

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE PESQUISAS HIDRÁULICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS HÍDRICOS E SANEAMENTO AMBIENTAL**

DISSERTAÇÃO

**CARACTERIZAÇÃO DE COMUNIDADE MICROBIANA EM
BIOFILME ASSOCIADA A FILTRO BIOLÓGICO PARA O
TRATAMENTO DE EFLUENTE DE AQUACULTURA**

Karina Vogel Vidal de Oliveira

Porto Alegre, abril de 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE PESQUISAS HIDRÁULICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS HÍDRICOS E SANEAMENTO AMBIENTAL

**Caracterização de Comunidade Microbiana em Biofilme Associada a Filtro
Biológico para o Tratamento de Efluente de Aquacultura**

Karina Vogel Vidal de Oliveira

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental (M.Sc.).

Orientador: Prof. Antônio Domingues Benetti

Co-orientadora: Profa. Ana Paula Guedes Frazzon

Banca Examinadora:

Prof. Paulo César O. Vergne de Abreu	Departamento de Oceanografia Biológica, FURG
Dra. Lúcia Helena Ribeiro Rodrigues	Departamento de Biodiversidade e Ecologia, PUCRS
Prof. Dieter Wartchow	Instituto de Pesquisas Hidráulicas UFRGS

Porto Alegre, abril de 2010

Dedico esta dissertação ao
Cauê, pois sem ele jamais teria
tido forças para chegar até o fim
desta extenuante jornada que é o
mestrado.

« L'essentiel est invisible pour les yeux. »
Antoine de Saint-Exupéry

“Nós matamos o tempo, mas ele enterra-nos.”
Machado de Assis

APRESENTAÇÃO

Este trabalho foi desenvolvido no Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental do Instituto de Pesquisas Hidráulicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no Laboratório de Aquacultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Laboratório de Ecologia de Fitoplâncton e de Microorganismos Marinhos do professor Paulo Cesar Abreu, sob a orientação do Prof. Antônio Domingues Benetti da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e co-orientado pela Profa. Ana Paula Guedes Frazzon da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Agradeço ao meu marido, Cassiano, que participou ativamente do trabalho, ficou sempre ao meu lado e agüentou todo o mau humor gerado pelo estresse do mestrado.

Aos estagiários Gabriela e Renato por toda dedicação, ajuda e amizade.

Ao professor Endres por permitir que assistisse as aulas de hidráulica, sem as quais jamais conseguiria ser aprovada na seleção do mestrado.

A todos os colegas do laboratório de Aquacultura - Leandro, André, Darci, Juliana, Raquel, Maira, Diego, Luís, Frederico e Kyrie, por toda a ajuda. Aos professores Sílvia e Danilo por gentilmente permitirem que eu desenvolvesse o trabalho no Laboratório de Aquacultura e por toda ajuda e apoio.

Ao meu orientador Antônio D. Benetti por seus ensinamentos.

A minha co-orientadora, Profa. Ana Paula G. Frazzon por permitir a mudança nos rumos da pesquisa, quando o projeto inicial apresentou problemas.

Aos técnicos do IPH Mara, Susan e principalmente ao Tiago, pela ajuda e ao último pelas longas horas de cromatografia.

Ao professor Paulo Abreu, cuja ajuda foi fundamental para realização deste trabalho e também por permitir que eu utilizasse toda sua infra-estrutura.

À Nadir, sempre disposta a ajudar a conseguir recursos e a resolver os problemas.

Ao professor Cimélio Bayer por permitir que eu usasse o laboratório de análises.

Ao Tonho pela amizade, ajuda e consolo em momentos difíceis.

Ao Darci e a Juliana pela companhia e ajuda nas pesagens.

Ao Haig They, Neusiane e Alessandro por terem me ajudado a não enlouquecer com o FISH.

A Dionéia por ajudar a resolver os problemas do FISH.

A toda equipe de laboratório da FURG por todo apoio e carinho.

A Natália pelo filtro.

A minha vó por ter me emprestado o notebook e por todo apoio.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS.

Esta pesquisa foi realizada com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Edital MCT/CNPq/SEAP-PR/CT-Agronegócio/CT-Verde Amarelo/CT Saúde/CT Hidro – nº7/2008, Projeto Sistema de Tratamento com Recirculação de Efluentes Aplicado à Aquacultura: uma alternativa sustentável, Processo 560.074/2008-5.

RESUMO

Na aquacultura de recirculação são utilizados filtros biológicos para o tratamento do efluente antes que este retorne aos tanques. Estas unidades de tratamento têm como finalidade a transformação de nitrogênio amoniacal em nitrato, pois a amônia e o nitrito são tóxicos para os peixes. O nitrogênio amoniacal tende a se acumular na água de cultivo, pois é um importante produto de excreção dos organismos aquáticos e degradação da ração não consumida. Nestes filtros biológicos, os microorganismos responsáveis pelo tratamento da água residuária se encontram aderidos no meio de preenchimento, formando um biofilme. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar as comunidades microbianas presentes no biofilme associado ao filtro biológico de uma unidade experimental de tratamento de efluente de aquacultura. Durante o experimento, realizado em dois sistemas paralelos representando unidades de aquacultura com e sem recirculação de água, também foram monitorados parâmetros de qualidade da água. Os tanques experimentais foram povoados com juvenis de tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), que foram submetidos a pesagens a cada quinze dias para avaliar seu ganho de biomassa. As bactérias foram identificadas através da técnica de análise microbiológica da hibridização fluorescente *in situ* (FISH). A estrutura do biofilme foi avaliada através de microscopia eletrônica de varredura. Os resultados indicam que a nitrificação teve um papel mais importante no controle da qualidade da água no sistema com recirculação em relação ao tanque sem recirculação. A análise microbiológica do meio de preenchimento do filtro revelou uma presença marcante (com proporções de Cy3/DAPI variando entre 0,5% e 7,6%) de células ativas de organismos nitrificantes (oxidadores de amônia e de nitrito), pertencendo a gêneros distintos como *Nitrobacter*, *Nitrococcus* e *Nitrosomonas*, além de outros grupos de presença expressiva, como bactérias filamentosas (com proporções de 11,2% a 17,3% da contagem de células marcadas com DAPI). As imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura revelaram a natureza do arranjo destas bactérias no meio filtrante, caracterizando um biofilme bem desenvolvido, composto por diversos morfotipos microbianos. O conhecimento das bactérias que compõe este biofilme pode tornar possível a geração de melhorias que podem ser implementadas para aumentar a eficiência do sistema.

PALAVRAS-CHAVE: microorganismos nitrificantes, biofilme, FISH, filtro biológico, aquacultura com recirculação.

ABSTRACT

In recirculating aquaculture, biological filters are used for treating the effluent before it returns to tanks. These treatment units are intended for transforming ammoniacal nitrogen into nitrate, since ammonia and nitrite are toxic to fish. Ammoniacal nitrogen tends to accumulate in culture water, because it is an important excretion product from aquatic organisms and also due to degradation of non consumed feed. In these biological filters, microorganisms responsible for the treatment of waste water adhere to the filler, forming a biofilm. The present work intended to characterize the microbial community present in the biofilm associated to the biological filter at an experimental aquaculture effluent treatment unit. During the experiment, conducted in two parallel systems representing aquaculture units with and without water recirculation, water quality parameters were also monitored. Experimental tanks were populated with juvenile Nile Tilapias (*Oreochromis niloticus*), which were subjected to weighing every 15 days in order to assess their biomass gain. Bacteria were identified through the microbiological analysis technique of Fluorescent In Situ Hybridization (FISH). The biofilm structure was assessed using scanning electron microscopy. The results indicate that nitrification had a more important role in the control of water quality in the system with recirculation compared with the tank without recirculation. The microbiological analysis of the filter media revealed a significant presence (with Cy3/DAPI range between 0.5% e 7.6%) of active cells from nitrifying organisms (ammonia and nitrite oxidizers), which belonged to different genera such as *Nitrobacter*, *Nitrococcus* and *Nitrosomonas*, in addition to groups that had an expressive presence, such as filamentous bacteria (representing 11.2% to 17.3% of the total DAPI stained cells). Scanning Electron Microscopy images revealed the nature of the arrangement of these bacteria in the filtering media, characterizing a well developed biofilm made up of diverse microbial morphotypes. The knowledge about the bacteria making up the biofilm may enable improvements that can be implemented to increase system effectiveness.

Keywords: nitrifying microorganisms, biofilm, FISH, biological filter, recirculating aquaculture.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	<i>Erro! Indicador não definido.</i>
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo Geral.....	3
2.2 Objetivos Específicos	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Princípios de Processos Biológicos de Tratamento de Efluentes	4
3.2 Estrutura e Função dos Biofilmes	7
3.3 Remoção de Nitrogênio: Microorganismos Nitrificantes e Desnitrificantes.....	10
3.4 Hibridização Fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	16
4 METODOLOGIA	18
4.1 Descrição do Sistema Experimental de Aquacultura com Recirculação	18
4.2 Manejo dos Sistemas de Cultivo	21
4.3 Métodos de Análise de Qualidade de Água	23
4.4 Métodos Microbiológicos.....	25
4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura	27
4.6 Análise Estatística	28
5 RESULTADOS OBTIDOS E DISCUSSÃO.....	29
5.1 Qualidade da Água	29
5.1.1 A Evolução do Nitrogênio Inorgânico nos dois Sistemas de Cultivo	29
5.1.2 Carbono Orgânico Total.....	38
5.1.3 Oxigênio Dissolvido e Temperatura	40
5.1.4 Alcalinidade e pH	44
5.1.5 Sólidos Totais, Suspensos e Dissolvidos	48
5.1.6 Condutividade Elétrica, Salinidade e Turbidez.....	54
5.2 Crescimento dos Peixes durante o Experimento.....	60
5.3 Análise de FISH	61
5.3.1 Controle Negativo.....	63
5.3.2 Eubactérias.....	64
5.3.3 α - Proteobacteria	65
5.3.4 β - Proteobacteria	65
5.3.5 γ - Proteobacteria	66
5.3.6 <i>Cytophaga – Flavobacter</i>	66
5.3.7 <i>Nitrobacter</i> sp.NIT.....	66
5.3.8 AOB β (NSO190)	67
5.3.9 AOB β (NSO1225)	67
5.3.10 <i>Nitrococcus mobilis</i> NTCOC	68
5.3.11 <i>Pseudomonas fluorescens</i> Ag1	68
5.4 Análise Morfológica através do DAPI.....	69
5.5 Análises de Microscopia Eletrônica de Varredura	70
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E RECOMENDAÇÕES	75
7 CONCLUSÕES.....	77
8 REFERÊNCIAS.....	78
9 ANEXOS.....	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: Fotomicrografia de biofilme corado com DAPI.....	8
Figura 3.2: Imagem de Microscopia Eletrônica de Varredura de um biofilme.....	8
Figura 3.3: Desenho esquemático da estrutura tridimensional de um biofilme.....	9
Figura 3.4: <i>Nitrosospira briensis</i>	12
Figura 3.5: <i>Nitrosolobus multiformis</i>	12
Figura 3.6: <i>Nitrobacter vulgaris</i>	12
Figura 3.7: Relações filogenéticas das bactérias oxidantes de nitrito e amônia.	13
Figura 4.1: Foto do sistema experimental de aquacultura com recirculação.	18
Figura 4.2: Fluxograma do sistema com recirculação.....	19
Figura 4.3: Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).	19
Figura 4.4: Foto do filtro biológico.....	20
Figura 4.5: Foto do meio de preenchimento	20
Figura 4.6: Foto do Venturi.....	21
Figura 4.7: Desenho esquemático de um aerador Venturi	21
Figura 4.8: Amostra para biometria	22
Figura 4.9: Cromatógrafo iônico do IPH	23
Figura 4.10: Condutivímetro do IPH.....	23
Figura 4.11: Aparato de filtração	25
Figura 4.12: Procedimento de corte dos filtros	25
Figura 4.13: Lâminas cobertas com parafilme e com as sondas	26
Figura 5.1: Variação ao longo do tempo da concentração do Nitrogênio Amoniacal Total..... no tanque de cultivo sem recirculação.....	29
Figura 5.2: Variação ao longo do tempo da concentração do Nitrogênio Amoniacal Total..... no tanque de cultivo do sistema com recirculação.	29
Figura 5.3: Variação ao longo do tempo da concentração do Nitrogênio Amoniacal Total..... a saída do filtro biológico do sistema com recirculação.....	30
Figura 5.4: Variação ao longo do tempo da concentração do Nitrogênio Amoniacal Total..... do efluente da retrolavagem do filtro biológico do sistema com recirculação.....	30
Figura 5.5: Variação ao longo do tempo da concentração do Nitrito no tanque de cultivo..... do sistema sem recirculação.	31
Figura 5.6: Variação ao longo do tempo da concentração do Nitrito no tanque de cultivo..... do sistema com recirculação.....	32
Figura 5.7: Variação ao longo do tempo da concentração do Nitrito na saída do filtro do sistema com recirculação.....	32
Figura 5.8: Variação ao longo do tempo da concentração do Nitrito do efluente da..... retrolavagem da saída do filtro biológico do sistema com recirculação.....	32
Figura 5.9: Variação ao longo do tempo da concentração do Nitrato no tanque de cultivo do sistema sem recirculação.	33
Figura 5.10: Variação ao longo do tempo da concentração do Nitrato no tanque de cultivo do sistema com recirculação.....	34
Figura 5.11: Variação ao longo do tempo da concentração do Nitrato na saída do filtro..... biológico do sistema com recirculação.....	34
Figura 5.12: Variação ao longo do tempo da concentração do Nitrato do efluente da retrolavagem do filtro biológico do sistema com recirculação.....	34
Figura 5.13: Variação ao longo do tempo do Nitrogênio Inorgânico (Nitrogênio Amoniacal ... Total, Nitrito e Nitrato) no tanque de cultivo do sistema sem recirculação.	35
Figura 5.14: Variação ao longo do tempo do Nitrogênio Inorgânico (Nitrogênio Amoniacal ... Total, Nitrito e Nitrato) no tanque de cultivo do sistema com recirculação.....	36

Figura 5.15: Correlação Polinomial de Pearson entre a concentração de Nitrogênio.....	
Amoniacal e a soma das concentrações de Nitrito e Nitrato do tanque sem recirculação	37
Figura 5.16: Correlação Polinomial de Pearson entre a concentração de Nitrogênio.....	
Amoniacal e a soma das concentrações de Nitrito e Nitrato do tanque com recirculação	37
Figura 5.17: Correlação Polinomial de Pearson entre a concentração de Nitrogênio.....	
Amoniacal e a soma das concentrações de Nitrito e Nitrato da saída do filtro	37
Figura 5.18: Correlação Polinomial de Pearson entre a concentração de Nitrogênio.....	
Amoniacal e a soma das concentrações de Nitrito e Nitrato da retrolavagem	38
Figura 5.19: Variação ao longo do tempo do Carbono Orgânico Total no tanque de cultivo do sistema sem recirculação.	38
Figura 5.20: Variação ao longo do tempo do Carbono Orgânico Total no tanque de cultivo do sistema com recirculação.....	39
Figura 5.21: Variação ao longo do tempo do Carbono Orgânico Total na saída do filtro biológico do sistema com recirculação.....	39
Figura 5.22: Variação ao longo do tempo do Carbono Orgânico Total do efluente da retrolavagem do sistema com recirculação.....	39
Figura 5.23: Variação ao longo do tempo do Oxigênio Dissolvido no tanque de cultivo do sistema sem recirculação.	41
Figura 5.24: Variação ao longo do tempo do Oxigênio Dissolvido no tanque de cultivo do sistema com recirculação.....	41
Figura 5.25: Variação ao longo do tempo do Oxigênio Dissolvidos no tanque de cultivo na.... saída do filtro biológico do sistema com recirculação.	41
Figura 5.26: Variação ao longo do tempo do Oxigênio Dissolvido no efluente da retrolavagem do sistema com recirculação.....	42
Figura 5.27: Variação ao longo do tempo da Temperatura no tanque de cultivo do sistema sem recirculação.	43
Figura 5.28: Variação ao longo do tempo da Temperatura no tanque de cultivo do sistema com recirculação.....	43
Figura 5.29: Variação ao longo do tempo do pH no tanque de cultivo do sistema sem recirculação.....	44
Figura 5.30: Variação ao longo do tempo do pH no tanque de cultivo do sistema com..... recirculação.....	44
Figura 5.31: Variação ao longo do tempo do pH na saída do filtro biológico do sistema sem... recirculação.....	45
Figura 5.32: Variação ao longo do tempo do pH do efluente da retrolavagem do sistema sem. recirculação.....	45
Figura 5.33: Variação ao longo do tempo da Alcalinidade no tanque de cultivo do sistema sem recirculação.	46
Figura 5.34: Variação ao longo do tempo da Alcalinidade no tanque de cultivo do sistema com recirculação.....	46
Figura 5.35: Variação ao longo do tempo da Alcalinidade na saída do filtro biológico do..... sistema com recirculação.....	47
Figura 5.36: Variação ao longo do tempo da Alcanidade do efluente da retrolavagem do sistema com recirculação.....	47
Figura 5.37: Variação ao longo do tempo de Sólidos Totais no tanque de cultivo do sistema... sem recirculação.	48
Figura 5.38: Variação ao longo do tempo de Sólidos Totais no tanque de cultivo do sistema... com recirculação.....	48
Figura 5.39: Variação ao longo do tempo de Sólidos Totais na saída do filtro biológico do sistema com recirculação.....	49
Figura 5.40: Variação ao longo do tempo de Sólidos Totais do efluente da retrolavagem do sistema com recirculação.....	49

Figura 5.41: Variação ao longo do tempo de Sólidos Suspensos no tanque de cultivo do sistema sem recirculação.	50
Figura 5.42: Variação ao longo do tempo de Sólidos Suspensos no tanque de cultivo do sistema com recirculação.	50
Figura 5.43: Variação ao longo do tempo de Sólidos Suspensos na saída do filtro biológico do sistema com recirculação.	51
Figura 5.44: Variação ao longo do tempo de Sólidos Suspensos do efluente da retrolavagem do sistema com recirculação.	51
Figura 5.45: Variação ao longo do tempo de Sólidos Dissolvidos no tanque de cultivo do sistema sem recirculação.	52
Figura 5.46: Variação ao longo do tempo de Sólidos Dissolvidos no tanque de cultivo do sistema com recirculação.	52
Figura 5.47: Variação ao longo do tempo de Sólidos Dissolvidos na saída do filtro biológico do sistema com recirculação.	53
Figura 5.48: Variação ao longo do tempo de Sólidos Dissolvidos no tanque de cultivo do sistema com recirculação.	53
Figura 5.49: Variação ao longo do tempo da Condutividade Elétrica no tanque de cultivo do sistema com recirculação.	54
Figura 5.50: Variação ao longo do tempo da Condutividade Elétrica na saída do filtro biológico do sistema com recirculação.	54
Figura 5.51: Variação ao longo do tempo da Condutividade Elétrica na saída do filtro biológico do sistema com recirculação.	55
Figura 5.52: Variação ao longo do tempo da Condutividade Elétrica do efluente da retrolavagem do sistema com recirculação.	55
Figura 5.53: Variação ao longo do tempo da Salinidade no tanque de cultivo do sistema sem recirculação.	56
Figura 5.54: Variação ao longo do tempo da Salinidade no tanque de cultivo do sistema com recirculação.	56
Figura 5.55: Variação ao longo do tempo da Salinidade na saída do filtro biológico do sistema com recirculação.	57
Figura 5.56: Variação ao longo do tempo da Salinidade do efluente da retrolavagem do sistema com recirculação.	57
Figura 5.57: Variação ao longo do tempo da Turbidez no tanque de cultivo do sistema sem recirculação.	58
Figura 5.58: Variação ao longo do tempo da Turbidez no tanque de cultivo do sistema com recirculação.	58
Figura 5.59: Variação ao longo do tempo da Turbidez na saída do filtro biológico do sistema com recirculação.	59
Figura 5.60: Variação ao longo do tempo da Turbidez do efluente da retrolavagem do sistema com recirculação.	59
Figura 5.61: Foto ilustrando a diferença na turbidez entre os tanques de cultivo.	60
Figura 5.62: Foto ilustrando um DAPI da coleta 23.	61
Figura 5.63: Foto ilustrando um FISH da coleta 23.	61
Figura 5.64: Percentual de bactérias hibridizadas para os diferentes tipos de sonda.	62
Figura 5.65: Percentual de bactérias hibridizadas para os diferentes tipos de sonda.	63
Figura 5.66: Primeiro coleta (2 dias de experimento).	70
Figura 5.67: Sexta coleta (12 dias de experimento).	70
Figura 5.68: Coleta 12 (24 dias de experimento).	71
Figura 5.69: Coleta 13 (26 dias de experimento).	71
Figura 5.70: Coleta 15 (30 dias de experimento).	72
Figura 5.71: Coleta 16 (32 dias de experimento).	72
Figura 5.72: Coleta 17 (34 dias de experimento).	73

Figura 5.73: Coleta 19 (24 dias de experimento).....	73
Figura 5.74: Coleta 23 (46 dias de experimento).....	74
Figura 5.75: Coleta 23 (24 dias de experimento).....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1: Composição típica da ração utilizada no experimento	21
Tabela 4.2: Métodos de análise dos parâmetros de qualidade da água	24
Tabela 4.3: Sondas utilizadas com suas respectivas especificidades, origens e seqüências. ..	26
Tabela 4.4: Concentração da formamida da solução de hibridização e concentração de NaCl .. da solução de lavagem.	27
Tabela 5.1: Concentração média e desvio padrão do Nitrogênio Amoniacal Total nos pontos.. de coleta dos sistemas com e sem recirculação.....	31
Tabela 5.2: Concentração média e desvio padrão do Nitrito nos pontos de coleta	33
Tabela 5.3: Concentração média e desvio padrão do Nitrato nos pontos de coleta	35
Tabela 5.4: Concentração média e desvio padrão do Carbono Orgânico Total nos pontos de ... coleta.....	40
Tabela 5.5: Concentração média e desvio padrão do Oxigênio Dissolvido nos pontos de	42
Tabela 5.6: Concentração média e desvio padrão da Temperatura nos pontos de coleta	44
Tabela 5.7: Concentração média e desvio padrão do pH nos pontos de coleta.....	45
Tabela 5.8: Concentração média e desvio padrão da Alcalinidade nos pontos de coleta	48
Tabela 5.9: Concentração média e desvio padrão de Sólidos Totais nos pontos de coleta.....	50
Tabela 5.10: Concentração média e desvio padrão de Sólidos Suspensos nos pontos de	52
Tabela 5.11: Concentração média e desvio padrão de Sólidos Dissolvidos nos pontos de.....	54
Tabela 5.12: Concentração média e desvio padrão da Condutividade Elétrica nos pontos de ... coleta.....	56
Tabela 5.13: Concentração média e desvio padrão da Salinidade nos pontos de coleta	58
Tabela 5.14: Concentração média e desvio padrão da Turbidez nos pontos de coleta	59
Tabela 5.15: Peso médio dos peixes em gramas nas 5 biometrias realizadas durante o período experimental.	60
Tabela 5.16: Ganho de peso médio dos peixes durante o período experimental.	60
Tabela 5.17: Percentual de bactérias hibridizadas do Controle Negativo em relação ao total... de bactérias coradas com DAPI nas coletas 21, 23 e 25.....	64
Tabela 5.18: Percentual de Eubactérias hibridizadas em relação ao total de bactérias coradas.. com DAPI nas coletas 21, 23 e 25.....	64
Tabela 5.19: Percentual de α - Proteobactérias hibridizadas em relação ao total de bactérias ... coradas com DAPI nas coletas 21, 23 e 25	65
Tabela 5.20: Percentual de β - Proteobactérias hibridizadas em relação ao total de bactérias ... coradas com DAPI nas coletas 21, 23 e 25	65
Tabela 5.21: Percentual de γ - Proteobactéria hibridizadas em relação ao total de bactérias	66
Tabela 5.22: Percentual de <i>Cytophaga</i> – <i>Flavobacter</i> hibridizados em relação ao total de	66
Tabela 5.23: Percentual de <i>Nitrobacter</i> sp hibridizados em relação ao total de bactérias	67
Tabela 5.24: Percentual de AOB β bactérias (NOS190) hibridizadas em relação ao total de bactérias coradas com DAPI nas coletas 21, 23 e 25	67
Tabela 5.25: Percentual de AOB β bactérias (NSO1225) hibridizadas em relação ao total de .. bactérias coradas com DAPI nas coletas 21, 23 e 25	68
Tabela 5.26: Percentual de <i>Nitrococcus mobilis</i> hibridizados em relação ao total de bactérias . coradas com DAPI nas coletas 21, 23 e 25	68

Tabela 5.27: Percentual de <i>Pseudomonas fluorescens</i> hibridizados em relação ao total de bactérias coradas com DAPI nas coletas 21, 23 e 25	68
Tabela 5.28: Percentual de filamentosas de diferentes tamanhos nas coletas 21, 23 e 25	69
Tabela 9.1: Valores de nitrogênio amoniacal total nos pontos de coleta	85
Tabela 9.2: Valores de nitrito nos pontos de coleta.....	86
Tabela 9.3: Valores de nitrato nos pontos de coleta.....	87
Tabela 9.4: Valores de oxigênio dissolvido nos pontos de coleta.....	88
Tabela 9.5: Valores de temperatura nos tanques sem recirculação e com recirculação.....	89
Tabela 9.6: Valores de pH nos pontos de coleta	90
Tabela 9.7: Valores de alcalinidade nos pontos de coleta.....	91
Tabela 9.8: Valores de carbono orgânico total nos pontos de coleta	92
Tabela 9.9: Valores de sólidos totais nos pontos de coleta	93
Tabela 9.10: Valores de sólidos suspensos nos pontos de coleta.....	94
Tabela 9.11: Valores de sólidos dissolvidos nos pontos de coleta.....	95
Tabela 9.12: Valores de condutividade nos pontos de coleta.....	96
Tabela 9.13: Valores de salinidade nos pontos de coleta	97
Tabela 9.14: Valores de turbidez nos pontos de coleta	98
Tabela 9.15: Percentual de células hibridizadas – Controle Negativo.....	99
Tabela 9.16: Percentual de Eubactérias hibridizadas	99
Tabela 9.17: Percentual de α - Proteobactérias hibridizadas.....	100
Tabela 9.18: Percentual de β - Proteobactérias hibridizadas.....	100
Tabela 9.19: Percentual de γ - Proteobactéria hibridizadas.....	101
Tabela 9.20: Percentual de <i>Cytophaga</i> – <i>Flavobacter</i> hibridizados	101
Tabela 9.21: Percentual de <i>Nitrobacter</i> sp hibridizados	102
Tabela 9.22: Percentual de AOB β bactérias (NOS190) hibridizadas	102
Tabela 9.23: Percentual de AOB β bactérias (NSO1225) hibridizadas	103
Tabela 9.24: Percentual de <i>Nitrococcus mobilis</i> hibridizados.....	103
Tabela 9.25: Percentual de <i>Pseudomonas fluorescens</i> hibridizados	104
Tabela 9.26: Percentual de filamentosas grandes.....	104
Tabela 9.27: Percentual de filamentosas médias.....	105
Tabela 9.28: Percentual de filamentosas pequenas	105
Tabela 9.29: Percentual de filamentosas totais	106

LISTA DE ABREVIATURAS

- AMO – Amônia Monooxigenase
ANOVA – Análise de Variância
AOB – Bactérias Oxidadoras de Amônia
C - Carbono
CME – Centro de Microscopia Eletrônica
COM – Ponto de Coleta do Tanque de Cultivo Com Recirculação
COT – Carbono Orgânico Total
DAPI – 4',6-Diamidino-2-Fenilindol
DBC – Delineamento em Blocos Casualizados
DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio
DBOC - Demanda Bioquímica de Oxigênio Carbonácea
DBON - Demanda Bioquímica de Oxigênio Nitrogenada
DIC – Delineamento Inteiramente Casualizado
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
dNTP – Desoxiribonucleotídeo Fosfatado
DQO – Demanda Química de Oxigênio
EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
FISH – Hibridização Fluorescente *in Situ*
FURG – Universidade Federal do Rio Grande
ICBS – Instituto de Ciências Básicas da Saúde
IPH – Instituto de Pesquisas Hidráulicas
MAR-FISH – Microautoradiografia combinada com Hibridização Fluorescente *in Situ*
MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
mRNA – RNA Mensageiro
N – Nitrogênio
NOB – Bactérias oxidadoras de nitrito
NTU – Unidade Nefelométrica de Turbidez
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
PET – Politereftalato de Etila
PVC – Cloreto de Polivinila
RAS – Sistema de Aquacultura com Recirculação
rDNA – DNA Ribossomal
RET - Ponto de Coleta da Saída da Retrolavagem

RNA – Ácido Ribonucleico

rRNA – RNA Ribossomal

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

SEM – Ponto de Coleta do Tanque de Cultivo Sem Recirculação

SF - Ponto de Coleta da Saída do Filtro Biológico

SD – Sólidos Dissolvidos

SS – Sólidos Suspensos

ST – Sólidos Totais

tRNA – RNA Transportador

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UV – Ultravioleta

16S rRNA – RNA Ribossomal da região 16S

1. INTRODUÇÃO

A poluição aquática e a eutrofização dos corpos hídricos têm aumentado consideravelmente devido à crescente industrialização e urbanização e ao uso cada vez maior de fertilizantes na agricultura. A maioria dos rios que atravessam as cidades brasileiras encontra-se contaminados, sendo este considerado um importante problema ambiental do país. Esta deterioração ocorre porque a maioria das cidades não possui coleta e tratamento de esgotos domésticos, jogando *in natura* o esgoto nos rios (TUCCI *et al.*, 2001). Entretanto, diversas outras atividades podem comprometer a integridade dos ecossistemas aquáticos como, por exemplo, as descargas de efluentes da aquacultura - ricos em nutrientes e matéria orgânica, e que raramente recebem algum tipo de tratamento (BARAK *et al.*, 2003; TACON & FOSTER, 2003; VALENTI *et al.*, 2000).

A adição de nutrientes como o nitrogênio e o fósforo em corpos hídricos pode favorecer um crescimento significativo em número de determinados organismos (HELLAWELL, 1986). Dessa forma, geralmente, no tratamento de águas residuárias, é desejável diminuir a concentração de fósforo, amônia e outras formas de nitrogênio no efluente final, sendo que isto pode ser atingido através de processos físicos, químicos e biológicos (REYNOLDS & RICHARDS, 1995).

A nitrificação é o termo utilizado para descrever o processo biológico de duas etapas em que a amônia ($\text{NH}_4\text{-N}$) é oxidada a nitrito ($\text{NO}_2\text{-N}$) e nitrito é oxidado a nitrato ($\text{NO}_3\text{-N}$). A necessidade de nitrificação no tratamento de águas residuárias deve-se à preocupação com os impactos na qualidade da água ocasionados pelo descarte de amônia no corpo hídrico receptor, tais como diminuição na concentração de oxigênio dissolvido e toxicidade para os peixes (METCALF & EDDY, 2003). Na aquacultura, pelo fato de a amônia ser o principal composto nitrogenado excretado por animais aquáticos, problemas de toxidez ligados a esta substância podem ocorrer em todos os tipos de sistemas de cultivo (COLT & ARMSTRONG 1981 apud ARANA, 2004).

O conhecimento da população da comunidade bacteriana responsável pela nitrificação é importante para que seja implementado um manejo adequado do processo de tratamento (MORIARTY, 1997). Ao conhecer as bactérias quimioautotróficas que realizam a nitrificação, é possível verificar se as condições físico-químicas da água (pH, oxigênio dissolvido, temperatura), as concentrações de macro-nutrientes (como o carbono) e de micro-nutrientes (como alguns metais que são requeridos como co-fatores de diversas enzimas) são adequadas para se atingir uma boa eficiência do sistema (KOWALCHUCK & STEPHEN, 2001; MADIGAN & MARTINKO, 2006).

Atualmente, o uso de técnicas moleculares, como FISH, MAR-FISH, microsensores combinados com FISH e *in situ* PCR, permitem o monitoramento das comunidades microbianas do biofilme. A informação combinada destas novas tecnologias poderá ser utilizada para fornecer subsídios para simular as reações que ocorrem em um biofilme, baseado nas atividades de micro-escala e na organização espacial das comunidades bacterianas. Desta forma, não é mais preciso considerar este biofilme como uma “caixa-preta”, como usualmente acontecia para alguns sistemas de tratamento de efluentes (AOI, 2000).

O método FISH, usando sondas de oligonucleotídeos que tem como alvo rRNA, é freqüentemente aplicado para quantificar a composição da comunidade microbiana em diferentes ambientes (DAIMS *et al.*, 2001). O 16S rRNA é o alvo ideal para o FISH pois este está presente em quase todos os organismos e a identificação de populações microbianas naturais é baseada na classificação filogenética das seqüências 16S do rRNA. Um grande número de seqüências deste segmento de RNA de diferentes organismos estão armazenadas em bancos de dados, e o grande número de cópias desta fração do material genético por célula aumenta bastante a sensibilidade, possibilitando a detecção de uma única célula (AOI, 2002).

Pretende-se, com este trabalho, contribuir para o conhecimento das espécies de microorganismos associadas a filtros biológicos utilizados para tratamento de efluentes de aquacultura. Segundo Michaud *et al.* (2006) a importância das comunidades bacterianas em sistemas de aquacultura de recirculação é da mesma ordem de magnitude que dos peixes, em termos de processos ligados diretamente as suas atividades e seus efeitos na qualidade da água. Afinal, de acordo com Michaud *et al.* (2006), atingir um melhor entendimento da ecologia e biologia das populações microbianas em um filtro biológico é necessário para o desenvolvimento e otimização da eficiência e economicidade da aquacultura com recirculação. O conhecimento gerado por este trabalho poderá ser usado para melhorar a eficiência dos processos biológicos de tratamento de efluentes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Verificar a estrutura e composição das comunidades microbianas do biofilme presente no filtro biológico .

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar grupos de microorganismos nitrificantes presentes no biofilme;
- Analisar a qualidade da água durante o período experimental;
- Observar de que forma a nitrificação altera a qualidade da água;
- Complementarmente, verificar se o sistema de recirculação influenciou no ganho de peso do peixe cultivado.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Princípios de Processos Biológicos de Tratamento de Efluentes

Biodegradação é a quebra de compostos orgânicos que ocorre devido à atividade microbiana (MAIER *et al.*, 2000). Em um senso amplo, praticamente todos organismos procariotos participam de processos de biodegradação, decompondo moléculas orgânicas como forma de suprir sua necessidade de obtenção de energia para produção de ATP e de intermediários metabólicos (WACKETT, 2006). Devido à grande diversidade metabólica, diferentes microorganismos podem utilizar uma grande variedade de fontes de energia e carbono (TORTORA *et al.*, 2005).

A biodegradação envolve uma série de etapas de degradação biológica ou rotas metabólicas que resultam na oxidação de um composto. O processo completo, ou mineralização, resulta na formação de dióxido de carbono, água e minerais, num processo que provê tanto carbono quanto energia para reprodução e crescimento das células (MAIER *et al.*, 2000). Desta forma, é amplamente reconhecido o importante papel dos procariotos na reciclagem do carbono, nitrogênio, enxofre e outros elementos em escala global (WACKETT, 2006).

Os processos biológicos de tratamento de águas residuárias envolvem um uso em larga escala de microorganismos para bioconversão em escala industrial. Os principais objetivos de uma planta de tratamento são reduzir a matéria orgânica e inorgânica do afluente e eliminar outros compostos potencialmente tóxicos ou prejudiciais ao ambiente (MADIGAN & MARTINKO, 2006). Alguns compostos encontrados em efluentes, principalmente nos industriais, são tóxicos para bactérias, sendo necessário um pré-tratamento (METCALF & EDDY, 2003).

A eficiência do tratamento e a quantidade de oxigênio requerida para estabilizar a matéria orgânica do efluente são usualmente mensuradas através de testes como a Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) e a Demanda Química de Oxigênio (DQO) (METCALF & EDDY, 2003). O teste de DBO é essencialmente um ensaio biológico que envolve a determinação do oxigênio consumido por organismos vivos (principalmente bactérias) enquanto degradam a matéria orgânica presente no resíduo, em condições que sejam as mais similares possíveis àquelas que ocorrem na natureza (SAWYER *et al.*, 2003). Sendo assim, níveis mais altos de materiais orgânicos e inorgânicos no efluente resultam numa mais alta DBO (MADIGAN & MARTINKO, 2006).

Os principais tipos de processos biológicos utilizados para o tratamento de águas residuárias podem ser divididos em duas categorias: processos de crescimento em leito suspenso e processos de crescimento em leito fixo. Nos processos de crescimento em leito suspenso, os microorganismos responsáveis pelo tratamento são mantidos em suspensão líquida através de métodos de mistura apropriados. Os processos em leito suspenso podem ser aeróbios ou anaeróbios. Nos processos de crescimento em leito fixo, os microorganismos responsáveis pela remoção de matéria orgânica ou nutrientes estão aderidos num material de preenchimento inerte. A matéria orgânica e os nutrientes são removidos pela passagem do afluente pelo crescimento em leito fixo, também conhecido como biofilme (METCALF & EDDY, 2003).

O filtro biológico é um processo de crescimento em leito fixo em que o efluente passa através de um leito de material inerte. Material sintético de plástico ou brita podem ser utilizados como meio de preenchimento (REYNOLDS & RICHARDS, 1995). Na realidade, filtro biológico não é um nome adequado para este processo, pois este não envolve qualquer fenômeno de peneiramento ou filtração mecânica, sendo, na verdade, um processo de oxidação biológica (PESSÔA & JORDÃO, 2005).

Os filtros biológicos de meio suspenso são filtros granulares expansíveis que possuem um comportamento de clarificação semelhante a filtros de areia, apesar de apresentarem porosidade bastante diferente. Estes filtros removem sólidos, enquanto favorecem o crescimento microbiano para remoção de resíduos dissolvidos. São resistentes a colmatação biológica e geralmente requerem pouca água para a retro-lavagem. A área superficial específica dos pequenos grânulos (2-3 mm) esféricos de polietileno tipicamente usados como meio filtrante é moderada (1150-1475 m²/m³) (MALONE & BEECHER, 2000). A maior parte do crescimento microbiano é aeróbio, mas próximo ao meio filtrante é anaeróbio. Conforme o tempo passa, a espessura do biofilme bacteriano aumenta, devido ao aumento da biomassa bacteriana (REYNOLDS & RICHARDS, 1995).

Em sistemas de crescimento em leito fixo utilizados para nitrificação, a maior parte da Demanda Bioquímica de Oxigênio Carbonácea (DBOC) deve ser removida antes que os organismos nitrificantes possam se estabelecer. Outro fator que influencia na eficiência da oxidação da amônia a nitrato é a concentração de oxigênio dissolvido (METCALF & EDDY, 2003).

Além das aplicações clássicas associadas a estes processos, como tratamento de águas residuárias domésticas e industriais, há um interesse que vem sendo despertado a respeito da sua utilidade em relação à produção aquícola. Nesta área, destacam-se os estudos feitos em

sistemas de aquacultura com recirculação (RAS – do inglês *Recirculating Aquaculture Systems*).

A aquacultura com recirculação está se tornando popular em diversos países, devido à considerável redução do uso de terra, água e produção de poluentes, ao alto nível de controle do ambiente e alta produtividade proporcionados por esta tecnologia (HAFEDH *et al.*, 2003). Este tipo de aquacultura envolve um sistema de tratamento e acondicionamento da água utilizada, de forma que tipicamente utiliza menos do que 10% da água consumida em métodos tradicionais de cultivo (TIMMONS *et al.*, 2002). Os quatro processos críticos de tratamento são: a aeração (suplementação de oxigênio dissolvido), a clarificação (remoção de sólidos e matéria orgânica – com redução na DBO), a oxidação biológica (redução da DBO, amônia e nitrito) e a degaseificação (eliminação do excesso de gás carbônico). Processos adicionais de tratamento, como desnitrificação (redução dos níveis de nitrato, reposição da alcalinidade), ozonização (eliminação de cor, redução da DBO), desinfecção (eliminação de patógenos), podem ser necessários para atender necessidades específicas de uma produção (MALONE & BEECHER, 2000).

O Nitrogênio Amoniaco Total é o parâmetro de qualidade da água mais crítico em sistemas intensivos com recirculação e deve ser mantido em concentrações pouco elevadas. O nitrogênio amoniaco total é composto de duas frações: amônia não ionizada (NH_3) e amônia ionizada (NH_4^+), sendo que a primeira é extremamente tóxica para muitos organismos aquáticos. A proporção de amônia não-ionizada depende do pH e da temperatura da água (MALONE & BEECHER, 2000). A porcentagem de NH_3 aumenta em pH alcalino, já que a concentração de H^+ diminui e a reação desloca-se para esquerda (BALDISSEROTTO, 2002).



A amônia é produzida como o principal produto final do catabolismo de proteínas e é excretado pelos peixes como amônia não-ionizada (NH_3) através das brânquias (TIMMONS *et al.*, 2002), podendo também derivar da decomposição de sobras de ração não consumida. As membranas celulares são geralmente permeáveis à amônia não-ionizada, mas não muito permeáveis aos íons amônio. A excreção de amônia é sobretudo decorrente de difusão passiva de NH_3 (ECKERT, 2000). Uma vez no ambiente aquático, a amônia é oxidada a nitrito e este a nitrato por bactérias (BALDISSEROTTO, 2002). Amônia, nitrito e nitrato são extremamente solúveis em água (TIMMONS *et al.*, 2002).

