

CARACTERIZAÇÃO DA ASSEMBLÉIA DE BACTÉRIAS NITRIFICANTES PELO MÉTODO "FLUORESCENT *IN SITU* HYBRIDIZATION" (FISH) NO BIOFILME E ÁGUA DE LARVICULTURA DO CAMARÃO-ROSA *FARFANTEPENAEUS PAULENSIS*.

SIMONE SOARES OLIVEIRA, WILSON WASIELESKY JR., EDUARDO L. C. BALLESTER & PAULO CESAR ABREU
 Fundação Universidade Federal do Rio Grande – Laboratório de Ecologia de Fitoplâncton e Microorganismos Marininhos
 Departamento de Oceanografia – CxPostal: 474 – CEP: 96201-900 – Rio Grande – RS/Brasil
 E-mail: simoneoli@gmail.com

RESUMO

Entre novembro e dezembro de 2002 foi realizado um experimento na Estação Marinha de Aqüicultura - EMA/FURG, Rio Grande - RS/Brasil, durante a larvicultura do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis*. Substratos artificiais foram adicionados aos tanques para formação de biofilme. Estes eram coletados diariamente para análise de clorofila-*a* e determinação da abundância e composição da assembléia de bactérias utilizando FISH ("Fluorescent *in situ* Hybridization"). As mesmas variáveis foram analisadas em amostras de água dos cultivos, além de medida da concentração de amônia, nitrito e nitrato. No início do experimento foi observada a maior concentração de amônia na água, que atingiu 413.98 µM diminuindo para 73.92µM em seguida. Através do balanço de massa de nitrogênio foi possível verificar que a maior absorção de nitrogênio dos tanques ocorreu devido a nitrificação (22.3%). Os processos de nitrificação e desnitrificação tiveram grande importância na remoção de compostos nitrogenados em tanques de larvicultura, representando uma remoção de 39% da amônia presente na água. A concentração de compostos nitrogenados influenciou a composição da assembléia de bactérias no biofilme e na água, principalmente com a predominância dos grupos β- e γ-proteobactérias, relacionadas com a variação da amônia, enquanto bactérias do grupo α-proteobactéria estiveram relacionadas com a variação de nitrito.

PALAVRAS-CHAVE: Aqüicultura; ecologia microbiana; nitrificação; biologia molecular; ciclagem nutrientes.

ABSTRACT

Between November and December of 2002, one experiment was conducted in the Laboratory of Mariculture of FURG University, Rio Grande – RS/Brazil, during the larviculture of the pink-shrimp *Farfantepenaeus paulensis*. Artificial substrates were added to the tanks for biofilm formation, and were daily collected and analyzed for chlorophyll *a* and abundance and composition of bacterial assemblage by the Fluorescent *in situ* hybridization-FISH technique. The same variables were also analyzed in water samples collected daily besides the concentration of ammonium, nitrite and nitrate. Largest ammonium concentration were measured in the beginning of the larviculture experiment, reaching 413.98 µM and decreasing to 73.92 µM in the following days. A nitrogen mass balance showed that the largest uptake of nitrogen in the tanks resulted from nitrification process (22.3%). Nitrification/denitrification processes showed very important in the nitrogen elimination on larviculture tanks, the 39% of the ammonium was eliminated of the water for this way. The concentration of nitrogen compounds influenced the composition of the bacterial assemblage in the biofilm and water, with the predominance of β- and γ-proteobacteria groups, related to the ammonium variation, whereas the α-proteobacteria were related to the nitrite variation.

KEY-WORDS: Aquaculture; microbial ecology; nitrification; molecular biology; nutrient cycling

1 – INTRODUÇÃO

Uma das principais preocupações com os sistemas de cultivo intensivo de camarão é o acúmulo de produtos nitrogenados, especialmente amônia (NH₄). Vários autores já demonstraram que o acúmulo desse composto pode ser tóxico para os camarões, afetando seu consumo alimentar, crescimento e sobrevivência (Cavalli *et al.* 1996; Miranda F^o 1997; Ostrensky & Poerch 1992; Ostrensky & Wasielesky 1995; Tomasso 1994; Wasielesky *et al.* 1994).

