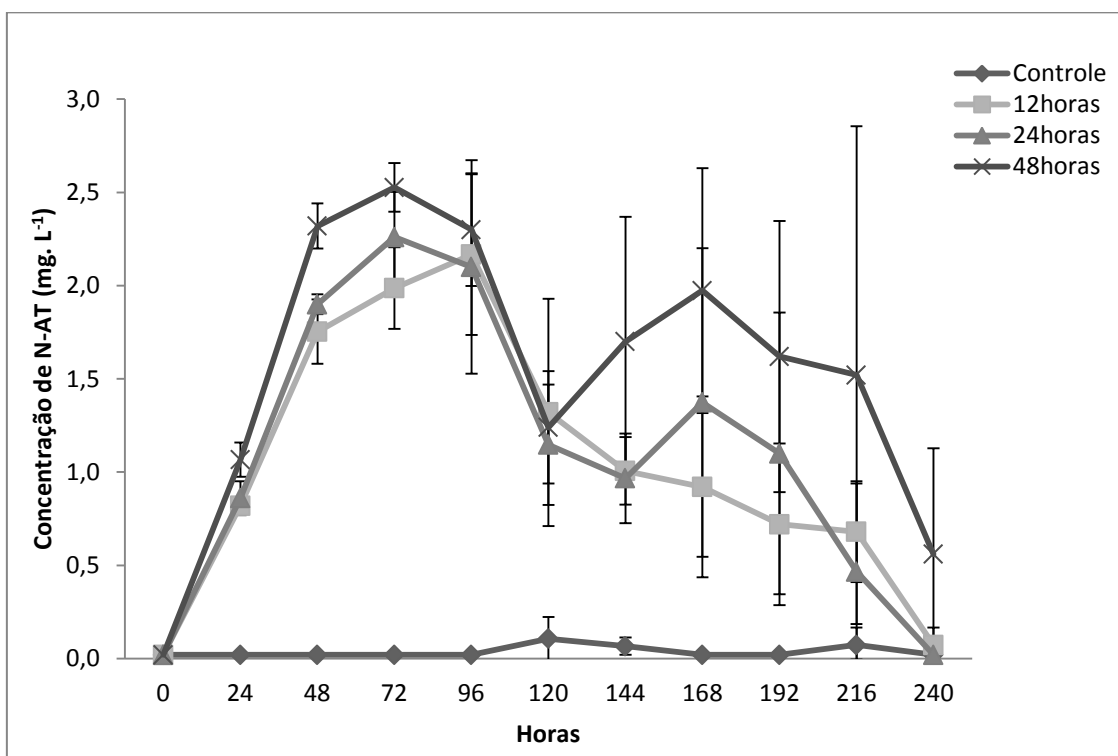


Figura 3: Concentração de nitrogênio amoniacal total (N-AT) durante o experimento

Na figura 3 encontram-se os níveis de Nitrogênio Amoniacal Total (N-AT) ao longo do estudo, foi verificado o efeito das aplicações de H_2O_2 com aumento da concentração de amônia nestes tratamentos que receberam peróxido de hidrogênio. O valor máximo de N-AT foi encontrado no tratamento 48-horas $2,52 \text{ mg L}^{-1}$ as 72 horas e os valores mínimos foram encontrados no tratamento controle que se mantiveram zerados ou próximos a zero durante todo o experimento. No final do experimento os tratamentos 12-horas e 24-horas estavam com a concentração de N-AT próxima a zero como no controle.

Devido aos elevados valores de N-AT, foram feitas fertilizações diárias, a partir das 48 horas de experimento, com melaço de cana de açúcar, para aumentar a relação C:N no meio, o sistema começou a reduzir os níveis de amônia. O tratamento controle começou a ser fertilizado apenas 96 horas após o início do experimento e nunca ultrapassou concentrações acima de $0,24 \text{ mg L}^{-1}$ de amônia.

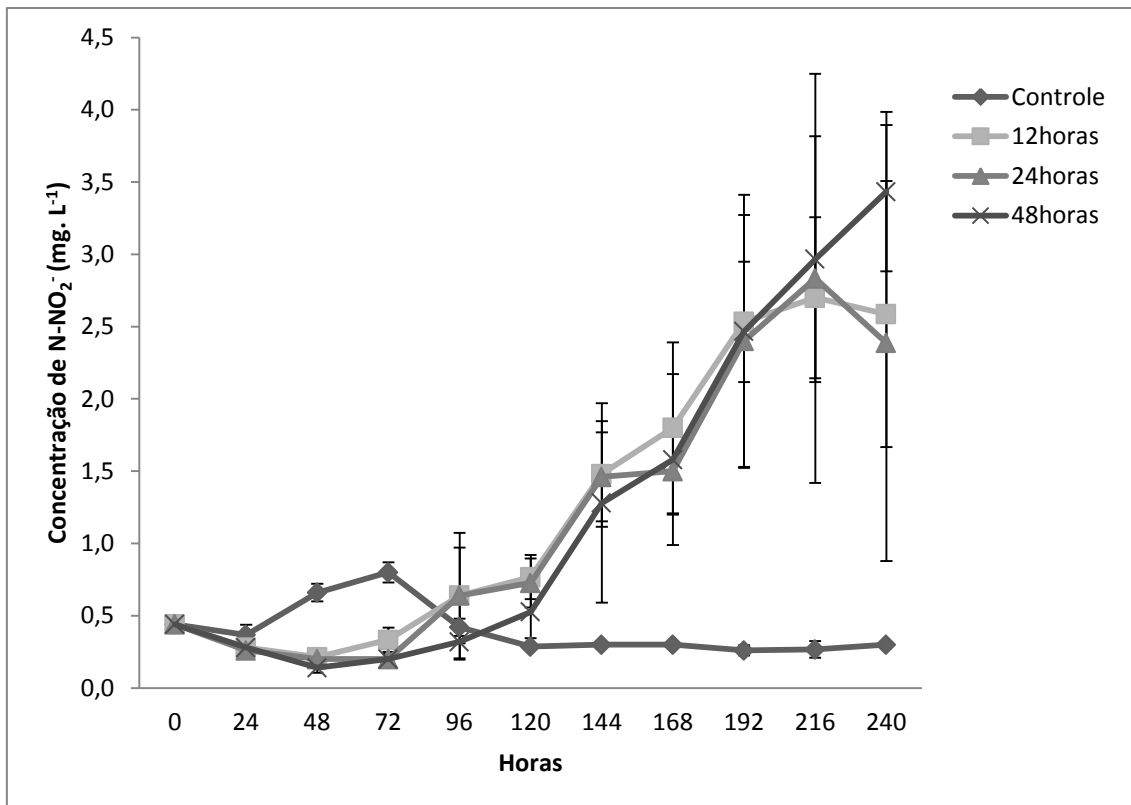


Figura 4: Concentração de nitrito no decorrer do experimento

Nos tratamentos com adição de peróxido ocorreram picos de nitrito, indicando uma recuperação da comunidade de bactérias nitrificantes. O tratamento controle, a partir do segundo dia acumula aproximadamente 1 mg L^{-1} de N-NO_2^- se diferenciando significativamente dos outros tratamentos e depois de 96 horas estabiliza a uma concentração de aproximadamente $0,3\text{ mg L}^{-1}$ de N-NO_2^- . Os tratamentos com peróxido atingiram o valor mínimo de nitrito nas primeiras 48 horas, aproximadamente $0,2\text{ mg L}^{-1}$, sendo o valor mínimo registrado no tratamento 48-horas $0,14\text{ mg L}^{-1}$ e o valor máximo também foi registrado neste tratamento $3,43\text{ mg L}^{-1}$ no final do experimento (Fig. 4).