O nitrogênio é um nutriente essencial para todos os organismos vivos e está presente em proteínas, ácidos nucleicos, nucleotídeos e pigmentos. A decomposição de compostos nitrogenados é particularmente importante em sistemas intensivos de aquacultura com recirculação, devido à toxicidade da amônia, do nitrito e, em alguns casos, do nitrato (TIMMONS *et al.*, 2002). Para a maioria das espécies, não é recomendada a manutenção da concentração de amônia não-ionizada acima de 0,05 mg/L de NH₃-N, (TIMMONS *et al.*, 2002). Além disso, mesmo em concentrações não letais, a amônia pode ainda diminuir o crescimento dos peixes, provocar lesões nas brânquias, interferir na osmorregulação, diminuir a excreção e aumentar a susceptibilidade a doenças (ARANA, 2004).

A oxidação biológica pode ser um método eficaz de controlar a amônia, sendo que esta é a metodologia mais utilizada na aquacultura com recirculação. A capacidade de remoção da amônia é amplamente dependente da área superficial disponível para o crescimento de bactérias nitrificantes. Para este fim, o meio utilizado no filtro deve ser inerte, não compressível e não biodegradável. Estes filtros biológicos devem ser cuidadosamente projetados para suportar a carga de amônia gerada pelo sistema (TIMMONS *et al.*, 2002).

3.2 Estrutura e Função dos Biofilmes

O biofilme pode ser definido como comunidades de microorganismos imobilizados conjuntamente numa matriz de substâncias poliméricas extracelulares de origem microbiana (XAVIER *et al.*, 2003). As figuras 3.1 e 3.2 ilustram imagens de biofilme. Algumas características distinguem este tipo de organização das bactérias planctônicas, como, por exemplo, alta densidade populacional, uma matriz de polímeros extracelulares e uma vasta gama de heterogeneidades físicas e químicas (BEER & STOODLEY, 2006). A maior parte da vida microbiana, tanto em quantidade como em termos de atividade, encontra-se em biofilmes. Este tipo de estrutura forma-se naturalmente em qualquer superfície sólida em contato com água não esterilizada (XAVIER *et al.*, 2003).

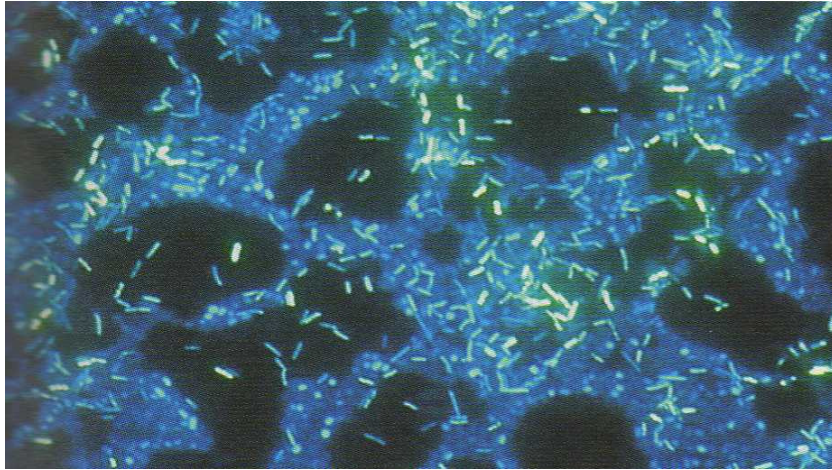


Figura 3.1: Fotomicrografia de biofilme corado com DAPI. Fonte: Madigan & Martinko, 2006

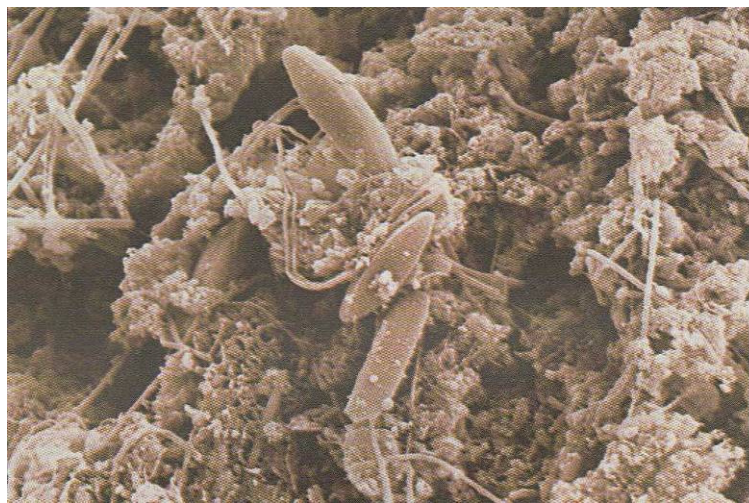


Figura 3.2: Imagem de Microscopia eletrônica de varredura de um biofilme. Os corpos grandes e ovalados são diatomáceas que ficaram presas no biofilme viscoso. Fonte: Tortora *et al.*, 2005.

Uma grande vantagem adaptativa do biofilme é que um consórcio de vários organismos pode se estabelecer e manter sua posição por um longo período de tempo, se comparado com a forma de vida planctônica (FLEMMING & WINGENDER, 2001a). Agregados microbianos ocorrem praticamente em qualquer lugar e são responsáveis pela maior parte das conversões microbianas em ambientes aquáticos (BEER & STOODLEY, 2006). Um exemplo clássico é a nitrificação que ocorre em biofilmes e permite a proximidade espacial das bactérias oxidantes de amônia e das de nitrito. Substâncias poliméricas extracelulares mantêm os organismos próximos e são responsáveis pela adesão do biofilme a uma determinada superfície (FLEMMING & WINGENDER, 2001a). Além disso, os componentes aniônicos de certas matrizes de polímeros são os únicos elementos que contribuem para a homeostase, já que os biofilmes são estruturas abertas que permitem a entrada de solutos na comunidade microbiana (COSTERTON, 2007).

A configuração tridimensional do biofilme apresenta estruturas em formas de pilares e canais por onde a água circula (figura 3.3). Isso permite aos grupos de microorganismos constituintes do biofilme um acesso eficiente aos nutrientes, e facilita igualmente a remoção de resíduos. Se essas bactérias crescessem em uma camada uniforme e espessa, ficaria repleto de microorganismos, não haveria nutrientes disponíveis nas regiões mais profundas e resíduos tóxicos poderiam se acumular (TORTORA *et al.*, 2005).

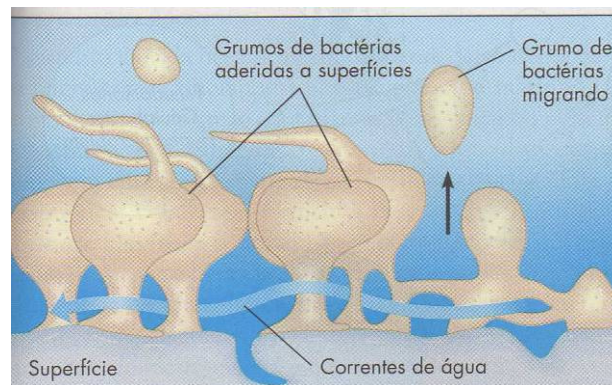


Figura 3.3: Desenho esquemático da estrutura tridimensional de um biofilme.
Fonte: Tortora *et al.*, 2005.

As células bacterianas presentes no biofilme mantêm sua sensibilidade aos estímulos ambientais e cada uma destas irá ajustar sua expressão gênica de acordo com o micro-nicho onde se encontra. Se as condições do entorno se modificarem, a célula muda seu fenótipo e pode até mesmo mudar sua posição na comunidade, com a finalidade de aumentar suas chances de sobrevivência. Bactérias com uma função ecológica importante para a comunidade mudarão seu fenótipo até encontrarem a posição e capacidade metabólica ótima (COSTERTON, 2007).

Sinais provenientes de bactérias de espécies cooperativas e competitivas vão influenciar cada célula sésil, na mesma extensão que fatores nutricionais e/ou ambientais. Esta comunicação pode influenciar tanto posição quanto atividade (COSTERTON, 2007)

O biofilme tem importância em várias atividades humanas. Estações de tratamento de águas ou efluentes removem organismos patogênicos e reduzem a quantidade de matéria orgânica na água ou efluente através de interação com biofilme. Além disso, numerosos bioprocessos utilizam biofilmes. O crescimento não desejado de biofilmes, em contrapartida, tem um impacto negativo em várias atividades (XAVIER *et al.*, 2003). Alguns exemplos são: a placa dentária e infecções (TORTORA *et al.*, 2005), colonização de tubulações de água (AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION, 1999), formação de biofilmes em navios (BEER & STOODLEY, 2006).

Quando organizadas em biofilmes, as bactérias apresentam uma resistência significativamente maior a antibióticos e biocidas do que quando estão isoladas. Este fenômeno ainda não é completamente compreendido. Biocidas oxidantes podem ser consumidos em reação com as substâncias poliméricas extracelulares, como já foi demonstrado para o cloro (FLEMMING & WINGENDER, 2001b).

As vantagens de uma célula bacteriana em se encontrar contida num biofilme são numerosas, notadamente no que diz respeito à proteção contra agentes agressivos. Além das já citadas resistências a biocidas e antibióticos, os biofilmes demonstram também resistência acrescida à radiação UV, à desidratação (a matriz de substâncias poliméricas extracelulares é altamente hidratada) e a predadores como protozoários (XAVIER *et al.*, 2003).

Em sistemas de aquacultura, além da biomassa bacteriana presente em filtros biológicos, a formação de biofilmes pode ocorrer na superfície dos tanques de criação e nas tubulações (KARUNASAGAR *et al.*, 1996). Os tanques em que são feitas as criações, após sucessivas utilizações, armazenam grande quantidade de patógenos. Dessa maneira é fundamental a desinfecção periódica desses tanques para se evitar que tais patógenos, concentrados principalmente em fundos porosos, possam causar sérios problemas aos peixes a serem colocados nestes locais (PAVANELLI *et al.*, 1998). Como muitos destes microorganismos encontram-se em biofilmes, a desinfecção destes tanques torna-se mais difícil. De acordo com Karunasagar *et al.* (1996) é necessária a remoção física do biofilme da superfície dos tanques e a secagem periódica destes, pois as bactérias estruturadas em biofilmes não são facilmente eliminadas por tratamentos sanitários e podem ser uma fonte de infecção para os organismos cultivados.

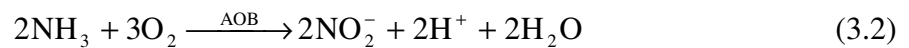
Devido à sua grande área específica, o filtro biológico é a maior fonte de bactérias para o sistema (LEONARD *et al.*, 2000). Quanto menor for a reposição de água, maior será a quantidade de matéria orgânica dissolvida, resultando num aumento da quantidade de bactérias heterotróficas (LEONARD *et al.*, 2002). Num sistema de aquacultura com recirculação, em que há pouca reposição de água, é importante o controle, no filtro biológico, de bactérias potencialmente patogênicas para os organismos cultivados.

3.3 Remoção de Nitrogênio: Microorganismos Nitrificantes e Desnitrificantes

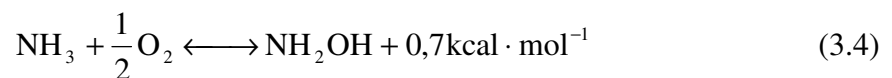
A remoção de nitrogênio de águas residuárias através da ação combinada de nitrificantes e desnitrificantes tornou-se uma importante área de pesquisa, estimulada pelas exigências no padrão de emissão dos efluentes, que têm como objetivo a prevenção da eutrofização e a diminuição dos efeitos tóxicos da amônia em organismos aquáticos

(BRENNER *et al.*, 2005). A nitrificação é um pré-requisito para a remoção total do nitrogênio de águas residuárias através de desnitrificação subsequente e é um processo muito importante para a ciclagem global de nitrogênio (JURETSCHKO *et al.*, 1998). Outro processo que remove o nitrogênio é o ANAMOX, que oxida a amônia com o nitrito como acceptor de elétrons, produzindo nitrogênio gasoso. Esta reação ocorre em condições anóxicas (MADIGAN & MARTINKO, 2006)

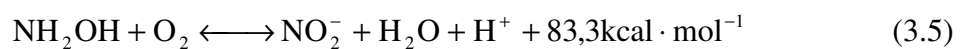
A nitrificação consiste na oxidação da amônia a nitrito e posteriormente do nitrito a nitrato. Estas reações são geralmente descritas conforme equações 3.2 e 3.3. Ambas as reações ocorrem sob condições aeróbicas (SAWYER *et al.*, 2003). A oxidação da amônia a nitrito produz íons hidrogênio, consumindo alcalinidade e podendo diminuir o pH da água (BOLEY *et al.*, 2000).



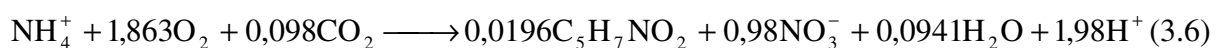
Na realidade, estas duas reações são simplificações do verdadeiro processo catabólico das bactérias que oxidam a amônia (AOB) e bactérias que oxidam o nitrito. A nitrificação é iniciada dentro da membrana citoplasmática, quando a amônia é oxidada a hidroxilamina, através da enzima integral, a amônia-monooxigenase (AMO) (HAGOPIAN & RILEY, 1998).



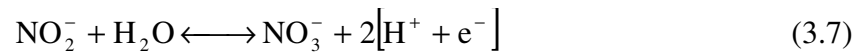
Energia interna deve ser investida para ativar a catálise da AMO. A hidroxilamina é então transportada para o periplasma e convertida a nitrito com a formação simultânea de um próton livre) (HAGOPIAN & RILEY, 1998).



Nesta segunda reação é que íons de hidrogênio são liberados na água e podem superar a capacidade tampão desta. Como as bactérias nitrificantes são especialmente sensíveis a variações no pH, é indicado adicionar alcalinidade em sistemas de recirculação (HAGOPIAN & RILEY, 1998; BOLEY *et al.* 2000). A equação 3.6, que resume a nitrificação, permite verificar que para g de nitrogênio amoniacal (na forma de N) convertido, 4,25g de O₂ são utilizadas, 0,16g de novas células são formadas (C₅H₇NO₂), 7,07g de alcalinidade na forma de CaCO₃ são consumidas e 0,08g de carbono inorgânico são usadas na formação de novas células (METCALF & EDDY, 2003).



A nitratação é uma série de reações de transferência de elétrons seguidas de desidrogenações. A enzima nitrito oxirredutase, também conhecida como nitrito desidrogenase, catalisa a formação de nitrato (HAGOPIAN & RILEY, 1998).



A capacidade de mineralização das bactérias nitrificantes é bastante conhecida entre os aquacultores, mas a bacteriologia por trás deste processo não (HAGOPIAN & RILEY, 1998). Dois grupos de organismos altamente especializados – as bactérias que oxidam a amônia e as que oxidam o nitrito – são chamados de nitrificantes. Os nomes dos gêneros de bactérias que oxidam a amônia têm o prefixo *Nitroso-*, incluindo *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira* (figura 3.4), *Nitrosolobus* (figura 3.5) e *Nitrosovibrio*. Já os das bactérias que oxidam o nitrito começam com *Nitro-*, como *Nitrobacter* (figura 3.6), *Nitrococcus*, *Nitrospira* e *Nitrospina*. Estes microorganismos são caracterizados pela sua capacidade de crescimento litotrófico, no qual a energia é gerada pela oxidação de amônia a nitrito (oxidantes de amônia) e de nitrito a nitrato (oxidantes de nitrito). Bactérias nitrificantes são autotróficas, fixando CO₂, sua maior fonte de carbono, através do Ciclo de Calvin. Além do crescimento aeróbio litotrófico, estes organismos possuem uma grande diversidade metabólica (BRENNER *et al.*, 2005; TIMMONS *et al.*, 2002).

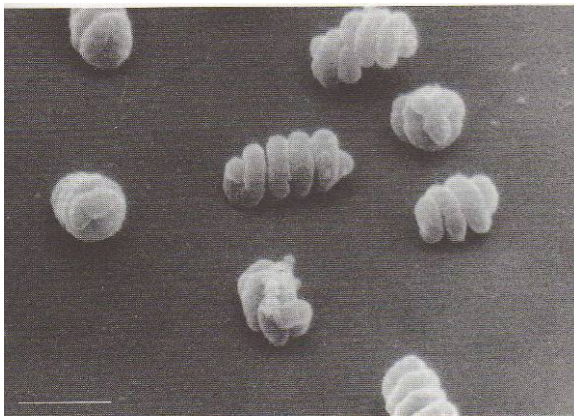


Figura 3.4: *Nitrospira briensis*
Fonte: Brenner *et al.*, 2005

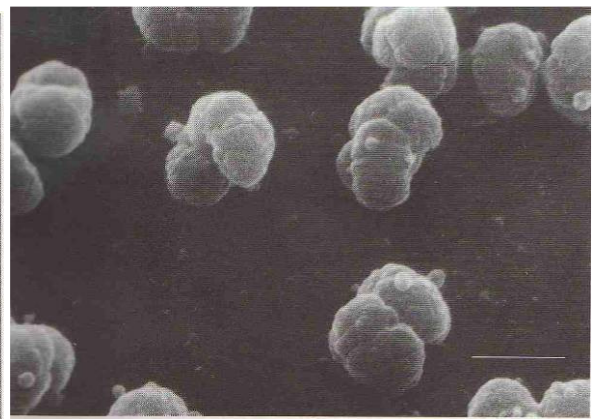


Figura 3.5: *Nitrosolobus multiformis*
Fonte: Brenner *et al.*, 2005



Figura 3.6: *Nitrobacter vulgaris* Fonte: Brenner *et al.*, 2005

Análises comparativas da região 16S do rRNA demonstram que todas as bactérias oxidantes de amônia são membros das subclasses β ou γ de Proteobacteria (Figura 3.7). Os gêneros *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus* e *Nitrosovibrio* e a espécie *Nitrosococcus mobilis* formam uma assembléia monofilética dentro da subclasse β . O gênero *Nitrosococcus* constitui um ramo separado dentro da subclasse γ . Entre as bactérias oxidantes de nitrito, os gêneros *Nitrobacter*, *Nitrococcus* e *Nitrospina* fazem parte das subclasses α , Δ e γ . Já o gênero *Nitrospira* pertence ao Filo *Nitrospira*, que representa uma linhagem independente (BOCK & WAGNER, 2006).

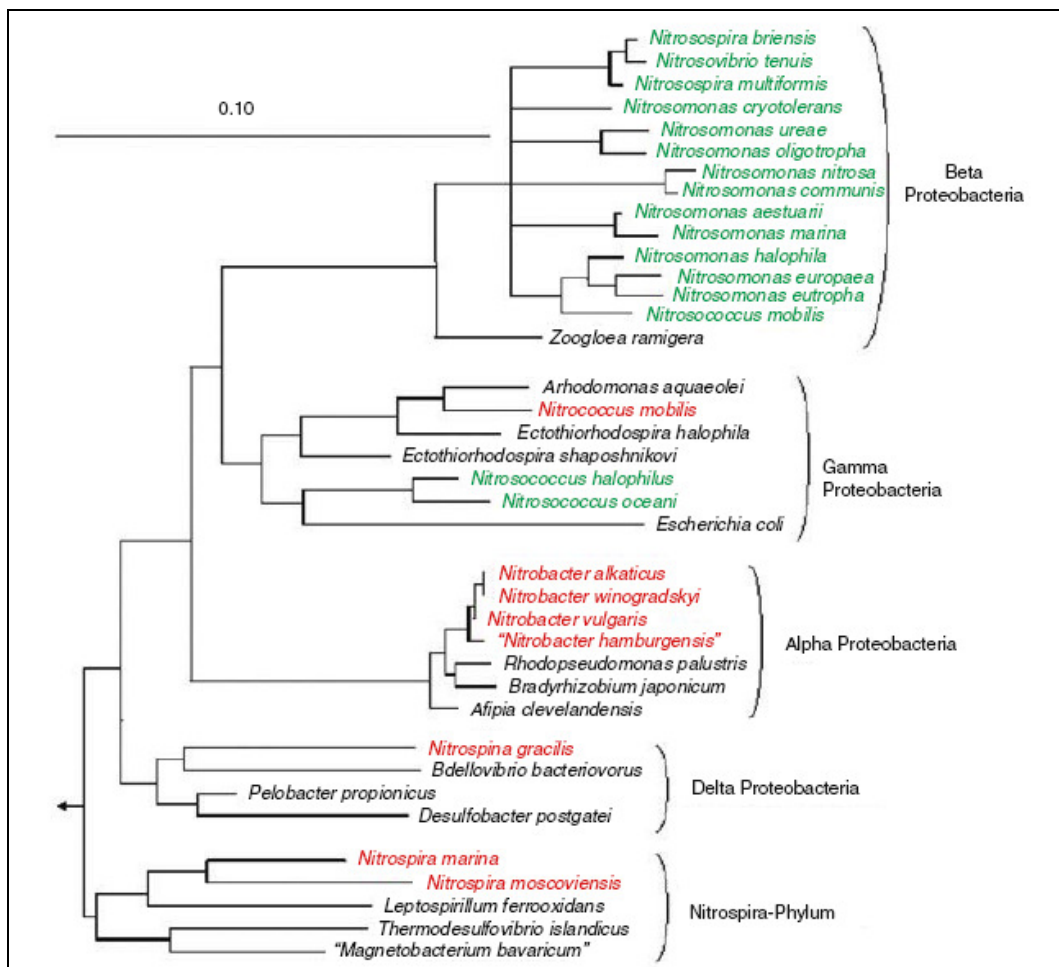


Figura 3.7: Relações filogenéticas das bactérias oxidantes de nitrito e amônia. Fonte: Bock & Wagner, 2006 As espécies em verde são as oxidadoras de amônia e em vermelho estão as oxidadoras de nitrito. Durante o experimento foram marcadas com Cy3 as oxidadoras de amônia pertencentes ao grupo Beta Proteobacteria, a Gamma Proteobacteria oxidadora de nitrito *Nitrococcus mobilis* e bactérias do gênero *Nitrobacter* que pertencem a Alpha Proteobacteria.

Oxidantes de amônia e nitrito ocorrem na maioria dos ambientes aeróbios em que a matéria orgânica é mineralizada, e são amplamente distribuídas em solos, água doce, água marinha, esgoto e biofilmes (BRENNER *et al.*, 2005). Estes microorganismos possuem

mecanismos de sobrevivência que permitem sua distribuição cosmopolita em ambientes aquáticos e terrestres (HAGOPIAN & RILEY, 1998).

Em filtros biológicos, as bactérias nitrificantes geralmente coexistem com microorganismos heterotróficos como bactérias heterotróficas, protozoários e micrometazoários, os quais metabolizam compostos orgânicos degradáveis biologicamente. Bactérias heterotróficas crescem significativamente mais rápido do que bactérias nitrificantes e vão prevalecer sobre estas últimas na competição por espaço e oxigênio nos filtros biológicos, quando as concentrações de matéria orgânica dissolvida e particulada forem altas (TIMMONS *et al.*, 2002). Uma importante ferramenta para o controle da comunidade microbiana é a relação carbono/nitrogênio inorgânico (C/N). Para uma alta relação C/N as bactérias heterotróficas são favorecidas na competição com as bactérias oxidantes de amônia. Uma relação C/N relativamente baixa favorece as bactérias nitrificantes na competição com as heterotróficas (MICHAUD *et al.*, 2006).

Muitos dos estudos sobre bactérias nitrificantes da microflora de materiais de filtros de sistemas de recirculação são recentes. Isso se deve à baixa culturabilidade destas amostras ambientais. Contagens diretas de bactérias de amostras ambientais em microscópio, como água doce, água marinha e sedimentos, geralmente excedem a contagem de viáveis em diversas ordens de magnitude, devido à presença de bactérias não cultiváveis (ITOI *et al.*, 2007).

Já a desnitrificação é a redução de nitrato a ácido nítrico, óxido nitroso e gás nitrogênio. As bactérias capazes de realizar este processo podem tanto ser autotróficas quanto heterotróficas (METCALF & EDDY, 2003). As mais comumente utilizadas em tratamento de efluentes são as heterotróficas capazes de realizar respiração anaeróbia, utilizando como acceptor de elétrons o nitrato. (MAIER *et al.*, 2000). Os organismos heterotróficos incluem os seguintes gêneros: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Hypomicrobium*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Paracoccus*, *Propionibacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Spirillum* e *Vibrio* (PAYNE, 1981 apud METCALF & EDDY, 2003). Apesar de, geralmente, o filtro biológico utilizado na aquicultura com recirculação não ter como objetivo a desnitrificação, gêneros de bactérias desnitrificantes têm sido encontrados em trabalhos de diversos autores (ITOI *et al.*, 2007; LEONARD *et al.* 2000; ITOI *et al.*, 2006; SUGITA *et al.*, 2005).

Uma diversidade de populações microbianas, que estão envolvidas em nitrificação, amonificação, redução de nitrato, desnitrificação, proteólise e redução de sulfato, foram detectadas em materiais de filtro de sistema de recirculação de aquário. Estes fatos sugerem

que a qualidade da água das instalações de aquacultura equipadas com sistemas de recirculação é mantida por uma diversificada comunidade bacteriana associada ao meio de preenchimento do filtro biológico (SUGITA *et al.*, 2005).

Em pesquisa realizada por Itoi *et al.* (2007), inicialmente microorganismos do gênero *Pseudomonas* e *Flavobacterium* aderiram aos grânulos de preenchimento. Enquanto *Pseudomonas* permaneceu na camada interna do biofilme, *Flavobacterium* diminuiu sua densidade. *Comamonas* e *Ideonella* foram as principais componentes da camada externa, sendo que cada uma respondeu diferentemente ao condicionamento do filtro: *Ideonella* aumentou sua abundância, e *Comamonas* diminuiu. Curiosamente, não foi detectada nenhuma bactéria oxidante de amônia típica, como *Nitrosomonas*, durante o experimento. Foram isolados muitos clones de *Pseudomonas fluorescens*, que podem produzir nitrito quando crescem na amônia. Bactérias oxidantes de nitrito, como *Nitrobacter*, *Nitrospina* e *Nitrococcus* foram detectadas em um grande número de análises, apesar de o gênero predominante ser *Nitrospira*. A estrutura das comunidades do biofilme pode depender das funções fisiológicas das bactérias nitrificantes, que são quimiolitotróficas aeróbias e demandam oxigênio. Geralmente, o ambiente da camada interna do biofilme apresenta baixas concentrações tanto de oxigênio quanto de substrato (amônia e nitrito). Isto pode explicar porque *Nitrospira* pode ser detectada principalmente na camada externa do biofilme.

Foi revelado, através de um estudo da comunidade bacteriana do biofilme de um filtro biológico num sistema de recirculação de água para criação de carpa (*Cyprinus carpio*) e do peixe-dourado (*Carassius auratus*), que a comunidade bacteriana na superfície do material filtrante era composta de diversos grupos de bactérias, inclusive uma oxidante de nitrito, *Nitrospira*, a qual correspondia entre 8% e 9,8% dos táxons bacterianos no material filtrante. Além disso, o sistema de recirculação do peixe-dourado apresentou uma prevalência de *Hyphomicrobium facilis* (42% do total de táxons), e no sistema da carpa não houve prevalência de nenhuma espécie bacteriana. A diferença na composição das espécies bacterianas pode ser atribuída às espécies de peixes, aos ambientes de criação e aos períodos de criação (SUGITA *et al.*, 2005).

Em trabalho comparando as bactérias nitrificantes de sistemas de água doce e marinha, com a utilização de sondas de oligonucleotídeos, não foram encontradas bactérias do gênero *Nitrosomonas* na água doce, mas ocorreu a nitrificação no filtro biológico. Em ambiente de água marinha, não só foi possível detectar a espécie *Nitrosomonas europea*, como foi possível observar que esta espécie e as linhagens próximas eram as oxidantes de amônia mais abundantes. Quanto às bactérias oxidantes de nitrito, os dados do trabalho sugerem que o gênero *Nitrobacter* não era o responsável por esta etapa da nitrificação, já que este não foi

detectado em nenhum dos dois ambientes (HOVANEK & DELONG, 1996). Os estudos sobre a comunidade bacteriana de filtros biológicos de sistemas de aquacultura de recirculação realizados em ambientes de água doce são relativamente poucos, quando em comparação aos experimentos desta natureza realizados em sistemas de água salgada.

3.4 Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH)

O seqüenciamento comparativo e a sistemática molecular estão modificando rapidamente a essência dos estudos na microbiologia taxonômica e ambiental. Estima-se que apenas 5 a 10 % de todos organismos em alguns ecossistemas possam ser identificados pela microbiologia clássica. Isto tem sido uma grande deficiência na avaliação da maior parte dos sistemas naturais (AMANN *et al.*, 1990). Métodos moleculares, como o FISH, permitem que microorganismos não cultiváveis possam ser caracterizados filogeneticamente (GIOVANNONI *et al.*, 1988).

Sondas podem ser usadas para analisar DNA ou RNA extraído das células ou podem ser transferidos para reagir com rRNA e fluorescer dentro da célula (METCALF & EDDY, 2003). O RNA é uma molécula de ácido nucléico formada, geralmente por uma só cadeia. A seqüência de bases (estrutura primária) é similar à do DNA, exceto pela substituição da desoxirribose por ribose e de timina por uracil. Existem três classes principais de ácido ribonucleico, sendo que todos intervêm na síntese protéica: RNA mensageiro (mRNA), que contém a informação genética para a seqüência de aminoácidos; RNA transportador (tRNA), que identifica e transporta as moléculas de aminoácidos até o ribossomo; e, ainda, o RNA ribossômico (rRNA), que representa 50% da massa dos ribossomos. O ribossomo proporciona as condições moleculares para a síntese de polipeptídios (ZAHA, 2000).

A hibridização *in situ*, definida em um senso stricto, é uma técnica de localização que identifica ácidos nucléicos dentro da célula intacta (AMANN & SCHLEIFER, 2005; MAIER *et al.*, 2000). A ligação de sondas com ribossomos pode ser observada microscopicamente quando uma coloração fluorescente é conectada a sonda. Através de tratamentos com os reagentes apropriados, as membranas se tornam permeáveis e permitem a penetração da mistura da coloração e sonda na célula. Após a hibridização da sonda diretamente com o RNA ribossomal nos ribossomos, as células se tornam uniformemente fluorescentes e podem ser observadas através de um microscópio de epifluorescência (MADIGAN & MARTINKO, 2006)

O RNA ribossomal não é o único alvo da hibridização *in situ*, mas por diversas razões, entre estas a sua estabilidade e um grande número de cópias, é o mais comumente utilizado

(AMANN & SCHLEIFER, 2005). Dependendo da seqüência da sonda, o FISH pode ser utilizado para detectar todas as células bacterianas (uma sonda universal) ou uma população específica de células (sonda específica para uma espécie) (MAIER *et al.*, 2000). Isso se deve ao fato de que os rRNAs diferem ao longo de seu comprimento em relação ao quão conservativa é a seqüência, dessa forma, regiões mais ou menos conservativas vão controlar a especificidade das sondas (AMANN *et al.*, 1990).

Uma das limitações do FISH é que este somente pode ser utilizado para organismos que já tenham sido seqüenciados (RITTMAN & McCARTY, 2001). A baixa sensibilidade da sonda ou a dificuldade de acesso à célula podem gerar um falso negativo (AMANN, 1995).

Análises moleculares têm demonstrado que os métodos de cultivo de procariotos geralmente subestimam as populações de bactérias oxidantes de amônia (AOB) numa amostra. Como este grupo cresce de maneira bastante lenta, o seu isolamento é difícil e demorado. Além disso, os meios de cultura podem selecionar linhagens que não necessariamente representam as populações mais abundantes no ambiente (KOWALCHUK & STEPHEN, 2001).

O FISH tem sido utilizado em trabalhos de ecologia microbiana aplicada à aquacultura, visando compreender a diversidade de microorganismos existentes em ambientes de cultivo e suas interações com a qualidade da água (IVANOV *et al.*, 2006; BURRELL *et al.*, 2001; JURETSCHKO *et al.*, 1998; KINDAICHI *et al.*, 2007). Outros métodos moleculares como eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) e biblioteca de clones também estão sendo utilizados para este fim (TAL *et al.*, 2006; ITOI *et al.*, 2006; TAL *et al.*, 2003; SUGITA *et al.*, 2005; BOURNE *et al.*, 2004).

4 METODOLOGIA

4.1 Descrição do Sistema Experimental de Aquacultura com Recirculação

As unidades experimentais de aquacultura consistiram em um sistema com recirculação de água (figura 4.1 e figura 4.2) e um sistema do tipo convencional, com trocas contínuas de água e sem recirculação. Estas unidades foram montadas no Laboratório de Aquacultura da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os dois sistemas incluíam tanques de fibrocimento com capacidade de 1000L, e foram manejados buscando simular e comparar situações de aquacultura com e sem recirculação de água.

A reposição da água foi feita com água da rede de abastecimento da Universidade, sendo necessária a remoção do cloro residual, que pode ser fatal para os peixes. A remoção do cloro residual da água foi feita com uma solução de tiosulfato de sódio a 5% aplicada na dose de 0,11mL para cada litro de água repostas. Durante o período experimental (entre 23/10/2008 e 12/12/2008) foram feitas 25 coletas para análise da qualidade da água, além de coletas para análise microbiológica e biometrias dos peixes das unidades experimentais.

O sistema com recirculação foi composto por um filtro biológico de leito flutuante (*floating beads biofilter*) de fluxo ascendente e aerador do tipo Venturi, conectados a um tanque de cultivo de fibrocimento com capacidade de mil litros de água. Cada tanque foi povoado com 104 juvenis de tilápias do Nilo (peso médio individual=8,2g) (*Oreochromis niloticus*) (figura 4.3). O sistema foi dimensionado para a contínua nitrificação, aeração e remoção de sólidos suspensos da água. A energia necessária para a manutenção da circulação da água em circuito fechado foi provida por uma bomba hidráulica elétrica de 0,5 hp, que forneceu uma vazão de 10 litros por minuto.



Figura 4.1: Foto do sistema experimental de aquacultura com recirculação.

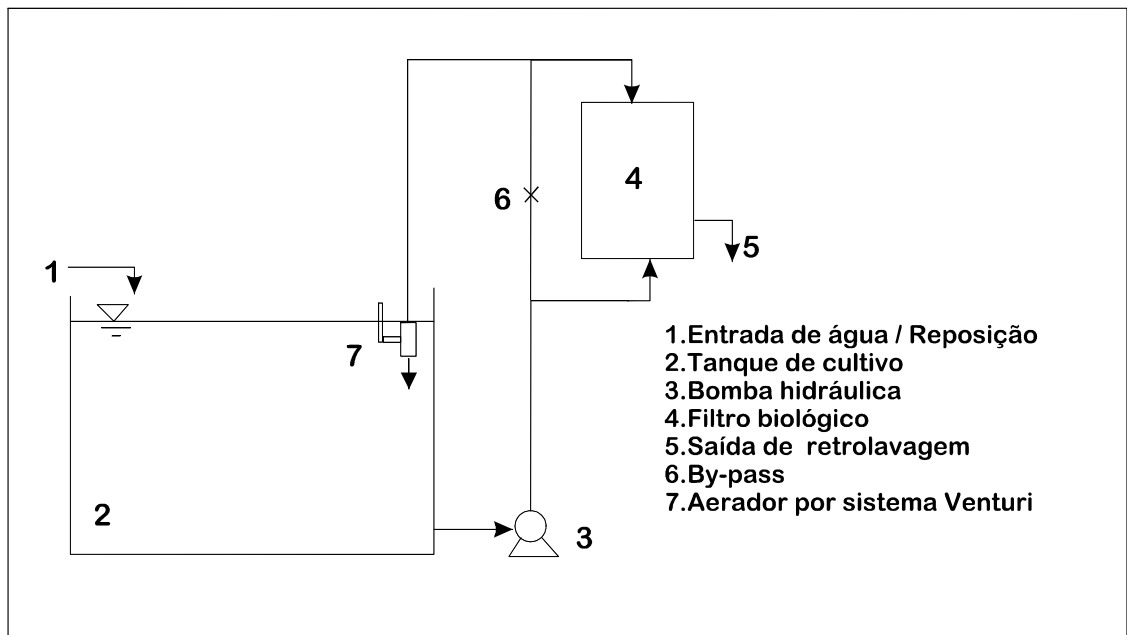


Figura 4.2: Fluxograma do sistema com recirculação



Figura 4.3: Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Fonte: FISHBASE, 2008

O filtro biológico (figura 4.4) foi confeccionado com o uso de uma bombona plástica de 50 litros adaptada para a função. Este foi preenchido com 34 litros de grânulos (5mm x 3mm x 2mm) de polietileno de baixa densidade - *beads* (figura 4.5), que possuem a propriedade de flutuar logo abaixo da superfície da água ($d= 0,91$), promovendo o desenvolvimento de biofilme e proporcionando uma zona de filtração mecânica. Dessa forma, o filtro biológico utilizado para o tanque com recirculação foi projetado para cumprir as funções de nitrificação e remoção de sólidos, conforme Malone & Beecher (2000).

Os *beads* usados no preenchimento do filtro possuem uma alta área superficial específica quando em conjunto ($1150-1475 \text{ m}^2/\text{m}^3$). De acordo com Malone & Beecher (2000), em estudos feitos para filtros biológicos de leito flutuante granular (*floating beads biofilters*), a taxa de conversão do nitrogênio amoniacal por volume de meio filtrante fica entre 140g e 350g de Nitrogênio Amoniacal Total (NAT)/ m^3 dia. (TIMMONS *et al.*, 2002). Assumindo uma taxa média de 245g de Nitrogênio Amoniacal Total (NAT)/ m^3 dia, calcula-se

que o meio filtrante utilizado no filtro biológico deste experimento possui uma capacidade de remoção de 8,3g de nitrogênio amoniacal por dia. Considerando a fração de nitrificação *In Situ*, que reconhece o efeito da nitrificação que ocorre nas paredes do tanque e nos encanamentos do sistema, e que, conservadoramente, pode ser calculada como 30% da remoção de nitrogênio amoniacal total que ocorre no sistema (TIMMONS *et al.*, 2002), estima-se que o sistema projetado possui uma capacidade de remoção total de 11,9g de nitrogênio amoniacal por dia.



Figura 4.4: Foto do filtro biológico



Figura 4.5: Foto do meio de preenchimento.

Considerando que a ração utilizada no experimento possui 42% de proteína, pode ser usado a equação 4.1 sugerida por Timmons *et al.* (2002) na estimativa da taxa de alimentação diária máxima suportada pela taxa de remoção de nitrogênio amoniacal esperada para o filtro biológico usado:

$$TA = \frac{P_{NAT}}{CP \times 0,092} \quad (4.1)$$

Onde,

TA= Taxa de Alimentação diária (g/dia)

P_{NAT}= Produção de Nitrogênio Amoniacal Total (g/dia)

CP= Conteúdo Protéico do alimento (gramas de proteína/gramas de alimento)

Ao considerar que o sistema com recirculação é competente no controle de uma taxa de produção de nitrogênio amoniacal de até 11,9g por dia, calcula-se que o sistema suporta uma taxa máxima de alimentação de 308 gramas de ração por dia (42% de proteína).

A aeração foi provida através de um sistema Venturi (figura 4.6). Este dispositivo faz a água passar por um estrangulamento bastante pronunciado, ao sair do qual se estende num trecho de tubulação divergente (figura 4.7), onde parte da energia cinética se transforma de novo em carga estática ou de pressão (ADDISON, 1954) O seu funcionamento se baseia no princípio de Bernoulli, de que um aumento de velocidade corresponde a uma queda da pressão (NEVES, 1986). Desta forma as condições existentes no ponto de estrangulamento criam um vácuo que succiona o ar para a tubulação de água. Este processo favorece a aeração da água.



Figura 4.6: Foto do Venturi.

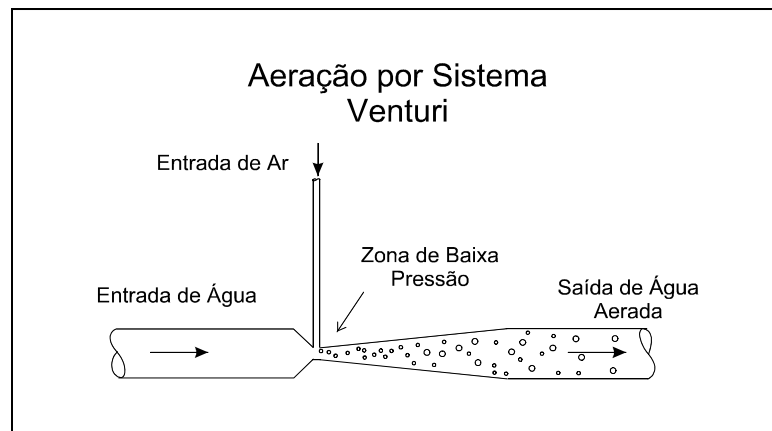


Figura 4.7: Desenho esquemático de um aerador Venturi

4.2 Manejo dos Sistemas de Cultivo

Em ambos os sistemas de cultivo, os peixes foram arraçoados diariamente com taxas variando de 7% a 5% do peso corpóreo, considerando um fator de conversão alimentar de 1,3 para tilápias, conforme metodologia proposta por Timmons *et al.* (2002). Para a alimentação das tilápias foi utilizada uma ração extrusada (Supra Juvenil Gaiola[®]). A tabela 4.1 apresenta a composição típica destes produtos.