Thompson *et al.* (2002), em um estudo sobre a eficiência do biofilme (matriz orgânica colonizada por microorganismos que se estabelece sobre qualquer superfície submersa) na manutenção da qualidade de água em tanques de cultivo, relacionaram a diminuição na concentração de amônia, principalmente à absorção deste elemento pelas microalgas e cianobactérias presentes no biofilme. Entretanto, o surgimento de compostos nitrogenados menos tóxicos como nitrito e nitrato nos tanques de cultivo após os máximos valores de amônia alcançados, indicaram que as bactérias nitrificantes presentes no biofilme e na água têm também um importante papel na manutenção da qualidade da água.

Além da manutenção da qualidade de água, os microorganismos presentes no biofilme podem ter grande importância como fonte de alimento para os organismos cultivados e no controle das doenças (Abreu *et al.* 1998; Thompson *et al.*). Porém, pouco se sabe sobre a estrutura da comunidade de bactérias que compõem o biofilme. O grande obstáculo para essa compreensão tem sido a dificuldade na identificação das bactérias devido às técnicas convencionalmente utilizadas. Com o avanço da biologia molecular e o uso dessas novas técnicas no estudo da

ecologia de microorganismos, é possível agora identificar grupos filogenéticos, determinar a variação espacial e temporal de espécies de microorganismos e elucidar função e atividade das comunidades microbianas diretamente em amostras coletadas no ambiente, sem a necessidade de cultivo mono-específicos de bactérias (Aoi 2002).

Neste estudo foi empregado o método de biologia molecular denominado "Fluorescent *in situ* Hybridization" (FISH) (Pernthaler *et al.* 2000), que permite enumerar e identificar grupos de bactérias provenientes de amostras do ambiente. Este método é baseado na hibridização com marcadores (sondas) fluorescentes de segmentos do 16S-rRNA, que demarcam bactérias de espécies ou grupos específicos. Em princípio, a técnica FISH permite não só a identificação filogenética de grandes grupos, mas também a determinação da abundância e tamanho das células demarcadas.

As bactérias nitrificantes fazem parte dos grupos α , β , e γ -proteobactéria e são responsáveis pela oxidação da amônia a nitrato via nitrito (nitrificação) e seguido pela desnitrificação, que reduz o nitrato a nitrogênio gasoso, processos que também reduzem o nível de amônia nos tanques de cultivo. As subclasses β , e γ , da classe *Proteobacteria*, contém a maior parte das espécies de bactérias nitrificantes, isto é, aquelas responsáveis pela oxidação da amônia. Entre estas, se destacam os gêneros *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* e *Nitrospira* (Bothe *et al.* 2000). Vários trabalhos têm sido realizados aplicando-se o método FISH para estudo das comunidades de bactérias nitrificantes em biofilme. Araya *et al.* (2002) encontrou dominância do grupo β -proteobactéria no biofilme bacteriano em um rio eutrófico; Biesterfeld *et al.* (1998) analisando biofilme em filtros, encontrou forte correlação entre a presença de bactérias dos grupos α - e β -proteobactéria e redução dos níveis de amônia em água doce, enquanto que Hovanec *et al.* (1998), combinando o uso de FISH e monitoramento da química da água, sugeriu uma correspondência entre mudanças na composição da comunidade bacteriana e o início da oxidação da amônia.