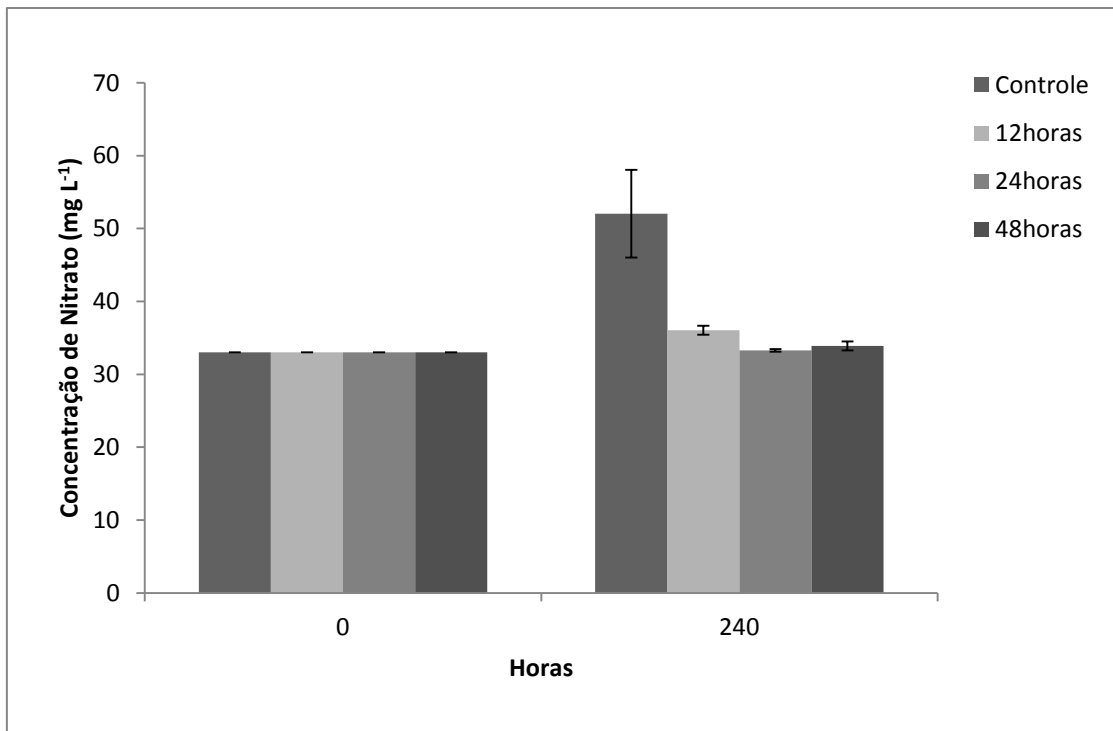


Figura 5: Concentração de nitrato no decorrer do experimento

O nitrato não sofreu alterações nos tratamentos com peróxido, variando de 33,0 a 36,1 mg L⁻¹, porém no controle a variação de 33,0 a 52,0 mg L⁻¹ se diferenciou significativamente dos demais tratamentos (Fig. 5).

Microrganismos

Os organismos presentes em maior abundância foram as microalgas *Planctonema sp.* (Clorófita) e *Oocistis sp.* (Clorófita), o ciliado *Euplotes sp.* e os flagelados. Também foram observados rotíferos em raras ocasiões.