Tabela 4.1: Composição típica das rações utilizadas no experimento (Fonte: Site ALISUL/SUPRA[®], 2009).

Níveis de Garantia	Supra Juvenil Gaiola [®]
Umidade (Max.):	12%
Energia digestível:	3.800 Kcal/kg
Proteína Bruta (Min.):	42%
Extrato etéreo (Min.):	9%
Cálcio (Max.):	3%
Fósforo (Min.):	1,5%
Vitamina C:	500mg/kg

Foram realizadas biometrias por amostragem (figura 4.8) quinzenais durante o experimento, onde 10 tilápias foram pesadas. Além disso, no início e no final do experimento foram feitas biometrias completas, em que todos os indivíduos foram pesados.



Figura 4.8: Amostra para biometria

Quando necessário, foram utilizados aquecedores de 300 w, um em cada tanque, para manutenção de uma temperatura adequada para o cultivo. De acordo com Rakocy e McGinty (1989), a faixa ideal de temperatura para Tilápia é entre 27,8 e 30 °C (faixa que foi almejada durante o experimento), sendo que o crescimento desta espécie diminui consideravelmente quando a temperatura da água atinge os 20° e pode morrer se a temperatura da água chegar a 10°C. No sistema sem recirculação houve troca diária de 300L de água para manutenção da qualidade da água. Já no sistema com recirculação, as trocas de água se limitaram às retro-lavagens diárias, com exceção do período inicial do experimento, quando a comunidade de bactérias nitrificantes ainda não havia se estabelecido e foram realizadas trocas quando o nível de amônia atingiu valores acima de 7 mg/L de nitrogênio amoniacal total.

Para que a função e eficiência de nitrificação e remoção de sólidos fossem cumpridas, foram necessárias retro-lavagens (*backwashing*) diárias visando à remoção do excesso de sólidos e biofilme acumulados no interior do filtro. Além disso, pretendeu-se com este manejo que fosse mantida uma massa apropriada de bactérias nitrificantes residentes no filtro (MALONE & BEECHER, 2000). Os sólidos orgânicos que tendem a acumular no interior do filtro não só podem se decompor e produzir amônia, como encorajam o crescimento de bactérias heterotróficas que competem por espaço e nutrientes com as bactérias nitrificantes (ZHANG *et al.* 1995; MATSUDA *et al.* 1988 *apud*: MALONE & BEECHER, 2000).

A retro-lavagem remove o excesso de bactérias heterotróficas, sólidos e possivelmente também bactérias nitrificantes. Se o intervalo entre as retro-lavagens for muito curto, as nitrificantes não terão tempo suficiente para o restabelecimento de suas populações, reduzindo

a taxa de nitrificação do filtro. Há, portanto, a necessidade de um equilíbrio entre evitar o acúmulo de sólidos e biomassa heterotrófica e fornecer tempo necessário para o crescimento das nitrificantes, determinado pela frequência de retro-lavagens (MALONE & BEECHER, 2000). Para o sistema estudado foram realizadas retro-lavagens diárias de cerca de 12L.

4.3 Métodos de Análise de Qualidade de Água

As amostras de água foram coletadas de dois em dois dias para melhor acompanhar o processo de nitrificação e verificar se a qualidade desta se encontra adequada para o cultivo de organismos cultivados. As coletas e preservação das amostras seguiram a metodologia descrita em APHA *et al.*, (1998). Foram amostrados quatro pontos:

- O tanque de cultivo do sistema sem recirculação (SEM), onde a amostra foi coletada diretamente do tanque de cultivo;
- O tanque de cultivo do sistema com recirculação (COM), sendo a coleta realizada da mesma forma que o ponto SEM;
- A saída do filtro biológico (SF), onde havia um registro logo após a passagem pelo filtro para possibilitar a amostragem;
- O efluente gerado na retrolavagem (RET), com a amostra sendo coletada no registro destinado à realização da retrolavagem;

As análises foram conduzidas nos laboratórios do IPH e do Departamento de Solos da UFRGS. As análises seguiram o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA *et al.*, 1998). Os parâmetros, as metodologias e equipamentos (figuras 4.9 e 4.10) utilizados estão descritos na tabela 4.2.



Figura 4.9: Cromatógrafo Iônico do IPH



Figura 4.10: Condutivímetro do IPH

Tabela 4.2: Métodos de análise dos parâmetros de qualidade da água

Parâmetro	Método de Análise
Alcalinidade	Método 2320B (APHA <i>et al.</i> , 1998) Titulométrico
Amônia	Método 4500-NH ₃ B e Método 4500-NH ₃ C (APHA <i>et al.</i> , 1998) Destilação e Titulometria
Carbono Orgânico Total	Método 5310B (APHA <i>et al.</i> , 1998) Combustão via seca Analisador de Carbono marca Shimadzu – TOC-V CSH.
Cloreto	Método 4110B (APHA <i>et al.</i> , 1998) Cromatografia Iônica Cromatógrafo Iônico marca Dionex® – DX120
Condutividade	Método 2510 (APHA <i>et al.</i> , 1998) Instrumental: Condúvmetro marca YSI® - modelo 33
Fluoreto	Método 4110B (APHA <i>et al.</i> , 1998) Cromatografia Iônica Cromatógrafo Iônico marca Dionex® – DX120
Nitrato	Método 4110B (APHA <i>et al.</i> , 1998) Cromatografia Iônica Cromatógrafo Iônico marca Dionex® – DX120
Nitrito	Método 4110B (APHA <i>et al.</i> , 1998) Cromatografia Iônica Cromatógrafo Iônico marca Dionex® – DX120
Oxigênio	Método 4500-O (APHA <i>et al.</i> , 1998) Winkler modificado pela Azida Sódica
pH	Método 4500-H ⁺ B (APHA <i>et al.</i> , 1998) Eletrométrico pHmetro marca Denver – Ultrabasic
Salinidade	Método 2520B (APHA <i>et al.</i> , 1998) Método da Condutividade Elétrica Condúvmetro marca YSI® - modelo 33
Sólidos Dissolvidos Totais	Por subtração dos Sólidos Suspensos Totais dos Sólidos Totais
Sólidos Suspensos Totais	Método 2540D (APHA <i>et al.</i> , 1998) Secagem à 103-105°C
Sólidos Totais	Método 2540B (APHA <i>et al.</i> , 1998) Secagem à 103-105°C
Sulfato	Método 4110B (APHA <i>et al.</i> , 1998) Cromatografia Iônica Cromatógrafo Iônico marca Dionex® – DX120
Turbidez	Método 2130B (APHA <i>et al.</i> , 1998) Método Nefelométrico Turbidímetro marca Micronal® – B250

4.4 Métodos Microbiológicos

As amostras de biofilme para realização do método FISH foram coletadas do filtro biológico do sistema de aquacultura com recirculação. A metodologia para realização do FISH que foi utilizado é descrita em Pernthaler *et al.* (2001) e Cottrell (2005).

As amostras, compostas de 10 beads, foram fixadas em 10 mL de formaldeído (4%) para posterior análise. Em cada amostra, o biofilme das placas foi extraído utilizando-se um aparelho de ultra-som (Cole Palmer Mod. 4710 Series Ultrasonic Homogenizer) aplicando-se nove pulsos de 10 segundos, numa frequência de 20-kHz.

Uma nova fixação com paraformaldeído 20% diluído à 2% em tampão fosfato foi realizada durante uma hora com a finalidade de melhorar a permeabilidade da membrana plasmática. As amostras foram filtradas através de filtro de policarbonato com porosidade de 0,2 μm (figura 4.11). Cada filtro foi então cortado em 12 pedaços (figura 4.12). Para cada sonda (tabela 4.2), um pedaço do filtro foi colocado sobre uma lâmina coberta com parafilme, sobre uma gota de 10 μl da sonda (figura 4.13). Em seguida, foi adicionado 40 μl de sonda sobre o filtro. A lâmina foi então colocada em um tubo fechado, um para cada sonda, saturado com solução de hibridização (NaCl 0,9M; Tris-HCl 20mM pH7,2; EDTA 5mM; SDS 0,01%, sendo que a concentração de formamida varia de acordo com a sonda - tabela 4.3). Estes tubos foram incubados a uma temperatura de 52 °C overnight para hibridização.



Figura 4.11: Aparato de filtração.



Figura 4.12: Procedimento de corte dos filtros.

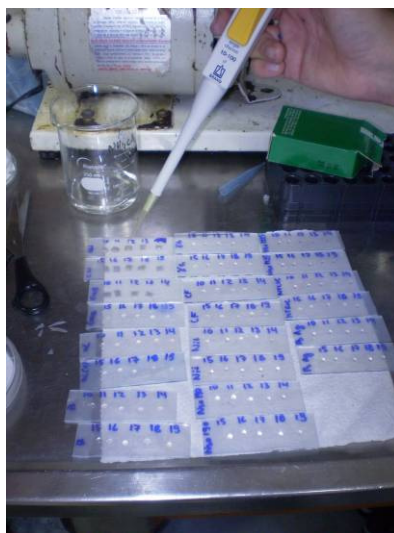


Figura 4.13: Lâminas cobertas com parafilme e com as sondas.

Tabela 4.3: Sondas utilizadas com suas respectivas especificidades, origens e seqüências.

Sonda	Especificidade	Origem	Seqüência
Controle Negativo	Não compatível com qualquer grupo de bactéria	16S rRNA	5'-CCTAGTGACGCCGTCGAC-3'
Eub338	Bactéria	16S rRNA	5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'
Alfa	α - Proteobacteria	16S rRNA	5'-GGTAAGGTTCTGCGCGTT-3'
Beta	β - Proteobacteria	16S rRNA	5'-GCCTTCCCACTTCGTTT-3'
Gama	γ - Proteobacteria	16S rRNA	5'-GCCTTCCCACATCGTTT-3'
CF	<i>Cytophaga – Flavobacter</i>	16S rRNA	5'-TGGTCCGTGTCTCAGTAC-3'
Nso 1225	Todas AOB beta	16S rRNA	5'-CGCCATTGTATTACGTGTGA-3'
Nso 190	Todas AOB beta	16S rRNA	5'-CGATCCCCTGCTTTCTCC-3'
NIT3	<i>Nitrobacter</i> sp.	16S rRNA	5'-CCTGTGCTCCATGCTCCG-3' 5'-CCTGTGCTCCAGGCTCCG-3' (competidor)
Ntcoc 206	<i>Nitrococcus mobilis</i>	16S rRNA	5'-CGGTGCGAGCTTGCAAGC-3'
Ps Ag1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Ag1	16S rRNA	5'-GATAACTCGTCATCAGCTC-3'

Após serem retirados da estufa, os filtros foram transferidos para uma solução de lavagem (Tris-HCl 20mM pH 7,2; EDTA 10mM; SDS 0,01%, sendo que a concentração de NaCl varia conforme a sonda) de acordo com a sonda utilizada (tabela 4.4), onde permaneceram por 15 minutos à 56°C. Após este procedimento, os filtros foram então corados com DAPI na concentração de 2 μ g/ml. Em seguida, os filtros foram lavados 3 vezes

em etanol 80% e secos em papel Whatman 3M. Por fim, as lâminas foram montadas com a aplicação de 10 µl de uma solução 4:1 de Citifluor e Vectashield.

Tabela 4.4: Concentração da formamida da solução de hibridização e concentração de NaCl da solução de lavagem.

Sondas	Concentração de Formamida da Solução de Hibridização	Concentração de Cloreto de Sódio da Solução de Lavagem
Eub, Alfa, Beta, Gama	30	102 mM
CF	35	80 mM
Nos 1225	35	80 mM
Nos 190	55	20 mM
NIT3	40	56 mM
Ntcoc 206	10	450 mM
Ps Ag1	30	100 mM

As lâminas foram visualizadas em microscópio de epifluorescência Zeiss Axioplan com lâmpada Osran HPG 50W equipado com conjunto de filtros ópticos UV (BP 365/11 FT 395 LP 397 - 487901), onde é possível visualizar todas as bactérias coradas com o DAPI; e o filtro HQ:CY3 (HQ 545/30, 610/75, Q570/p), sendo que com este último são visualizadas apenas as bactérias hibridizadas com os marcadores. Em cada lamina foram fotografados e contados 10 campos. Para contagem foi utilizado o programa Image Tool-UTHSCA (University of Texas Health Science Center, San Antonio - Texas/USA). Toda contagem foi corrigida subtraindo-se do controle negativo (CESAR, 2002).

4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

A estrutura tridimensional do biofilme foi fotografada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) realizada junto ao Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFRGS. O microscópio eletrônico de varredura utilizado foi um JEOL - JSM 6060.

No laboratório do IPH, as amostras foram fixadas, lavadas e desidratadas de acordo com o protocolo do Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS (2009). A fixação do material foi feita imediatamente após a coleta da amostra, por pelo menos uma semana. A amostra foi imersa numa solução composta por 1,2mL de glutaraldeído a 25%, 5,0mL de tampão fosfato a 0,2M e 3,8mL de água destilada. Após esta etapa, foram realizadas 3 lavagens de 30 minutos cada. A solução de lavagem é composta por tampão fosfato a 0,2M e água destilada na proporção de 1:1. A desidratação (progressiva, de forma a evitar a lise celular) foi feita colocando a amostra em diferentes concentrações de acetona por um tempo

determinado, sucessivamente, começando com acetona a 30% por 10min, seguindo com a concentração de 50% por 10min, 70% por 10min, 90% por 10min, 90% por 20min (renovação da solução, devido à perda por evaporação), 100% por 10min e finalizando com acetona a 100% por 20min. (CME/UFRGS, 2009).

Posteriormente, estas amostras foram dessecadas até o ponto crítico e metalizadas no Centro de Microscopia Eletrônica. A dessecação foi realizada no aparelho de Ponto Crítico (Critical Point Dryer) da Balzers CPD030. Após o Ponto Crítico, as amostras foram colocadas no Stub, com o auxílio de uma lupa. Finalmente, foi feita a metalização, que visa tornar o material condutivo por meio da deposição de um metal sobre a amostra. Os metais utilizados foram ouro e platina. A metalizadora (Sputter Coater) utilizada foi a SCD050 da Balzers.

4.6 Análise Estatística

Os parâmetros de qualidade da água levantados foram contrastados mediante análise de variância (ANOVA), utilizando Delineamento em Blocos Casualizados (DBC com o tempo como fator de bloco) (QUINN & KEOUGH, 2007). Este delineamento permite isolar o efeito do tempo como causa de variação dos dados, diferenciando-o do efeito dos tratamentos. Neste caso os tratamentos considerados foram os pontos amostrados (SEM, COM, SF e RET). Para a aplicação da ANOVA, verificou-se a homocedasticidade dos dados através do teste de Hartley. A homocedasticidade para alguns conjuntos de dados ($\alpha=0,05$) foi alcançada após transformações logarítmicas ou potenciais (QUINN & KEOUGH, 2007). O contraste de médias foi feito através do teste de Tukey. Também foram feitas análises de correlação de Pearson e teste de Wilcoxon para dados com distribuição não-paramétrica (QUINN & KEOUGH, 2007). Para todos os casos, foi considerado um nível de significância de 5% (ou $p<0,05$).

As informações quantitativas geradas a partir das análises microbiológicas também foram contrastadas através de ANOVA seguida pelo teste de Tukey. Nestes casos adotou-se um delineamento inteiramente casualizado (DIC). Também foi considerado um nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS OBTIDOS E DISCUSSÃO

5.1 Qualidade da Água

A seguir serão apresentados os resultados obtidos referentes à qualidade da água nos dois sistemas de cultivo.

5.1.1 A evolução do Nitrogênio Inorgânico nos dois Sistemas de Cultivo

As figuras 5.1 a 5.4 apresentam os resultados do Nitrogênio Amoniacal Total dos quatro pontos de coleta dos dois sistemas de cultivo.

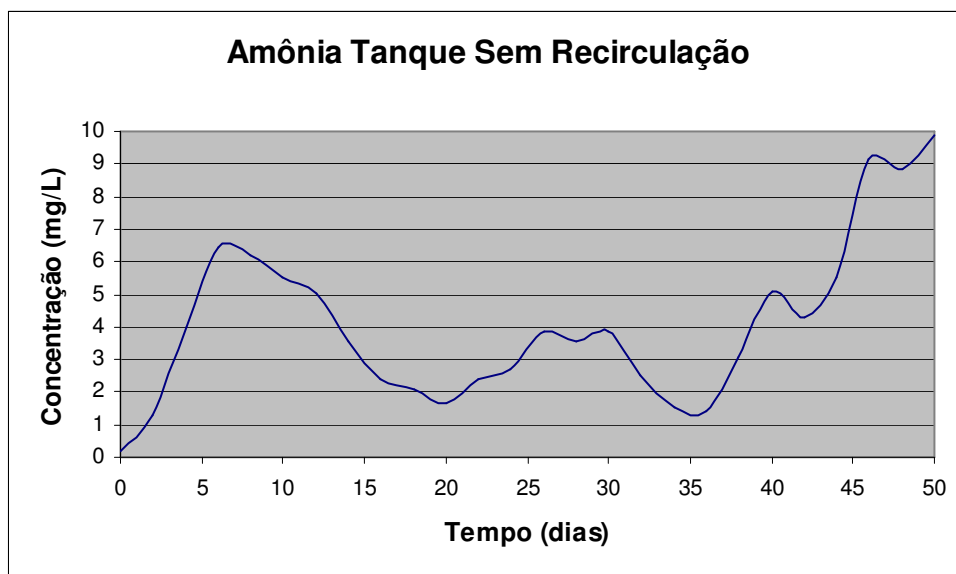


Figura 5.1: Variação ao longo do tempo da concentração do Nitrogênio Amoniacal Total no tanque de cultivo sem recirculação.

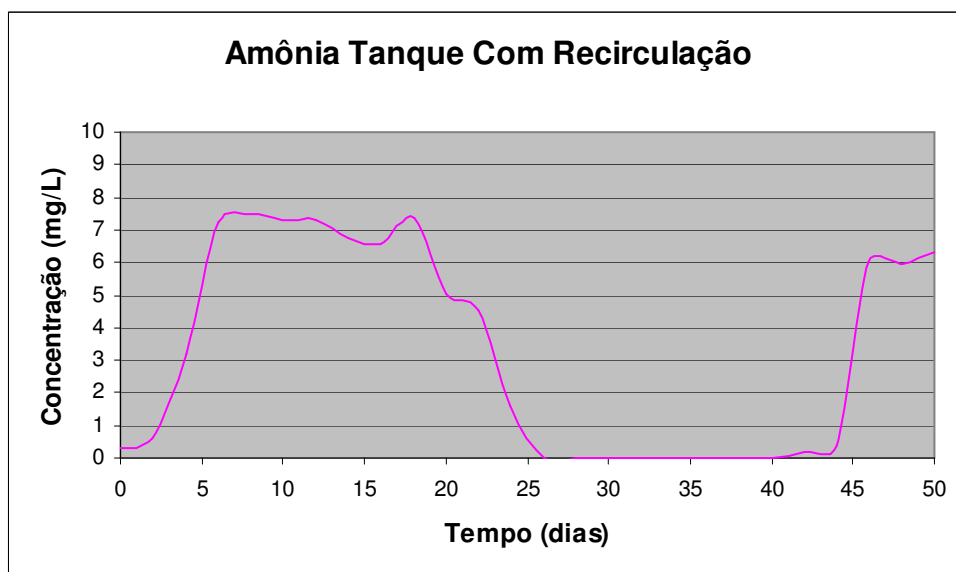


Figura 5.2: Variação ao longo do tempo da concentração do Nitrogênio Amoniacal Total no tanque de cultivo do sistema com recirculação.

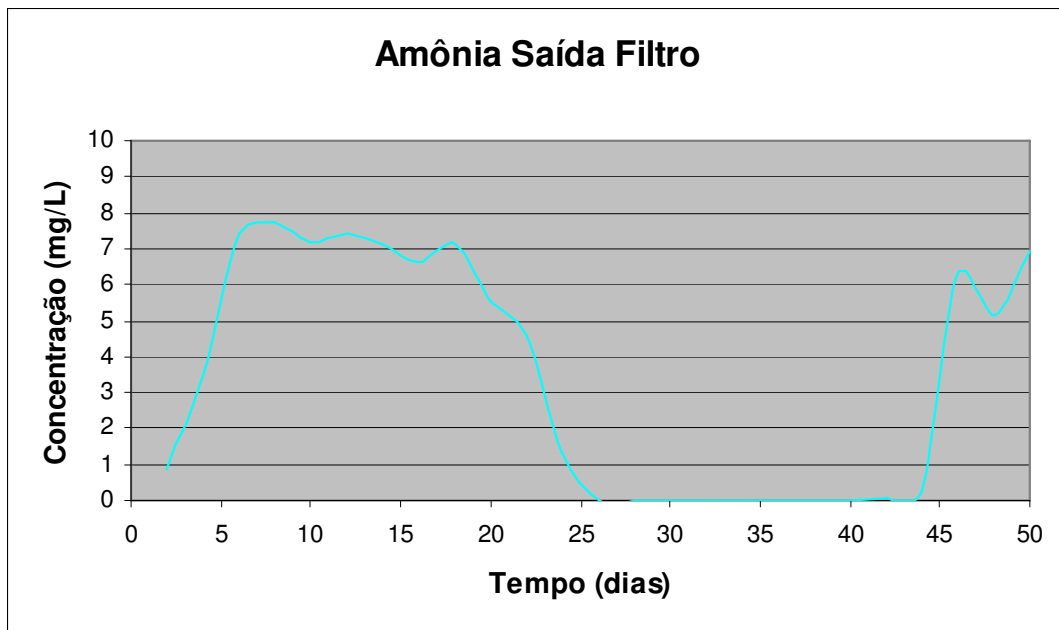


Figura 5.3: Variação ao longo do tempo da concentração do Nitrogênio Amoniacal Total na saída do filtro biológico do sistema com recirculação.

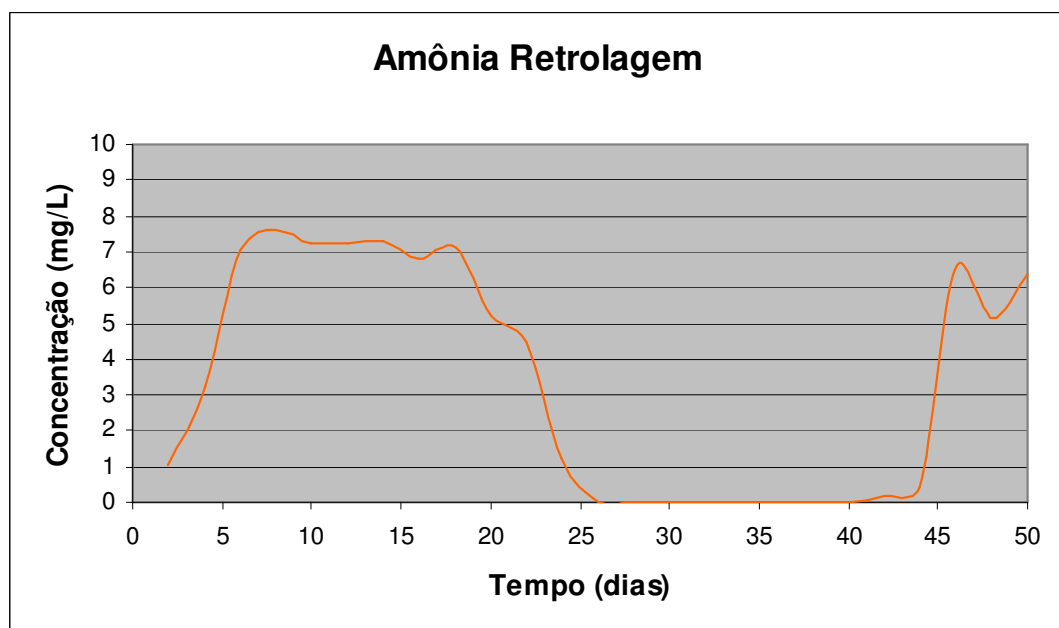


Figura 5.4: Variação ao longo do tempo da concentração do Nitrogênio Amoniacal Total do efluente da retrolavagem do filtro biológico do sistema com recirculação.

Na Análise de Variância (ANOVA) não foi encontrada diferença significativa ($p > 0,05$) na concentração de amônia dos dois tratamentos (tabela 5.1). É importante ressaltar, que no sistema sem recirculação, devido à toxicidade do nitrogênio amoniacal para os peixes, a baixa concentração desta substância no sistema sem recirculação foi mantida através de trocas de água diárias (de cerca de 300 litros). Já no sistema com recirculação, conforme será visto posteriormente, a nitrificação foi a principal responsável pela diminuição da concentração de amônia, sendo a reposição da água perdida na retrolavagem

(aproximadamente 12 litros) a única troca de água diária. No início do experimento, ambos os sistemas tiveram um período de aclimação, onde não houve nitrificação. Isso se deve ao fato de as bactérias nitrificantes serem bactérias de crescimento lento (HAGOPIAN & RILEY, 1998) e não ter sido utilizado nenhum tipo de inóculo. Na coleta 22 houve um aumento da amônia no sistema com recirculação. Este aumento está relacionado à relação entre o carbono e o nitrogênio, uma diminuição na proporção de bactérias oxidadoras de amônia do grupo beta e a predação por protozoários, como será discutido posteriormente.

Tabela 5.1: Concentração média e desvio padrão do Nitrogênio Amoniacoal Total nos pontos de coleta dos sistemas com e sem recirculação (n=25).

Ponto de Coleta	Média (\pm desvio padrão) em mg/L
Tanque Sem Recirculação	4,24 (\pm 2,41)
Tanque Com Recirculação	3,36 (\pm 3,21)
Saída do Filtro	3,37 (\pm 3,23)
Retrolavagem	3,41 (\pm 3,28)

As figuras 5.5 a 5.8 mostram os resultados do Nitrito nos quatro pontos de coleta dos dois sistemas de cultivo.

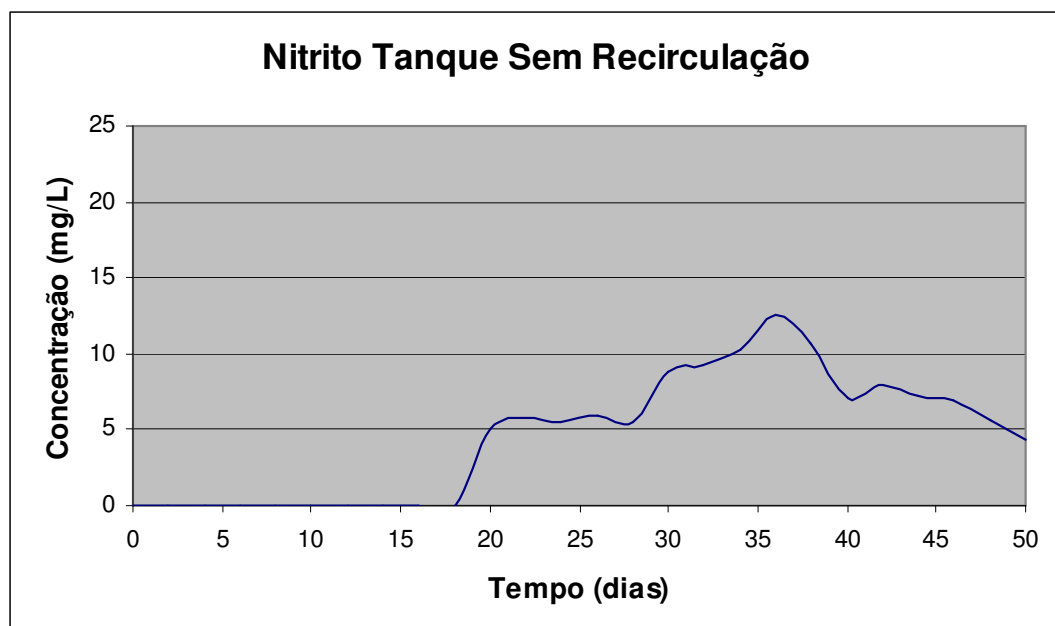


Figura 5.5: Variação ao longo do tempo da concentração do Nitrito no tanque de cultivo do sistema sem recirculação.

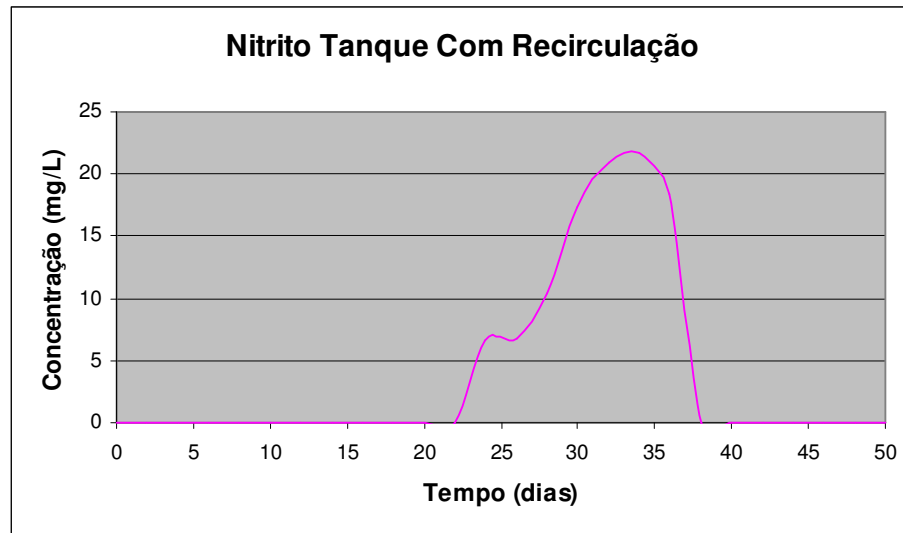


Figura 5.6: Variação ao longo do tempo da concentração do Nitrito no tanque de cultivo do sistema com recirculação.

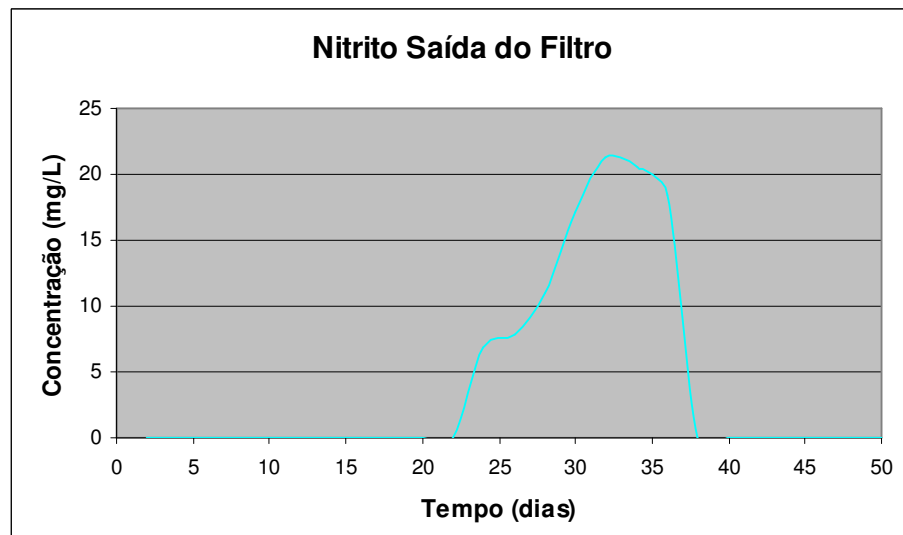


Figura 5.7: Variação ao longo do tempo da concentração do Nitrito na saída do filtro do sistema com recirculação.

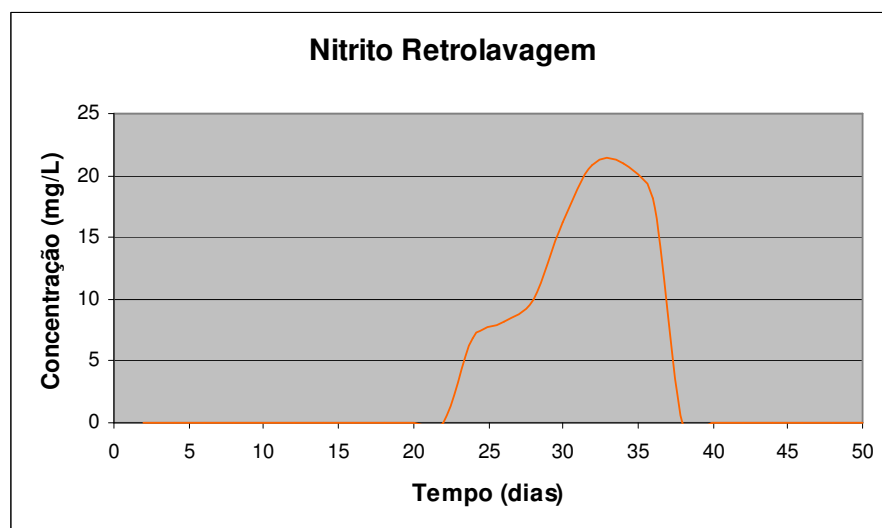


Figura 5.8: Variação ao longo do tempo da concentração do Nitrito do efluente da retrolavagem da saída do filtro biológico do sistema com recirculação.

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) na concentração de nitrito entre o sistema sem recirculação e o sistema com recirculação (tabela 5.2). Já entre os diferentes pontos do sistema com recirculação (tanque de cultivo, saída do filtro e efluente da retrolavagem) não houve diferença significativa ($p > 0,05$). No tanque de cultivo com trocas diárias de água a nitratação não foi suficiente para eliminar o nitrito produzido na nitratação. No início da nitrificação ocorreu uma elevação da concentração do nitrito nos pontos do sistema sem recirculação, devido à conversão da amônia em nitrito. Uma maior disponibilidade de substrato (amônia) favorece um desequilíbrio inicial entre as comunidades de bactérias oxidadoras de amônia e de nitrito, sendo que o primeiro grupo tende a crescer mais rápido no início (GROMMEN *et al.*, 2002), já que o nitrito torna-se disponível após a oxidação da amônia. Na coleta 19 do sistema com recirculação, o nitrito não foi mais detectado através de cromatografia iônica.

Tabela 5.2: Concentração média e desvio padrão do Nitrito nos pontos de coleta (n=25). As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey com 95% de confiança.

Ponto de Coleta	Média (\pm desvio padrão) em mg/L	
Tanque Sem Recirculação	4,73 (\pm 4,06)	a
Tanque Com Recirculação	4,09 (\pm 7,43)	b
Saída do Filtro	4,12 (\pm 7,39)	b
Retrolavagem	4,05 (\pm 7,28)	b

As concentrações de nitrato são apresentados nos gráfico das figura 5.9 a 5.12.

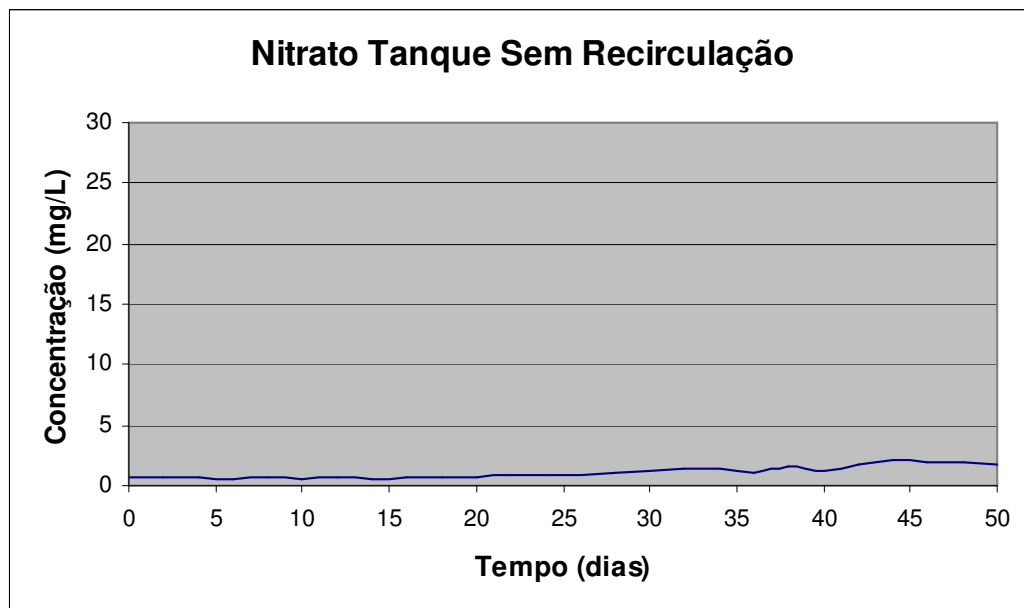


Figura 5.9: Variação ao longo do tempo da concentração do Nitrato no tanque de cultivo do sistema sem recirculação.

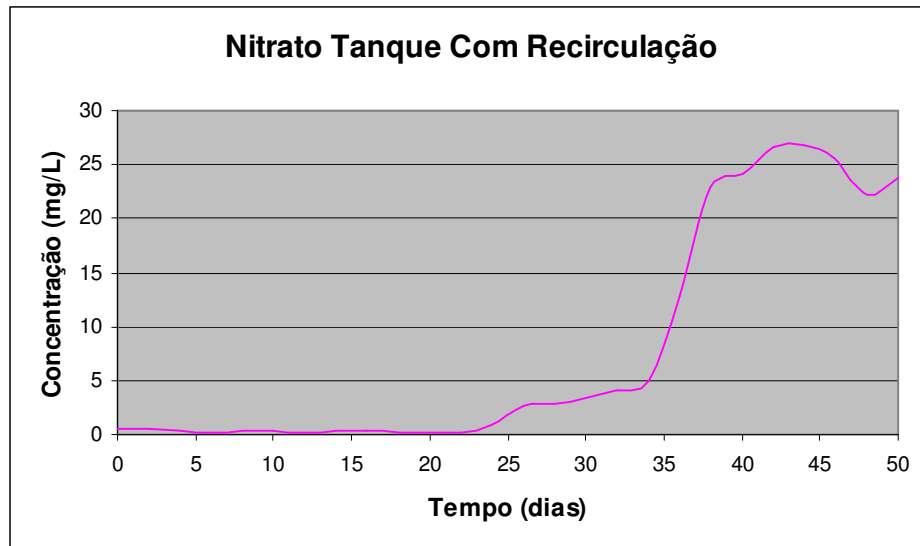


Figura 5.10: Variação ao longo do tempo da concentração do Nitrato no tanque de cultivo do sistema com recirculação.

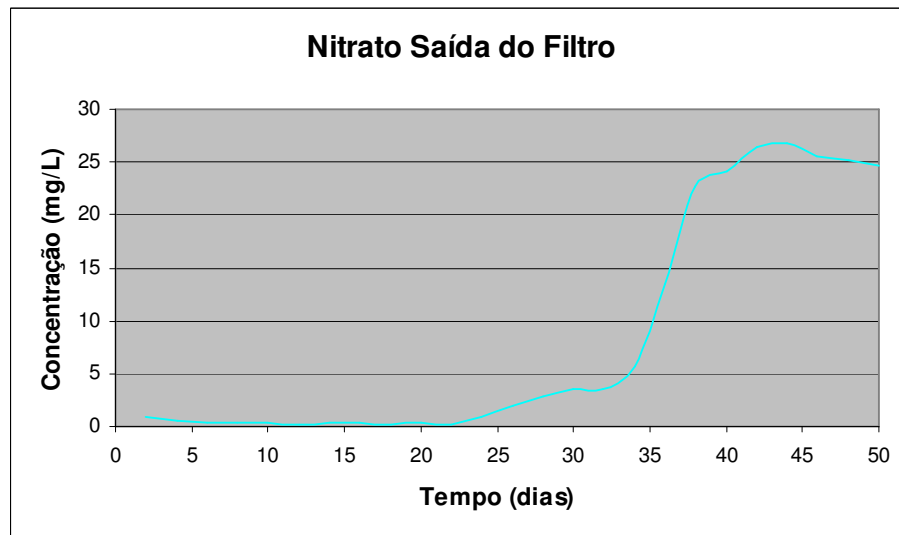


Figura 5.11: Variação ao longo do tempo da concentração do Nitrato na saída do filtro biológico do sistema com recirculação.

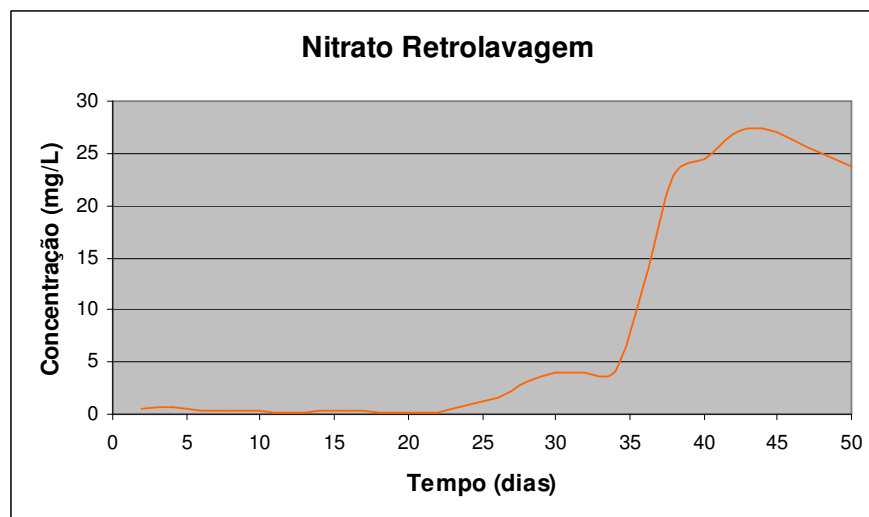


Figura 5.12: Variação ao longo do tempo da concentração do Nitrato do efluente da retrolavagem do filtro biológico do sistema com recirculação.