Rickard *et al.* (2003a) identificaram grupos de bactérias pelo seqüenciamento parcial de genes do 16S rRNA e encontraram que o biofilme formado num tanque de vidro era composto por 29 grupos de bactérias heterotróficas e 15 destes grupos são encontrados no plâncton. Hibiya *et al.* (2003) revelaram em seu estudo utilizando FISH que bactérias que oxidam amônia estão distribuídas principalmente no interior do biofilme e as demais bactérias, juntamente com as denitrificantes, estão localizadas nas regiões mais externas. O método FISH foi também utilizado por Falkentoft *et al.* (2002) para identificar modificações na composição da população bacteriana num biofilme utilizado para a remoção de fósforo. Dang & Lovell (2000) encontraram que o biofilme é composto principalmente por grupos afiliados de *Roseobacter* (α -proteobactéria) e *Alteromonas* (γ -proteobactéria) em seus estágios de colonização, utilizando ARDRA (amplified DNA restriction analysis) e Okabe *et al.* (1999) utilizaram FISH para analisar a organização espacial das bactérias nitrificantes num biofilme de tratamento de esgoto doméstico e encontraram que o gênero *Nitrosomonas* é o mais abundante entre as bactérias que oxidam amônia.

Da mesma forma, a partir desta técnica de biologia molecular, pretende-se esclarecer neste trabalho alguns aspectos da sucessão microbiana durante a formação do biofilme, bem como estabelecer a importância das bactérias nitrificantes na ciclagem de nutrientes nitrogenados em tanques de cultivo.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um experimento durante a larvicultura do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Pérez Farfante 1967) (Decapoda-Penaeidae), na Estação Marinha de Aquicultura - EMA/FURG, sul do Brasil. O experimento foi conduzido em dois tanques de concreto cilíndrico-cônicos (previamente limpos com cloro para remoção de biofilme existente) com capacidade para 12000 L, com área de fundo de 10 m² e 3.6m de diâmetro interno, localizados no setor de larvicultura (EMA-FURG), que eram abastecidos com água salgada filtrada em filtros de areia. A metodologia utilizada na rotina da larvicultura segue protocolo proposto por Santos (2003) rotineiramente utilizadas na EMA para a produção de pós-larvas. A renovação de água teve início somente no nono dia de experimento quando, a partir daí, manteve uma média diária de renovação de 70% do volume total do tanque.

Foram estocados aproximadamente 416 naúplios II.L⁻¹ de *F. paulensis* em cada tanque, provenientes de

desovas em laboratório de matrizes capturadas no litoral de Santa Catarina, Brasil. O tipo e a quantidade de alimento fornecido foi diferenciado em função de cada estágio larval (Wasielesky 2000).

Para análise da formação do biofilme, foram colocadas junto à parede do tanque 35 placas de PVC de 6x6 cm, previamente lixadas e pintadas com tinta EPOXI, reproduzindo as mesmas condições físicas da parede do tanque. Estas placas eram coletadas diariamente, perfazendo 35 dias de experimento. A cada dois dias foram coletadas amostras de água para análise de amônia ($N-NH_3 + NH_4$; UNESCO 1983), nitrito ($N-NO_2$) e nitrato ($N-NO_3$) (Strickland & Parsons 1972) em três repetições para cada tanque. A temperatura da água foi medida diariamente utilizando termômetro de mercúrio com precisão de 0.5°C.

Para obtenção da concentração de clorofila *a*, pedaços de 2x2 cm das placas foram colocados em vials com 10 ml de acetona 90% (Merck® PA), armazenados no escuro por 24 h a -12°C. A medida do teor de clorofila *a* foi realizada utilizando um fluorímetro Turner TD700, previamente calibrado, de acordo com Welschmeyer (1994).

O biofilme das placas foi extraído utilizando-se um aparelho de ultra-som (Cole Palmer Mod. 4710 Series Ultrasonic Homogenizer) aplicando-se três pulsos de 15 segundos em cada lado da placa, numa frequência de 20 kHz. O biofilme foi ressuspendido em água salgada filtrada e concentrada em filtro de policarbonato Nuclepore 0.2 µm. As bactérias do biofilme retidas no filtro e também da água do tanque foram fixadas com paraformaldeído 2% recém preparado. A preparação das amostras pelo método FISH foi realizada de acordo com o protocolo proposto por Pernthaler *et al.* (2000), com algumas modificações, como descrito a seguir.