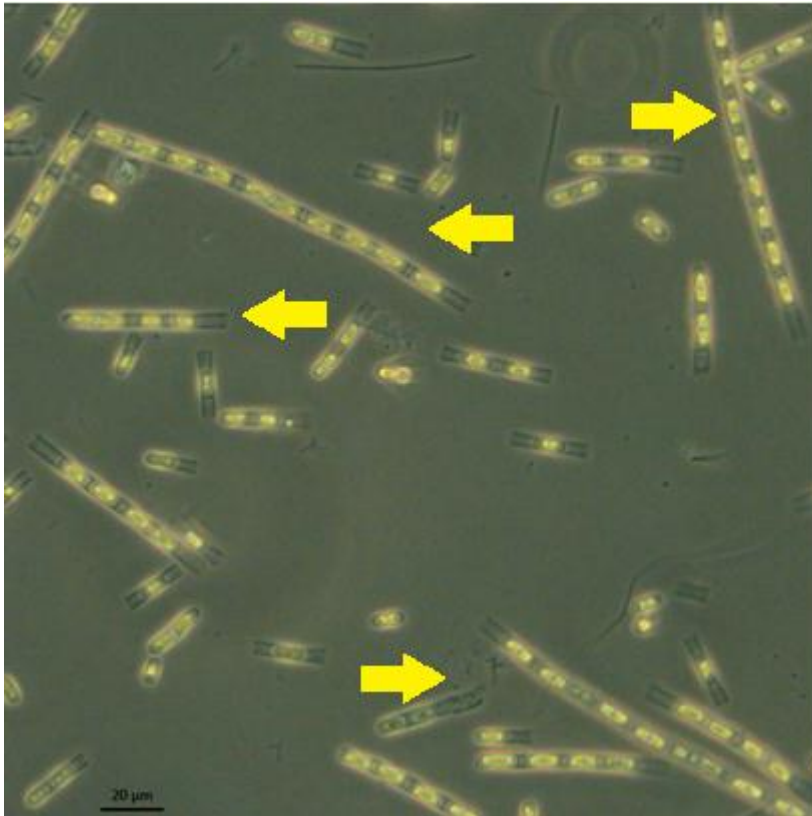


Figura 6: *Planctonema sp.* no aumento de 400x

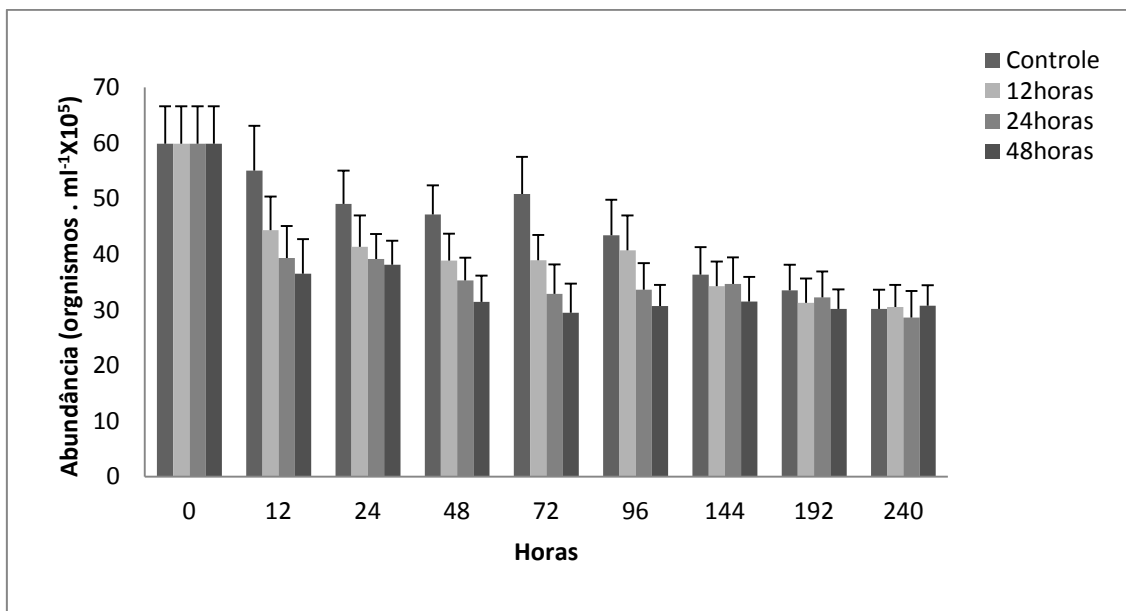


Figura 7: Abundância de *Planctonema sp.* no decorrer do experimento

Planctonema sp. (Fig. 6) foi o organismo mais abundante nas contagens e sua presença caracteriza a coloração esverdeada do biofilme (autotrófico). Nas primeiras 48 horas se observa uma diminuição no número de células nos tratamentos devido à aplicação do H_2O_2 . Nas primeiras 12 horas de experimento o tratamento Controle se diferencia significativamente do tratamento 48-horas. Esta diferença também é

evidenciada no segundo dia de experimento. Após 72 horas o controle se diferencia significativamente dos tratamentos 24-horas e 48-horas. No decorrer do experimento o controle também tendeu a diminuir a abundância de *Planctonema sp.*

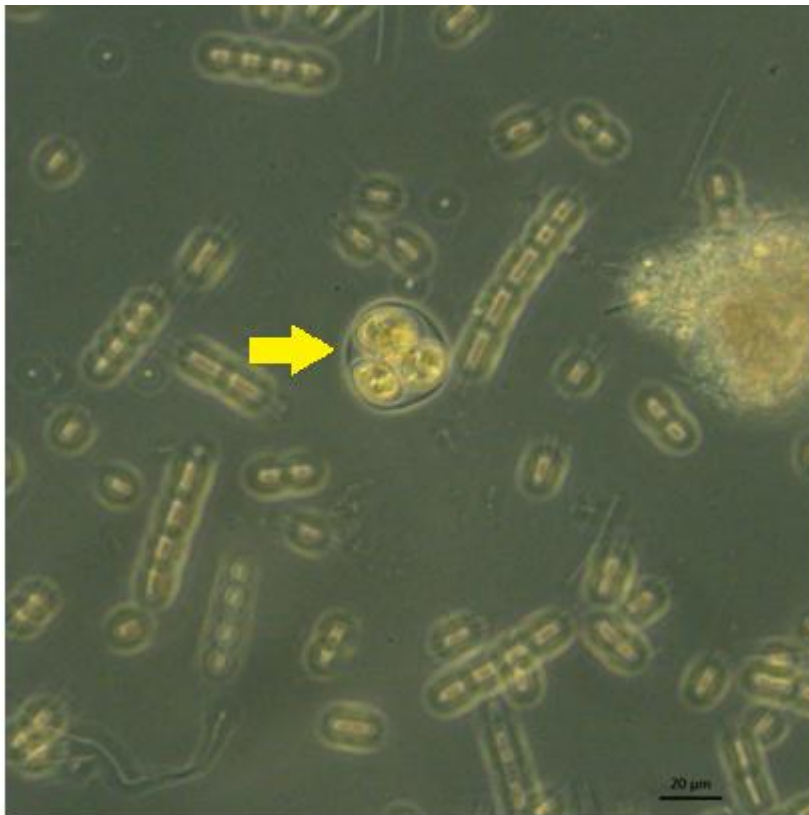


Figura 8: *Oocistis sp.* no aumento de 400x

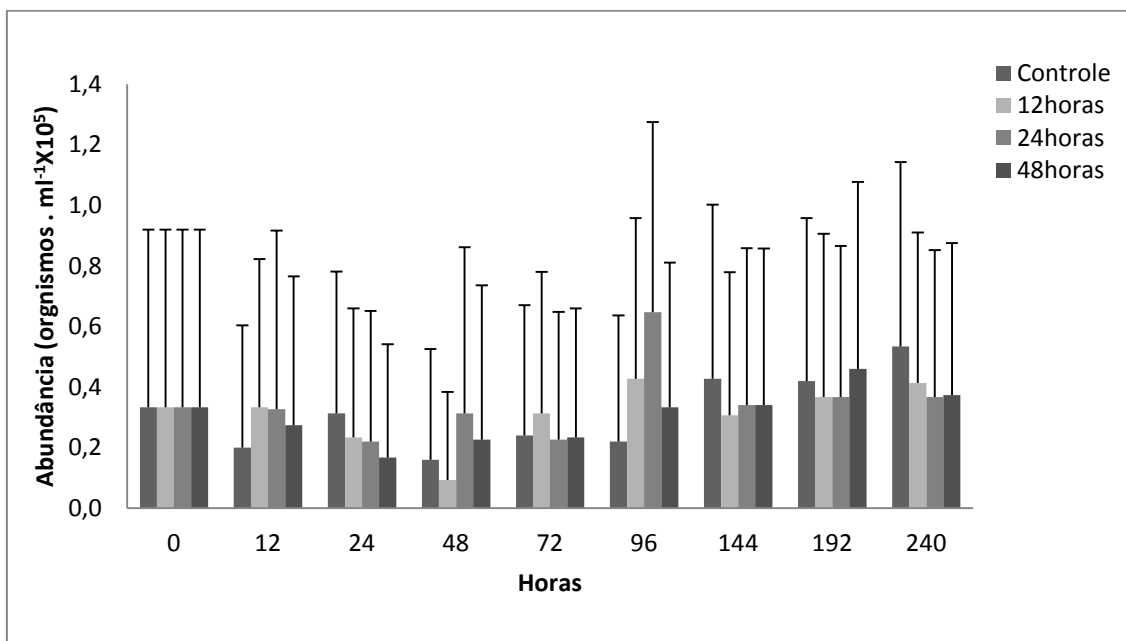


Figura 9: Abundância de *Oocistis sp.* no decorrer do experimento

Oocistis sp. (Fig. 9) também esteve presente no meio de cultivo. Esta microalga também não sofrer com o efeito do peróxido e se manteve presente, mesmo que em números baixos, em todas as amostras. Os tratamentos com peróxido não se diferenciaram significativamente do Controle ou entre si.