Como mesmo após as transformações os dados de nitrato não apresentaram homocedasticidade, a análise estatística foi feita através de um teste não-paramétrico, o teste *T* de Wilcoxon. A concentração média de nitrato do tanque de cultivo sem recirculação foi significativamente inferior ($p < 0,05$) a dos pontos de coleta do sistema com recirculação (tabela 5.3). Este fato pode ser explicado pela tendência a acúmulo de nitrato em RAS (SANDU *et al.*, 2002; SILAPAKUL *et al.*, 2005; MARTINS *et al.* 2009a; MARTINS *et al.* 2009b; D'ORBCASTEL, 2009) já que a amônia foi sendo transformada em nitrito e posteriormente em nitrato sem a totalidade deste ser convertida em nitrogênio molecular. Mesmo após o ressurgimento da amônia no dia 44, a concentração de nitrato se manteve elevada no sistema com recirculação.

Tabela 5.3: Concentração média e desvio padrão do Nitrato nos pontos de coleta (n=25). As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste T de Wilcoxon com 95% de confiança.

Ponto de Coleta	Média (\pm desvio padrão) em mg/L	
Tanque Sem Recirculação	1,09 (\pm 0,49)	a
Tanque Com Recirculação	8,29 (\pm 10,73)	b
Saída do Filtro	8,47 (\pm 10,96)	b
Retrolavagem	8,42 (\pm 11,01)	b

As figuras 5.13 e 5.14 ilustram a sucessão das formas de nitrogênio inorgânico nos tanques de cultivo dos sistemas com e sem recirculação.

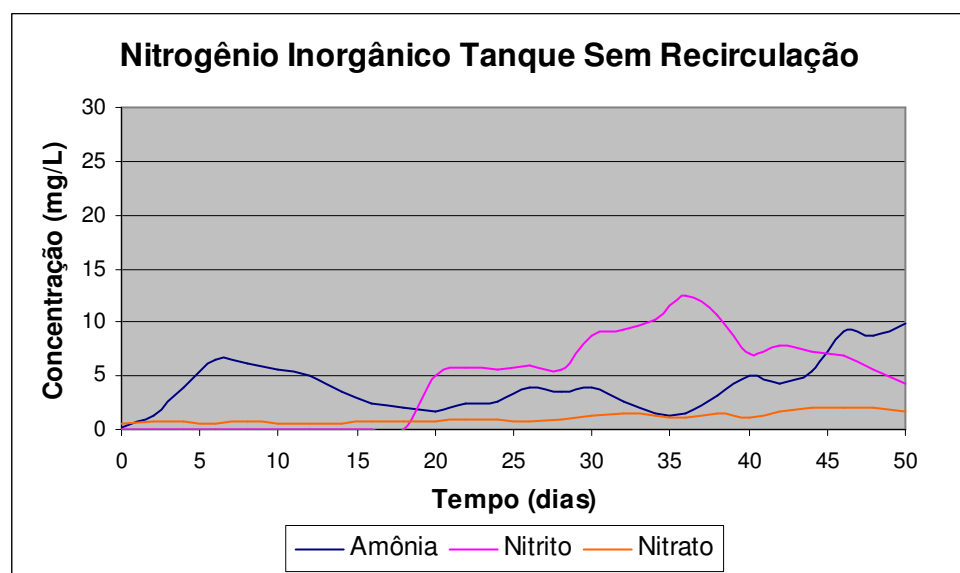


Figura 5.13: Variação ao longo do tempo do Nitrogênio Inorgânico (Nitrogênio Amoniacal Total, Nitrito e Nitrato) no tanque de cultivo do sistema sem recirculação.

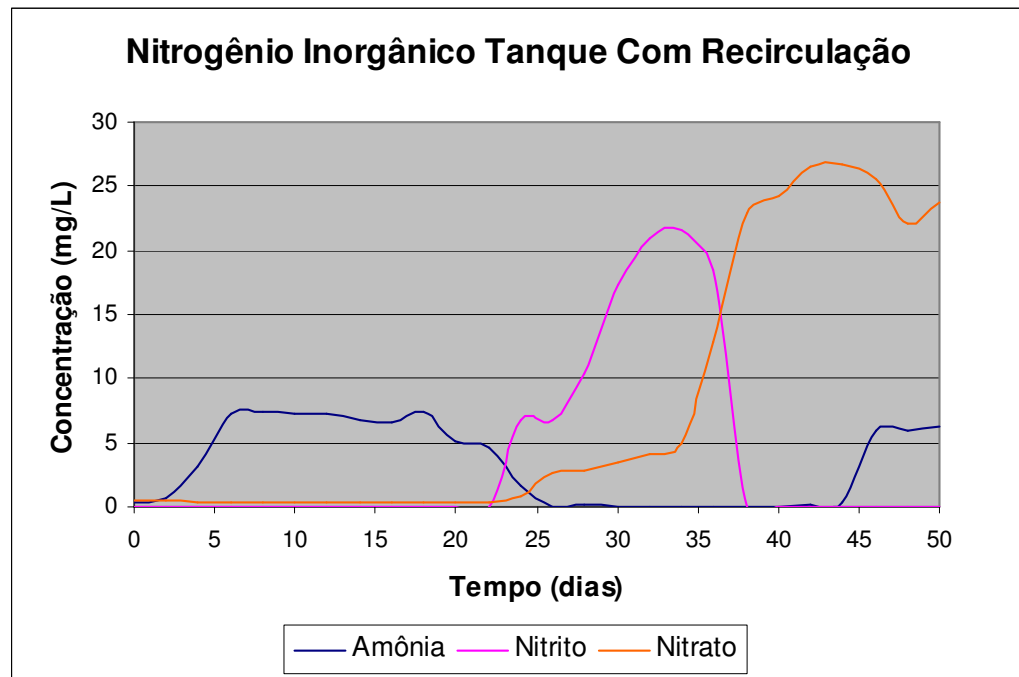


Figura 5.14: Variação ao longo do tempo do Nitrogênio Inorgânico (Nitrogênio Amoniacal Total, Nitrito e Nitrato) no tanque de cultivo do sistema com recirculação.

No gráfico da figura 5.14 é possível observar que a diminuição da concentração da forma mais reduzida (primeiramente amônia e depois nitrito) corresponde a um aumento da forma mais oxidada (de início nitrito e após o nitrato), indicando a ocorrência de uma oxidação biológica da amônia a nitrato. Por ser o produto final da nitrificação e haver pouca troca de água em um sistema com recirculação, o nitrato tende a se acumular no tanque. Uma possível causa para o ressurgimento do nitrogênio amoniacal no dia 44 seria a ocorrência de uma mudança na comunidade bacteriana, como a gradual substituição das bactérias oxidadoras de amônia por aquelas que realizam a oxidação do nitrito.

Para remover o nitrato que se acumula nesse tipo de sistema, podem ser utilizados um filtro de desnitrificação ou também aquaponia, que é a aquacultura associada a hidroponia, onde as plantas removem o excesso de nutrientes (LENNARD & LEONARD, 2006) Já no tanque sem recirculação, esta sucessão das formas de nitrogênio não é tão evidente e as concentrações dos compostos nitrogenados são mantidas em patamares propícios para o cultivo de peixes através de trocas frequentes de águas.

As figuras 5.15 a 5.18 apresentam os gráficos do teste de correlação entre a concentração de nitrogênio amoniacal total e a soma das concentrações de nitrito e nitrato.

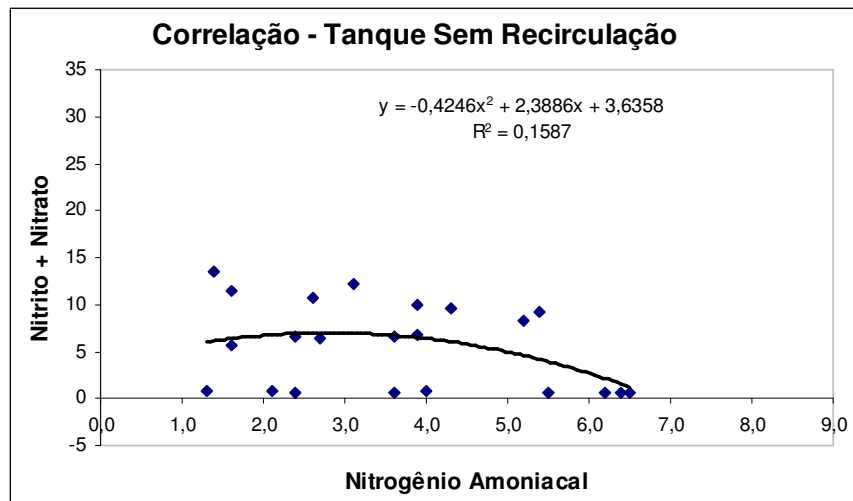


Figura 5.15: Correlação Polinomial de Pearson entre a concentração de nitrogênio amoniacal e a soma das concentrações de nitrito e nitrato referente ao período experimental de 23/10/2008 a 06/12/2008 do tanque de cultivo do sistema sem recirculação.

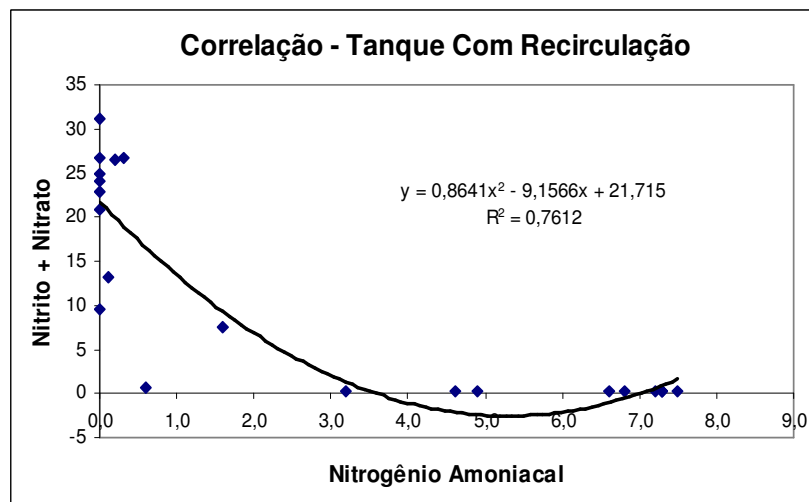


Figura 5.16: Correlação Polinomial de Pearson entre a concentração de nitrogênio amoniacal e a soma das concentrações de nitrito e nitrato referente ao período experimental de 23/10/2008 a 06/12/2008 do tanque de cultivo do sistema com recirculação.

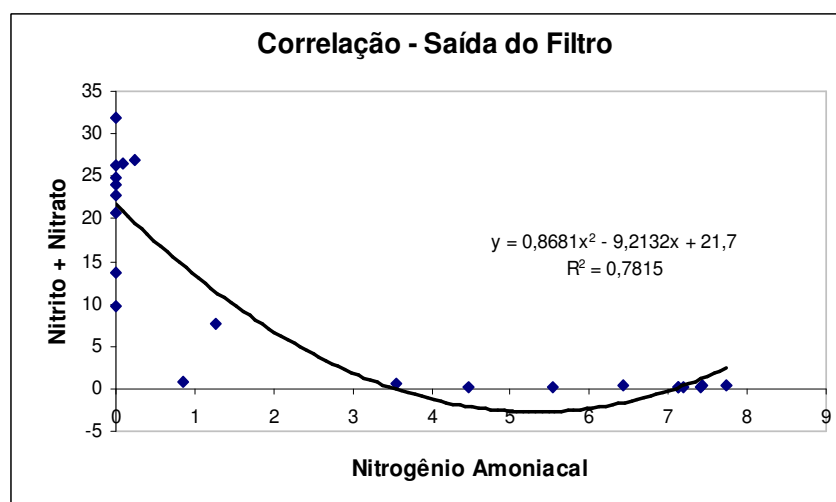


Figura 5.17: Correlação Polinomial de Pearson entre a concentração de nitrogênio amoniacal e a soma das concentrações de nitrito e nitrato referente ao período experimental de 23/10/2008 a 06/12/2008 da saída do filtro biológico do sistema com recirculação.

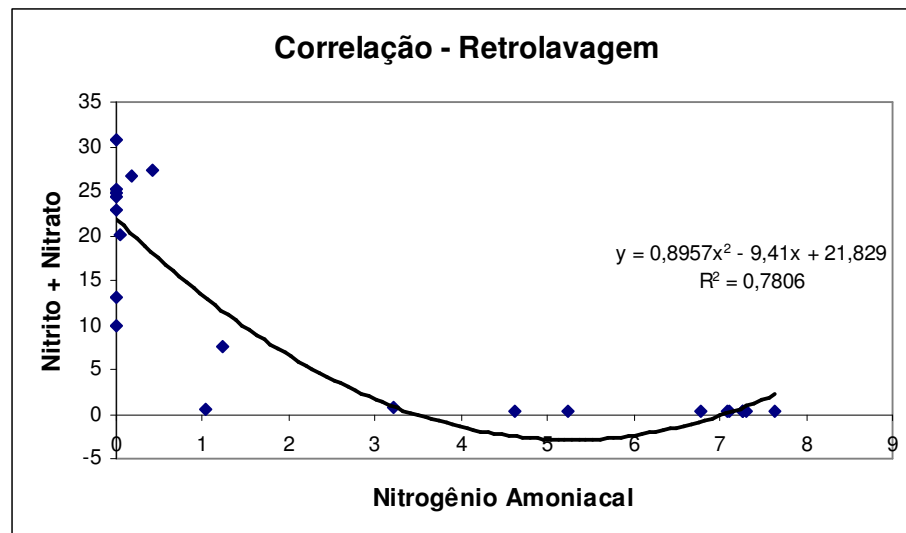


Figura 5.18: Correlação Polinomial de Pearson entre a concentração de nitrogênio amoniacal e a soma das concentrações de nitrito e nitrato referente ao período experimental de 23/10/2008 a 06/12/2008 do efluente da retrolavagem do sistema com recirculação.

Os pontos de coleta do sistema com recirculação tiveram uma correlação significativa entre o aumento da soma das concentrações de nitrito e nitrato e a diminuição da concentração de nitrogênio amoniacal. Desta forma, fica indicado que entre 76% e 78% da variação na concentração do nitrogênio amoniacal deve-se à nitrificação, pois este é o coeficiente de determinação (r^2) entre a variabilidade na concentração da matéria-prima da nitrificação (nitrogênio amoniacal) e a variabilidade na concentração dos produtos da nitrificação (nitrito e nitrato). Já no sistema sem recirculação não houve correlação significativa, sendo que a nitrificação não foi o principal fator de controle da amônia neste tanque de cultivo.

5.1.2 Carbono Orgânico Total

Os gráficos das figuras 5.19 a 5.22 mostram as variações nas concentrações de carbono orgânico total ao longo do experimento.

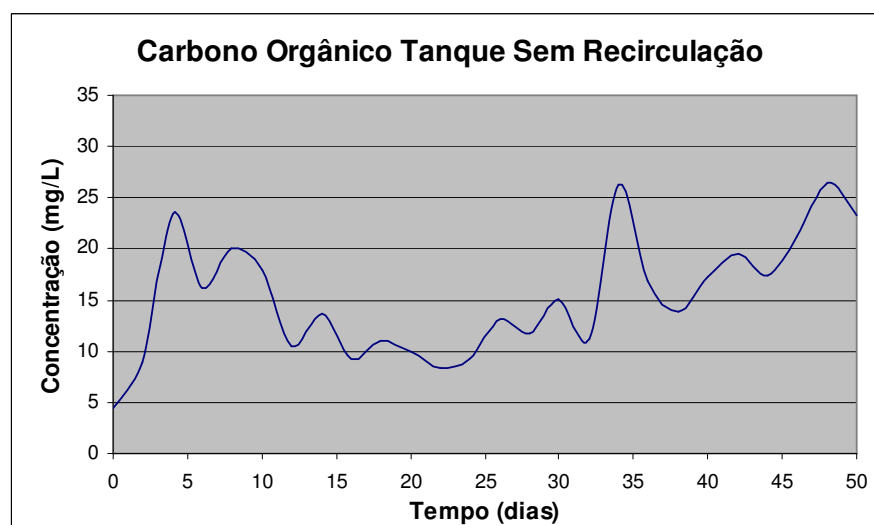


Figura 5.19: Variação ao longo do tempo do Carbono Orgânico Total no tanque de cultivo do sistema sem recirculação.

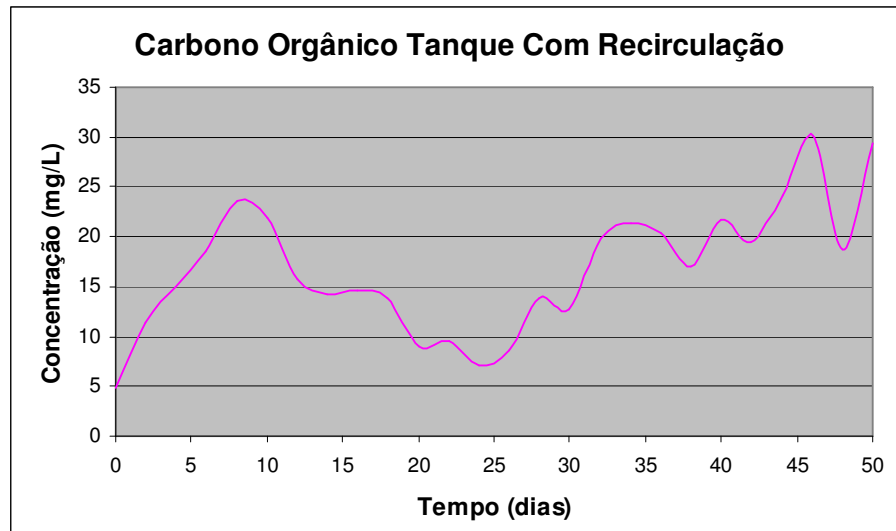


Figura 5.20: Variação ao longo do tempo do Carbono Orgânico Total no tanque de cultivo do sistema com recirculação.

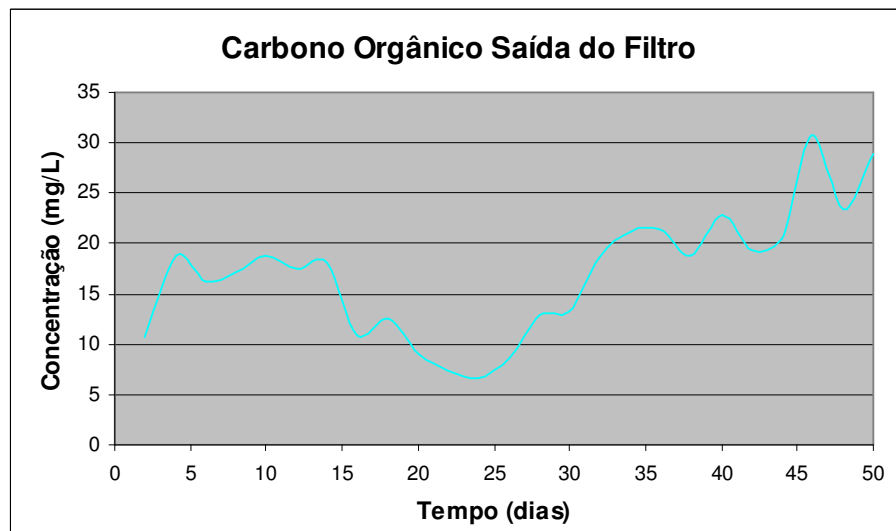


Figura 5.21: Variação ao longo do tempo do Carbono Orgânico Total na saída do filtro biológico do sistema com recirculação.

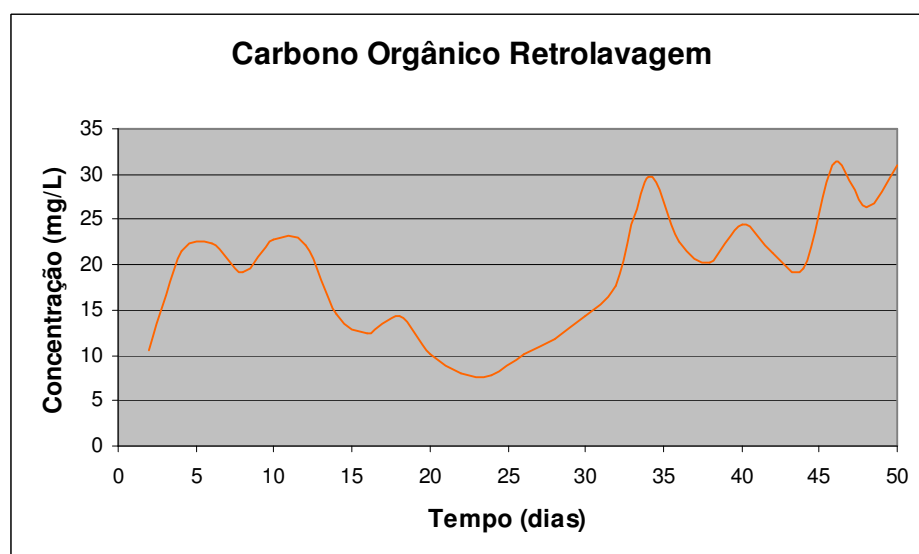


Figura 5.22: Variação ao longo do tempo do Carbono Orgânico Total do efluente da retrolavagem do sistema com recirculação.

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias das concentrações de carbono orgânico total (COT) do tanque sem recirculação e do efluente da retrolavagem (tabela 5.4). Nos três pontos do sistema com recirculação observou-se primeiro uma queda na concentração do COT. Posteriormente este tendeu a um aumento de concentração. No sistema sem recirculação esta tendência ocorreu de forma mais suave e as oscilações foram maiores.

O aumento na concentração de carbono orgânico total na fase final do experimento do sistema com recirculação está relacionado com o aumento na proporção de filamentosas, pois o aumento da relação carbono/nitrogênio favorece o surgimento deste grupo de bactérias (ABREU, 2004). É provável que no biofilme das paredes do tanque de cultivo do sistema sem recirculação também tenha ocorrido um aumento das filamentosas.

Como as bactérias heterotróficas crescem mais rápido que as bactérias nitrificantes, um aumento na relação carbono/nitrogênio tende a desfavorecer os microorganismos oxidadores de amônia e nitrito na competição por espaço e recursos dentro de um filtro biológico (MICHAUD *et al.*, 2006; TIMMONS *et al.*; 2002)

Tabela 5.4: Concentração média e desvio padrão do Carbono Orgânico Total nos pontos de coleta (n=25). As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey com 95% de confiança.

Ponto de Coleta	Média (\pmdesvio padrão) em mg/L	
Tanque Sem Recirculação	15,67 (\pm 5,57)	a
Tanque Com Recirculação	17,26 (\pm 6,08)	ab
Saída do Filtro	16,98 (\pm 6,24)	ab
Retrolavagem	18,67 (\pm 7,04)	b

5.1.3 Oxigênio Dissolvido e Temperatura

Nas figuras 5.23 a 5.26 são apresentadas as concentrações de Oxigênio Dissolvido nos tanques com e sem recirculação, na saída do filtro biológico e na retrolavagem.



Figura 5.23: Variação ao longo do tempo do Oxigênio Dissolvido no tanque de cultivo do sistema sem recirculação.

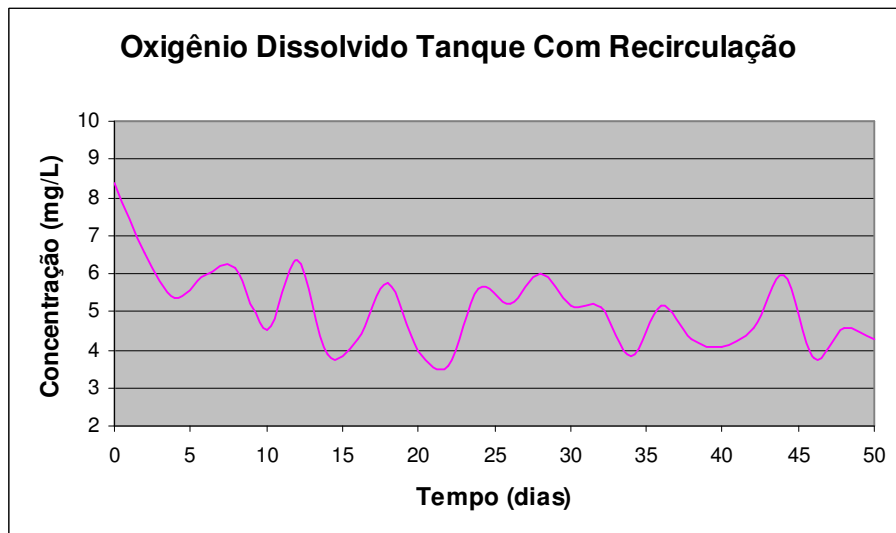


Figura 5.24: Variação ao longo do tempo do Oxigênio Dissolvido no tanque de cultivo do sistema com recirculação.

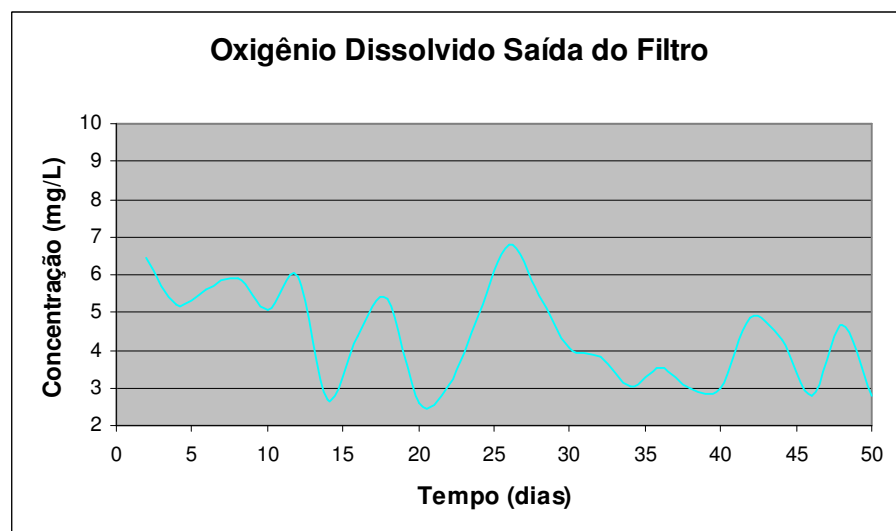


Figura 5.25: Variação ao longo do tempo do Oxigênio Dissolvido na saída do filtro biológico do sistema com recirculação.

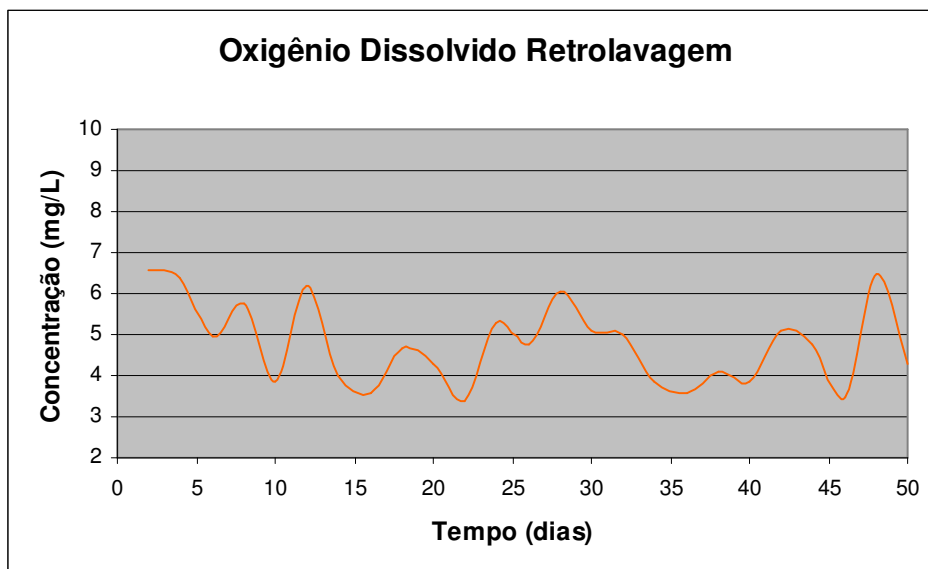


Figura 5.26: Variação ao longo do tempo do Oxigênio Dissolvido do efluente da retrolavagem do sistema com recirculação.

A concentração de oxigênio dissolvido foi significativamente menor ($p < 0,05$) nos pontos do sistema com recirculação (tabela 5.5). Isto não significa necessariamente que o sistema de aeração do tipo Venturi não tenha sido eficiente. Um maior consumo de oxigênio é esperado para o sistema com recirculação, que tende a apresentar uma maior biomassa bacteriana. Como a maior parte das bactérias oxidadoras de amônia e de nitrito (AOB e NOB) são aeróbias obrigatórias (KOWALCHUCK & STEPHEN, 2001; NI *et al.*, 2008), assim como outras bactérias heterotróficas, o consumo de oxigênio do filtro biológico provavelmente contribui com a diminuição deste no sistema com recirculação.

Porém, o sistema com recirculação conseguiu manter a concentração de oxigênio mais estável em relação ao sistema com troca de água. O sistema de recirculação teve uma queda na concentração do oxigênio na coleta do dia 40 de experimento até 2,38 mg/L. Este valor seria letal para espécies mais sensíveis a baixas concentrações de oxigênio, como a truta (ARANA, 2004).

Tabela 5.5: Concentração média e desvio padrão do Oxigênio Dissolvido nos pontos de coleta (n=25). As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey com 95% de confiança.

Ponto de Coleta	Média (\pm desvio padrão) em mg/L	
Tanque Sem Recirculação	6,08 (\pm 1,53)	A
Tanque Com Recirculação	4,96 (\pm 0,91)	b
Saída do Filtro	4,38 (\pm 1,30)	b
Retrolavagem	4,77 (\pm 1,01)	b

As figuras 5.27 e 5.28 apresentam os dados de temperatura dos dois tanques de cultivo.

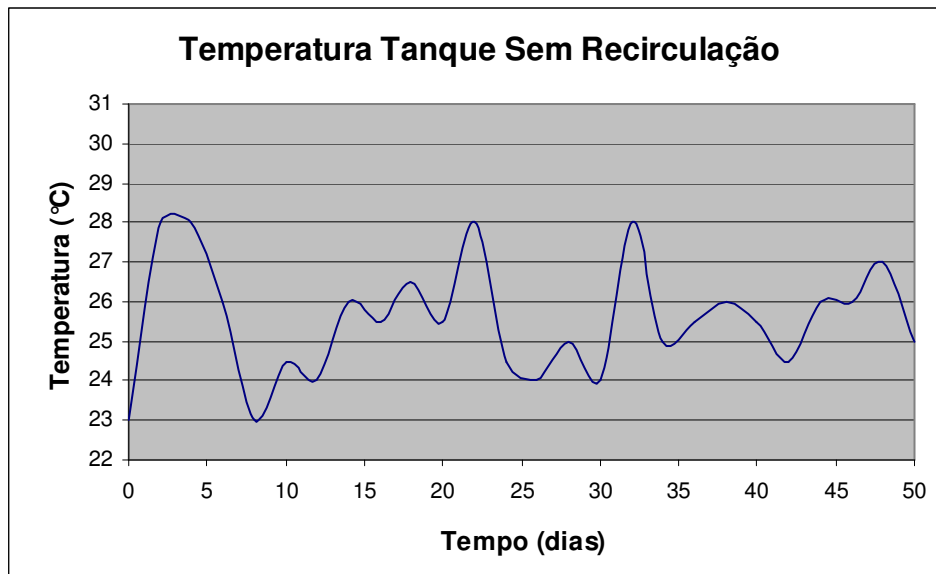


Figura 5.27: Variação ao longo do tempo da Temperatura no tanque de cultivo do sistema sem recirculação.

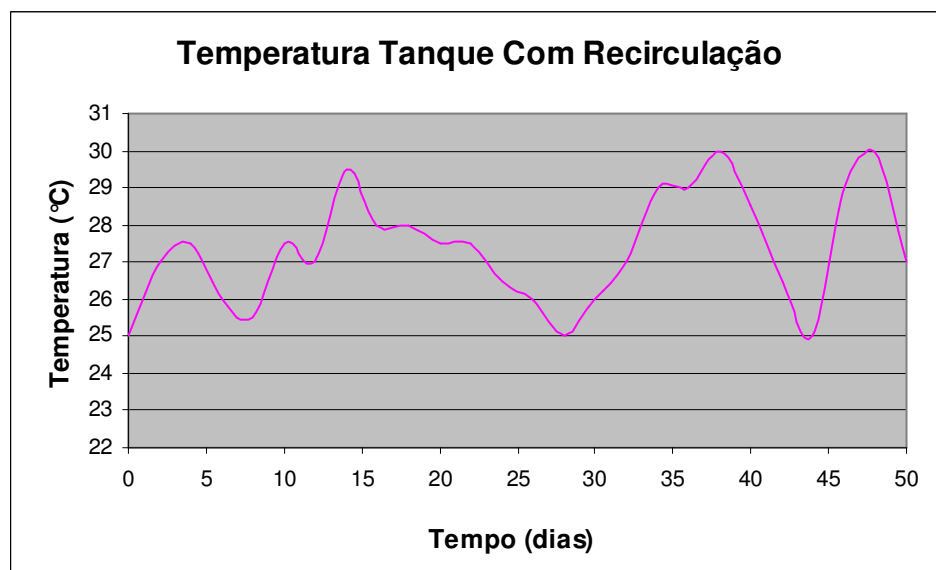


Figura 5.28: Variação ao longo do tempo da Temperatura no tanque de cultivo do sistema com recirculação.

A temperatura foi significativamente mais alta ($p < 0,05$) no sistema com recirculação (tabela 5.6). O sistema com recirculação tendeu a conservar o calor da água. O sistema apresenta menos trocas de água, o que proporciona uma maior estabilidade térmica. Esta diferença de temperatura entre os dois sistemas se deve a água de reposição. Após a sifonagem era possível observar uma diminuição da temperatura da água do tanque, especialmente em dias mais frios

Tabela 5.6: Concentração média e desvio padrão da Temperatura nos pontos de coleta (n=25). As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey com 95% de confiança.

Ponto de Coleta	Média (\pm desvio padrão) em °C	
Tanque Sem Recirculação	25,64 (\pm 1,38)	a
Tanque Com Recirculação	27,42 (\pm 1,46)	b

5.1.4 Alcalinidade e pH

As figuras 5.29 a 5.32 apresentam os resultados do pH dos quatro pontos de coleta dos dois sistemas de cultivo

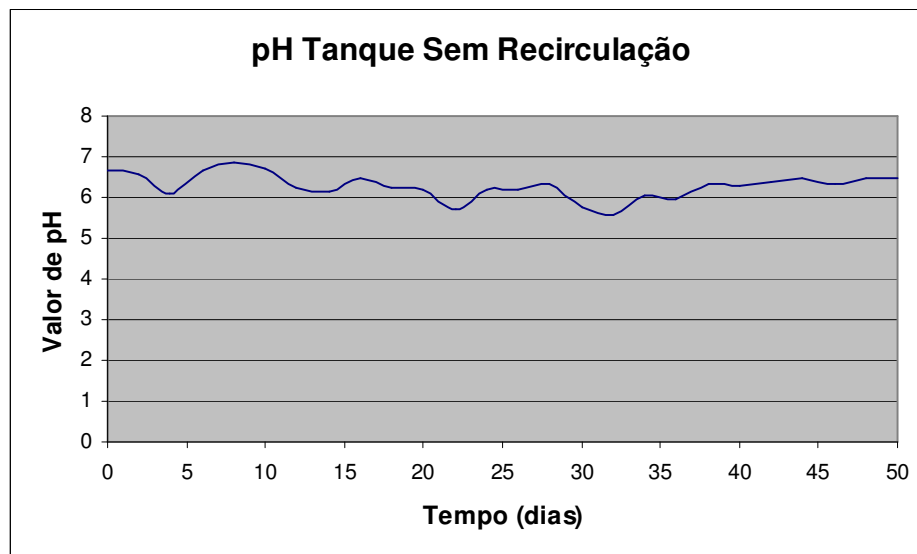


Figura 5.29: Variação ao longo do tempo do pH no tanque de cultivo do sistema sem recirculação.

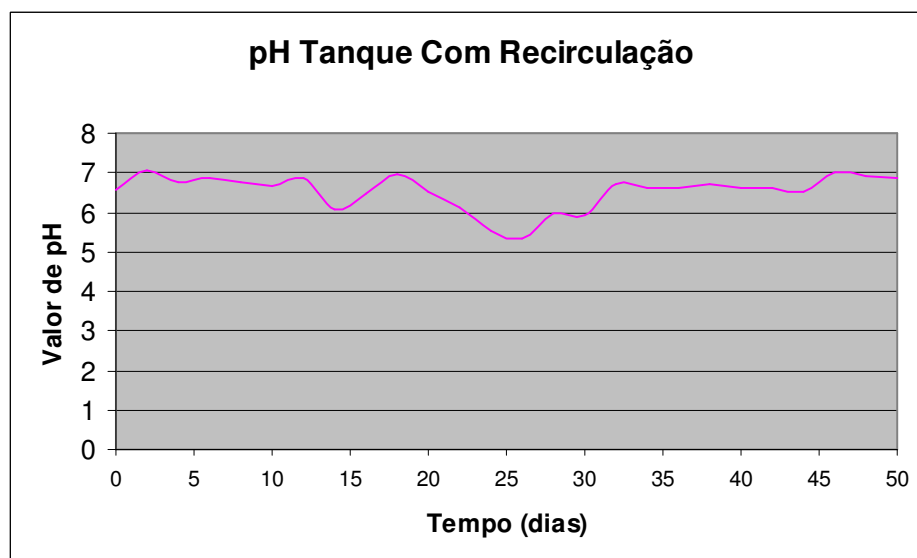


Figura 5.30: Variação ao longo do tempo do pH no tanque de cultivo do sistema com recirculação.

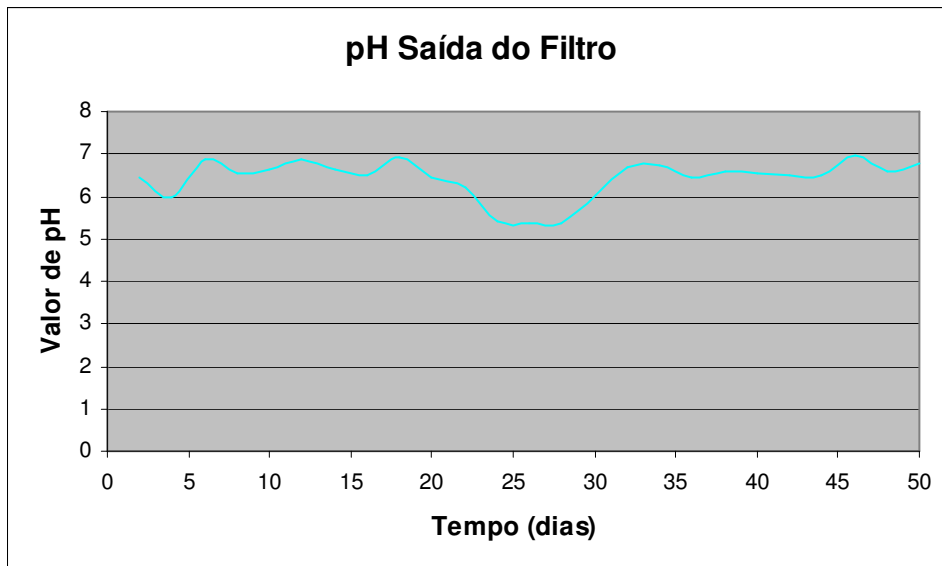


Figura 5.31: Variação ao longo do tempo do pH na saída do filtro biológico do sistema com recirculação.