Cada filtro (amostra) foi cortado em seções, mantendo sempre pedaços de filtro reservados para a necessidade de repetição do procedimento. Para cada sonda, um pedaço de filtro foi colocado sobre uma lâmina de vidro coberta com parafilme. Em seguida foi adicionado sobre cada pedaço de filtro 40 µl da solução contendo a sonda específica em uma concentração final de 2.5 ng.µl⁻¹. As lâminas foram colocadas em tubos fechados, um para cada sonda, saturados com solução de hibridização (NaCl 0.9 M; Tris-HCl 20 mM pH 7.2; EDTA 5 mM; SDS 0.01%; formamida 30%). Estes tubos foram incubados a 42°C por uma noite em estufa bacteriológica. Após este período de hibridização, as amostras foram transferidas para placa de acrílico contendo solução de lavagem (Tris-HCl 20 mM pH 7.2; EDTA 10 mM; SDS 0.01%; NaCl 102 mM) e mantidas durante 15 min a 48°C novamente em estufa. Posteriormente, cada pedaço de filtro foi corado com DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole) numa concentração de 20 µg.µl⁻¹ por 3 minutos e lavados em etanol 80%. Os pedaços de filtro foram então colocados entre lâmina e lamínula, utilizando-se como óleo de imersão uma mistura de Citifluor e Vectashield. Para confecção das lâminas pelo método FISH foram selecionados dias específicos dos experimentos, relacionados às maiores variações dos compostos nitrogenados na água.

Para esta análise foram utilizadas as seguintes sondas: Eubactéria (Controle Positivo) (5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3') Controle Negativo (5'- CCTAGTGACGCCGTCGAC -3'), Alfa 968 (5'-GGTAAGGTTCTGCGGTT-3') (Amann *et al.* 1990), Beta 42a (5'-GCCTTCCCCTTCGTTT-3') e Gama 42a (5'- GCCTTCCCACATCGTTT-3') (Manz *et al.* 1992), obtidas comercialmente da empresa Operon Technologies®. O controle negativo é uma sonda que apresenta uma seqüência não compatível com qualquer grupo de bactérias e é empregado para avaliar a eficiência de hibridização. O total de células negativas encontradas deve ser subtraído do total de células hibridizadas com marcadores específicos, e estas não devem superar a 10% do total de bactérias determinado pela contagem de bactérias marcadas com DAPI. Caso contrário, a amostra deve ser descartada. O controle positivo foi utilizado para nos certificar que as células contadas pertenciam ao grupo Eubactéria.

As bactérias marcadas com as sondas e com DAPI 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) e filtro HQ:CY3 (HQ 545/30, 610/75, Q570/p). A quantificação das bactérias foi realizada a partir de imagens captadas das lâminas utilizando câmera de vídeo CCD Watec, com sensibilidade luminosa de 0,0003 lux, acoplada ao microscópio de epifluorescência e a um microcomputador. Para captura das imagens foi utilizado o programa Capture X (X'treme 98 Windows 98). De cada amostra foram obtidas 5 imagens, que foram analisadas com o programa "freeware" Image Tool-UTHSCA (University of Texas Health Science Center, San Antonio – Texas/USA).

Foi realizado um balanço de massa de nitrogênio a fim de se avaliar a importância de determinados

processos na absorção de amônia nos tanques e assim determinar qual compartimento seria o maior responsável pela retirada deste elemento nitrogenado. Para avaliar o conteúdo de nitrogênio das bactérias livres e aderidas, foi utilizada a seguinte equação: $B = \text{Abund} \times f \times \text{BV}_{\text{médio}}$, onde abund = abundância média de bactérias em mL ou cm^2 ; $f = 60,15 \text{ fgN}\mu\text{m}^{-3}$, um fator médio de conversão para nitrogênio sugerido por Kemp *et al.* (1993) e $\text{BV}_{\text{médio}}$ é o biovolume médio das bactérias que neste caso foi utilizado o valor de $1 \mu\text{m}^3$. A determinação do conteúdo de nitrogênio das microalgas foi realizado através relação molar de 50:1 para C:Cl_a, e a partir deste extrapolado para nitrogênio através da razão atômica de Redfield (106C:16N:1P – Brock 1985; De Angelis 1992). A taxa de nitrificação foi calculada através da soma nitrito + nitrato após a diminuição da amônia e a desnitrificação e volatilização da amônia através de taxas sugeridas na bibliografia (16.4% por desnitrificação – Páez-Osuna *et al.* 1997; Volatilização da amônia 11% – Vinatea-Arana 1997; Baumgarten *et al.* 1996). Todos resultados foram convertidos em gN e expressos em % sobre o total de nitrogênio.

Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada através de análise de variância (ANOVA – one way, $\alpha=0.05$), depois de verificada a normalidade das variâncias através do teste de Levene e do teste K-S, respectivamente (Sokal & Rohlf 1969). As médias de abundância, e concentração de clorofila *a* nas telas dos tanques dos tratamentos foram submetidas ao “teste t” (Sokal & Rohlf 1969) para detectar a ocorrência de diferenças significativas ($\alpha=0.05$).

3 – RESULTADOS

A larvicultura foi realizada com temperatura da água variando entre 24 e 26°C, fotoperíodo natural e salinidade média de 30.

A concentração de amônia na água dos tanques de larvicultura apresentou três picos e a mesma tendência entre os tanques ($p > 0.05$) (Figura 1), sendo no tempo 2 a maior concentração obtida para os dois tanques (414 e 290 μM , respectivamente). Os picos seguintes apresentaram a concentração de 122 e 130 μM no tempo 4 e 74 e 115 μM no tempo 6, tanques 1 e 2 respectivamente. As menores concentrações obtidas foram no início do experimento, no qual a concentração variou de 3.12 a 3.67 μM . A partir do tempo 6 a água dos tanques passou a ser renovada, numa taxa diária de 70% do volume total. Até então era somente aumentado o volume para adequar ao desenvolvimento larval.

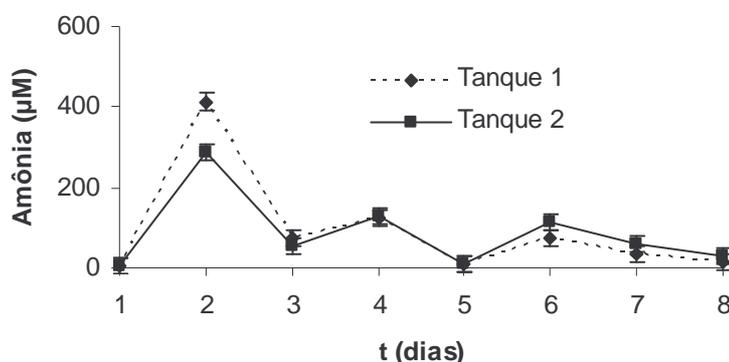


FIGURA 1 – Concentração média±DP de amônia (μM) nos tanques de larvicultura.

A água dos dois tanques apresentaram tendências totalmente diferentes em relação à concentração de nitrito ($p < 0,05$), especialmente após tempo 6, quando esse composto atingiu 11.13 μM e logo em seguida diminuiu para 5.74 μM . No tanque 1, não foram observadas variações significativas ao longo do experimento, e sua

concentração média manteve-se em torno de $1.33 \pm 0.32 \mu\text{M}$ (Figura 2).

Ao contrário do nitrito, a concentração de nitrato não apresentou diferença significativa entre os tanques ($p > 0,05$). No tanque 2 ocorreu um pico no tempo 5 ($22.7 \mu\text{M}$) e essa concentração diminuiu para $8.2 \mu\text{M}$ no tempo 8. O nitrato do tanque 1 manteve sua concentração em torno de $11.34 \mu\text{M} \pm 2.6$, não apresentando variações significativas ao longo do experimento ($p > 0.05$) (Figura 3).