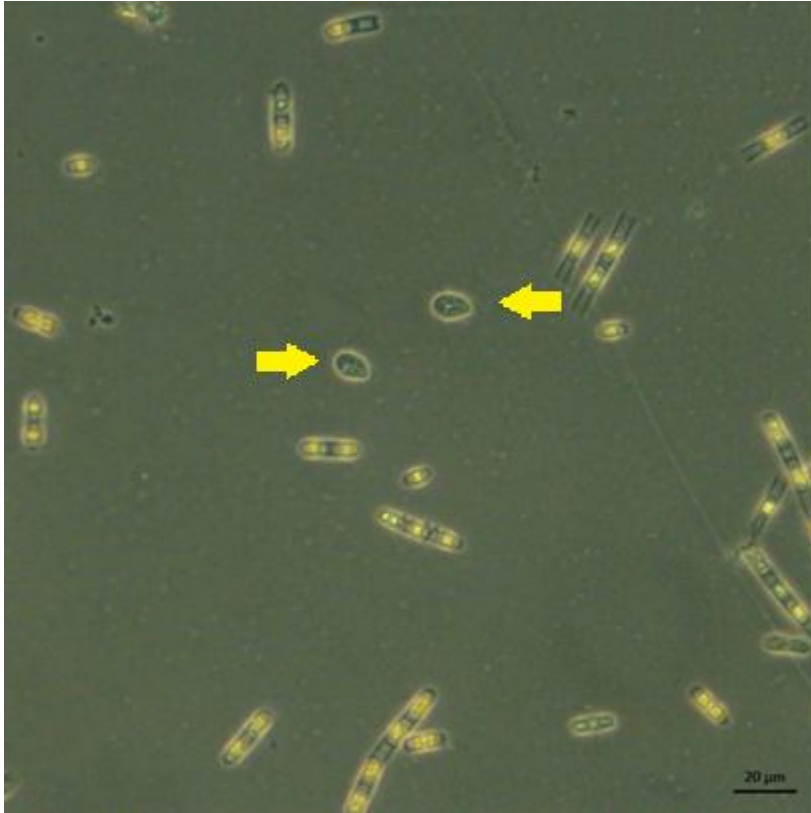


Figura 10: Flagelados no aumento de 400x

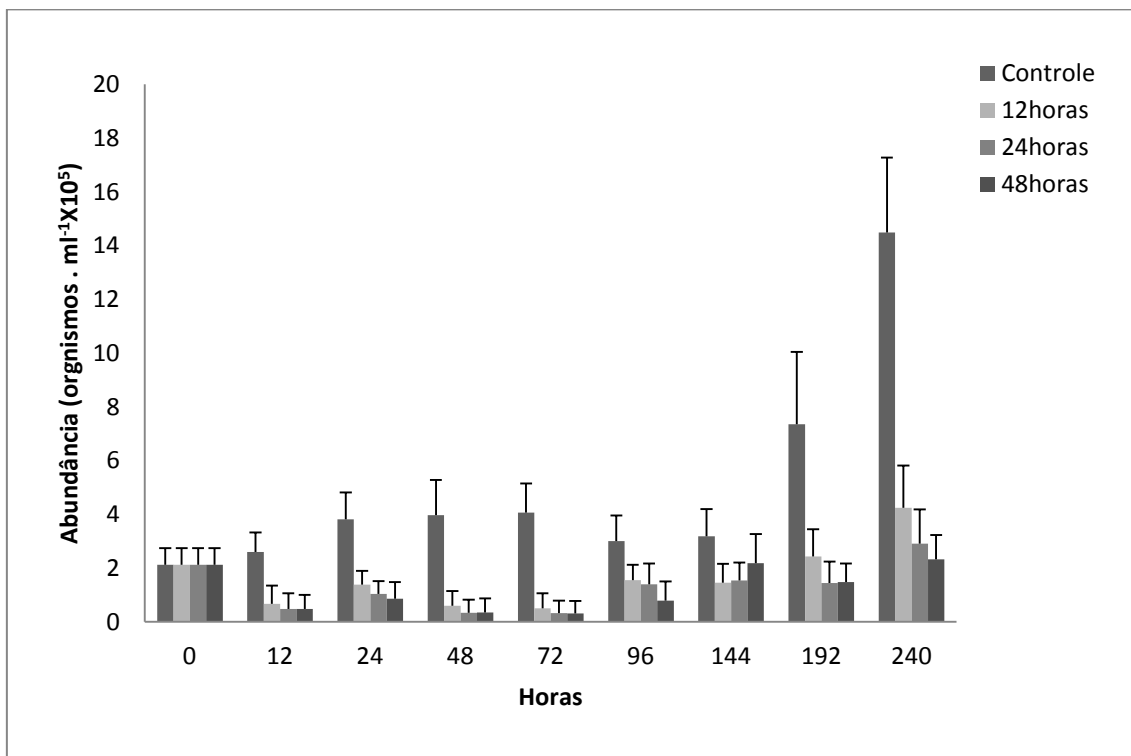


Figura 11: Abundância de flagelados no decorrer do experimento

Para os flagelados (Fig. 11), pode-se notar o efeito da adição de H_2O_2 desde o início das aplicações. O controle apresentou valores significativamente maiores do que os demais tratamentos. Entretanto, a partir de 96 horas os números de flagelados começaram a aumentar em todos os tratamentos, indicando uma recuperação destes organismos no meio de produção. A partir das primeiras 12 horas de experimento o Controle sempre se diferenciou significativamente dos três tratamentos, menos em 144 horas de experimento, e não houve diferença significativa entre os tratamentos que receberam peróxido de hidrogênio.