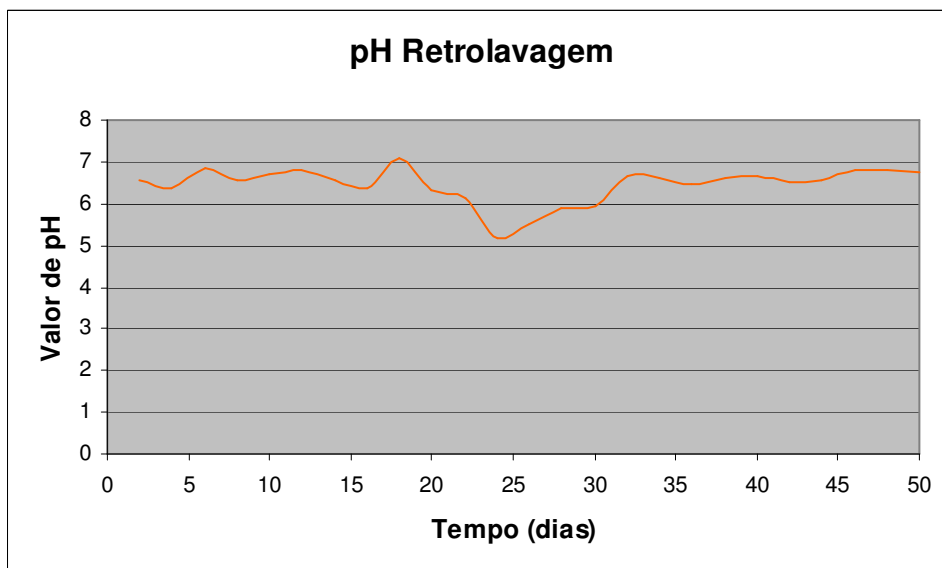


Figura 5.32: Variação ao longo do tempo do pH do efluente da retrolavagem do sistema com recirculação.

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os dois tanques de cultivo (tabela 5.7). O pH apresentou uma variação pequena durante o período experimental. Houve uma queda do pH no início da nitrificação (entre os dias 20 e 25).

Tabela 5.7: Concentração média e desvio padrão do pH nos pontos de coleta ($n=25$). As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey com 95% de confiança.

Ponto de Coleta	Média (\pm desvio padrão)	
Tanque Com Recirculação	6,52 (\pm 0,45)	a
Saída do Filtro	6,42 (\pm 0,46)	ab
Retrolavagem	6,44 (\pm 0,44)	ab
Tanque Sem Recirculação	6,26 (\pm 0,31)	b

A seguir, apresentam-se os gráficos de alcalinidade medida durante o período experimental (figuras 5.33 a 5.36).

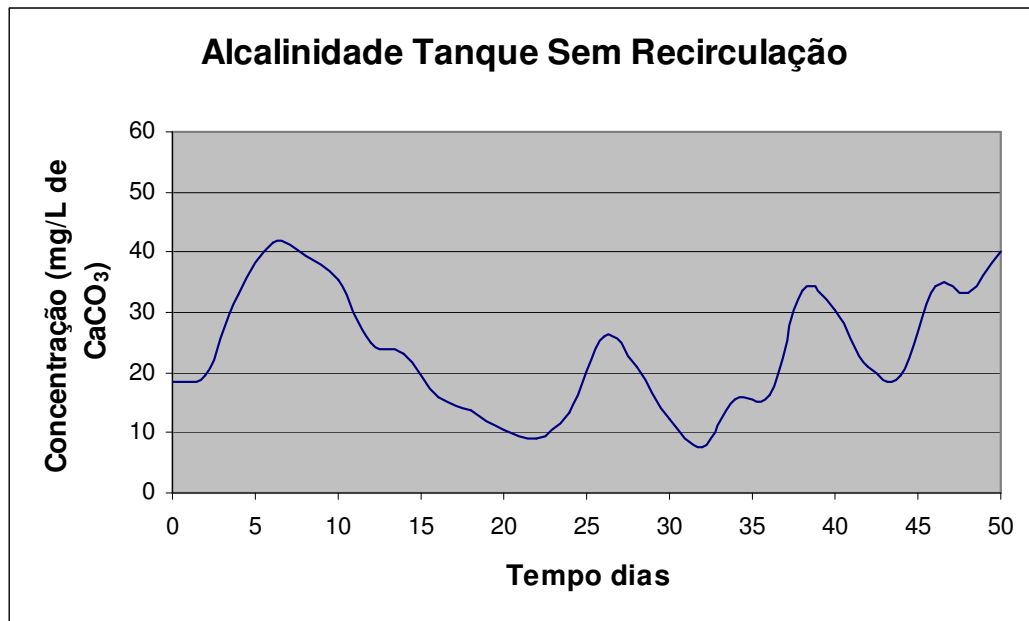


Figura 5.33: Variação ao longo do tempo da Alcalinidade no tanque de cultivo do sistema sem recirculação.

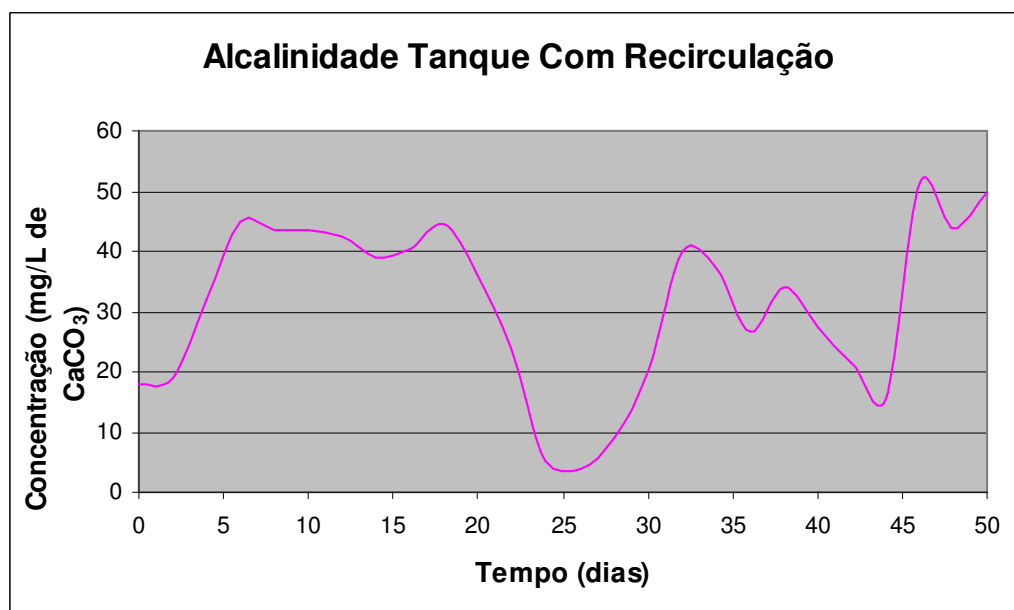


Figura 5.34: Variação ao longo do tempo da Alcalinidade no tanque de cultivo do sistema com recirculação.

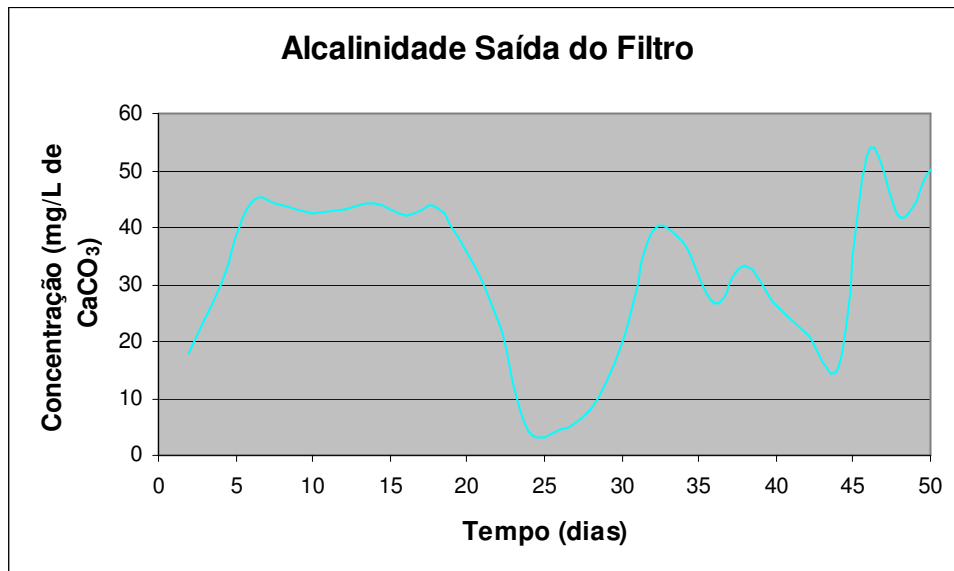


Figura 5.35: Variação ao longo do tempo da Alcalinidade na saída do filtro biológico do sistema sem recirculação.

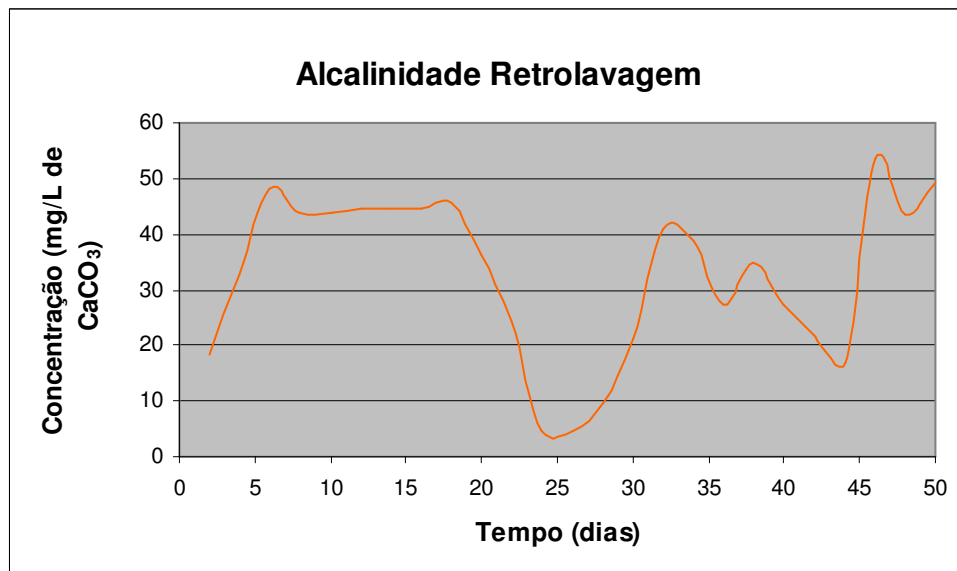


Figura 5.36: Variação ao longo do tempo da Alcalinidade do efluente da retrolavagem do sistema sem recirculação.

Houve uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre os pontos do sistema com recirculação e o tanque de cultivo sem recirculação (tabela 5.8). Assim como nos dados de pH, é possível observar uma diminuição na alcalinidade no início da nitrificação. Durante a nitrificação, a alcalinidade diminui aproximadamente 7mg/L de CaCO₃ para cada miligrama de amônia oxidada a nitrato (VAN RIJN *et al.*, 2006). Como efeito da nitrificação pronunciada, o sistema com recirculação demandou suplementação de alcalinidade, fornecida através da aplicação de CaCO₃. Esta suplementação de alcalinidade pode ter contribuído para as diferenças observadas entre os dois sistemas de cultivo para este parâmetro.

Tabela 5.8: Concentração média e desvio padrão da Alcalinidade nos pontos de coleta (n=25). As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey com 95% de confiança.

Ponto de Coleta	Média (\pm desvio padrão) em mg/L de CaCO ₃	
Tanque Sem Recirculação	23,61 (\pm 10,46)	a
Tanque Com Recirculação	31,78 (\pm 13,85)	b
Saída do Filtro	31,69 (\pm 14,19)	b
Retrolavagem	32,87 (\pm 14,36)	b

5.1.5 Sólidos Totais, Suspensos e Dissolvidos

As concentrações de sólidos totais, sólidos suspensos totais e sólidos dissolvidos totais são apresentados, respectivamente, nas figuras 5.37 a 5.40, 5.41 a 5.44 e 5.45 a 5.48.

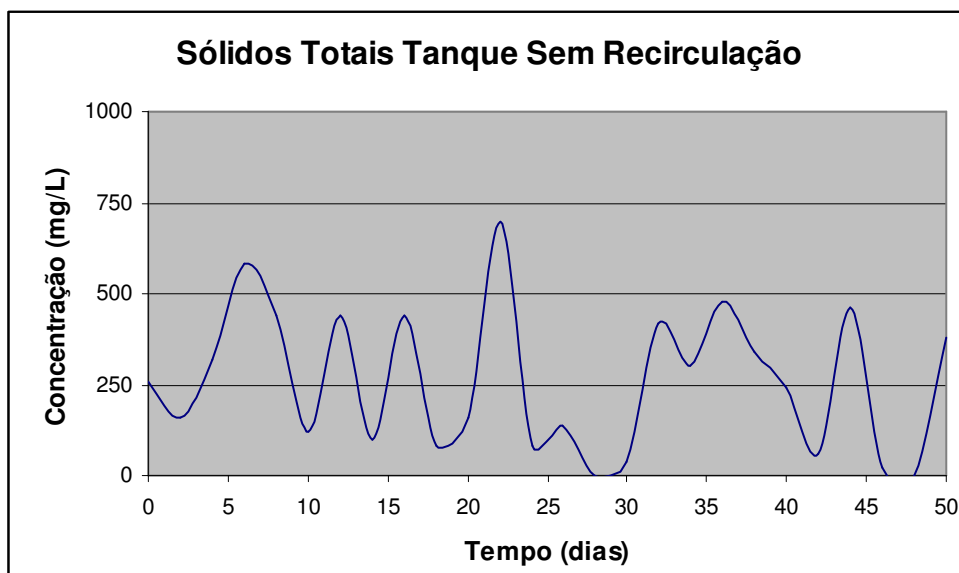


Figura 5.37: Variação ao longo do tempo de Sólidos Totais no tanque de cultivo do sistema sem recirculação.

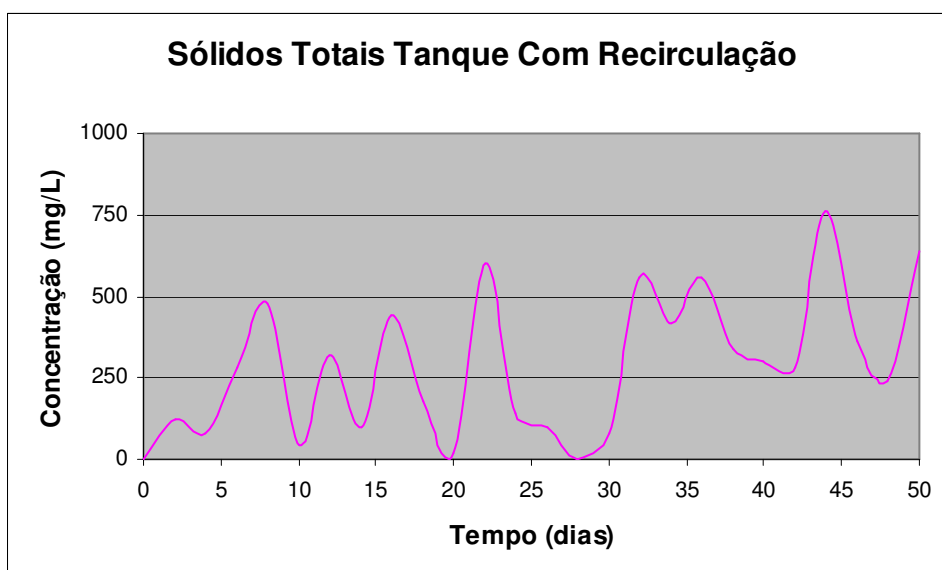


Figura 5.38: Variação ao longo do tempo de Sólidos Totais no tanque de cultivo do sistema com recirculação.

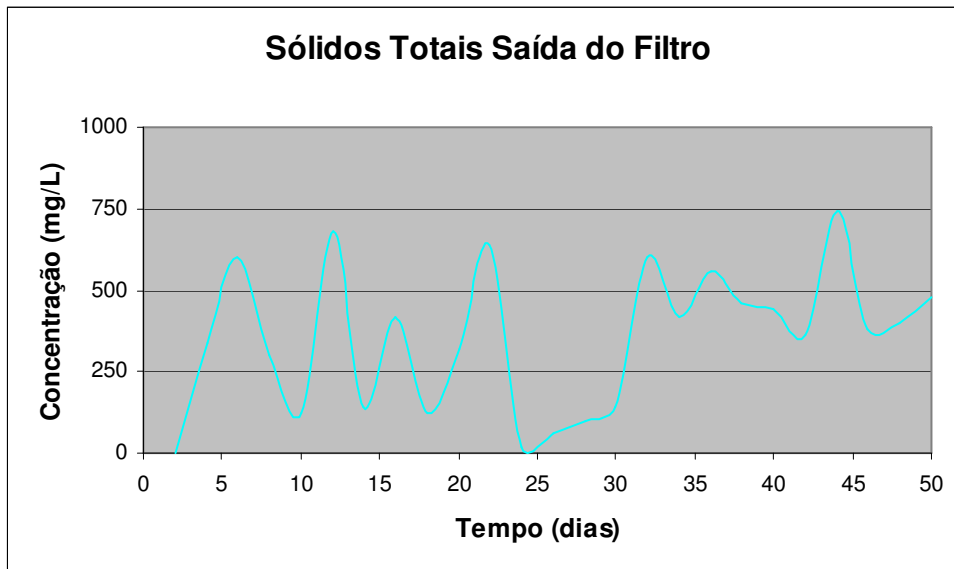


Figura 5.39: Variação ao longo do tempo de Sólidos Totais na saída do filtro biológico do sistema com recirculação.

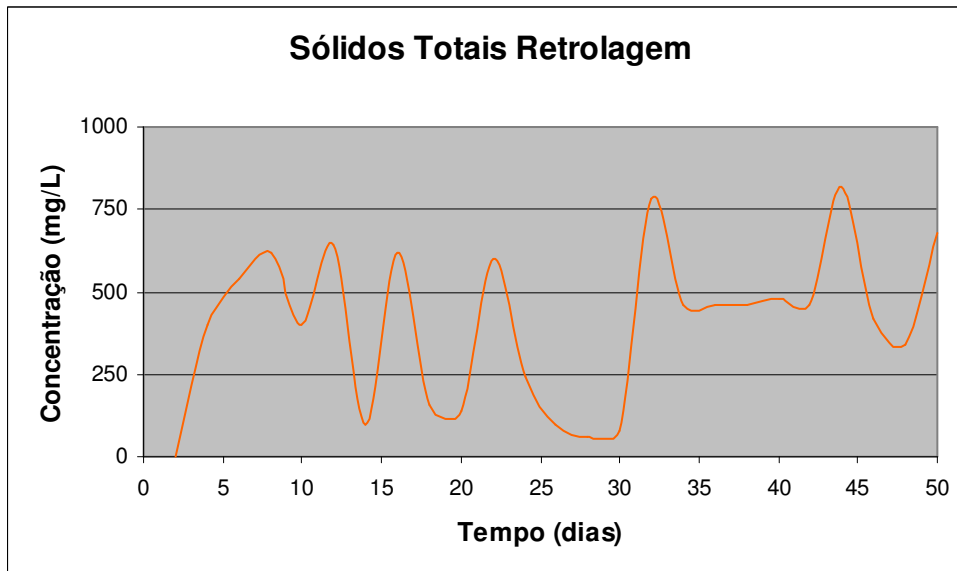


Figura 5.40: Variação ao longo do tempo de Sólidos Totais do efluente da retrolavagem do sistema com recirculação.

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias dos pontos de coleta (tabela 5.9). A concentração de sólidos totais foi menor no tanque de cultivo do sistema com recirculação do que no efluente da retrolavagem, mostrando que este processo ajudou a remover os sólidos totais do sistema. Não houve diferença significativa neste parâmetro de qualidade de água entre os tanques de cultivo. Os valores de sólidos totais oscilaram bastante durante todo o experimento.

Tabela 5.9: Concentração média e desvio padrão de Sólidos Totais nos pontos de coleta (n=25). As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey com 95% de confiança.

Ponto de Coleta	Média (\pm desvio padrão) em mg/L	
Tanque Sem Recirculação	260 (\pm 200)	a
Tanque Com Recirculação	298 (\pm 215)	ab
Saída do Filtro	354 (\pm 218)	bc
Retrolavagem	402 (\pm 237)	c

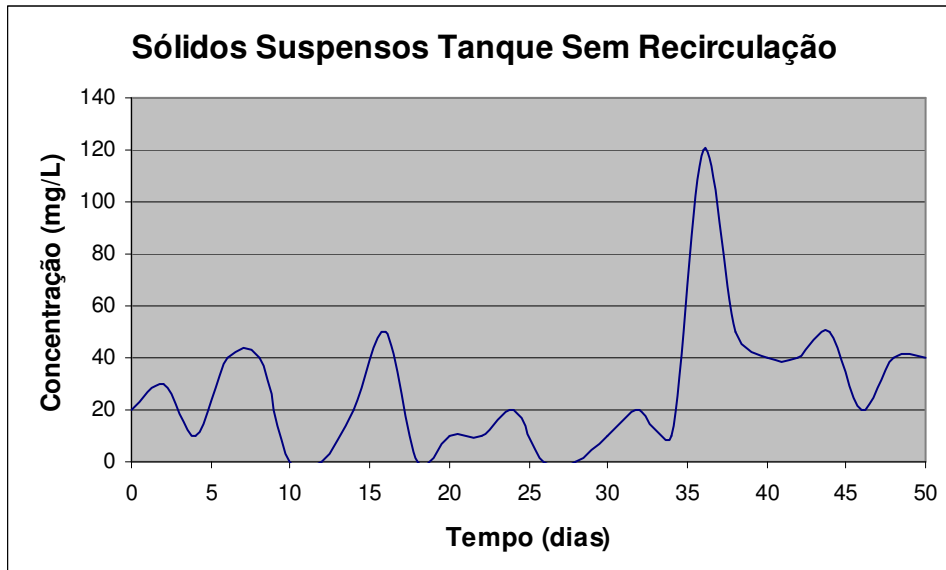


Figura 5.41: Variação ao longo do tempo de Sólidos Suspensos no tanque de cultivo do sistema sem recirculação.

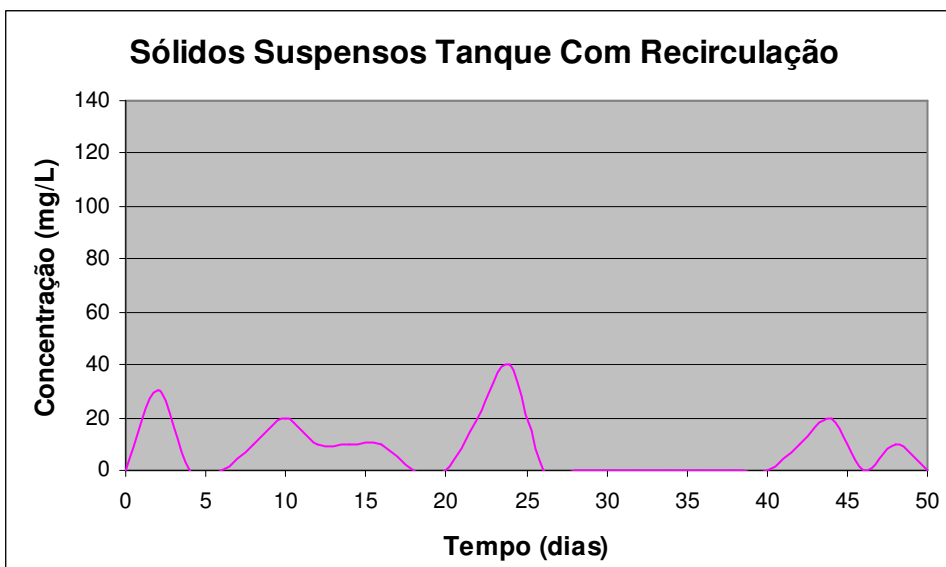


Figura 5.42: Variação ao longo do tempo de Sólidos Suspensos no tanque de cultivo do sistema com recirculação.

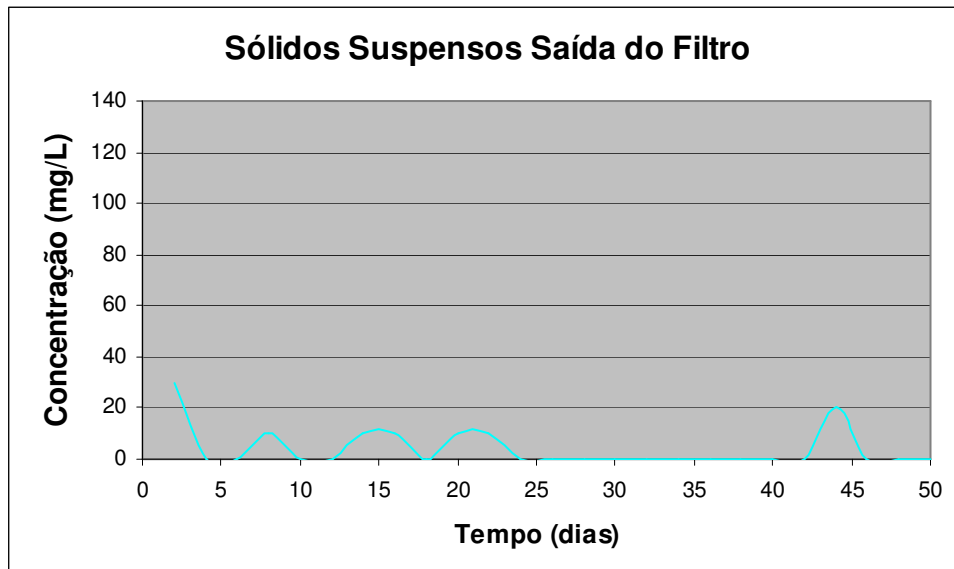


Figura 5.43: Variação ao longo do tempo de Sólidos Suspensos na saída do filtro biológico do sistema com recirculação.

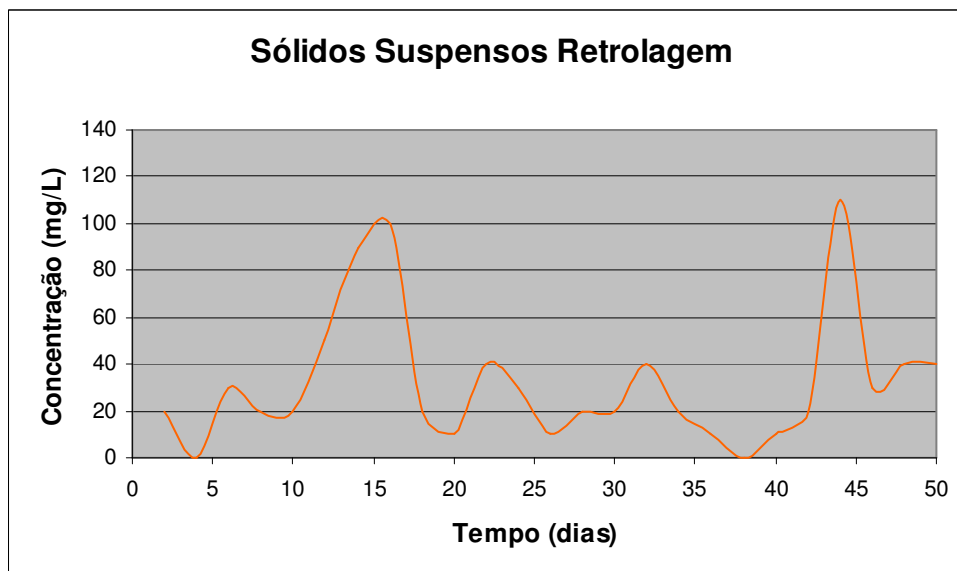


Figura 5.44: Variação ao longo do tempo de Sólidos Suspensos do efluente da retrolavagem do sistema com recirculação.

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre a concentração de sólidos suspensos totais (tabela 5.10). Os pontos de coleta da saída do filtro biológico e do tanque de cultivo do RAS apresentaram concentrações médias menores do que os dois outros pontos. Uma das funções do filtro biológico de leito flutuante é remover sólidos suspensos (TIMMONS *et al.*, 2002), e estes dados demonstram que este objetivo foi atingido. A retrolavagem é feita para retirar o excesso de sólidos suspensos do filtro e por isso o seu efluente tende a ser bastante concentrado. No tanque de cultivo do sistema tradicional, mesmo tendo sido feita uma sifonagem diária, as concentrações de sólidos suspensos permaneceram superiores as do sistema com recirculação.

Tabela 5.10: Concentração média e desvio padrão de Sólidos Suspensos nos pontos de coleta (n=25). As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey com 95% de confiança.

Ponto de Coleta	Média (\pm desvio padrão) em mg/L	
Saída do Filtro	4 (\pm 8)	a
Tanque Com Recirculação	8 (\pm 11)	a
Tanque Sem Recirculação	27 (\pm 26)	b
Retrolavagem	32 (\pm 29)	b

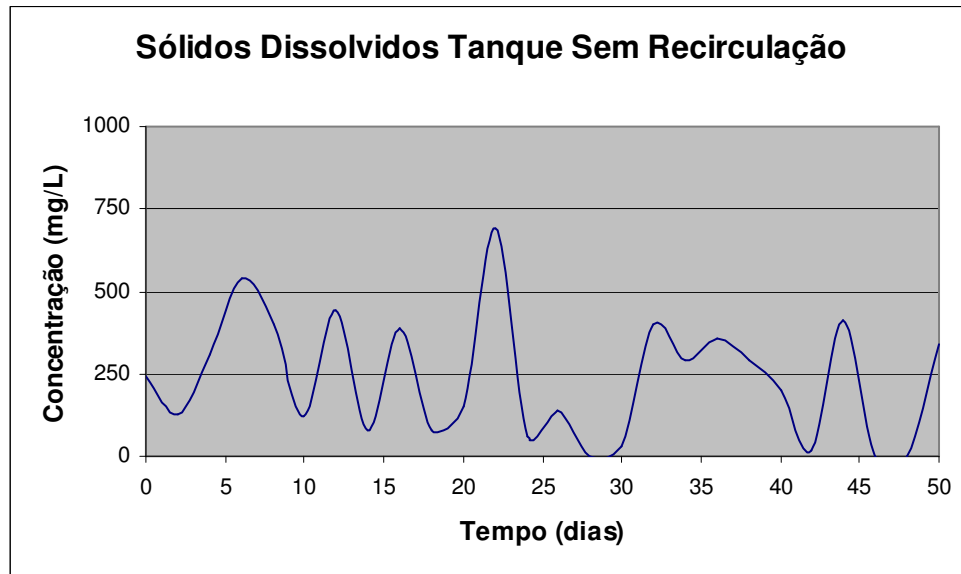


Figura 5.45: Variação ao longo do tempo de Sólidos Dissolvidos no tanque de cultivo do sistema sem recirculação.

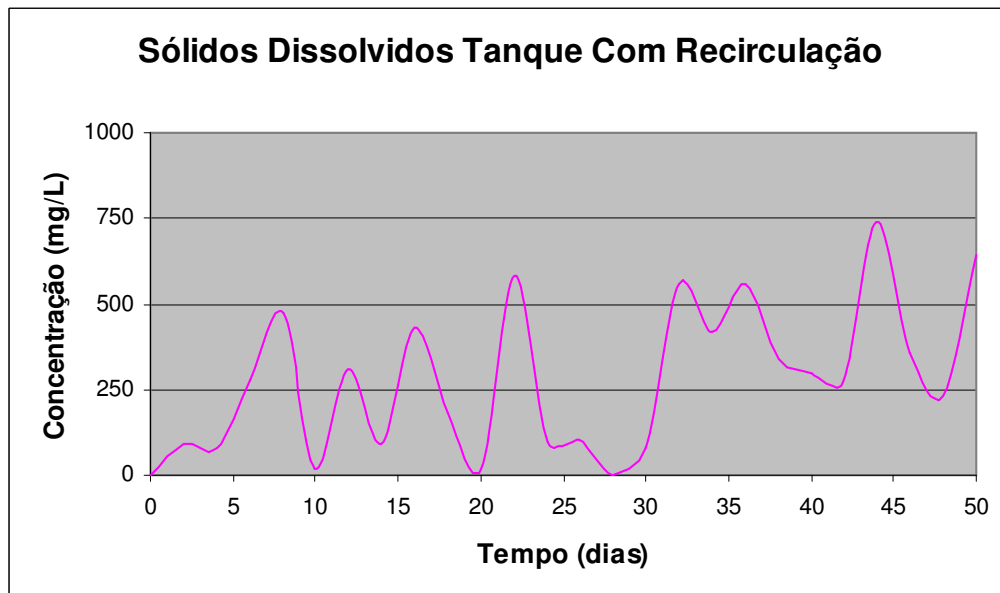


Figura 5.46: Variação ao longo do tempo de Sólidos Dissolvidos no tanque de cultivo do sistema com recirculação.

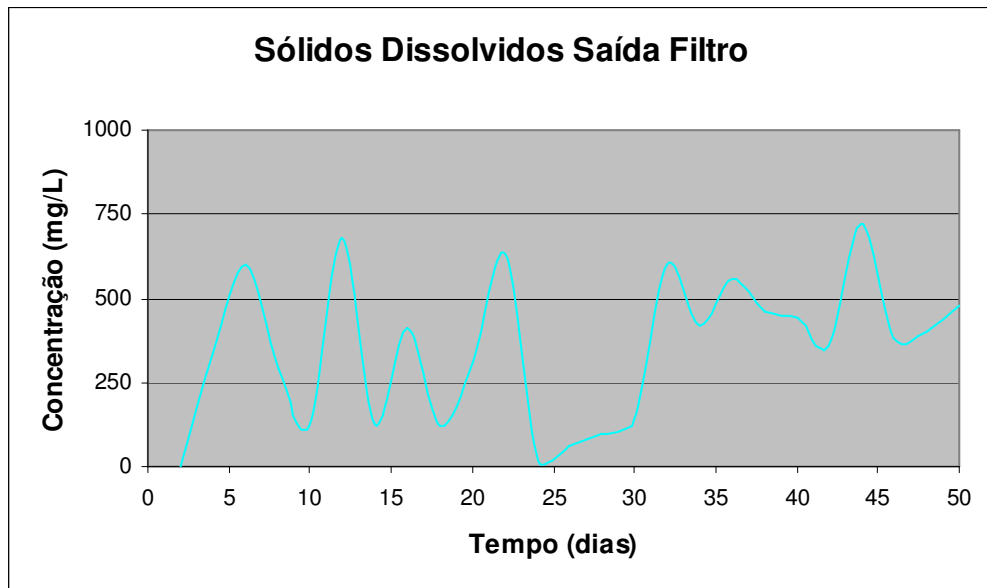


Figura 5.47: Variação ao longo do tempo de Sólidos Dissolvidos na saída do filtro biológico do sistema com recirculação.

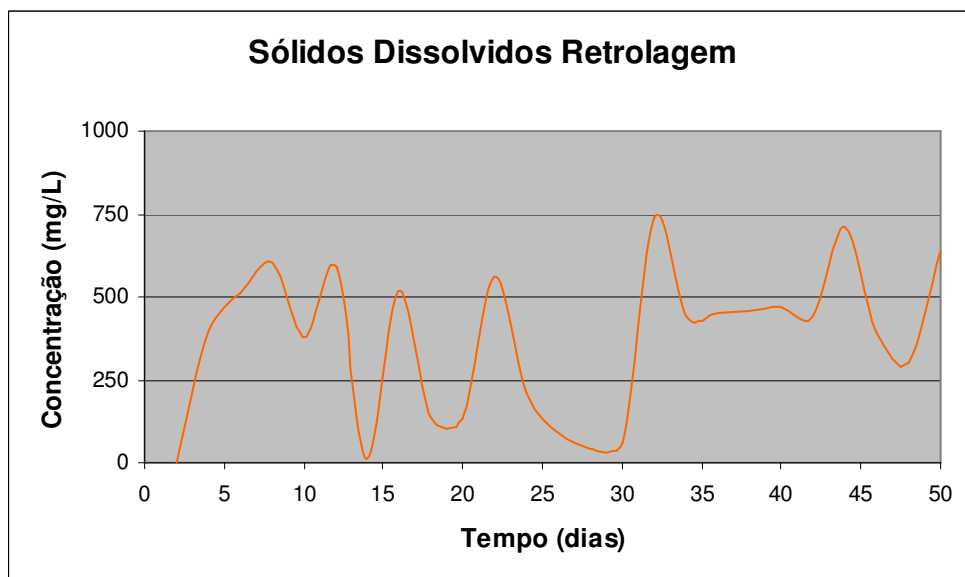


Figura 5.48: Variação ao longo do tempo de Sólidos Dissolvidos do efluente da retrolavagem do sistema com recirculação.

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias dos pontos de coleta (tabela 5.11). A concentração de sólidos dissolvidos totais foi menor no tanque de cultivo do sistema com recirculação do que no efluente da retrolavagem, mostrando que este processo contribuiu também para a remoção de sólidos dissolvidos totais, além dos sólidos suspensos totais. Não houve diferença significativa na concentração de sólidos dissolvidos entre os tanques de cultivo. Assim como os valores de sólidos totais, as concentrações deste parâmetro oscilaram bastante durante todo o experimento.

Tabela 5.11: Concentração média e desvio padrão de Sólidos Dissolvidos nos pontos de coleta (n=25). As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey com 95% de confiança.

Ponto de Coleta	Média (\pm desvio padrão) em mg/L	
Tanque Sem Recirculação	235 (\pm 190)	a
Tanque Com Recirculação	290 (\pm 216)	ab
Saída do Filtro	351 (\pm 216)	bc
Retrolavagem	371 (\pm 227)	c

5.1.6 Condutividade Elétrica, Salinidade e Turbidez

A variação da condutividade elétrica é apresentada nos gráficos das figuras 5.49 a 5.52.

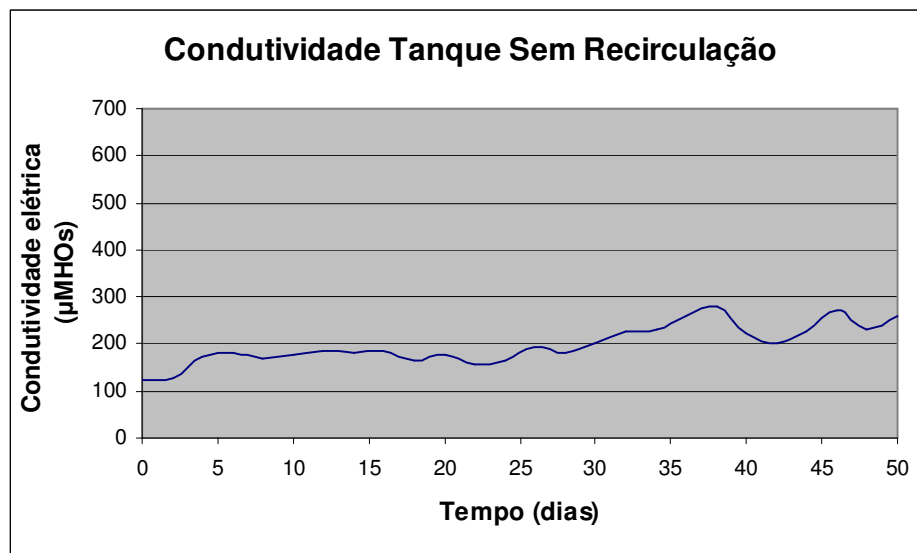


Figura 5.49: Variação ao longo do tempo da Condutividade Elétrica no tanque de cultivo do sistema sem recirculação.

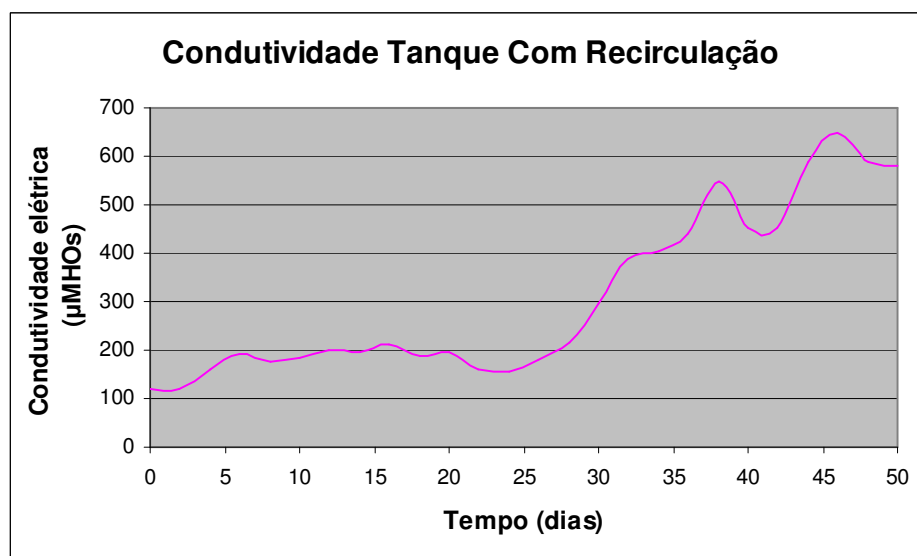


Figura 5.50: Variação ao longo do tempo da Condutividade Elétrica no tanque de cultivo do sistema com recirculação.