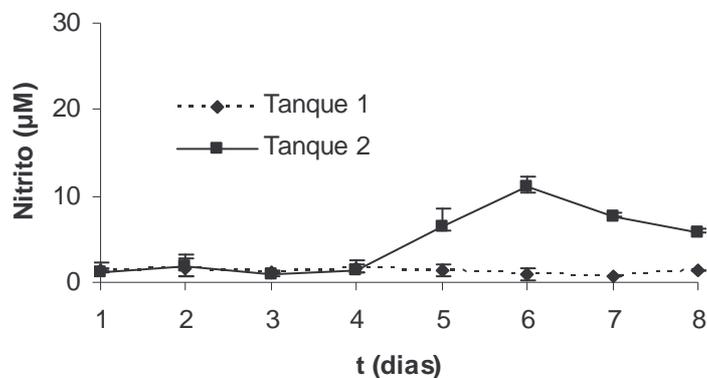


FIGURA 2 – Concentração média \pm DP de nitrito (μM) nos tanques de larvicultura.

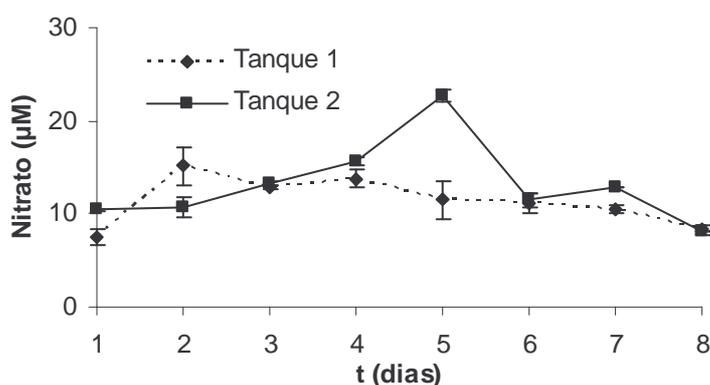


FIGURA 3 – Concentração média \pm DP de nitrato (μM) nos tanques de larvicultura.

A clorofila *a* medida no biofilme extraído das placas dos tanques atingiu sua maior concentração no tempo 6, atingindo $1.21 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ no tanque 1 e $0.56 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ no tanque 2 (Figura 4). A clorofila *a* do tanque 1 apresentou as maiores concentrações observadas (média = $0.54 \pm 0.46 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) enquanto que no tanque 2 a concentração média foi de $0.29 \pm 0.21 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Não houve diferença significativa nas concentrações de clorofila *a* entre os tanques.

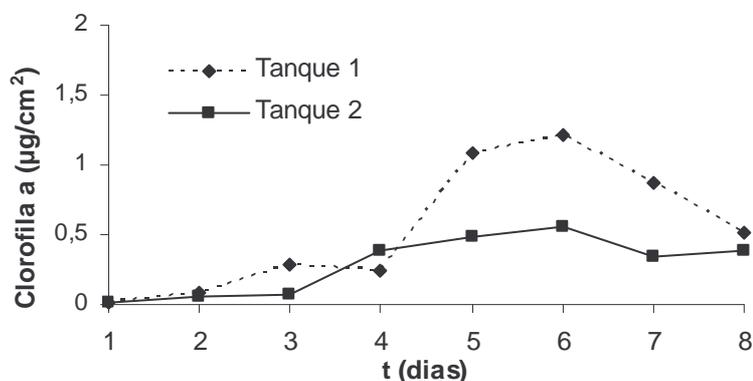


FIGURA 4 – Concentração média \pm DP de clorofila *a* ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) nos tanques de larvicultura.

Não houve diferença significativa entre os grupos α -, β - e γ -proteobactéria na água dos dois tanques. Da mesma forma, a abundância destas bactérias no biofilme das placas apresentou a mesma tendência entre os três grupos analisados. No tempo 4 foi observado um aumento na abundância dos 3 grupos no biofilme do tanque 1 sendo que os grupos β - e γ -proteobactéria apresentaram as maiores abundâncias ($10.89 \cdot 10^6$ bact.cm⁻² e $12.42 \cdot 10^6$ bact.cm⁻²) (Figura 5). No tempo 6 foi observado outro pico para as bactérias do grupo γ - ($7.92 \cdot 10^6$ bact.cm⁻²) e α -proteobactéria ($21.33 \cdot 10^6$ bact. cm⁻²), que atingiram a maior abundância observada ao longo do experimento no tanque 1. Todos os grupos tenderam a reduzir sua abundância ao final do experimento, quando apresentaram $1.58 \cdot 10^6$ bact.cm⁻² grupo α , $0.50 \cdot 10^6$ bact.cm⁻² no grupo β - e $2.10 \cdot 10^6$ bact.cm⁻² do grupo γ -proteobactéria.