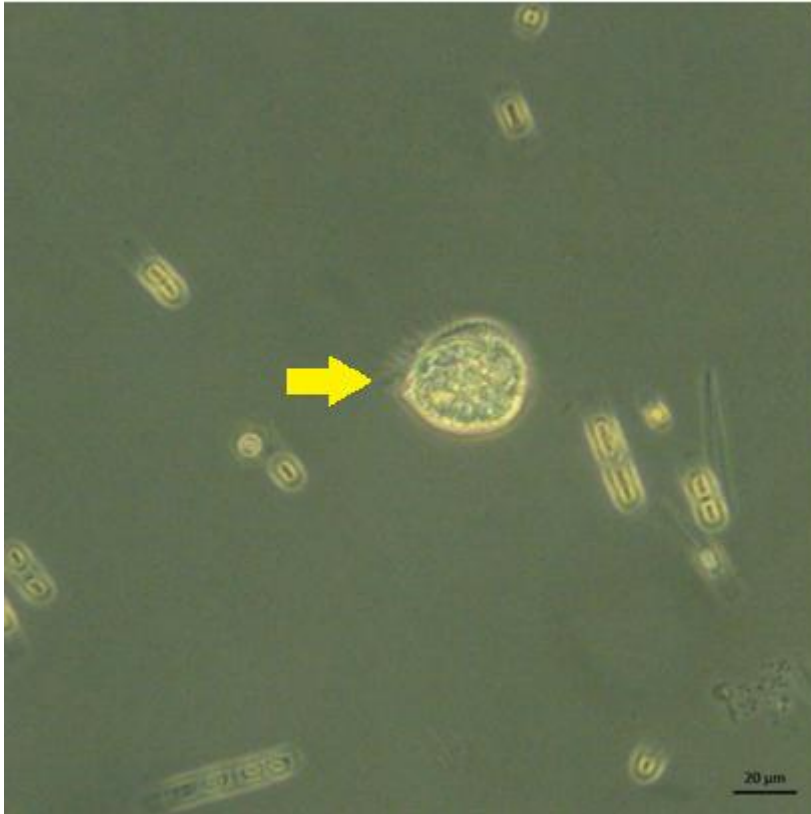


Figura 12: *Euplotes sp.* no aumento de 400x

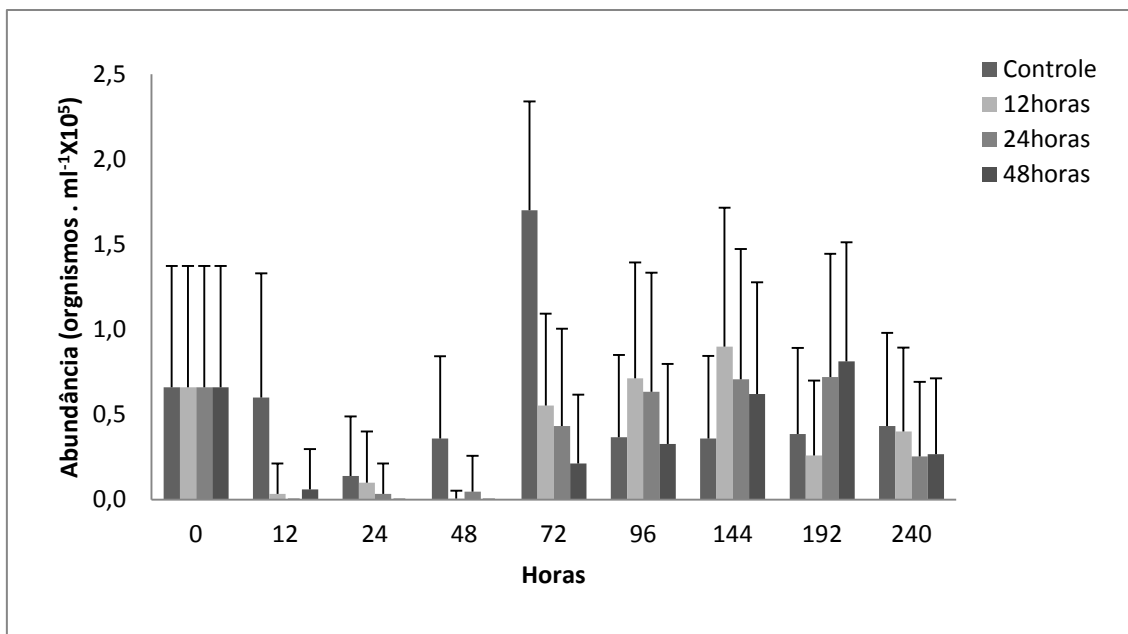


Figura 13: Abundância de *Euplotes sp.* no decorrer do experimento

O ciliado *Euplotes sp.* (Fig. 13) mostrou uma redução de sua abundância nas primeiras 48 horas em todos os tratamentos onde houve adição de peróxido de hidrogênio, havendo uma recuperação da população de ciliados após este período. Somente em 72 horas ocorreu diferença significativa entre o Controle e o tratamento 48-horas. Nas demais amostragens não ocorreram diferenças significativas.

Desempenho zootécnico

Tabela 2: Dados zootécnicos dos camarões utilizados no decorrer dos 11 dias de experimento (média ± desvio padrão).

Parâmetros	Controle	12horas	24horas	48horas
Peso inicial(g)	5,509 ± 1,05	5,509 ± 1,05	5,509 ± 1,05	5,509 ± 1,05
Ganho de peso(g)	1,005 ± 0,46 ^a	0,354 ± 0,21 ^b	0,596 ± 0,17 ^{ab}	0,553 ± 0,11 ^{ab}
Sobrevivência	97,76% ± 3,86	100%	100%	97,76% ± 3,86

Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os valores (p<0,05)

Nos 11 dias de duração do experimento os camarões tiveram crescimento de aproximadamente um grama no controle e de meio grama nos tratamentos não havendo diferença significativa entre tratamentos e controle, porém houve diferença significativa entre os pesos inicial e final no controle, 24horas e 48horas. O ganho de peso se diferenciou significativamente somente entre o controle e o tratamento 12horas. As altas taxas de sobrevivência não tiveram diferenças significativas, nos mostrando que o H₂O₂ não afetou os camarões durante o experimento e as mortes de dois animais, um no controle e um no tratamento 48horas, se deram por outro fator.

DISCUSSÃO

Os dados de qualidade de água, temperatura, salinidade e, especialmente oxigênio dissolvido (OD), não diferiram significativamente entre os tratamentos e se mantiveram dentro dos padrões ideais para o cultivo da espécie *L. vannamei* (Van-Wyk & Scarpa 1999).

O principal limitante na produção de animais aquáticos é o oxigênio. A falta de O_2 pode levar a produção ao colapso em questão de minutos. Vinatea *et al.* (2009) informam que a água de um sistema superintensivo de *L. vannamei* (856 camarões/ m^3) com $4,1 \text{ mg } O_2 \text{ L}^{-1}$, os níveis de OD caem a níveis críticos ($0,65 \text{ mg } O_2 \text{ L}^{-1}$) em, no máximo, 30 minutos após desligamento do sistema de aeração. Isto se dá devido à grande demanda de oxigênio dissolvido pelos organismos produzidos e pelo metabolismo microbiano aeróbico acentuado nestes sistemas (Burford *et al.* 2003, Wasielesky *et al.* 2006).