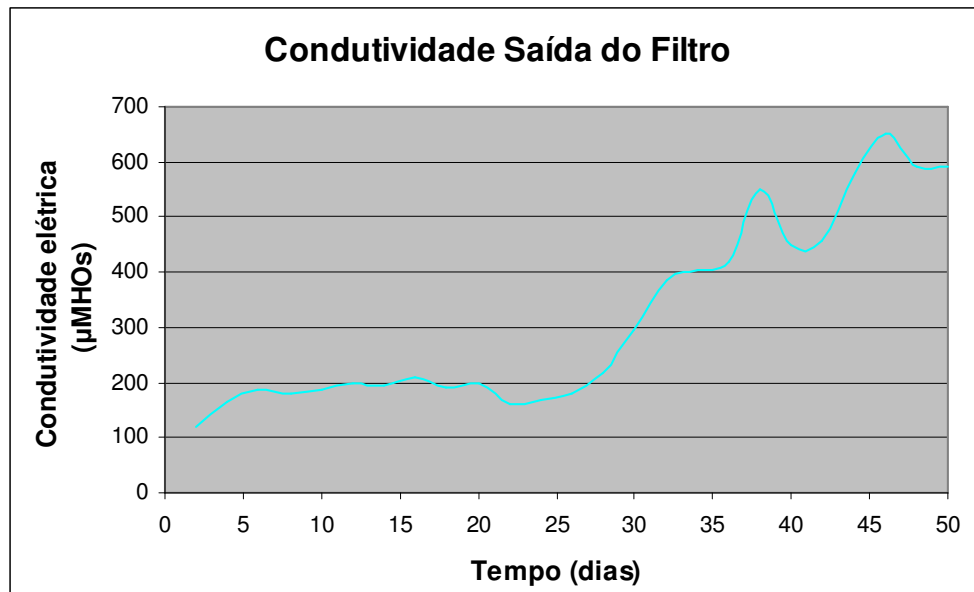


Figura 5.51: Variação ao longo do tempo da Condutividade Elétrica na saída do filtro biológico do sistema com recirculação.

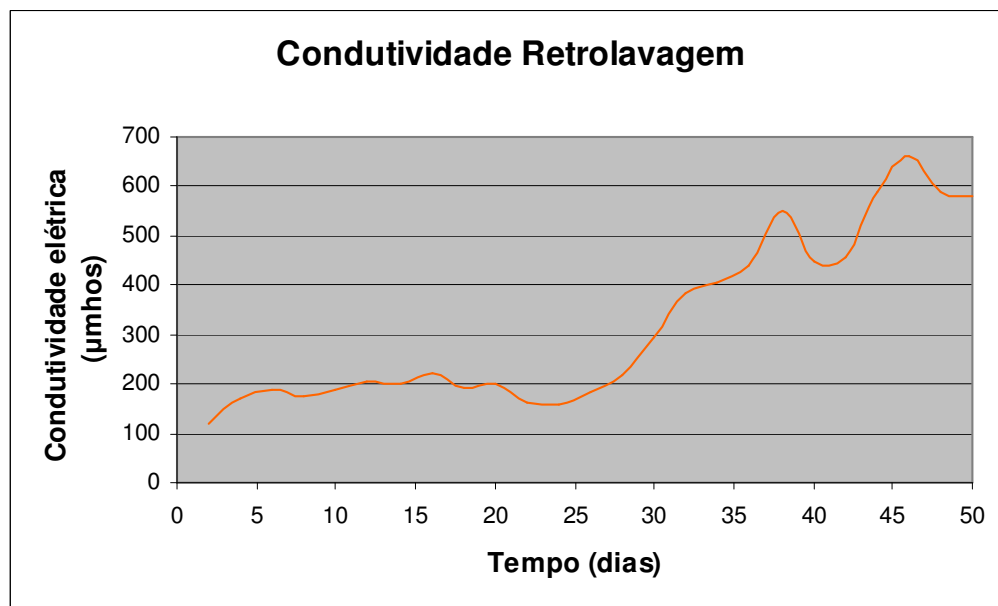


Figura 5.52: Variação ao longo do tempo da Condutividade Elétrica do efluente da retrolavagem do sistema com recirculação.

A condutividade elétrica foi significativamente menor ($p < 0,05$) no tanque de cultivo sem recirculação (tabela 5.12). Assim como o nitrato, outros íons tendem a se acumular no sistema com recirculação, aumentando assim a condutividade elétrica. A evaporação faz aumentar a concentração de íons na água, acarretando no aumento da condutividade elétrica. Como o sistema com recirculação tem baixa taxa de troca de água, este efeito é mais pronunciado. Outro fator que contribui para o aumento da concentração de íons é o acúmulo de restos de ração e metabólitos.

Tabela 5.12: Concentração média e desvio padrão da Condutividade Elétrica nos pontos de coleta (n=25). As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey com 95% de confiança.

Ponto de Coleta	Média (\pm desvio padrão) em μ MHOs	
Tanque Sem Recirculação	201 (\pm 39)	a
Tanque Com Recirculação	317 (\pm 172)	b
Saída do Filtro	317 (\pm 171)	b
Retrolavagem	319 (\pm 172)	b

As variações da salinidade nos quatro pontos medidos durante o podem ser observadas nas figuras abaixo (5.53 a 5.56). É possível observar que os três pontos de coleta do sistema com recirculação apresentaram uma tendência ao aumento da salinidade.

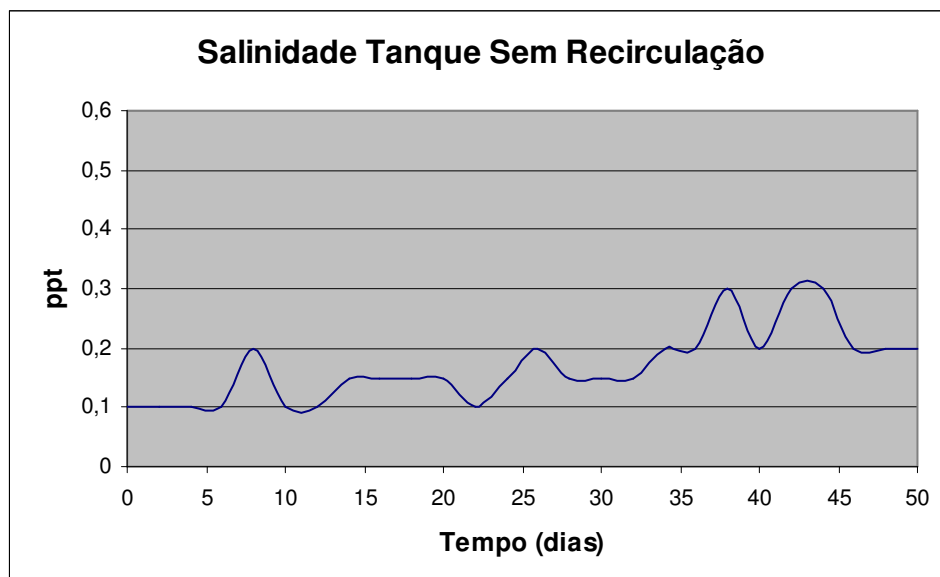


Figura 5.53: Variação ao longo do tempo da Salinidade no tanque de cultivo do sistema sem recirculação.

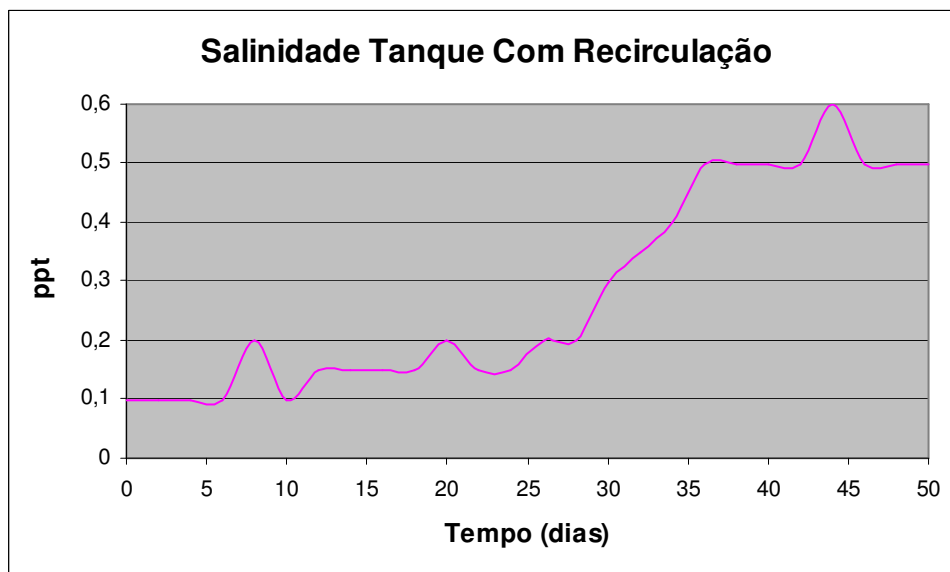


Figura 5.54: Variação ao longo do tempo da Salinidade no tanque de cultivo do sistema com recirculação.

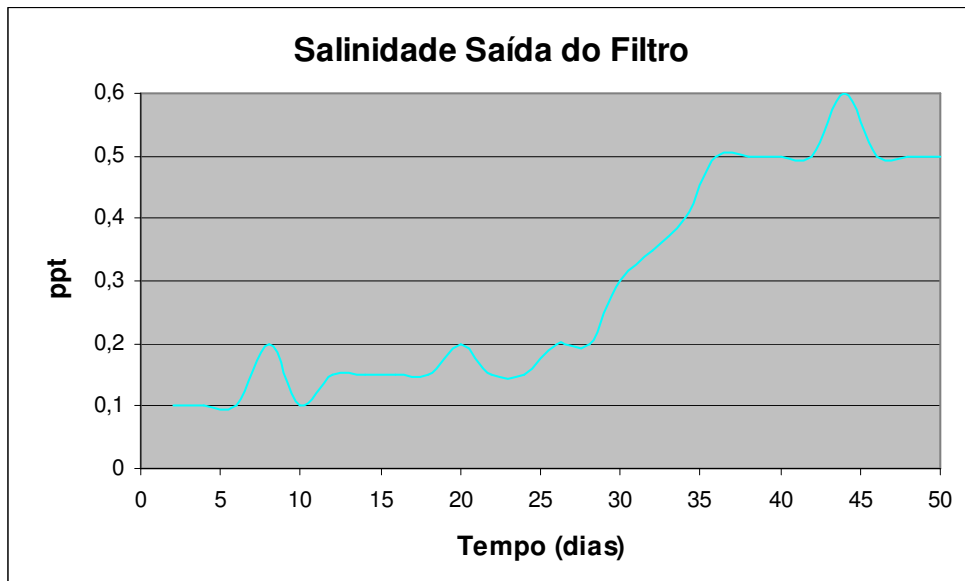


Figura 5.55: Variação ao longo do tempo da Salinidade na saída do filtro biológico do sistema com recirculação.

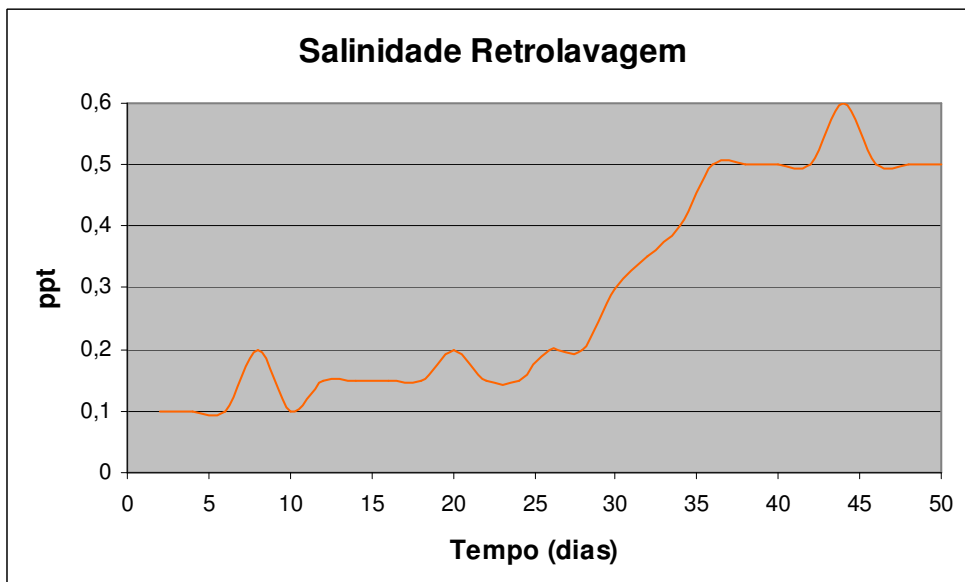


Figura 5.56: Variação ao longo do tempo da Salinidade do efluente da retrolavagem do sistema com recirculação.

Os pontos de coleta do sistema com recirculação apresentaram uma concentração média de salinidade significativamente superior ($p < 0,05$) ao do tanque sem recirculação (tabela 5.13). As médias e desvio padrões do sistema com recirculação foram iguais e nos três pontos ocorreu um aumento acentuado da salinidade na segunda metade do experimento, assim como ocorreu com a condutividade elétrica. O aumento da salinidade está relacionado ao aumento da concentração de íons na água, causado pela evaporação, acúmulo de restos de ração e metabólitos.

Tabela 5.13: Concentração média e desvio padrão da Salinidade nos pontos de coleta (n=25). As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey com 95% de confiança. (ppt* = partes por mil)

Ponto de Coleta	Média (\pm desvio padrão) em ppt*	
Tanque Sem Recirculação	0,17 (\pm 0,06)	a
Tanque Com Recirculação	0,29 (\pm 0,17)	b
Saída do Filtro	0,29 (\pm 0,17)	b
Retrolavagem	0,29 (\pm 0,17)	b

Os gráficos abaixo apresentam os valores medidos de turbidez (figuras 5.57 a 5.60).

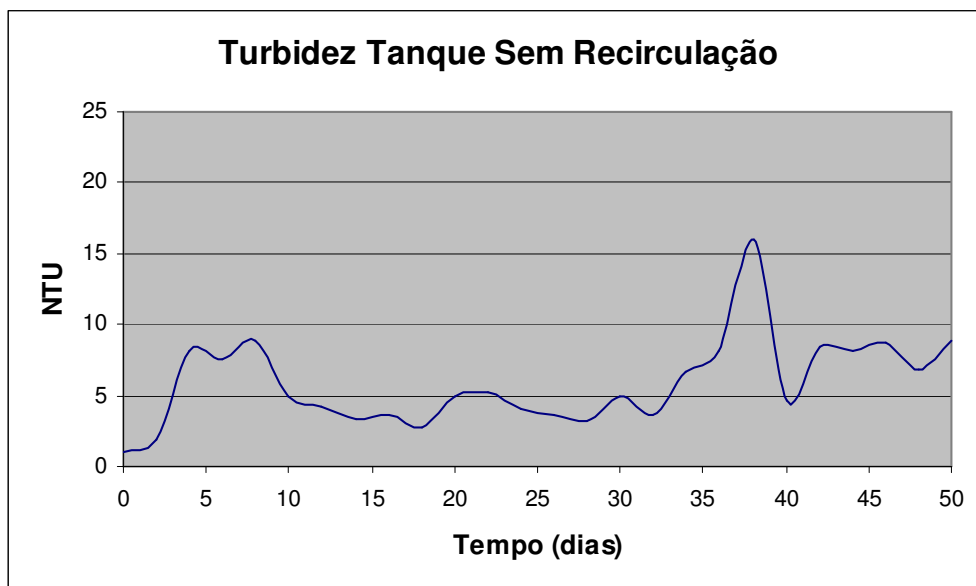


Figura 5.57: Variação ao longo do tempo da Turbidez no tanque de cultivo do sistema sem recirculação.

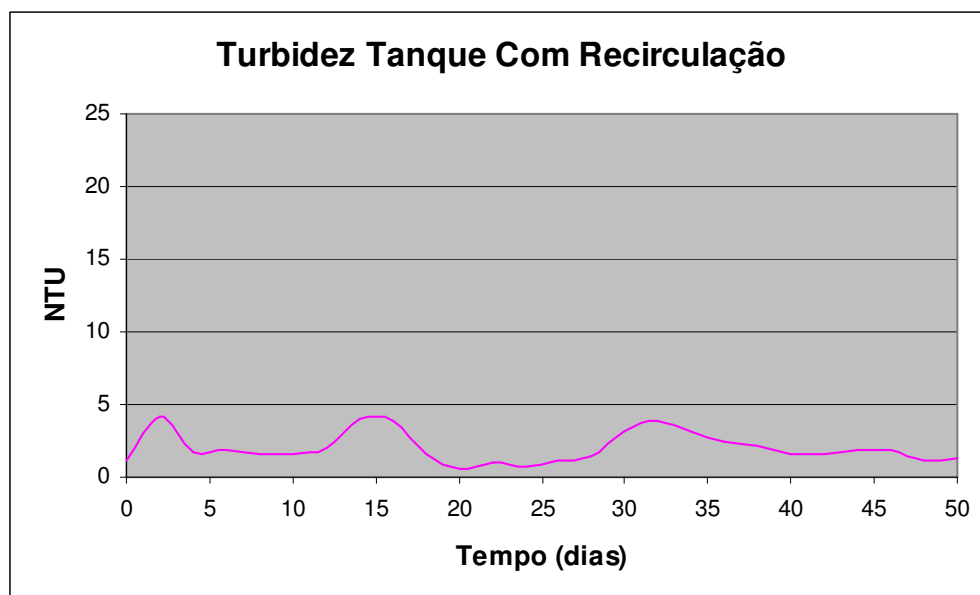


Figura 5.58: Variação ao longo do tempo da Turbidez no tanque de cultivo do sistema com recirculação.

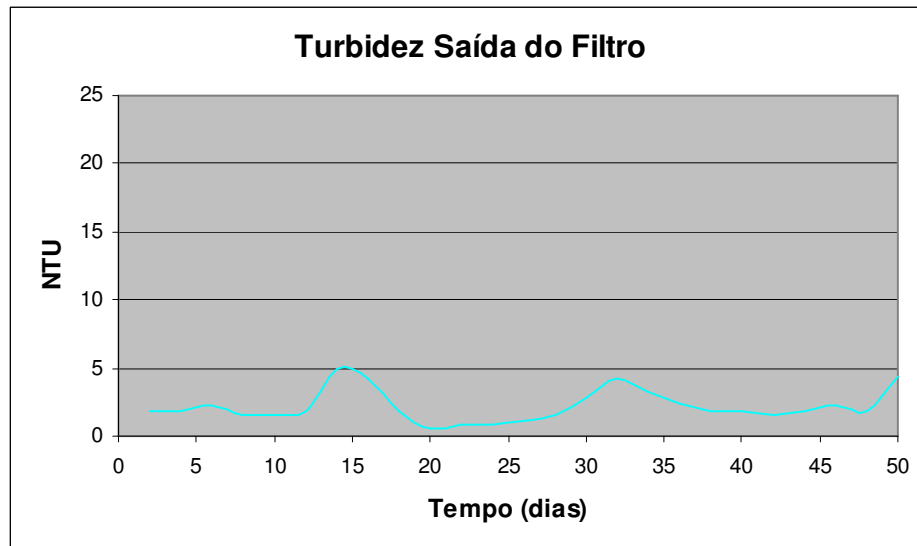


Figura 5.59: Variação ao longo do tempo da Turbidez na saída do filtro biológico do sistema com recirculação.

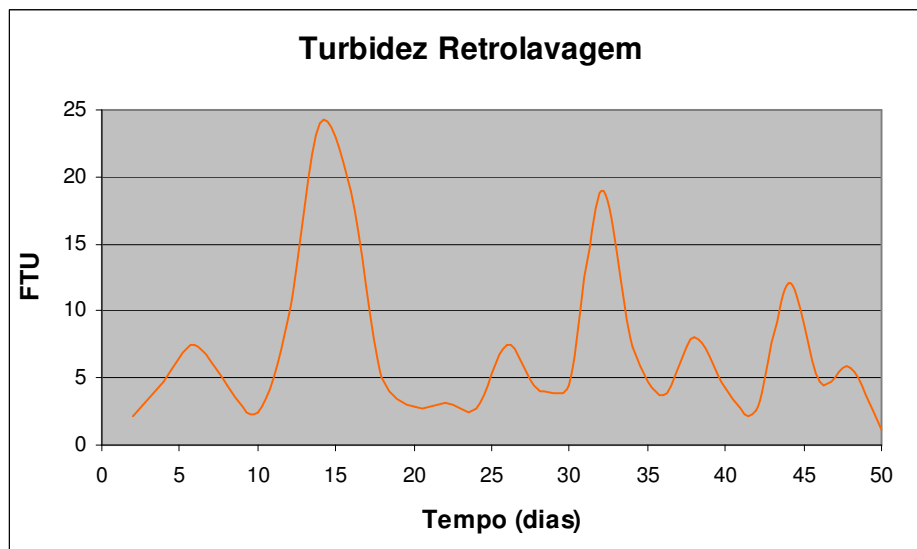


Figura 5.60: Variação ao longo do tempo da Turbidez do efluente da retrolavagem do sistema com recirculação.

A turbidez do tanque de cultivo com recirculação foi significativamente menor ($p < 0,05$) do que do de sistema tradicional (tabela 5.14), fato que podia ser observado durante o experimento (figura 5.61). A remoção de sólidos suspensos pelo filtro biológico contribuiu com a diminuição da turbidez no tanque com recirculação.

Tabela 5.14: Concentração média e desvio padrão da Turbidez nos pontos de coleta ($n=25$). As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey com 95% de confiança.

Ponto de Coleta	Média (\pm desvio padrão) em NTU	
Tanque Com Recirculação	2,06 (\pm 1,03)	a
Saída do Filtro	2,21 (\pm 1,17)	a
Tanque Sem Recirculação	6,06 (\pm 3,01)	b
Retrolavagem	6,92 (\pm 5,81)	b

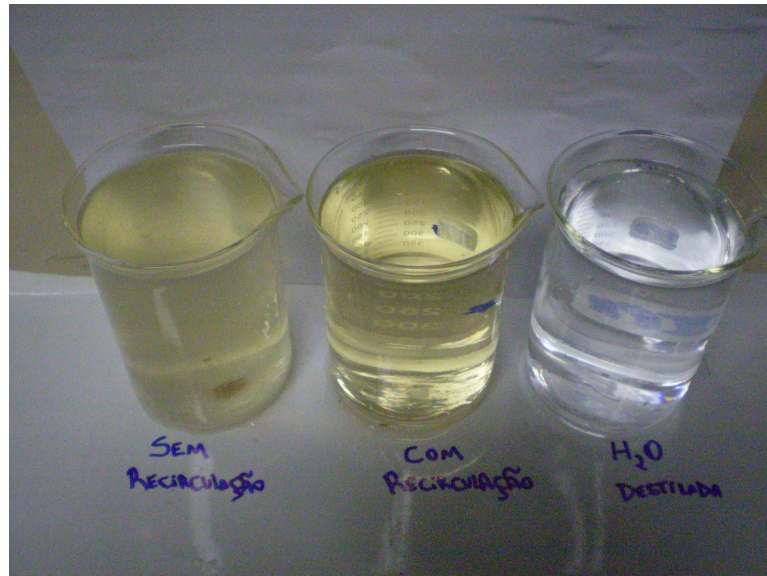


Figura 5.61: Foto ilustrando a diferença na turbidez entre os tanques de cultivo.

5.2 Crescimento dos Peixes durante o Experimento

O desenvolvimento dos peixes durante o experimento foi acompanhado através de pesagens periódicas. Os dados de peso médio dos peixes nas cinco biometrias encontram-se na tabela 5.15:

Tabela 5.15: Peso médio dos peixes em gramas nas 5 biometrias realizadas durante o período experimental. As pesagens foram realizadas em 23/10/08, 06/11/08, 20/11/08, 05/12/08 e 12/12/08.

	Peso médio 1 (±DP)	Peso médio 2 (±DP)	Peso médio 3 (±DP)	Peso médio 4 (±DP)	Peso médio 5 (±DP)
Sem	8,3 (±0,59)	15,9 (±6,95)	31,4 (±8,36)	57,3 (±20,09)	77,3 (±13,52)
Com	8,1 (±0,78)	12,5 (±5,17)	27,5 (±10,58)	53,5 (±14,52)	75,6 (±13,34)

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os dois tratamentos no ganho de peso médio dos peixes. Como o RAS utiliza menos água para cultivar 1kg de peixe (TIMMONS, 2002), o fato de não haver diferença significativa de ganho de biomassa entre os dois tanques, mostra que o sistema com recirculação é mais vantajoso, neste aspecto.

Os peixes do tanque de cultivo sem recirculação apresentaram um ganho de peso médio individual de 69g durante os 52 dias de experimento e as tilápias do RAS engordaram em média 67,4g cada uma (tabela 5.16).

Tabela 5.16: Ganho de peso médio dos peixes durante o período experimental. Não houve diferença significativa para o aumento de biomassa das tilápias dos dois sistemas.

Ganho de peso individual (gramas)						
	1 a 2	2 a 3	3 a 4	4 a 5	Total	Média (±desvio padrão)
Sem	7,57	15,4	26,0	20,0	69,0	17,25 (±7,75)
Com	4,36	15,0	26,0	22,1	67,4	16,86 (±9,50)

5.3 Análise de FISH

As análises de FISH foram realizadas conforme descritas na metodologia, através de contagens em fotos de microscopia de epifluorescência com filtros revelando a coloração DAPI (figuras 5.62) e a coloração Cy3 (figura 5.63). A hibridização é indicada pela coloração Cy3.

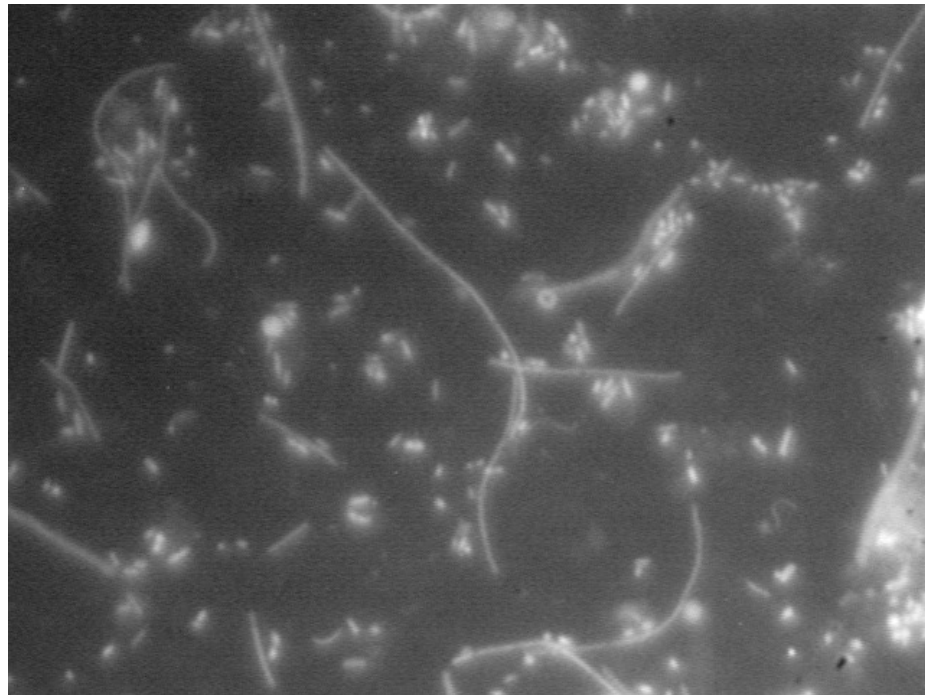


Figura 5.62: Foto ilustrando um DAPI da coleta 23.

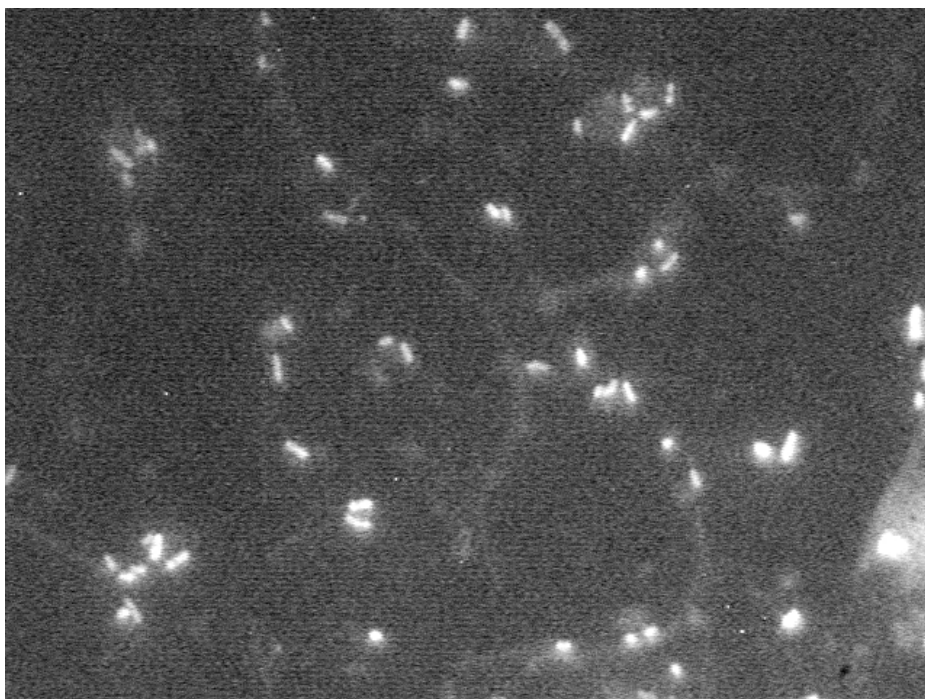


Figura 5.63: Foto ilustrando um FISH da coleta 23. As bactérias que apresentam um brilho mais forte são as coradas com Cy3.

Em ecologia microbiana, as contagens do total de células são geralmente realizadas em amostras ambientais com colorações gerais ou específicas para visualizar as células. O DAPI é uma coloração específica para DNA que cora praticamente todas as células presentes em uma amostra (MADIGAN & MARTINKO, 2006). Já o método FISH é baseado na hibridização com marcadores (sondas) fluorescentes de segmentos do 16SrRNA, que demarcam bactérias de espécies ou grupos específicos determinados pela especificidade da sonda (OLIVEIRA, 2004).

Foram obtidas as seguintes proporções entre o número de células bacterianas coradas com DAPI e o número de células hibridizadas com as diferentes sondas (figuras 5.64 e 5.65) nas coletas 21, 23 e 25, que equivalem aos dias 42, 46 e 50 do experimento.

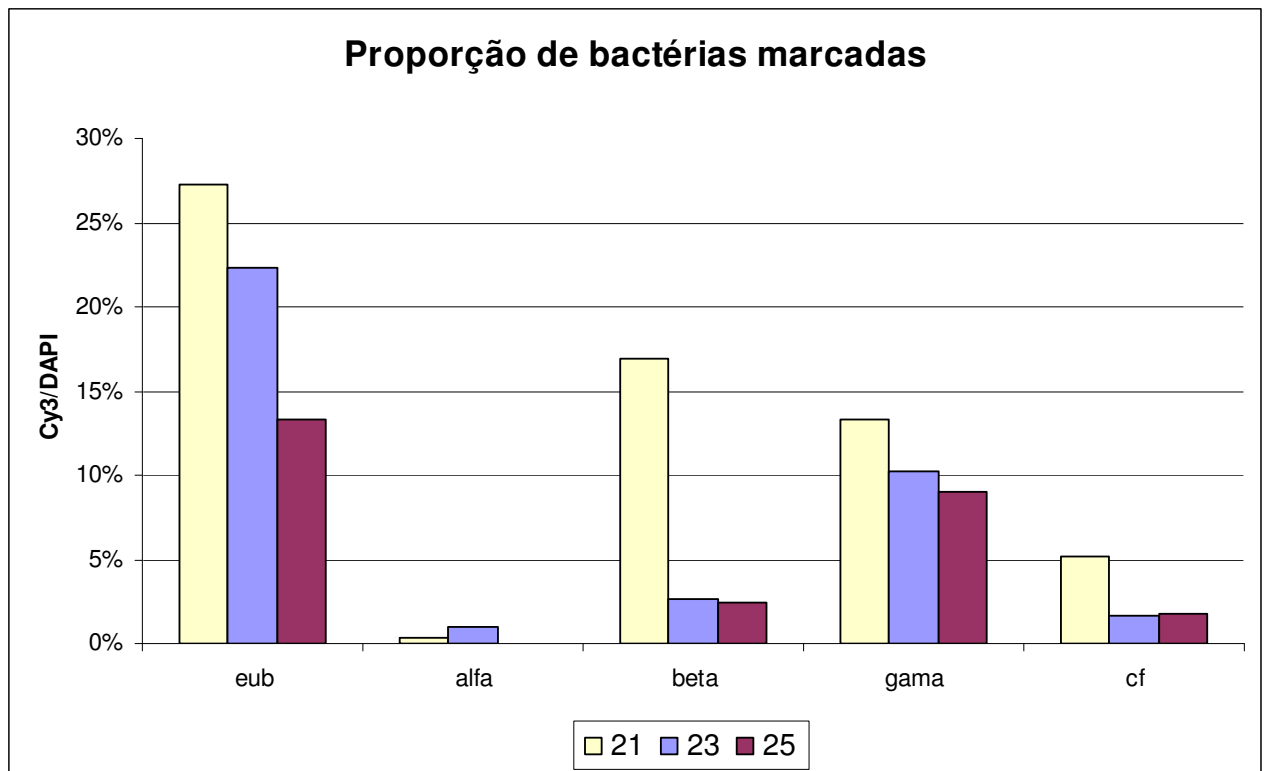


Figura 5.64: Figura ilustrando o percentual de bactérias hibridizadas (marcadas com Cy3) para os diferentes tipos de sonda. As coletas 21, 23 e 25 correspondem respectivamente às datas 08/12/2008, 10/12/2008 e 12/12/2008.

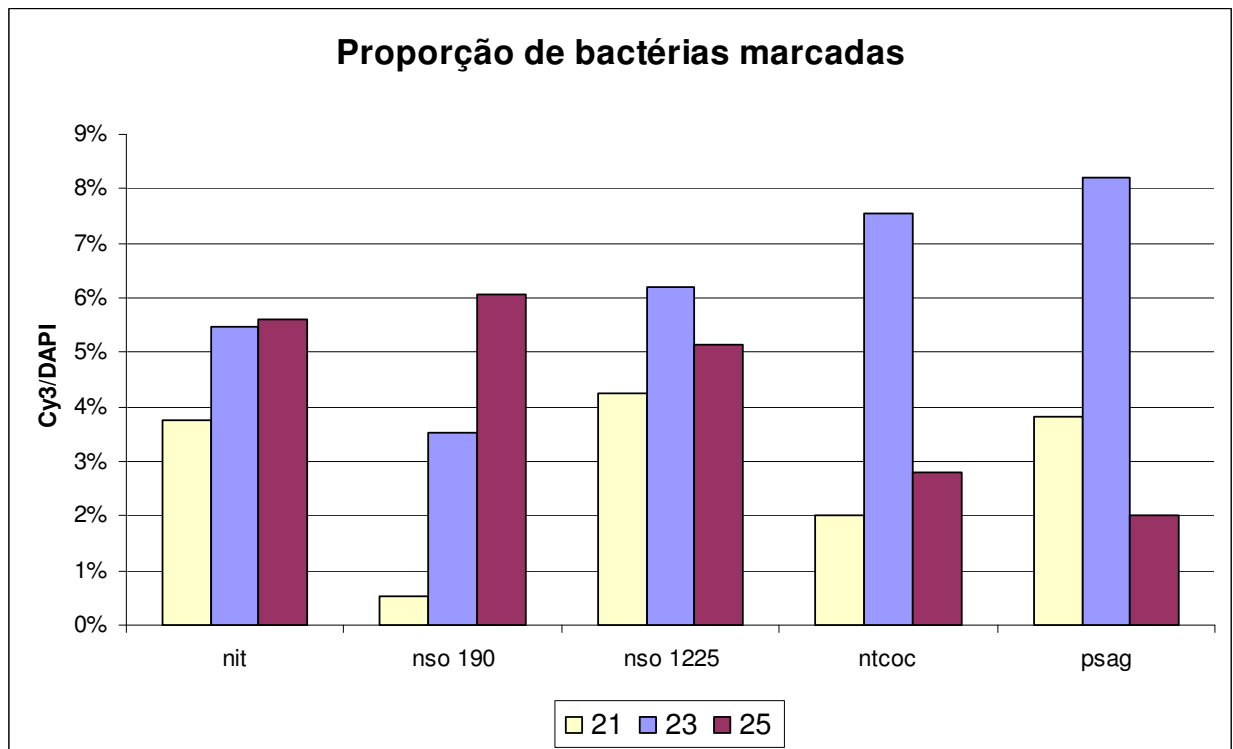


Figura 5.65: Figura ilustrando o percentual de bactérias hibridizadas (marcadas com Cy3) para os diferentes tipos de sonda. As coletas 21, 23 e 25 correspondem respectivamente às datas 08/12/2008, 10/12/2008 e 12/12/2008.

Foi possível observar a presença tanto de organismos oxidadores de nitrito, quanto de organismos oxidadores de amônia em ambos os pontos de coleta. Dentro dos grupos alfa, beta e Gama, o alfa foi o que apresentou a menor proporção de hibridização. A bactéria aeróbia *Pseudomonas fluorescens* Ag1 que possui algumas linhagens com capacidade para utilizar nitrato ao invés de oxigênio comoceptor final de elétrons (MADIGAN & MARTINKO, 2006), também apareceu nas três coletas. Isso indica que pode ter ocorrido desnitrificação.

Hovanec *et al.* (1998) combinando o uso de FISH e monitoramento da água sugeriu uma correspondência entre mudanças na composição da comunidade bacteriana e o início da oxidação da amônia. É possível observar uma tendência de recuperação das bactérias do oxidadoras de amônia do grupo beta (NSO190), que pode ter sido influenciada pelo incremento da concentração de amônia.

5.3.1 Controle Negativo

O marcador controle negativo apresenta uma seqüência não compatível com qualquer grupo de bactérias, sendo empregado para avaliar a eficiência de hibridização. Percentuais de bactérias marcadas com o marcador controle negativo superior a 10% do total de bactérias indicam que a análise deve ser descartada, sendo o ideal menor ou igual a 1%. Esse percentual é subtraído do percentual de células hibridizadas com marcadores específicos (CESAR, 2002).

O maior percentual médio de bactérias hibridizadas do controle negativo foi do ponto de coleta 21 com 0,5%. Este controle é importante para verificar se as somente células que tenham o fragmento específico de rRNA 16S hibridizaram. Quando o valor do controle negativo encontra-se dentro do aceitável, porém é diferente de zero, este valor é subtraído nas demais sondas. Os resultados obtidos para o controle negativo encontram-se resumidos na tabela 5.17.

Tabela 5.17: Percentual de bactérias hibridizadas (marcadas com Cy3) do Controle Negativo em relação ao total de bactérias coradas com DAPI nas coletas 21, 23 e 25 (equivalente a 42, 46 e 50 dias de experimento respectivamente). O número de campos contatos para cada amostra foi 10.

Percentual de Bactérias Hibridizadas em Relação ao DAPI	
Coleta	Média (\pmdesvio padrão) em %
21	0,50 (\pm 1,18)
23	0,06 (\pm 0,19)
25	0,47 (\pm 0,51)

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as três coletas para o controle negativo.

5.3.2 Eubactérias

A sonda de eubactérias é específica para uma região conservadora da região 16S do rRNA do grupo das Eubactérias (SUNDE *et al.*, 2003). Isso significa que uma grande quantidade de espécies do Domínio Bactéria hibridiza com esta sonda.

A sonda EUB deve ser vista apenas como um controle para verificar a eficiência do FISH. O método FISH tem uma correlação positiva com a atividade metabólica, apresentando um potencial para ser utilizado como um indicador fisiológico (BOUVIER & del GIORGIO, 2003). Os resultados para as coletas 21, 23 e 25 se encontram na tabela 5.18.

Tabela 5.18: Percentual de Eubactérias hibridizadas (marcadas com Cy3) em relação ao total de bactérias coradas com DAPI nas coletas 21, 23 e 25 (equivalente a 42, 46 e 50 dias de experimento respectivamente). O número de campos contatos para cada amostra foi 10.

Percentual de Bactérias Hibridizadas em Relação ao DAPI		
Coleta	Média (\pmdesvio padrão) em %	
21	27,21 (\pm 12,26)	a
23	22,35 (\pm 8,38)	ab
25	13,32 (\pm 5,55)	b

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) no percentual de Eubactérias hibridizadas em relação ao total de bactérias coradas com DAPI. A coleta 23 apresentou uma concentração relativa maior de Eubactérias do que a coleta 25. Este fato se deve provavelmente a uma

maior concentração de filamentosas em relação às outras formas de bactérias que foi encontrada na coleta 25, conforme será discutido posteriormente.

5.3.3 α - Proteobacteria

α – Proteobacteria é uma classe de bactérias gram-negativas do filo Proteobacteria. A classe é baseada na análise filogenética de seqüências de 16S rRNA (GARRITY, 2005). Em um estudo analisando biofilmes em filtros, foi encontrada forte correlação entre a presença de bactérias dos grupos alfa e beta proteobactérias e redução dos níveis de amônia em água doce (OLIVEIRA, 2002). Os resultados para esta classe encontram-se na tabela 5.19.

Tabela 5.19: Percentual de α - Proteobactérias hibridizadas (marcadas com Cy3) em relação ao total de bactérias coradas com DAPI nas coletas 21, 23 e 25 (equivalente a 42, 46 e 50 dias de experimento respectivamente). O número de campos contatos para cada amostra foi 10.

Percentual de Bactérias Hibridizadas em Relação ao DAPI		
Coleta	Média (\pmdesvio padrão) em %	
23	1,02 (\pm 1,15)	a
21	0,32 (\pm 0,49)	ab
25	0,05 (\pm 0,14)	b

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as coletas 23 e 25 para as α – Proteobactérias.