Em casos de falhas no sistema de aeração de sistemas BFT, a utilização do H_2O_2 se mostrou viável na manutenção dos níveis de OD e sobrevivência dos organismos produzidos. Por exemplo, Lima *et al.* (2012) verificaram que a utilização de 5 ppm de peróxido de hidrogênio promoveu o aumento nos níveis de OD da água de produção, mas seu efeito teve duração curta, de apenas duas a três horas, devido à alta taxa de dissolução deste composto na água. No intuito de estabelecer os níveis de toxicidade para *L. vannamei*, Furtado *et al.* (2014) verificaram que o nível de segurança é de $14,3 \mu\text{L } H_2O_2 \text{ L}^{-1}$ e que dosagens acima de $58 \mu\text{L } H_2O_2 \text{ L}^{-1}$ afetam os camarões, causando melanização na carapaça e guelras, mortalidade e queda na qualidade de água.

Sabe-se que o uso de H_2O_2 favorece a ocorrência de stress oxidativo nos organismos presentes no sistema, pois quando se decompõe no meio de produção gera as espécies reativas de oxigênio (ERO). Como exemplos de EROs temos o radical hidroxila ($OH\cdot$), o próprio peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Sigler *et al.* 1999). A redução de um elétron no oxigênio produz o radical superóxido, $O_2^{\cdot-}$, que é uma base fraca com uma baixa reatividade com a maioria das biomoléculas e um oxidante fraco em pH neutro. O peróxido de hidrogênio é capaz de difundir-se rapidamente através das membranas celulares e na presença de íons de metais de transição podem ser convertidos em radicais hidroxila através da reação de Fenton (Betteridge 2000).

Em pH neutro ou ácido, H_2O_2 existe predominantemente no estado totalmente neutro. Portanto, sua molécula não possui carga elétrica e pode passar livremente através das membranas se difundindo por toda a célula. O peróxido de hidrogênio é um oxidante mais forte do que $O_2^{\cdot-}$ e tem sido sugerido que este pode atuar também como uma molécula de sinalização (Khan e Wilson, 1995). O dano oxidativo causado por H_2O_2 tem sido atribuído à sua reação com os metais de transição (Fe^{2+} , Fe^{3+} e Fe^{4+}). Estas reações podem envolver a formação de radicais centrados em proteínas os quais, em seguida, catalisam os processos oxidativos, tal como a peroxidação lipídica (Barr *et al.* 1996). O H_2O_2 reage muito rapidamente com várias peroxidases e a reação dá origem a radicais livres derivados (Mason, 1997).

Especificamente com relação às bactérias, Imlay *et al.* 1988 estudaram a sensibilidade de diversas cepas mutantes de *Escherichia coli* à baixas concentrações de peróxido de hidrogênio. As cepas tiveram comprometidas as suas capacidades de reparar danos no DNA e se tornaram muito sensíveis, morrendo após as aplicações de peróxido de hidrogênio. Entretanto, células privadas de alimentação (com baixos níveis de equivalentes redutores) eram resistentes a peróxido de hidrogênio. Por outro lado, estudos *in vitro* da reação de Fenton (reação de peróxido de hidrogênio com o ferro) mostraram que o peróxido de hidrogênio é capaz de gerar rupturas das cadeias de DNA, formar radicais de DNA prejudiciais, na presença de metais de transição (Fe, Cu, Zn) e de equivalentes redutores, provocando a morte das bactérias (Storz *et al.* 1990, Imlay 2003).

Apesar de não terem sido determinadas as abundâncias das bactérias presentes nas amostras, os resultados de N-AT e N-NO₂⁻ demonstram claramente que a comunidade bacteriana nitrificante sofreu os efeitos da adição do peróxido, pois após as aplicações de H₂O₂ os valores de N-AT aumentaram significativamente e só tornam a diminuir 24 horas após o término das aplicações de H₂O₂ e após as fertilizações com melaço de cana de açúcar. As altas concentrações de amônia (N-AT) podem causar prejuízos ao crescimento dos camarões, ou mesmo mortalidade destes organismos, em casos de concentrações elevadas (Ostrensky & Wasielesky 1995, Lin & Chen 2003, Li *et al.* 2007). Em nenhum momento os níveis de N-AT passaram do nível de segurança, devido fertilização com melaço de cana de açúcar, não afetando assim os organismos produzidos (Avnimelech 1999, Hari *et al.* 2004, Samocha *et al.* 2007).

A ação negativa da adição de peróxido de hidrogênio sobre bactérias nitrificantes já foi constatado em outros estudos. Por exemplo, Furtado *et al.* (2014) detectaram um aumento nos níveis de N-AT de acordo com o aumento da dosagem de H₂O₂ utilizada para oxigenar o sistema de aquíicultura. Já Schwartz *et al.* (2000) verificaram que biofiltros em sistemas de recirculação para peixes tem uma redução de 80% na capacidade de remoção de amônia, após a aplicação de 100 mg L⁻¹ de H₂O₂. Dependendo da dose de H₂O₂ utilizada na oxigenação do sistema as comunidades bacterianas podem, ou não, colapsar completamente (Pedersen & Pedersen 2012).

Neste estudo, após 96 horas de experimento verificou-se uma diminuição nas concentrações de N-AT nas mesmas proporções do aumento nas concentrações de N-NO₂⁻, o que indica que não houve perda de amônia por volatilização. A diminuição na concentração de amônia e posterior aumento nas concentrações de nitrito evidenciam uma rápida recuperação da comunidade de bactérias amônio-oxidantes. Por outro lado os valores de N-NO₃⁻ se mantiveram estáveis nos tratamentos, indicando que a comunidade de bactérias nitrito-oxidantes não se recuperou até o final das análises. Sabe-se que bactérias nitrificantes presentes em água salgada demoram mais tempo para se estabelecer e se tornarem mais ativas influenciando no seu desenvolvimento e nos processos de nitrificação (Timmons *et al.*, 2002). Portanto, é possível que, a ação do peróxido de hidrogênio seja mais danosa as bactérias nitrificantes de água salgada.

Das microalgas presentes no sistema de bioflocos verificou-se que apenas a microalga *Planctonema sp.* sofreu algum tipo de efeito do H₂O₂ nas primeiras 72 horas de experimento, pois a abundância desta microalga no tratamento Controle diferiu

significativamente dos tratamentos onde houve adição de peróxido de hidrogênio. Matthijs *et al.* (2012) verificaram um aumento significativo da população de algas verdes após as aplicações de H₂O₂ em oito mesocosmos situados no lago Koetshuis, porém estas mostravam danos na superfície externa de suas paredes celulares. Entretanto, a redução da abundância de *Planctonema sp.* observada após 72 horas de experimento no tratamento Controle provavelmente se deve a alta concentração de SST (Gaona *et al.*, 2011) e a baixa luminosidade (500 lux). Por outro lado *Oocistis sp.* não pareceu ter sofrido o efeito do H₂O₂, SST e da luminosidade, pois sua presença em todos os tratamentos se manteve constante.

As microalgas e plantas em geral produzem ERO's com diferentes finalidades, tais como, controlar patologias e regularem compostos mais tóxicos (Apel & Hirt 2004). Drábková *et al.* (2007) constataram que, quanto maior a incidência luminosa, maior é a toxicidade do H₂O₂ em cianobactérias e microalgas. Apel & Hirt (2004) também descrevem uma gama de enzimas antioxidantes presentes nas células vegetais que auxiliam na proteção das organelas destas, tornando-as mais resistentes aos seus efeitos. Alguns desses mecanismos de eliminação enzimática de ERO's em algas são o superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e da peroxidase (POD), bem como compostos não enzimáticos, tais como, a glutathiona (GSH) e carotenóides (CAR) (Mallick & Mohn, 2000).

No protozooplanton os flagelados sofreram um efeito claro das aplicações de H₂O₂, já nas primeiras horas de experimento, com uma diminuição acentuada na abundância desses organismos nos tratamentos devido a sua menor capacidade de resistir ao stress oxidativo. Após o término das aplicações de H₂O₂ em 48 horas começa uma recuperação dessa abundância, mas nunca chegando ao mesmo nível do tratamento Controle. A espécie de ciliado presente no cultivo foi *Euplotes sp.* que também se mostrou sensível aos efeitos da aplicação de H₂O₂. Após as primeiras 72 horas, onde há uma diferença significativa entre o controle e os tratamentos, estes organismos começam a se recuperar dentro do sistema de cultivo da mesma maneira que os flagelados. A população de protozooplanton foi drasticamente reduzida em concentração de 5 a 8 mg L⁻¹ quase sendo eliminados por completo (Matthijs *et al.* 2012).

A comunidade microbiana que compõe os bioflocos é formada por bactérias, protozoários, e outros microrganismos que podem servir como presas (Samocha *et al.* 2007). O efeito da produtividade natural em sistemas de produção de *L. vannamei*, comprovaram tal fato, devido as melhores taxas de conversão alimentar em sistemas sem renovação de água e com formação de bioflocos obtidos por Wasielesky *et al.* (2006a). Os baixos valores na abundância do protozooplanton podem ter levado ao menor crescimento dos camarões nos tratamentos onde o H₂O₂ foi aplicado. Isto porque os protozoários presentes no biofilme podem ser fontes de elementos essenciais para o camarão, tais como ácidos graxos poliinsaturados, minerais, aminoácidos e vitaminas (Avnimelech 2006; Tacón *et al.* 2002; Mosset *et al.* 2006). Além disso, a alimentação seletiva dos microrganismos presentes no biofilme também foi indicada pelo fracionamento de um isotópico de carbono observado em *Farfantepenaeus paulensis* (, Abreu *et al.* 2007).

CONCLUSÃO

O presente estudo constatou que a utilização de H₂O₂ afeta o processo de nitrificação no sistema BFT e indiretamente afeta os camarões resultando em um menor desempenho no crescimento e ganho de peso. Entretanto, verificou-se que existe uma rápida recuperação especialmente das bactérias amônio-oxidantes, mas não das nitrito-oxidantes.

O efeito da adição de peróxido de hidrogênio não parece ser acumulativo uma vez que não se observou maiores danos nos tratamentos que receberam este elemento por períodos maiores de tempo.

Conclui-se que em um curto período de tempo, o uso do H₂O₂ pode ser ministrado para salvar os organismos produzidos em sistema BFT sem causar danos sérios. Entretanto, outros estudos devem ser feitos para detectar o tempo máximo de utilização de H₂O₂ e seu efeito sobre o camarão *Litopenaeus vannamei* e seu desempenho zootécnico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abele-Oeschger D., Sartoris F.J., Pörtner H.O. Hydrogen peroxide causes a decrease in aerobic metabolic rate and in intracellular pH in the shrimp *Crangon crangon*. *Comp Biochem Physiol*; 117: 123-129, 1997.
- Abreu, P.C., Ballester, E.L.C., Odebrecht, C., Wasielesky, W. Jr, Cavalli, R.O., Granéli, W. & Anésio, A.M. Importance of biofilm as food source for shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*) evaluated by stable isotopes ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$). *J Exp Mar Biol Ecol*, 347, 88–96, 2007.
- Aminot A., Chaussepied, M. *Manuel des analyses chimiques en milieu marin*. Brest, CNEXO, 395p., 1983.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). *Official Methods of Analysis of AOAC, 16th edition*. Patricia Cunniff (editora), Washington, DC. 2000
- Apel K., Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, p 373–399, 2004.
- APHA (American Public Health Association). *Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th edition*. Washington, DC. 1193p, 1998.
- Avnimelech, Y. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture*, 176, p227-235, 1999.
- Avnimelech, Y. Bio-filters: The need for a new comprehensive approach. *Aquacultural Engineering* 34, p172–8, 2006.
- Avnimelech, Y. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. *Aquaculture* 264, 140–147, 2007.

- Barr, D.P., Gunther M.R., Deterling L.J., Tomer K.B., Mason R.P.: ESR spin trapping of a protein-derived tyrosyl radical from the reaction of cytochrome c with hydrogen peroxide. *J.Biol.Chem.* 271, 15498-15503, 1996.
- Bendschneider, K., Robinson, R.J. A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in seawater. *J. Mar. Res.* 11, 87-96, 1952.
- Betteridge, D. J. What is oxidative stress? *Metabolism*, Volume 49, Issue 2, Supplement 1, p -8, 2000.
- Boyd, C.E. Pond Water Aeration System. *Aquacultural Engineering*, v. 18, p. 29 – 40, 1998.
- Boyd, C.E. Overview: mechanical pond aeration. *Global Aquaculture Advocate*, v.8, p. 59-60, 2008b.
- Burford, M.A., Thompson P.J., Bauman R.H. & Pearson D.C. Nutrient and microbial dynamics in high-intensive, zero-exchange shrimp ponds in Belize. *Aquaculture*, 219: 393-41,2003.
- Burford, M.A., Thompson, P.J., McIntosh, R.P., Bauman, R.H. Pearson, D.C. The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero-exchange system. *Aquaculture*, 232:525-537, 2004.
- Drábková, M., Admiraal, W., and Marsálek, B. Combined exposure to hydrogen peroxide and light – Selective effects on cyanobacteria, green algae and diatoms. *Environ. Sci. Technol.*, 41(1), 309-314, 2007.
- Gaona, C.A.P., Poersch, L.H., Krummenauer, D., Foes, G.K., Wasielesky, W. The effect of solids removal on water quality, growth and survival of *Litopenaeus vannamei* in a biofloc technology culture system. *International Journal of Recirculating Aquaculture*. 11: 54-73, 2011.
- Furtado, P. S., Serra, F. P., Poersch, L. H., & Wasielesky Jr, W. Short communication: Acute toxicity of hydrogen peroxide in juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in biofloc technology systems. *Aquaculture International*, 22(2), 653-659. 2014.
- Halliwell B., Gutteridge J.M. Free radicals in biology and medicine. *New York: Oxford University Press*; 1998.
- Imlay, J.A., Chin, S.M., Linn, S. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science*. 240 : 640-642, 1988.
- Imlay, J. A. Pathways of oxidative damage. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 395-418, 2003.