5.3.4 β - Proteobacteria

Assim como o grupo gama-proteobactéria, beta-proteobactérias compreendem a maior parte dos gêneros de bactérias nitrificantes (OLIVEIRA, 2004). De acordo com Cesar (2002) existe um efeito positivo de elementos nitrogenados neste grupo de bactérias. A nitrificação está diretamente relacionada com a concentração de nitrogênio amoniacal. Os resultados para este grupo se encontram na tabela abaixo:

Tabela 5.20: Percentual de β - Proteobactérias hibridizadas (marcadas com Cy3) em relação ao total de bactérias coradas com DAPI nas coletas 21, 23 e 25 (equivalente a 42, 46 e 50 dias de experimento respectivamente). O número de campos contatos para cada amostra foi 10.

Percentual de Bactérias Hibridizadas em Relação ao DAPI		
Coleta	Média (\pmdesvio padrão) em %	
21	16,90 (\pm 6,99)	a
23	2,69 (\pm 2,14)	b
25	2,37 (\pm 2,39)	b

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre a coleta 21 e as outras duas amostras coletadas para as betas proteobactérias. Foi possível observar uma grande diminuição do percentual deste grupo na coleta 23, sendo que a proporção se manteve menor na coleta 25.

5.3.5 γ - Proteobacteria

As bactérias do grupo gama são gram-negativas de Proteobactérias e compreendem um grande número de patógenos para o homem e para animais. As bactérias do gênero *Nitrococcus* e da espécie *Nitrosococcus oceanus* pertencem ao grupo gama, sendo que o primeiro é oxidador de nitrito e a segunda de amônia (COSKUNER & CURTIS, 2002). Os percentuais de hibridização encontram-se na tabela abaixo.

Tabela 5.21: Percentual de γ - Proteobactéria hibridizadas (marcadas com Cy3) em relação ao total de bactérias coradas com DAPI nas coletas 21, 23 e 25 (equivalente a 42, 46 e 50 dias de experimento respectivamente). O número de campos contatos para cada amostra foi 10.

Percentual de Bactérias Hibridizadas em Relação ao DAPI	
Coleta	Média (\pmdesvio padrão) em %
21	13,28 (\pm 3,02)
23	10,26 (\pm 3,65)
25	9,06 (\pm 5,40)

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as três coletas para as proteobactérias do grupo gama.

5.3.6 *Cytophaga – Flavobacter*

Os percentuais de hibridização para os gêneros *Cytophaga* e *Flavobacter* encontram-se na tabela 5.22.

Tabela 5.22: Percentual de *Cytophaga – Flavobacter* hibridizados (marcadas com Cy3) em relação ao total de bactérias coradas com DAPI nas coletas 21, 23 e 25 (equivalente a 42, 46 e 50 dias de experimento respectivamente). O número de campos contatos para cada amostra foi 10.

Percentual de Bactérias Hibridizadas em Relação ao DAPI		
Coleta	Média (\pmdesvio padrão) em %	
21	5,11 (\pm 3,71)	a
25	1,73 (\pm 1,75)	b
23	1,59 (\pm 2,02)	b

A coleta 21 foi a que apresentou um percentual maior de *Cytophaga* e *Flavobacter*. O grupo *Cytophaga – Flavobacter* é importante na decomposição de polímeros de matéria orgânica na fase dissolvida (FANDINO *et al.*, 2001).

5.3.7 *Nitrobacter* sp.NIT

Nitrobacter continua sendo o gênero oxidador de nitrito mais conhecido. Em geral, *Nitrobacter* se encontra distribuído de forma mais uniforme que as bactérias oxidadoras de amônia (SCHRAMM *et al.*, 1996). São pequenos bastonetes, com um flagelo subterminal. Ocasionalmente podem ser móveis (MADIGAN & MARTINKO, 2006).

Tabela 5.23: Percentual de *Nitrobacter* sp hibridizados (marcadas com Cy3) em relação ao total de bactérias coradas com DAPI nas coletas 21, 23 e 25 (equivalente a 42, 46 e 50 dias de experimento respectivamente). O número de campos contatos para cada amostra foi 10.

Percentual de Bactérias Hibridizadas em Relação ao DAPI	
Coleta	Média (\pmdesvio padrão) em %
21	3,74 (\pm 3,13)
23	5,46 (\pm 4,77)
25	5,61 (\pm 2,51)

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as três coletas.

5.3.8 AOB β (NSO190)

Esta sonda é para uma seqüência (5'-CGATCCCCTGCTTTCTCC-3') comum as betas bactérias oxidadoras de amônia. As AOB beta pertencem aos gêneros *Nitrosovibrio*, *Nitrospira*, *Nitrosomonas*. A espécie *Nitrosococcus mobilis* também é uma beta-proteobactéria (BOCK & WAGNER, 2006).

Tabela 5.24: Percentual de AOB β bactérias hibridizadas (marcadas com Cy3) em relação ao total de bactérias coradas com DAPI nas coletas 21, 23 e 25 (equivalente a 42, 46 e 50 dias de experimento respectivamente). O número de campos contatos para cada amostra foi 10.

Percentual de Bactérias Hibridizadas em Relação ao DAPI		
Coleta	Média (\pmdesvio padrão) em %	
25	6,07 (\pm 4,03)	a
23	3,54 (\pm 3,04)	a
21	0,53 (\pm 0,54)	b

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) de percentual de hibridização deste grupo entre a coleta 21 e as outras duas. A diminuição na proporção destas bactérias na coleta 21 pode ser a causa do aumento súbito da amônia na coleta 22. É possível que neste momento tenha havido um colapso das AOB. Nas coletas 23 e 25 a proporção de AOB já está maior e a amônia começou a estabilizar, indicando uma recuperação da comunidade microbiana. Conforme já foi discutido anteriormente, o aumento na relação carbono/nitrogênio provavelmente contribui para essa baixa proporção de oxidadoras de amônia na coleta 21.

5.3.9 AOB β (NSO1225)

Esta sonda é para uma seqüência (5'-CGCCATTGTATTACGTGTGA-3') comum as beta bactérias oxidadoras de amônia. As AOB beta pertencem aos gêneros *Nitrosovibrio*, *Nitrospira*, *Nitrosomonas*. A espécie *Nitrosococcus mobilis* também é uma beta-proteobactéria (BOCK & WAGNER, 2006).

Tabela 5.25: Percentual de AOB β bactérias hibridizadas (marcadas com Cy3) em relação ao total de bactérias coradas com DAPI nas coletas 21, 23 e 25 (equivalente a 42, 46 e 50 dias de experimento respectivamente). O número de campos contatos para cada amostra foi 10.

Percentual de Bactérias Hibridizadas em Relação ao DAPI	
Coleta	Média (\pmdesvio padrão) em %
21	4,24 (\pm 5,66)
23	6,19 (\pm 2,45)
25	5,13 (\pm 2,59)

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) no percentual de hibridização deste grupo para os três pontos de coleta.

5.3.10 *Nitrococcus mobilis* NTCOC

Nitrococcus mobilis é um grande coco móvel, com um ou dois flagelos subterminais. Esta espécie é uma oxidadora de nitrito (MADIGAN & MARTINKO, 2006).

Tabela 5.26: Percentual de *Nitrococcus mobilis* hibridizados (marcadas com Cy3) em relação ao total de bactérias coradas com DAPI nas coletas 21, 23 e 25 (equivalente a 42, 46 e 50 dias de experimento respectivamente). O número de campos contatos para cada amostra foi 10.

Percentual de Bactérias Hibridizadas em Relação ao DAPI		
Coleta	Média (\pmdesvio padrão) em %	
23	7,56 (\pm 3,26)	a
25	2,81 (\pm 1,74)	b
21	2,00 (\pm 1,91)	b

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre a coleta 23 e as outras duas coletas (21 e 25), indicando que o gênero *Nitrococcus* está presente de forma mais evidenciada na coleta 23.

5.3.11 *Pseudomonas fluorescens* Ag1

O grupo das Pseudomonas é ecologicamente importante no solo e na água. Algumas linhagens são capazes de utilizar o nitrato como aceptor de elétrons ao invés do oxigênio durante a respiração celular (MADIGAN & MARTINKO, 2006).

Tabela 5.27: Percentual de *Pseudomonas fluorescens* hibridizados (marcadas com Cy3) em relação ao total de bactérias coradas com DAPI nas coletas 21, 23 e 25 (equivalente a 42, 46 e 50 dias de experimento respectivamente). O número de campos contatos para cada amostra foi 10.

Percentual de Bactérias Hibridizadas em Relação ao DAPI		
Coleta	Média (\pmdesvio padrão) em %	
23	8,19 (\pm 3,51)	a
21	3,82 (\pm 2,96)	b
25	2,02 (\pm 1,02)	b

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre a coleta 23 em relação às coletas 21 e 25. Isso indica que houve uma maior proporção desta espécie na coleta 23. A diminuição de nitrato no final do experimento pode ter sido por desnitrificação.

5.4 Análise Morfológica através do DAPI

As bactérias filamentosas não hibridizam com a sonda EUB. A diferença de percentual de filamentosas na composição da comunidade bacteriana pode ser uma explicação para a diferença no percentual de hibridização em EUB encontrado anteriormente (tabela 5.28).

Tabela 5.28: Percentual de Filamentosas de diferentes tamanhos nas coletas 21, 23 e 25 (equivalente a 42, 46 e 50 dias de experimento respectivamente). O número de campos contatos para cada amostra foi 110.

Percentual de Filamentosas em Relação ao Total do DAPI			
	Pontos de Coleta		
	21	23	25
	Média (±DP)	Média (±DP)	Média (±DP)
Filamentosas Grandes	1,02 (±0,33)	1,61 (±0,34)	1,50 (±0,49)
Filamentosas Médias	1,65 (±0,54)	3,34 (±0,79)	3,11 (±0,67)
Filamentosas Pequenas	8,49 (±2,05)	11,77 (±1,01)	12,66 (±0,61)
Total de Filamentosas	11,16 (±2,37)	16,71 (±1,86)	17,27 (±1,19)

A coleta 21 apresentou proporções significativamente menores ($p < 0,05$) para a contagem de filamentosas pequenas, médias, grandes e totais quando comparada às coletas 23 e 25. A coleta 25 apresentou uma maior prevalência para estes morfotipos em comparação à coleta 21, explicando parcialmente o menor percentual de hibridização para a sonda EUB (tabela 5.28). Na comparação entre as coletas 23 e 25, só foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$) na proporção de filamentosas pequenas.

Foram apontadas algumas causas para o crescimento excessivo de bactérias filamentosas (ABREU, 2004): valores de F/M (“Food to Microorganisms Ratio”) baixos, efluentes carentes em nutrientes (N,P), proporção alterada de C:N:P, baixo teor de oxigênio dissolvido, presença de substâncias facilmente biodegradáveis, idade elevada de lodo, configuração do reator biológico e sistema de recirculação, pH baixo, efluentes ricos em sulfuretos.

5.5 Análises de Microscopia Eletrônica de Varredura

Através da análise de MEV foi possível observar algumas mudanças na composição do biofilme ao longo do experimento. A figura 5.66 ilustra o início do experimento. Nesta fase fica evidente a pequena concentração de bactérias.

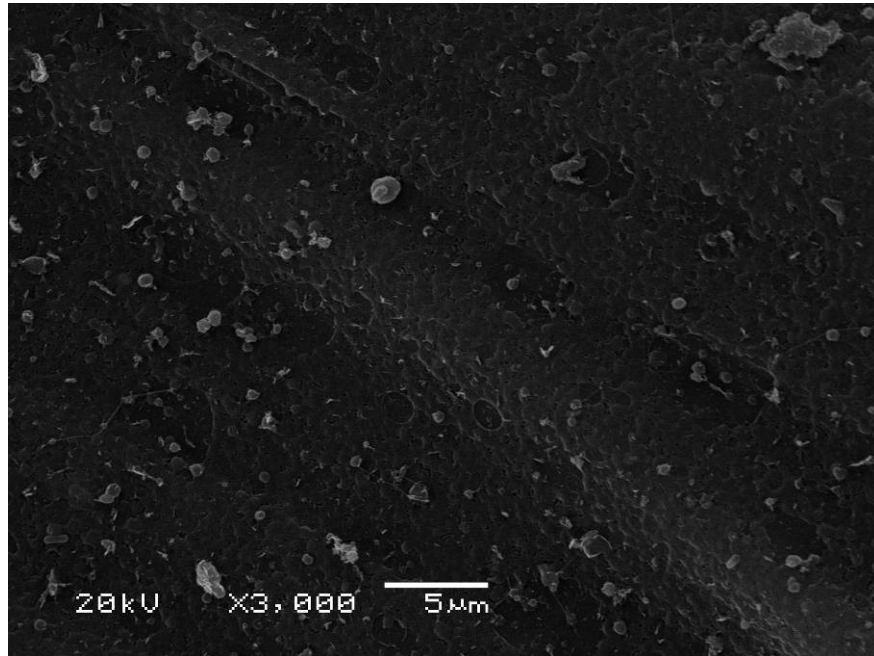


Figura 5.66: Primeiro coleta (2 dias de experimento): início do biofilme.

Já na foto da figura 5.67 é possível observar um aumento considerável na quantidade de microorganismos entre as coletas 1 e 6. Nesta fase a prevalência foi de bastonetes e cocos.

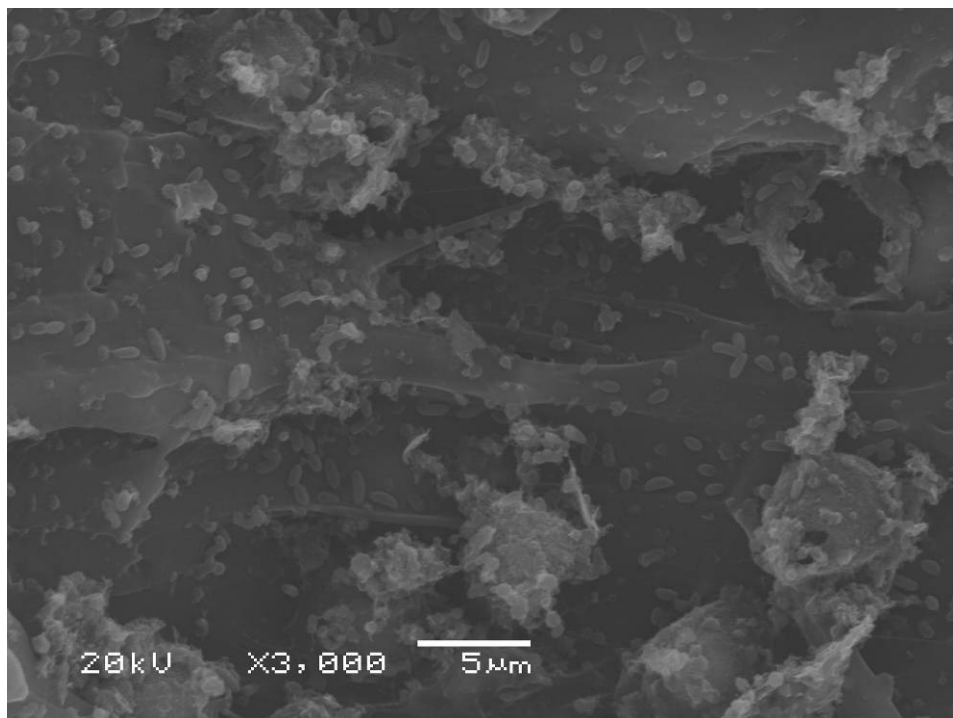


Figura 5.67: Sexta coleta (12 dias de experimento): prevalência de bactérias dos morfotipos cocos e bastonetes.

Na próxima imagem (figura 5.68), obtida na coleta 12, é possível observar uma grande quantidade de exopolímeros. As formas predominantes continuam sendo os cocos e os bastonetes.

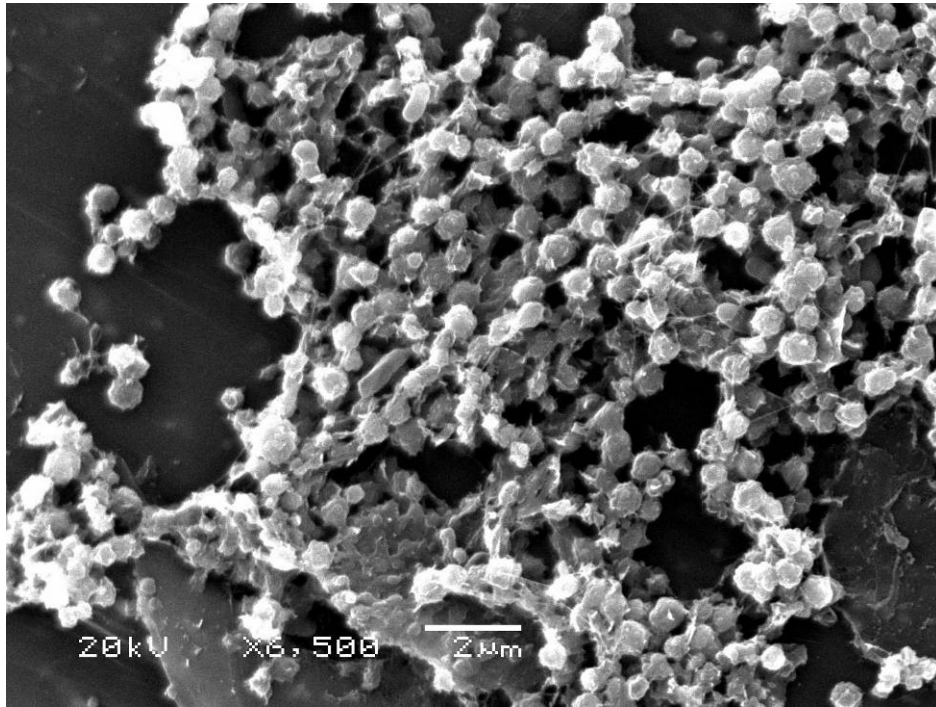


Figura 5.68: Coleta 12 (24 dias de experimento): nesta foto é possível observar uma grande quantidade de exopolímeros.

Na figura 5.69 começam a se observar filamentosas. Ainda em pequenas quantidades e não muito longas. Este é o período (13 coleta) aproximado em que o biofilme começou a ser colonizado por filamentosas.

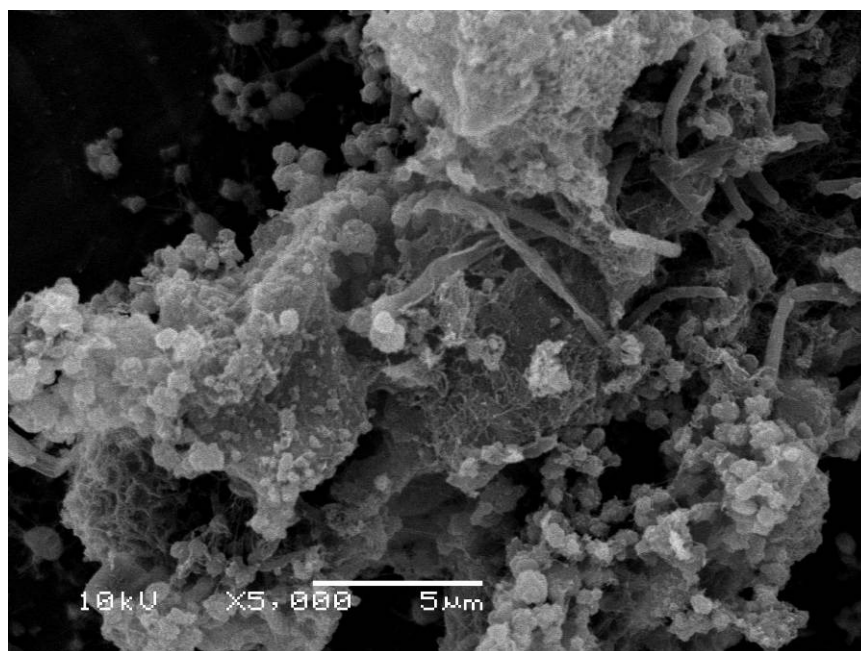


Figura 5.69: Coleta 13 (26 dias de experimento): nesta foto é possível observar algumas filamentosas.

Na figura 5.70 é possível observar uma teia de polímeros extracelulares (exopolímeros). Este material elaborado por bactérias sésseis pode ser utilizado como meio de fixação. Além disso este passa a envolver e aglutinar as células, protegendo-as contra condições adversas do ambiente (TORRES, 2001).

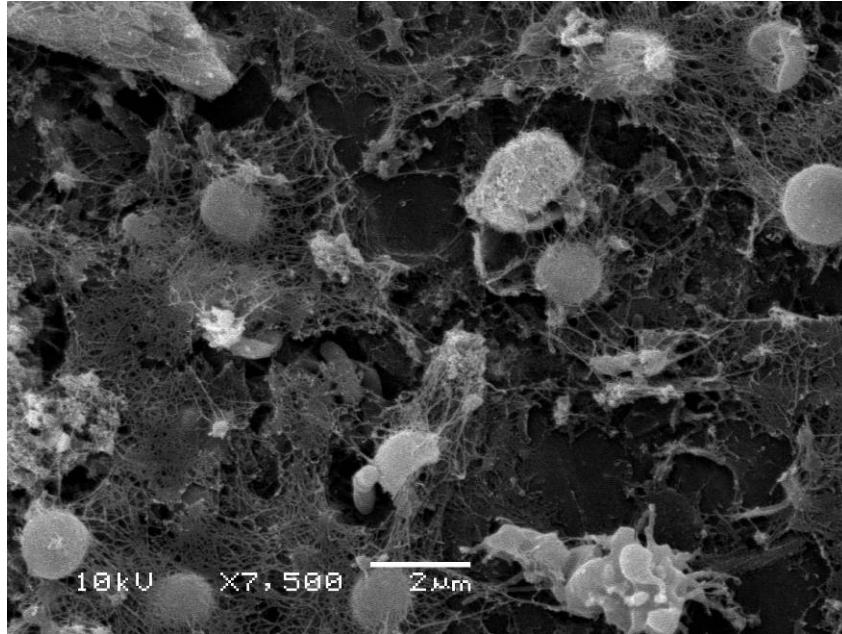


Figura 5.70: Coleta 15 (30 dias de experimento): nesta foto é possível observar uma teia de exopolímeros.

Na coleta 16 já foi possível observar filamentos consideravelmente maiores e o surgimento de espiroquetas, encontrados em conjunto com aglomerados de cocos e bastonetes. As células bacterianas freqüentemente encontram-se imersas em exopolímeros e substâncias secretadas (figura 5.71).



Figura 5.71: Coleta 16 (32 dias de experimento): nesta foto é possível observar filamentosas grandes e uma espiroqueta.

Nas próximas fotografias (figuras 5.72 e 5.73) o biofilme já está bastante espesso e as filamentosas já são bastantes numerosas. Devido à grande área superficial das bactérias filamentosas, quando sua concentração é excessiva, estas podem absorver uma maior porcentagem do material orgânico disponível e inibir o crescimento de organismos mais desejáveis (NORWECO, 2010).

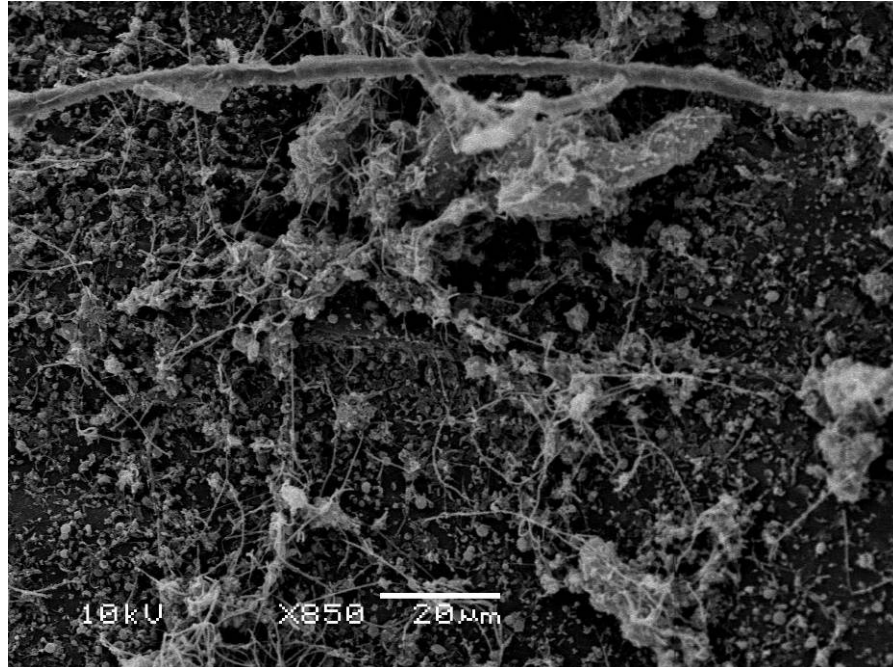


Figura 5.72: Coleta 17 (34 dias de experimento): nesta foto é possível observar uma grande quantidade de filamentosas.

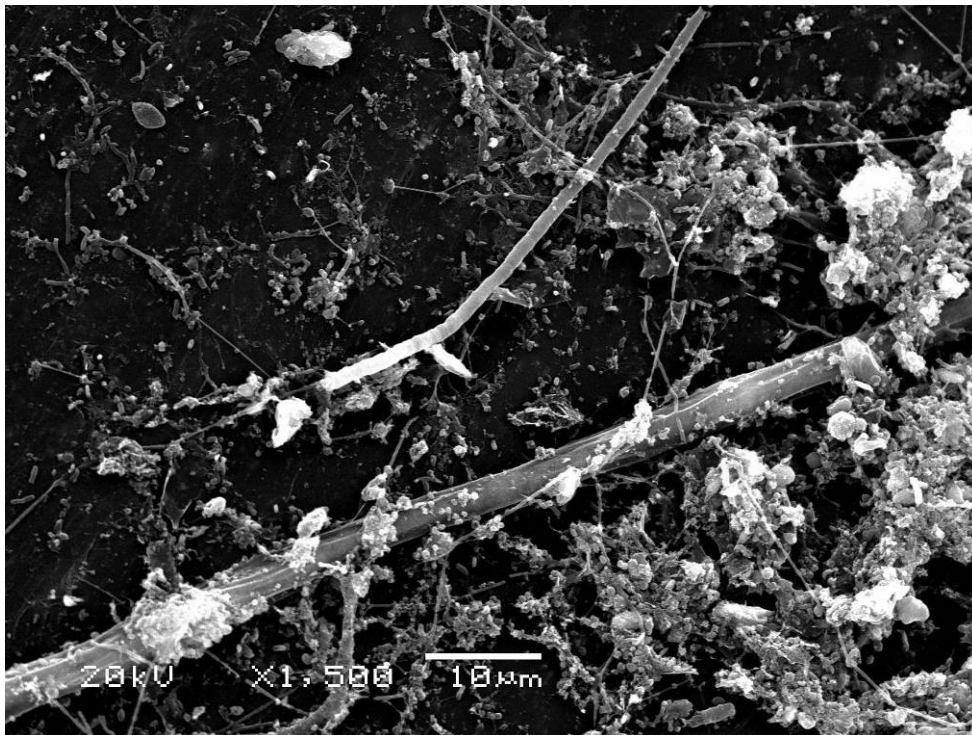


Figura 5.73: Coleta 19 (24 dias de experimento): nesta foto é possível observar bactérias filamentosas bastante longas e o biofilme bem espesso.

Na coleta 23 (figuras 5.74 e 5.75) o biofilme já está bastante espesso e com uma presença bastante significativa de filamentosas, associadas às demais formas bacterianas e

outros microorganismos. Foi possível também observar um flagelado. O aumento da amônia na coleta 22 pode também estar relacionado à predação de bactérias nitrificantes por protozoários. Isto observado em outros experimentos, sendo inclusive proposto o uso de protozoários predadores para o controle do acúmulo de biomassa bacteriana em filtros biológicos (COX *et al.*, 1999).

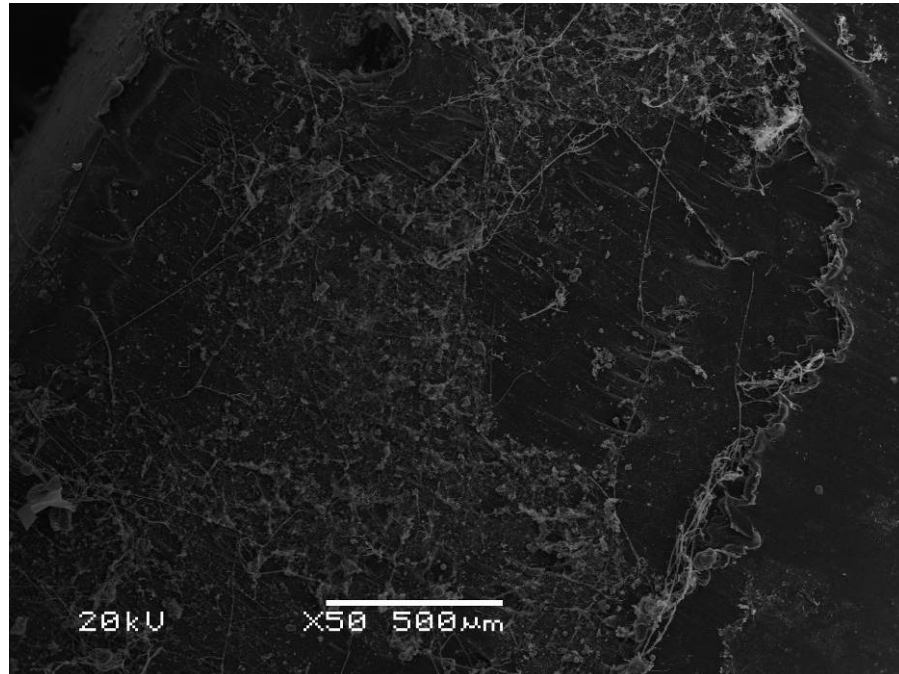


Figura 5.74: Coleta 23 (46 dias de experimento), nesta foto é observar o biofilme cobrindo parcialmente o bead, mesmo após o tratamento da amostra e filamentosas longas e abundantes.

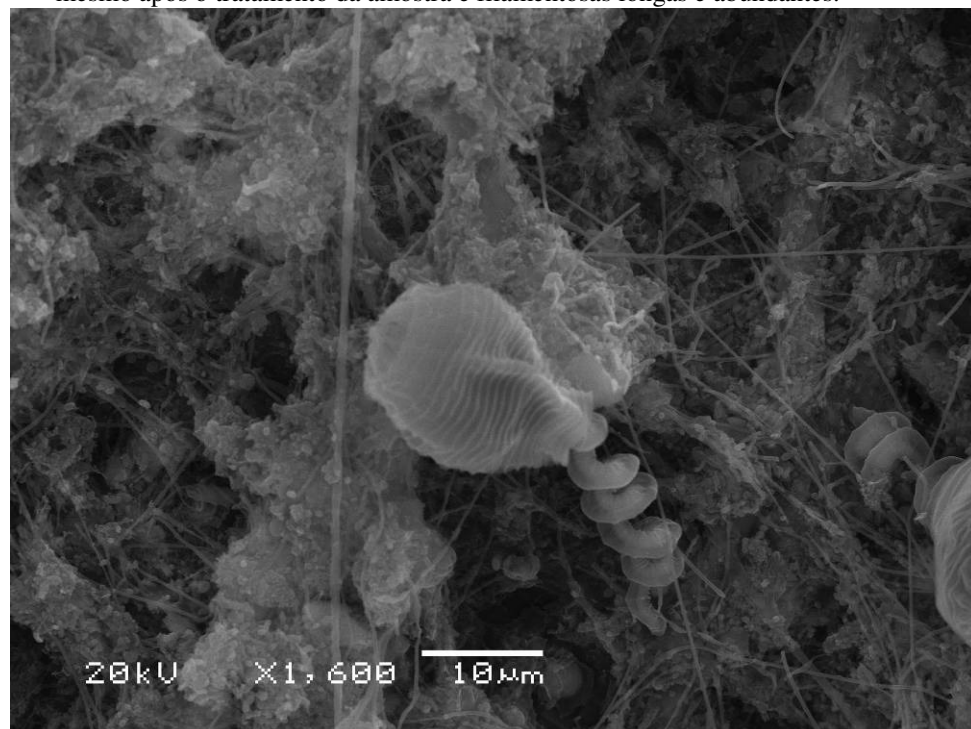


Figura 5.75: Coleta 23 (24 dias de experimento), nesta foto é possível o quão espesso está o biofilme e a presença de um ciliado (vorticelide).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E RECOMENDAÇÕES

Foi identificada uma presença significativa de bactérias oxidadoras de nitrito e de amônia no biofilme do filtro biológico, comprovando assim a ocorrência da nitrificação, verificada através do monitoramento da qualidade da água dos tanques. Foram encontradas bactérias oxidadoras de amônia (AOB) do grupo beta (com proporções DAPI/Cy3 de até $6,19 \pm 2,45\%$), que incluem: *Nitrosovibrio*, *Nitrosospira*, *Nitrosomonas* e *Nitrosococcus*. Além disso também foram encontradas as seguintes espécies de bactérias oxidantes de nitrito (NOB): *Nitrococcus mobilis* e *Nitrobacter* sp., (com proporções DAPI/Cy3 de até $7,56 \pm \%$). Também foi encontrada a bactéria *Pseudomonas fluorescens*, que pode atuar na desnitrificação em condições anóxicas.

Os resultados revelam uma associação entre os parâmetros de qualidade da água e as transformações da comunidade bacteriana, de forma que os resultados do FISH para a coleta 21 (com condições de qualidade da água distintas das coletas 23 e 25) diferem significativamente ($p < 0,05$) das coletas 23 e 25 para beta-proteobactérias, *Cytophaga* e *Flavobacter* e para β bactérias oxidadoras de amônia (NSO190) e bactérias filamentosas. As coletas 21, 23 e 25 correspondem, respectivamente, aos dias 42, 46 e 50 do experimento.

Apesar de que o ressurgimento de valores de nitrogênio amoniacal acima de 5mg/L, possa indicar que alguns fatores (como o aumento da relação carbono/nitrogênio e o aumento da proporção de filamentosas) podem ter influenciado negativamente a comunidade nitrificante a partir da coleta 21, também se percebe que a concentração de amônia estabiliza-se nas coletas 23 e 25. Esta estabilização indica que a comunidade nitrificante conseguiu ao menos igualar a taxa de produção de nitrogênio amoniacal no tanque. Foi possível perceber um aumento na proporção de β bactérias oxidadoras de amônia (NSO190) nas coletas 23 e 25, em relação à coleta 21, sugerindo a recuperação deste grupo de nitrificantes. Esta recuperação deve estar associada à estabilização na concentração de nitrogênio amoniacal neste período final.

Na análise de microscopia eletrônica de varredura foi possível observar o surgimento das bactérias filamentosas em torno das coletas 12 e 13 (dias 24 e 26 do início do experimento). No final do experimento, quando o biofilme já se apresentava espesso, foi encontrada uma grande quantidade de organismos filamentosos. Este resultado é corroborado pela análise morfológica feita com DAPI, que identificou um aumento significativo ($p < 0,05$) na proporção de bactérias filamentosas a partir da coleta 21. Em estudos posteriores seria interessante testar diferentes manejos do biofilme, na tentativa de melhorar a eficiência ao manipular as condições que favorecem o desenvolvimento de bactérias filamentosas.

O tanque de cultivo com filtro biológico manteve concentração baixa de amônia total principalmente através do processo de nitrificação. Já para o tanque com cultivo convencional, as trocas diárias de água, em volume de 300L, desempenharam um papel importante no controle da concentração de nitrogênio amoniacal total. No sistema com recirculação, as trocas diárias de água foram de, somente, 20L, necessárias para a retrolavagem do filtro biológico

Não houve diferença significativa de ganho de peso dos peixes entre os dois sistemas, o que configura uma vantagem para o sistema com recirculação, pois este utiliza menos água que o sistema convencional.

A aquacultura com recirculação é uma tecnologia bastante promissora, principalmente em locais onde há escassez de água, ou onde existe um grande mercado consumidor longe de uma fonte abundante de água. O estudo dos microorganismos presentes no filtro biológico, e a adaptação das técnicas de construção e manejo de acordo com este conhecimento, pode levar a um aumento na eficiência destes sistemas. Tais melhorias tecnológicas trariam ganhos não somente do ponto de vista da produtividade do sistema aquícola, mas também em relação a sua sustentabilidade ambiental, ao minimizar o uso de água e o lançamento de efluentes.

Com o avanço da biotecnologia ambiental, é possível e desejável aprimorar cada vez mais o conhecimento dos microorganismos envolvidos nos mais diversos processos de tratamento de efluentes. Técnicas moleculares como FISH aliadas à microscopia Confocal (a qual permite identificar a localização dos microorganismos no biofilme) e bibliotecas de clones (para melhor conhecer as espécies) são ferramentas importantes para a pesquisa destas bactérias. São importantes estudos que visem identificar as condições de contorno adequadas para o desenvolvimento de comunidades bacterianas competentes e resilientes no cumprimento das funções de tratamento desejadas. Além disso, pode ser verificado, durante o experimento, que estudos posteriores com desnitrificação e remoção de fósforo seriam importantes para remover o nitrato e fosfato que tendem a se acumular no sistema.

7 CONCLUSÕES

Esta pesquisa realizou a caracterização de comunidade microbiana em biofilme associado a filtro biológico utilizado para o tratamento de efluente de aquacultura. A caracterização foi feita através de identificação de bactérias pela técnica FISH (Hibridização Fluorescente *in Situ*) e análise morfológica com DAPI (4',6-Diamidino-2-Fenilindol). A composição do biofilme formado junto a superfície do material de enchimento do filtro biológico foi observado com o Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV). Também, foi realizado o monitoramento da qualidade da água em quatro pontos do sistema – tanques de cultivo com e sem recirculação, saída do filtro biológico e efluente da retrolavagem. Com base nos resultados medidos e observações realizadas, pode-se concluir o seguinte:

- 1º) O monitoramento da qualidade da água demonstrou a ocorrência de nitrificação no tanque de cultivo com recirculação, constatação corroborada pela detecção de bactérias oxidadoras de amônia e nitrito pela técnica FISH.
- 2º) Não houve diferença significativa entre as concentrações de amônia nos tanques de cultivo com e sem recirculação. Todavia, no tanque com recirculação, a redução de amônia deveu-se a nitrificação, enquanto que no tanque sem recirculação o controle da amônia foi mantido através de trocas de água.
- 3º) O aumento da relação carbono:nitrogênio e a predação podem ter causado a redução na proporção de bactérias oxidadoras de amônia ao final do experimento, resultando no ressurgimento de nitrogênio amoniacal.
- 4º) Ao final do experimento houve aumento na concentração de carbono orgânico, o que pode ter contribuído para o aumento na proporção de filamentosas observadas neste período.
- 5º) Não houve diferença significativa no ganho de peso dos peixes cultivados nos sistemas com e sem recirculação.

8 REFERÊNCIAS

- ABREU, A.A.V. **Identificação de Bactérias Filamentosas em Processos de Lamas Activadas através da Técnica de Hibridização *in-situ* de Fluorescência.** 142p. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Tecnologia do Ambiente). Universidade do Minho, Braga, Portugal, 2004.
- ADDISON, H. **Tratado de Hidráulica Aplicada.** Barcelona: Gustavo Gili, 1954. 704p.
- AMANN, R. I. *et al.* Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cell for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. **Journal of Bacteriology**, vol. 172, n. 2, p. 762-770, 1990.
- AMANN, R. I. Fluorescently labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probe in the study of microbial ecology. **Molecular Ecology**, n. 4, p. 543-554, 1995.
- AMANN, R.; SCHLEIFER, K. H.. Nucleic acid probes and their application in environmental microbiology. *In*: G.M. Garrity, D.J. *et a* (Ed) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology** 2ª Ed. vol. 2A, Springer: New York, 2005.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA), AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION (AWWA); WATER ENVIRONMENT FEDERATION (WEF). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.** 20ª ed. Washington: APHA, 1998. 1190p.
- AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION (AWWA). **Water Quality & Treatment: a handbook of community water supplies.** 5ª ed. Washington: McGraw-Hill Inc., 1999.
- AOI, Y. *et al.* Microbial ecology of nitrifying bacteria in wastewater treatment process examined by Fluorescence *in situ* Hybridization. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, vol. 90, n. 3, p. 234-240, 2000.
- AOI, Y. *In situ* identification of microorganisms in biofilm communities. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, vol. 94, n. 6, p. 552-556, 2002.
- ARANA, L. V. **Princípios Químicos de Qualidade da Água em Aqüicultura:** uma revisão para peixes e camarões. 2ª ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2004. 231p.
- BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de Peixes Aplicada à Piscicultura.** Santa Maria: Editora da UFSM, 2002. 212p.
- BARAK, Y *et al.* Phosphorus removal in a marine prototype, recirculating aquaculture system. **Aquaculture**, n.220, p. 313-326, 2003.
- BEER, D.; STOODLEY, P. Microbial biofilms. *In*: Dworkin M. *et al.* (Eds.) **Prokaryotes**, vol 2, New York: Springer, 2006.
- BOCK, E.; WAGNER M. Oxidation of inorganic nitrogen compounds as an energy source. *In*: Dworkin M. *et al.* (Eds.) **Prokaryotes**, vol 2, New York: Springer, 2006.