- Jiang, L., Pan, L. Effect of dissolved oxygen on immune parameters of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 18: 185-188, 2005.
- Jory, D.E., Cabrerias, R.T., Durwood, M.D., Fegan, D., Lee, G.P., Lawrence, A.L., Jackson, J.C., McIntosh, P.R., Castañeda, A.J. A global review of shrimp feed management: status and perspectives. *Aquaculture the World Aquaculture Society*, Baton Rouge, LA USA, 2001.
- Khan A.U., Wilson T.: Reactive oxygen species as cellular messengers. *Chem.BioL*.2,437-445, 1995.
- Lima, J.P.V., Brito, L.O., Costa, W.M., Costa, W.M., Olivera, G.A. Utilização de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) no incremento de oxigênio dissolvido em cultivo de *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Pesquisa Agropecuária Pernambucana*, v. 17, 2012.
- Mallick,N., Mohn, F.H. Reactive oxygen species: response of algal cells. *J. Plant Physiol.*, 157, pp. 183–193, 2000
- Mason R.P.: Electron spin resonance investigations of free radical toxicology, in Free Radicals in Biology and Environment (F. Minisci, Ed). *Kluwyver Academic Publishers, Dordrecht-Boston-Londo*, p. 1-27, 1997.
- Matthijs H.C.P., Visser P.M., Reeze B., Meeuse J., Slot P.C., Wijn G., Talens R., Huisman J. Selective suppression of harmful cyanobacteria in an entire lake with hydrogen peroxide. *Water Research* 46, 1460-1472, 2012.
- Mcabee, B.J, Browdy C.L., Rhodes R.J. & Stokes A.D. 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, 2003.
- Moss, S.M., Forster, I.P. & Tacon, A.G.J. Sparing effect of pond water on vitamins in shrimp diets. *Aquaculture* 258: p 388–395, 2006.
- Ostrensky, A, Wasielesky, W. Acute Toxicity of Ammonia to various life stages of the São Paulo shrimp, *Penaeus paulensis*, Pérez-Farfante, 1967. *Aquaculture*, 132: 339-347, 1995.
- Pedersen, L.F., Pedersen, P.B. Hydrogen peroxide application to a commercial recirculating aquaculture system. *Aquacultural Engineering* 46, p40-46, 2012.
- Reichwaldt, E.S., Zheng, L., Barrington, D.J., Ghadouani, A. “Acute Toxicological Response of *Daphnia* and *Moina* to Hydrogen Peroxide.” *J. Environ. Eng.*, 138(5), 607-611, 2012.

- Samocha, T.M., Patnaik, S., Speed, M., Ali, A.M., Burger, J.M., Almeida, R.V., Ayub, Z. Use of molasses as carbon source in limited discharge 35 nursery and grow-out systems for *Litopenaeus vannamei*. *Aquacultural Engineering*, 36:184-191, 2007.
- Schryver, P., Crab, R., Defoirdt, T., Boon, N., Verstraete, W. The basics of bio-flocs technology: the added value for aquaculture. *Aquaculture* 277, 125-137, 2008.
- Schwartz, M.F., Bullock, G.L., Hankins, J.A., Summerfelt, S.T., Mathias, J.A. Effects of selected chemo-therapeutants on nitrification in fluidized-sandbiofilters for coldwater fish production. *International Journal of Recirculating Aquaculture* 1, 61–81, 2000.
- Sigler K, Chaloupka J, Brozmanová J, Stadler N, Höfer M. Oxidative stress in microorganisms. *Folia Microbiol.*44:587–624, 1999.
- Sokal, R. R. and F. J. Rohlf. Biometry. Principle and practices of statistics in biological research. *W. H. Freeman & Company*. 776p, 1969.
- Storz G., Tartaglia L. A., Farr S. B., Ames B. N. Bacterial defenses against oxidative stress. *Trends Genet.* 6, 363–368, 1990.
- Tacon, A.G.J., Cody J.J., Conquest L.D., Divakaran S., Forster I.P. & Decamp O.E. Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. *Aquacult. Nutrition.* 8: 121-137, 2002.
- Timmons M.B., Ebeling J.M., Wheaton F.W., Summerfelt S.T. & Vinci B.J. Recirculating Aquaculture Systems. *Cayuga Aqua Ventures*, New York, NY, USA, p769, 2002.
- Triola, MF. Introdução à Estatística. Rio de Janeiro: LTC, 7ª edição, 1999.
- UNESCO. Chemical methods for use in marine environmental monitoring. *Manual and Guides 12*, Intergovernmental Oceanographic Commission. Paris, France, 1983.
- Utermohl, H. Zurvervollkommnung der quantitativen phytoplankton methodik. *Int. Ver. Theor. Angew. Limnol* 9:1-38, 1958
- Van Wyk & Scarpa J. “ Water Quality Requirements and Management.” Pages 128-138 in P. Van Wyk et al. (editors). *Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems*. Tallahassee, Florida, USA. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, 1999.

- Vinatea, L., Gálvez, A.O., Venero, J., Leffler, J., Browdy, C. Oxygen consumption of *Litopenaeus vannamei* juveniles in heterotrophic medium with zero water exchange. *Pesq. agropec. bras.* 44, (5) 534-538, 2009.
- Vinatea, L., Gálvez, A.O., Browdy, C.L., Stokes, A., Venero, J., Haveman, J., Lewis B.L., A. Lawson, A. Shuler, J.W. Leffler. Photosynthesis, water respiration and growth performance of *Litopenaeus vannamei* in a super-intensive raceway culture with zero water exchange: interaction of water quality variables. *Aquacultural Engineering*, 42 (1), pp. 17–24, 2010.
- Wasielesky Jr. W., Atwood, H., Stokes, A. & Browdy, C.L. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 258: 396–403, 2006.