- BOLEY, A.; MÜLLER, W. R.; HAIDER, G. Biodegradable polymers as solid substrate and biofilm carrier for denitrification in recirculated aquaculture systems. **Aquacultural Engineering**, n. 22, p. 75-85, 2000.
- BOURNE, D. G. *et al.* Microbial community dynamics in a larval aquaculture system of the tropical rock lobster *Panulirus ornatus*. **Aquaculture**, n. 242, p. 31-51, 2004.
- BOUVIER, T.; del GIORGIO, P. A. Factors influencing the detection of bacterial cells using fluorescence *in situ* hybridization (FISH): a quantitative review of published reports. **FEMS Microbiology Ecology**, n. 44, p. 3-15, 2003.
- BRENNER, J. D.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T (Eds.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: the proteobacteria**. Parte A. 2ª ed. East Lansing: Springer, volume 2, 2005. 304 p.
- BURRELL, P. C.; PHALEN, C. M.; HOVANEC, T. A. Identification of bacteria responsible for ammonia oxidation in freshwater aquaria. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 67, n. 12, p. 5791-5800, 2001.
- CESAR, D.E. **Estrutura e Dinâmica do Bacterioplâncton e suas Relações com Nutrientes Inorgânicos e Predação no Estuário da Lagoa dos Patos/RS**. 151p. Tese (Programa de Pós-graduação em Oceanografia Biológica). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2002.
- CME/UFRGS- Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS. Disponível em: <<http://www.cme.ufrgs.br>>. Acesso em Julho de 2009.
- COLT, J.; ARMSTRONG, D. Nitrogen toxicity to crustaceans, fish and mollusks. *In*: Allen, L.; Kinney, E. (Eds.) **Proceedings of the Bioengineering Symposium for Fish Culture**, Bethesda: Fish Culture Section of the American Fisheries Society, 1981.
- COSKUNER, G.; CURTIS, T. P. *In situ* characterization of nitrifiers in an activated sludge plant: detection of *Nitrobacter* Spp. **Journal of Applied Microbiology**, n. 93, p. 431-437, 2002.
- COSTERTON, J.W. **The Biofilm Primer**. Berlim: Springer, 2007. 199p.
- COTTRELL, M. Hibridização *in situ* Fluorescente – FISH (2005). Disponível em: <<http://www.ocean.udel.edu/csn/dkirchman/kirchmanlabmethods.htm>>. Acesso em: Julho de 2008.
- COX, H. J. *et al.* Predation of bacteria by the protozoa *Tetrahymena Pyriformis* in toluene-degrading cultures. **Biotechnology Letters**, n. 21, p. 235-239, 1999.
- DAIMS, H. *et al.* Cultivation-independent, semiautomatic determination of absolute bacterial cell numbers in environmental samples by Fluorescence *in situ* Hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 67, n. 12, p. 5810-5818, 2001.
- D'ORBCASTEL, E. R. *et al.* Comparative growth and welfare in rainbow trout reared in recirculating and flow through rearing systems. **Aquaculture Engineering**, vol. 40, n. 2, p. 79-86, 2009.

- ECKERT, R. **Fisiologia Animal: mecanismos e adaptações**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., 2000. 729p.
- FANDINO, L. B. *et al.* Variations in bacterial community structure during a dinoflagellate bloom analyzed by DGGE and 16S rDNA sequencing. **Aquatic Microbial Ecology**, n. 23, p. 119-130, 2001.
- FISHBASE: a global information system on fishes. Disponível em: <<http://www.fishbase.us/summary/SpeciesSummary.php?id=2>>. Acesso em: Dezembro de 2009.
- FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) – Part I: Structural and ecological aspects. **Water Science and Technology**, vol. 43, n. 6, p. 1-8, 2001a.
- FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) – Part II: Technical aspects. **Water Science and Technology**, vol. 43, n. 6, p. 9-16, 2001b.
- GARRITY, G.M. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: the Proteobacteria part C**. 2ª.ed. New York: Springer, v. 2, 2005. pp. 575.
- GIOVANNONI, A. *et al.* Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. **Journal of Bacteriology**, vol. 170, n. 2, p. 720-726, 1988.
- GROMMEN, R. *et al.* An improved nitrifying enrichment to remove ammonium and nitrite from freshwater aquaria systems. **Aquaculture**, n. 211, p. 115-124, 2002.
- HAFEDH, Y. S.; ALAM, A.; ALAM, A. Performance of biofilter media with different configuration in a water recirculation system for the culture of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquacultural Engineering**, n. 29, p. 139-154, 2003.
- HAGOPIAN, D. S.; RILEY, J. G. A closer look at the bacteriology of nitrification **Aquacultural Engineering**, n. 18, p. 223-244, 1998.
- HELLAWELL, J. M. **Biological Indicators of Freshwater Pollution and Environmental management**. New York: Elsevier Applied Science, 1986. 546 p.
- HOVANEK, T. A.; DELONG E. F. Comparative analysis of nitrifying bacteria associated with freshwater and marine aquaria. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 62, n. 8, p. 2888-2896, 1996.
- HOVANEK, T.A. *et al.* *Nitrospira*-like bacteria associated with nitrite oxidation in freshwater aquaria. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 64, n. 1, p. 258-264,. 1998.
- ITOI, S; NIKI, A; SUGITA, H. Changes in microbial communities associated with the conditioning of filter material in recirculating aquaculture systems of the pufferfish *Takifugu rubripes*. **Aquaculture**, n. 256, p. 287-295, 2006.

- ITOI, S. *et al.* Nitrite-oxidizing bacteria, *Nitrospira*, distribution in the outer layer of the biofilm from filter materials of a recirculating water system for the Goldfish *Carassius auratus*. **Aquaculture**, n. 264, p. 297-308, 2007.
- IVANOV, V. *et al.* Aggregation of ammonia-oxidizing bacteria in microbial biofilm on oyster shell surface. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, n. 22, p. 807-812, 2006.
- JURETSCHKO, S. *et al.* Combined molecular and conventional analysis of nitrifying bacterium diversity in active sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 64, n. 8, p. 3042-3051, 1998.
- KARUNASGAR, I.; OTTA, S. K.; KARUNASGAR, I. Biofilm formation by *Vibrio harveyi* on surfaces. **Aquaculture**, n. 140, p. 241-245, 1996.
- KINDAICHI, T. *et al.* In situ activity and spatial organization of anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria in biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 73, n. 15, p. 4931-4939, 2007.
- KOWALCHUK, G. A.; STEPHEN, J. R. Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. **Annual Reviews in Microbiology**, n. 55, p. 485-529, 2001.
- LENNARD, W. A.; LEONARD, B. V.; A comparison of three different hydroponics sub-systems (gravel beds, floating and nutrient film technique) in an Aquaponic test system. **Aquaculture International**, n. 14, p. 539-550, 2006.
- LEONARD, N.; BLANCHETON, J. P.; GUIRAUD, J. P. Populations of heterotrophic bacteria in recirculating aquaculture system. **Aquacultural Engineering**, n. 22, p. 109-120, 2000.
- LEONARD, N. *et al.* Bacteria and nutrients – nitrogen and carbon – in a recirculating system for sea bass production. **Aquacultural Engineering**, n. 26, p. 111-127, 2002.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M. **Brock Biology of Microorganisms**. 11^a ed. Upper Saddle River: Pearson Prentice Hall, 2006. 992 p.
- MAIER, R. M.; PEPPER, I. L.; GERBA, C. P. **Environmental Microbiology**. San Diego: Academic Press, 2000. 585 p.
- MALONE, R. F.; BEECHER, L. E. Use of floating bead filters to recondition recirculating waters in warmwater aquaculture production systems. **Aquacultural Engineering**, n. 22, p. 57-73, 2000.
- MARTINS, C. I. M. *et al.* The accumulation of substances in Recirculating Aquaculture Systems (RAS) affects embryonic and larval development in common carp *Cyprinus carpio*. **Aquaculture**, n. 291, p. 65-73, 2009a.
- MARTINS, C. I. M. *et al.* Is growth retardation present in Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* cultured in low water exchange recirculating aquaculture systems? **Aquaculture**, n. 298, p. 43-50, 2009b.

- MATSUDA, A.; IDE, T.; FUJI, S. Behavior of nitrogen and phosphorus during batch aerobic digestion of waste activated sludge – continuous aeration and intermittent aeration by control of DO. **Water Research**, n. 22, p.1495-1501, 1988.
- METCALF; EDDY. **Wastewater Engineering: Treatment and Reuse**. 4ª ed. New York: McGraw-Hill, 2003. 1819 p.
- MICHAUD, L. *et al.* Effect of particulate organic carbon on heterotrophic bacterial populations and nitrification efficiency in biological filters. **Aquacultural Engineering**, n. 34, p. 224-233, 2006.
- MORIARTY, D. J. W. The role of microorganisms in aquaculture ponds. **Aquaculture**, n. 151, p. 333-349, 1997.
- NEVES, E. T. **Curso de Hidráulica**. 8ª ed. Porto Alegre: Globo, 1986. 577p.
- NI, B. J. *et al.* Growth, maintenance and product formation of autotrophs in activated sludge: taking the nitrite-oxidizing bacteria as an example. **Water Research**, vol. 42, n. 16, p. 4261-4270, 2008.
- NORWECO - Norwalk Wastewater Equipment Company. Disponível em: <<http://www.norweco.com/html/lab/Identify.htm>>. Acesso em Janeiro de 2010.
- OLIVEIRA, S. S. **Caracterização do consórcio de bactérias nitrificantes pelo método FISH (Fluorescent *in situ* Hybridization) no Biofilme e Água de Sistema de Cultivo do Camarão-Rosa *Farfantepenaeus paulensis***. 60p. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Aqüicultura). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2004.
- PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C. & TAKEMOTO, R. M. **Doenças de Peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. Maringá: EDUEM: CNPQ: Nupélia, 1998. 264p.
- PAYNE, W. J. **Denitrification**. New York: Wiley, 1981.
- PERNTHALER, J. *et al.* Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with rRNA-targeted oligonucleotide probes. *In*: Paul, J. H. (Ed). **Methods in Microbiology**, v.30, Academic Press, USA. p. 207-226. 2001
- PESSÔA, C. A.; JORDÃO, E. P. **Tratamento de Esgotos Domésticos**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2005.
- QUINN, G.P; KEOUGH. M.J. **Experimental Design and Data Analysis for Biologists**. Cambridge: Cambridge University Press, 2007.
- RAKOCY, J. E.; MCGINTY, A. S. Pond Culture of Tilapia (1989). Disponível em: <<http://aqua.ucdavis.edu/DatabaseRoot/pdf/280FS.PDF>>. Acesso em: Janeiro de 2010.
- REYNOLDS, T. D.; RICHARDS, P. A. **Unit Operations and Processes in Environmental Engineering**. 2ª ed. Boston: PWS publishing Company, 1995. 798p.
- RITTMANN, B. E.; McCARTY, P. L. **Biotechnology del Medio Ambiente: principios e aplicaciones**. Madrid: McGraw-Hill. 2001.

- SANDU, S. I. *et al.* Factors influencing the nitrification efficiency of fluidized bed filter with a plastic bead medium. **Aquaculture Engineering**, vol. 26, n. 1, p. 41-59, 2002.
- SAWYER, C. N.; McCARTY, P. L.; PARKIN, G. F. **Chemistry for Environmental Engineering and Science**. 5^a ed. New York: McGraw-Hill Higher Education, 2003.
- SCHRAMM, A. *et al.* Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by In Situ Hybridization and the use of microelectrodes. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 62, n. 12, p. 4641-4647, 1996.
- SILAPAKUL, S. *et al.* Nitrogen compounds removal in a packed bed external loop airlift bioreactor. **Korean Journal of Chemical Engineering**, vol. 22, n. 3, p. 393-398, 2005.
- SUGITA, H.; NAKAMURA, H.; SHIMADA, T. Microbial communities associated with filter materials in recirculating aquaculture systems of freshwater fish. **Aquaculture**, n. 243, p. 403-409, 2005.
- SUNDE, P.T. *et al.* Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of bacteria in periapical lesions of a asymptomatic root-filled teeth. **Microbiology**, n. 149, 1095-1102, 2003.
- TACON, A. G. J.; FOSTER, I. P. Aquafeeds and the environment: Policy implications. **Aquaculture**, n. 226, p. 181-189, 2003.
- TAL, Y. *et al.* Anaerobic Ammonium-oxidizing (Anammox) bacteria and associated activity in fixed-film biofilters of a marine recirculating aquaculture system. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 72, n. 4, p. 2896-2904, 2006.
- TAL, Y. *et al.* Characterization of the microbial community and nitrogen transformation processes associated with moving bed bioreactors in a closed recirculated mariculture system. **Aquaculture**, n.215, p. 187-202, 2003.
- TIMMONS *et al.* **Recirculating Aquaculture Systems**. 2^a ed. Ithaca: Cayuga Aqua Ventures; Northeastern Regional Aquaculture Center Publication, 2002. 769p.
- TORRES, E. S. **Cinética de Parâmetros Microbiológicos na Formação de Biofilmes**. 91p. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Processamento, Gestão e Meio Ambiente na Indústria do Petróleo e Gás Natural). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.
- TORTORA, G. J; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 894p.
- TUCCI, C. E. M.; HESPANHOL, I.; CORDEIRO NETTO, O. M. **Gestão da Água no Brasil**. Brasília: UNESCO, 2001. 192p.
- VALENTI, W.C. *et al.* (Ed.) **Aqüicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável**. Brasília: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Ministério da Ciência e Tecnologia. 2000.

- VAN RIJN, J. *et al.* Denitrification in recirculating systems: theory and applications. **Aquaculture Engineering**, vol. 34, n. 3, p. 364-376, 2006.
- WACKETT, L.P. The methabolic pathways of biodegradation. *In: Dworkin M. et al. (Eds.) Prokaryotes*, vol 2, New York: Springer, 2006.
- XAVIER, J. B. *et. al.* Monitorização e Modelação da Estrutura de Biofilmes. **Boletim de Biotecnologia**, n. 76, p.2-13, 2003.
- ZAHA, A. (Coord.). **Biologia Molecular Básica**. 2ª ed. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2000. 336p.
- ZHANG, T. C. *et. al.* Competition for substrate and space in biofilms. **Water Environment Research**, n. 67, p.992-1003, 1995.

9 ANEXOS

Os valores obtidos para os parâmetros de qualidade da água e de contagem de bactérias encontram-se nas tabelas seguintes. Para os parâmetros de qualidade da água, foram contrastadas estatisticamente (ANOVA) as médias obtidas para os dados levantados a partir da coleta 1, momento em que o sistema com recirculação foi ligado, possibilitando a comparação dos quatro pontos amostrais. A homocedasticidade para alguns conjuntos de dados ($\alpha=0,05$) foi alcançada após transformações logarítmicas ou potenciais (QUINN & KEOUGH, 2007).

Os pontos amostrados foram: o tanque de cultivo do sistema sem recirculação (SEM); o tanque de cultivo do sistema com recirculação (COM); a saída do filtro biológico (SF); e o efluente gerado na retrolavagem (RET).

Tabela 9.1 – Valores de nitrogênio amoniacal total nos pontos de coleta

Nitrogênio Amoniacal Total (mg/L)					
Número da Coleta	Dia	Pontos de Coleta			
		Sem	Com	Ret	SF
0	0	0,2	0,3		
1	2	1,3	0,6	1,0	0,8
2	4	4,0	3,2	3,2	3,5
3	6	6,4	7,2	7,1	7,4
4	8	6,2	7,5	7,6	7,7
5	10	5,6	7,3	7,3	7,2
6	12	5,1	7,3	7,3	7,4
7	14	3,6	6,8	7,3	7,1
8	16	2,4	6,6	6,8	6,6
9	18	2,1	7,4	7,1	7,1
10	20	1,6	5,0	5,2	5,5
11	22	2,4	4,6	4,5	4,6
12	24	2,7	1,6	1,2	1,3
13	26	3,9	0,0	0,0	0,0
14	28	3,6	0,0	0,0	0,0
15	30	3,9	0,0	0,0	0,0
16	32	2,5	0,0	0,0	0,0
17	34	1,6	0,0	0,0	0,0
18	36	1,4	0,0	0,0	0,0
19	38	3,1	0,0	0,0	0,0
20	40	5,1	0,0	0,0	0,0
21	42	4,3	0,2	0,2	0,1
22	44	5,5	0,3	0,4	0,2
23	46	9,1	6,0	6,5	6,2
24	48	8,8	6,0	5,1	5,1
25	50	9,9	6,3	6,4	6,9

Tabela 9.2 – Valores de nitrito nos pontos de coleta

Nitrito (mg/L)					
Número da Coleta	Dia	Pontos de Coleta			
		Sem	Com	Ret	SF
0	0	0,0	0,0		
1	2	0,0	0,0	0,0	0,0
2	4	0,0	0,0	0,0	0,0
3	6	0,0	0,0	0,0	0,0
4	8	0,0	0,0	0,0	0,0
5	10	0,0	0,0	0,0	0,0
6	12	0,0	0,0	0,0	0,0
7	14	0,0	0,0	0,0	0,0
8	16	0,0	0,0	0,0	0,0
9	18	0,0	0,0	0,0	0,0
10	20	5,0	0,0	0,0	0,0
11	22	5,7	0,0	0,0	0,0
12	24	5,5	6,7	6,8	6,8
13	26	5,9	6,8	8,2	7,8
14	28	5,6	10,4	10,0	10,9
15	30	8,8	17,3	16,2	17,1
16	32	9,2	20,9	20,9	21,2
17	34	10,2	21,6	21,0	20,6
18	36	12,6	18,4	18,1	18,4
19	38	10,6	0,0	0,0	0,0
20	40	7,1	0,0	0,0	0,0
21	42	7,9	0,0	0,0	0,0
22	44	7,2	0,0	0,0	0,0
23	46	6,9	0,0	0,0	0,0
24	48	5,6	0,0	0,0	0,0
25	50	4,3	0,0	0,0	0,0

Tabela 9.3 – Valores de nitrato nos pontos de coleta

Nitrato (mg/L)					
Número da Coleta	Dia	Pontos de Coleta			
		Sem	Com	Ret	SF
0	0	0,6	0,5		
1	2	0,7	0,6	0,6	0,9
2	4	0,8	0,3	0,8	0,6
3	6	0,6	0,3	0,3	0,3
4	8	0,7	0,3	0,3	0,3
5	10	0,6	0,3	0,3	0,3
6	12	0,6	0,2	0,3	0,3
7	14	0,6	0,3	0,3	0,3
8	16	0,7	0,3	0,3	0,3
9	18	0,7	0,2	0,3	0,2
10	20	0,7	0,3	0,2	0,3
11	22	0,9	0,3	0,3	0,3
12	24	0,9	0,9	0,8	0,9
13	26	0,8	2,7	1,6	2,0
14	28	1,0	2,8	3,1	2,8
15	30	1,2	3,5	3,9	3,6
16	32	1,5	4,1	3,9	3,6
17	34	1,3	5,0	4,2	5,8
18	36	1,1	12,8	12,6	13,6
19	38	1,5	23,0	22,9	22,8
20	40	1,2	24,2	24,4	24,1
21	42	1,7	26,6	26,8	26,4
22	44	2,1	26,8	27,3	26,8
23	46	2,0	25,5	26,3	25,6
24	48	2,0	22,1	25,0	25,2
25	50	1,7	23,8	23,8	24,7

Tabela 9.4 – Valores de oxigênio dissolvido nos pontos de coleta

Oxigênio Dissolvido (mg/L)					
Número da Coleta	Dia	Pontos de Coleta			
		Sem	Com	Ret	SF
0	0	9,9	8,4		
1	2	9,0	6,6	6,6	6,5
2	4	5,1	5,4	6,4	5,2
3	6	6,1	6,0	5,0	5,6
4	8	7,5	6,2	5,8	5,9
5	10	8,7	4,5	3,9	5,1
6	12	7,6	6,4	6,2	6,0
7	14	8,0	3,9	4,0	2,7
8	16	5,1	4,3	3,6	4,4
9	18	5,5	5,8	4,7	5,4
10	20	7,9	4,0	4,3	2,6
11	22	6,0	3,6	3,4	3,1
12	24	6,4	5,6	5,3	5,0
13	26	3,5	5,2	4,8	6,8
14	28	6,3	6,0	6,0	5,5
15	30	6,5	5,2	5,1	4,1
16	32	5,9	5,1	5,0	3,8
17	34	5,9	3,8	3,9	3,0
18	36	5,2	5,2	3,6	3,5
19	38	7,2	4,3	4,1	3,0
20	40	2,4	4,1	3,9	3,0
21	42	6,0	4,6	5,1	4,9
22	44	4,9	6,0	4,8	4,3
23	46	4,6	3,8	3,5	2,8
24	48	6,1	4,6	6,5	4,7
25	50	5,1	4,3	4,3	2,8

Tabela 9.5 – Valores de temperatura nos tanques sem recirculação e com recirculação

Temperatura (°C)			
Coleta	Dia	Tanques de Cultivo	
		Sem	Com
0	0	23,0	25,0
1	2	28,0	27,0
2	4	28,0	27,5
3	6	26,0	26,0
4	8	23,0	25,5
5	10	24,5	27,5
6	12	24,0	27,0
7	14	26,0	29,5
8	16	25,5	28,0
9	18	26,5	28,0
10	20	25,5	27,5
11	22	28,0	27,5
12	24	24,5	26,5
13	26	24,0	26,0
14	28	25,0	25,0
15	30	24,0	26,0
16	32	28,0	27,0
17	34	25,0	29,0
18	36	25,5	29,0
19	38	26,0	30,0
20	40	25,5	28,5
21	42	24,5	26,5
22	44	26,0	25,0
23	46	26,0	29,0
24	48	27,0	30,0
25	50	25,0	27,0

Tabela 9.6 – Valores de pH nos pontos de coleta

pH					
Número da Coleta	Dia	Pontos de Coleta			
		Sem	Com	Ret	SF
0	0	6,6	6,6		
1	2	6,6	7,1	6,6	6,5
2	4	6,1	6,8	6,4	6,0
3	6	6,6	6,9	6,8	6,8
4	8	6,8	6,8	6,5	6,6
5	10	6,7	6,6	6,7	6,6
6	12	6,2	6,8	6,8	6,9
7	14	6,1	6,1	6,6	6,6
8	16	6,5	6,5	6,4	6,5
9	18	6,2	6,9	7,1	6,9
10	20	6,2	6,5	6,3	6,4
11	22	5,7	6,1	6,1	6,2
12	24	6,2	5,5	5,1	5,4
13	26	6,2	5,3	5,5	5,4
14	28	6,3	6,0	5,9	5,4
15	30	5,7	5,9	5,9	6,0
16	32	5,5	6,7	6,7	6,7
17	34	6,0	6,6	6,6	6,7
18	36	5,9	6,6	6,5	6,4
19	38	6,3	6,7	6,6	6,6
20	40	6,3	6,6	6,7	6,5
21	42	6,4	6,6	6,5	6,5
22	44	6,5	6,5	6,6	6,5
23	46	6,3	7,0	6,8	7,0
24	48	6,5	6,9	6,8	6,6
25	50	6,5	6,9	6,7	6,8

Tabela 9.7 – Valores de alcalinidade nos pontos de coleta

Alcalinidade (mg/L de CaCO₃)					
Número da Coleta	Dia	Pontos de Coleta			
		Sem	Com	Ret	SF
0	0	18,5	18,0		
1	2	19,5	19,0	18,2	18,0
2	4	32,9	31,9	32,8	29,7
3	6	41,6	45,0	48,1	44,1
4	8	39,4	43,6	44,0	44,0
5	10	35,5	43,6	43,7	42,4
6	12	24,8	42,4	44,5	43,3
7	14	23,2	38,8	44,6	44,1
8	16	16,0	40,3	44,5	42,2
9	18	13,7	44,6	45,6	43,4
10	20	10,4	36,0	36,1	35,9
11	22	9,1	23,9	24,6	23,4
12	24	13,2	5,1	4,8	4,3
13	26	25,9	3,9	4,8	4,7
14	28	21,1	9,1	9,7	8,1
15	30	12,1	20,2	21,2	19,8
16	32	7,6	39,9	40,8	39,3
17	34	15,7	37,4	38,8	37,5
18	36	16,3	26,6	27,4	26,5
19	38	33,5	34,2	34,9	33,4
20	40	30,5	27,3	27,4	26,5
21	42	21,0	21,4	21,6	21,3
22	44	19,6	15,4	17,0	15,4
23	46	34,2	51,2	53,6	53,2
24	48	33,3	43,8	43,6	41,8
25	50	40,1	49,8	49,3	50,1

Tabela 9.8 – Valores de carbono orgânico total nos pontos de coleta

Carbono Orgânico Total (mg/L)					
Número da Coleta	Dia	Pontos de Coleta			
		Sem	Com	Ret	SF
0	0	4,4	4,9		
1	2	8,9	11,4	10,5	10,8
2	4	23,5	14,9	21,5	18,7
3	6	16,1	18,5	22,5	16,3
4	8	20,0	23,5	19,3	17,2
5	10	18,0	22,0	22,8	18,9
6	12	10,5	15,8	22,1	17,5
7	14	13,6	14,3	14,5	18,1
8	16	9,2	14,7	12,5	10,8
9	18	11,0	13,8	14,4	12,6
10	20	10,0	8,9	10,1	9,1
11	22	8,3	9,6	8,0	7,3
12	24	9,2	7,1	7,7	6,6
13	26	13,1	8,6	10,1	8,7
14	28	11,7	13,8	11,9	13,0
15	30	15,2	12,8	14,4	13,3
16	32	11,3	19,8	17,8	18,6
17	34	26,4	21,3	29,7	21,2
18	36	16,8	20,3	22,5	21,4
19	38	13,9	17,1	20,3	18,8
20	40	17,2	21,6	24,6	22,9
21	42	19,6	19,5	21,3	19,3
22	44	17,5	24,1	19,7	20,5
23	46	21,2	30,1	31,3	30,7
24	48	26,4	18,8	26,3	23,4
25	50	23,3	29,3	31,1	28,8

Tabela 9.9 – Valores de sólidos totais nos pontos de coleta

Sólidos Totais (mg/L)					
Número da Coleta	Dia	Pontos de Coleta			
		Sem	Com	Ret	SF
0	0	260	0		
1	2	160	120	0	0
2	4	320	80	400	340
3	6	580	280	540	600
4	8	440	480	620	300
5	10	120	40	400	120
6	12	440	320	640	680
7	14	100	100	100	140
8	16	440	440	620	420
9	18	80	180	160	120
10	20	160	20	140	320
11	22	700	600	600	640
12	24	80	140	240	20
13	26	140	100	100	60
14	28	-	-	60	100
15	30	40	80	80	140
16	32	420	560	780	600
17	34	300	420	460	420
18	36	480	560	460	560
19	38	340	340	460	460
20	40	240	300	480	440
21	42	60	280	460	360
22	44	460	760	820	740
23	46	20	360	420	380
24	48	0	240	340	400
25	50	380	640	680	480

Tabela 9.10 – Valores de sólidos suspensos nos pontos de coleta

Sólidos Suspensos (mg/L)					
Número da Coleta	Dia	Pontos de Coleta			
		Sem	Com	Ret	SF
0	0	20	0		
1	2	30	30	20	30
2	4	10	0	0	0
3	6	40	0	30	0
4	8	40	10	20	10
5	10	0	20	20	0
6	12	0	10	50	0
7	14	20	10	90	10
8	16	50	10	100	10
9	18	0	0	20	0
10	20	10	0	10	10
11	22	10	20	40	10
12	24	20	40	30	0
13	26	0	0	10	0
14	28	0	0	20	0
15	30	10	0	20	0
16	32	20	0	40	0
17	34	10	0	20	0
18	36	120	0	10	0
19	38	50	0	0	0
20	40	40	0	10	0
21	42	40	10	20	0
22	44	50	20	110	20
23	46	20	0	30	0
24	48	40	10	40	0
25	50	40	0	40	0

Tabela 9.11 – Valores de sólidos dissolvidos nos pontos de coleta

Sólidos Dissolvidos (mg/L)					
Número da Coleta	Dia	Pontos de Coleta			
		Sem	Com	Ret	SF
0	0	240	0		
1	2	130	90	0	0
2	4	310	80	400	340
3	6	540	280	510	600
4	8	400	470	600	290
5	10	120	20	380	120
6	12	440	310	590	680
7	14	80	90	10	130
8	16	390	430	520	410
9	18	80	180	140	120
10	20	150	20	130	310
11	22	690	580	560	630
12	24	60	100	210	20
13	26	140	100	90	60
14	28	-	-	40	100
15	30	30	80	60	140
16	32	400	560	740	600
17	34	290	420	440	420
18	36	360	560	450	560
19	38	290	340	460	460
20	40	200	300	470	440
21	42	20	270	440	360
22	44	410	740	710	720
23	46	0	360	390	380
24	48	0	230	300	400
25	50	340	640	640	480

Tabela 9.12 – Valores de condutividade nos pontos de coleta

Condutividade (μMHOs)					
Número da Coleta	Dia	Pontos de Coleta			
		Sem	Com	Ret	SF
0	0	123	120		
1	2	128	119	119	120
2	4	175	160	169	165
3	6	182	192	189	189
4	8	169	177	176	179
5	10	177	185	188	188
6	12	186	200	203	199
7	14	180	195	199	195
8	16	187	212	222	210
9	18	165	190	192	190
10	20	176	198	201	200
11	22	158	162	162	161
12	24	163	158	160	168
13	26	195	180	185	180
14	28	182	217	218	218
15	30	200	295	296	294
16	32	225	387	385	387
17	34	229	405	406	405
18	36	260	440	440	420
19	38	282	550	550	550
20	40	222	453	450	448
21	42	203	452	457	458
22	44	227	590	590	580
23	46	272	650	660	650
24	48	230	590	590	590
25	50	260	580	580	590

Tabela 9.13 – Valores de salinidade nos pontos de coleta

Salinidade (ppt)					
Número da Coleta	Dia	Pontos de Coleta			
		Sem	Com	Ret	SF
0	0	0,10	0,10		
1	2	0,10	0,10	0,10	0,10
2	4	0,10	0,10	0,10	0,10
3	6	0,10	0,10	0,10	0,10
4	8	0,20	0,20	0,20	0,20
5	10	0,10	0,10	0,10	0,10
6	12	0,10	0,15	0,15	0,15
7	14	0,15	0,15	0,15	0,15
8	16	0,15	0,15	0,15	0,15
9	18	0,15	0,15	0,15	0,15
10	20	0,15	0,20	0,20	0,20
11	22	0,10	0,15	0,15	0,15
12	24	0,15	0,15	0,15	0,15
13	26	0,20	0,20	0,20	0,20
14	28	0,15	0,20	0,20	0,20
15	30	0,15	0,30	0,30	0,30
16	32	0,15	0,35	0,35	0,35
17	34	0,20	0,40	0,40	0,40
18	36	0,20	0,50	0,50	0,50
19	38	0,30	0,50	0,50	0,50
20	40	0,20	0,50	0,50	0,50
21	42	0,30	0,50	0,50	0,50
22	44	0,30	0,60	0,60	0,60
23	46	0,20	0,50	0,50	0,50
24	48	0,20	0,50	0,50	0,50
25	50	0,20	0,50	0,50	0,50

Tabela 9.14 – Valores de turbidez nos pontos de coleta

Turbidez (NTU)					
Número da Coleta	Dia	Pontos de Coleta			
		Sem	Com	Ret	SF
0	0	1,0	1,1		
1	2	1,9	4,1	2,1	1,8
2	4	8,2	1,7	4,7	1,8
3	6	7,5	1,8	7,5	2,2
4	8	8,8	1,6	4,4	1,6
5	10	5,0	1,6	2,5	1,5
6	12	4,2	2,0	9,8	1,9
7	14	3,3	4,0	24,0	5,0
8	16	3,7	3,8	19,0	4,3
9	18	2,8	1,6	5,1	1,9
10	20	4,9	0,6	2,9	0,6
11	22	5,3	1,0	3,2	0,8
12	24	4,0	0,7	2,8	0,8
13	26	3,7	1,2	7,5	1,2
14	28	3,2	1,5	4,2	1,5
15	30	5,0	3,2	4,4	2,8
16	32	3,7	3,8	19,0	4,3
17	34	6,7	3,1	7,3	3,2
18	36	8,2	2,5	3,8	2,4
19	38	16,0	2,1	8,0	1,9
20	40	4,7	1,6	4,3	1,8
21	42	8,4	1,6	2,6	1,6
22	44	8,1	1,9	12,0	1,9
23	46	8,7	1,9	4,8	2,2
24	48	6,8	1,2	5,8	1,8
25	50	8,8	1,3	1,2	4,4

Tabela 9.15 – Percentual de células hibridizadas – Controle Negativo

Percentual de Células Hibridizadas Cy3/DAPI - Controle Negativo (%)			
N° do campo	N° da Coleta		
	21	23	25
1	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,00	0,00
3	0,00	0,00	0,00
4	0,00	0,59	1,29
5	3,75	0,00	0,35
6	0,85	0,00	0,48
7	0,00	0,00	0,00
8	0,37	0,00	0,36
9	0,00	0,00	1,03
10	0,00	0,00	1,16

Tabela 9.16 – Percentual de células hibridizadas – Eubactérias

Percentual de Células Hibridizadas Cy3/DAPI – Eubactérias (%)			
N° do campo	N° da Coleta		
	21	23	25
1	23,88	21,67	11,89
2	29,36	32,26	16,62
3	27,72	32,50	15,10
4	39,21	31,45	27,53
5	56,08	21,80	10,37
6	17,52	10,23	10,68
7	17,30	9,56	8,62
8	16,26	25,94	11,81
9	22,70	17,93	9,76
10	22,04	20,18	10,80

Tabela 9.17 – Percentual de células hibridizadas – α – Proteobacteria

Percentual de Células Hibridizadas Cy3/DAPI - α – Proteobacteria (%)			
N° do campo	N° da Coleta		
	21	23	25
1	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,56	0,46
3	0,33	0,00	0,00
4	0,00	0,00	0,00
5	1,08	0,38	0,00
6	1,31	1,63	0,00
7	0,01	2,58	0,00
8	0,00	0,25	0,00
9	0,51	1,75	0,00
10	0,00	3,07	0,00

Tabela 9.18 – Percentual de células hibridizadas – β – Proteobacteria

Percentual de Células Hibridizadas Cy3/DAPI - β – Proteobacteria (%)			
N° do campo	N° da Coleta		
	21	23	25
1	4,36	2,93	0,00
2	9,85	0,00	0,64
3	24,75	0,57	2,68
4	19,79	6,19	0,52
5	19,05	1,10	0,20
6	23,22	3,19	1,84
7	16,24	5,26	3,53
8	13,12	4,81	1,69
9	12,55	1,69	7,28
10	26,06	1,12	5,29

Tabela 9.19 – Percentual de células hibridizadas – γ - Proteobacteria

Percentual de Células Hibridizadas Cy3/DAPI - γ- Proteobacteria (%)			
N° do campo	N° da Coleta		
	21	23	25
1	11,62	6,70	0,41
2	11,15	11,25	9,87
3	10,70	6,48	20,44
4	13,10	8,48	9,49
5	13,05	10,65	5,85
6	9,67	10,35	4,29
7	16,17	18,30	9,24
8	11,75	13,09	11,05
9	16,56	10,95	13,03
10	19,05	6,30	6,90

Tabela 9.20 – Percentual de células hibridizadas – *Cytophaga* – *Flavobacter*

Percentual de Células Hibridizadas Cy3/DAPI - <i>Cytophaga</i> – <i>Flavobacter</i> (%)			
N° do campo	N° da Coleta		
	21	23	25
1	2,88	0,00	0,00
2	3,12	0,00	0,00
3	3,11	0,00	0,00
4	6,59	0,00	1,19
5	10,99	1,66	1,43
6	4,63	5,06	0,98
7	1,39	3,34	1,34
8	7,19	0,35	3,73
9	10,87	0,87	4,18
10	0,36	4,65	4,49

Tabela 9.21 – Percentual de células hibridizadas – *Nitrobacter* sp.

Percentual de Células Hibridizadas Cy3/DAPI - <i>Nitrobacter</i> sp.NIT (%)			
N° do campo	N° da Coleta		
	21	23	25
1	1,43	0,66	3,49
2	5,38	3,24	5,49
3	2,58	17,63	9,37
4	2,84	2,54	4,77
5	3,21	2,50	3,71
6	2,56	8,12	4,61
7	1,14	5,43	3,55
8	12,00	3,96	3,46
9	3,67	6,19	7,64
10	2,63	4,29	10,06

Tabela 9.22 – Percentual de células hibridizadas – AOB β (NSO190)

Percentual de Células Hibridizadas Cy3/DAPI - AOB β (NSO190) (%)			
N° do campo	N° da Coleta		
	21	23	25
1	0,29	2,22	0,31
2	0,00	1,96	1,91
3	0,00	0,00	10,64
4	0,34	2,09	5,78
5	1,59	4,22	4,84
6	1,13	11,12	3,10
7	0,00	1,33	10,21
8	0,93	4,77	11,88
9	0,69	4,01	8,62
10	0,33	3,66	3,41

Tabela 9.23 – Percentual de células hibridizadas – AOB β (NSO1225)

Percentual de Células Hibridizadas Cy3/DAPI - AOB β (NSO1225) (%)			
N° do campo	N° da Coleta		
	21	23	25
1	0,51	6,84	1,97
2	2,49	3,72	0,40
3	0,00	5,24	8,15
4	0,00	9,86	4,10
5	1,79	2,40	7,07
6	1,80	8,97	8,39
7	2,21	8,99	4,42
8	5,25	5,74	6,09
9	11,04	4,68	6,28
10	17,34	5,50	4,41

Tabela 9.24 – Percentual de células hibridizadas – *Nitrococcus mobilis*

Percentual de Células Hibridizadas Cy3/DAPI - <i>Nitrococcus mobilis</i> NTCOC (%)			
N° do campo	N° da Coleta		
	21	23	25
1	1,41	9,73	0,00
2	0,42	13,53	2,40
3	2,03	7,54	3,41
4	0,54	1,77	5,26
5	2,50	6,28	1,68
6	1,13	5,46	2,73
7	1,07	9,89	4,76
8	0,19	4,72	4,61
9	5,14	9,00	0,68
10	5,56	7,66	2,58

Tabela 9.25 – Percentual de células hibridizadas – *Pseudomonas fluorescens*

Percentual de Células Hibridizadas Cy3/DAPI - <i>Pseudomonas fluorescens</i> Ag1 (%)			
N° do campo	N° da Coleta		
	21	23	25
1	1,83	3,60	0,56
2	2,32	6,16	1,94
3	1,72	6,30	1,86
4	2,09	3,58	2,09
5	1,43	6,99	1,68
6	1,29	12,52	1,57
7	3,67	9,64	4,53
8	9,12	7,99	2,38
9	7,26	12,29	1,42
10	7,44	12,84	2,14

Tabela 9.26 – Percentual de bactérias filamentosas grandes em relação ao DAPI total

Percentual de Bactérias Filamentosas Grandes (%)			
N° de repetições	N° da Coleta		
	21	23	25
1	0,85	2,34	1,17
2	1,15	1,66	1,55
3	0,74	1,58	1,20
4	1,49	2,08	2,14
5	1,25	1,53	2,34
6	0,91	1,50	1,34
7	1,40	1,21	1,13
8	0,58	1,59	1,92
9	1,06	1,18	1,31
10	0,52	1,53	0,69
11	1,25	1,52	1,67

Tabela 9.27 – Percentual de bactérias filamentosas médias em relação ao DAPI total

Percentual de Bactérias Filamentosas Médias (%)			
N° de repetições	N° da Coleta		
	21	23	25
1	1,01	4,89	2,77
2	1,07	4,59	3,75
3	1,47	3,49	2,84
4	2,75	3,14	4,16
5	2,02	3,55	4,09
6	2,09	3,42	3,25
7	1,28	2,77	3,03
8	1,97	2,86	3,08
9	1,06	2,80	2,94
10	1,83	2,95	2,13
11	1,63	2,23	2,21

Tabela 9.28 – Percentual de bactérias filamentosas pequenas em relação ao DAPI total

Percentual de Bactérias Filamentosas Pequenas (%)			
N° de repetições	N° da Coleta		
	21	23	25
1	5,36	13,49	12,38
2	6,95	12,21	13,87
3	8,58	11,71	12,84
4	10,70	11,98	13,05
5	7,44	12,01	11,72
6	9,70	11,52	12,28
7	5,24	9,23	12,27
8	11,18	11,62	12,13
9	10,46	12,22	12,89
10	9,35	11,97	12,57
11	8,40	11,48	13,31

Tabela 9.29 – Percentual de bactérias filamentosas totais em relação ao DAPI total

Percentual de Bactérias Filamentosas Totais (%)			
N° de repetições	N° da Coleta		
	21	23	25
1	7,22	20,72	16,32
2	9,16	18,46	19,16
3	10,78	16,77	16,88
4	14,93	17,20	19,35
5	10,71	17,09	18,15
6	12,70	16,43	16,87
7	7,92	13,21	16,42
8	13,73	16,08	17,14
9	12,58	16,21	17,14
10	11,71	16,46	15,40
11	11,28	15,23	17,19