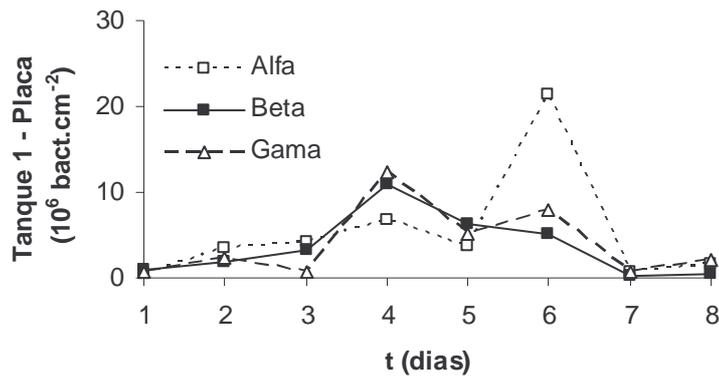


FIGURA 5 – Abundância (10^6 bact.cm⁻²) de α -, β - e γ -proteobactérias no biofilme das placas do tanque 1 da larvicultura.

Na água do tanque 1 (Figura 6), todos grupos apresentaram aumento na abundância no tempo 4, destacando as bactérias do grupo α -proteobactéria, que apresentaram a maior abundância, atingindo $21.33 \cdot 10^6$ bact.mL⁻¹. O grupo β apresentou abundância de $0.78 \cdot 10^6$ bact.mL⁻¹ e o grupo γ $0.49 \cdot 10^6$ bact.mL⁻¹. Os grupos α e β , logo após o aumento do tempo 4, diminuíram sua abundância, chegando a $0,17 \cdot 10^6$ bact.mL⁻¹ e $0.14 \cdot 10^6$ bact.mL⁻¹, respectivamente, e o grupo que se destacou nesse tempo foi o γ -proteobactéria, que atingiu sua abundância máxima no experimento, com $0.68 \cdot 10^6$ bact.mL⁻¹. Os grupos não se diferenciaram estatisticamente na água do tanque 1 ($p > 0,05$).

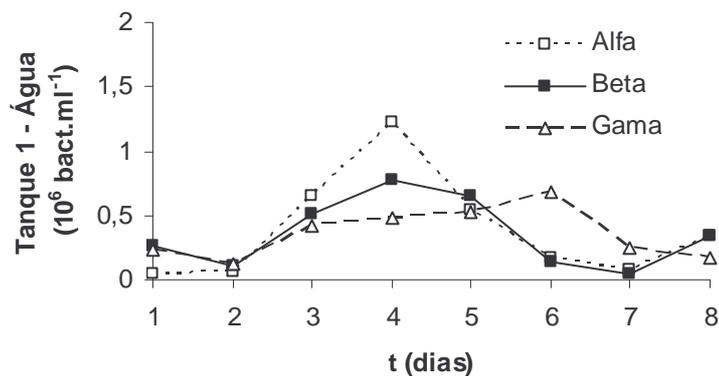


FIGURA 6 – Abundância (10^6 bact.ml⁻¹) de α -, β e γ -proteobactérias na água do tanque 1 da larvicultura.

No biofilme do tanque 2, os maiores valores de abundância bacteriana também ocorreram no tempo 4 (Figura 7), porém, ao contrário do tanque 1, o grupo que se destaca é o das α -proteobactérias, que chegaram a $25.38 \cdot 10^6$ bact.cm⁻². Após essa tempo, há uma diminuição acentuada na abundância de todos os grupos, com

exceção do grupo γ -proteobactéria, que não havia se destacado significativamente no tempo 4, mas atinge $11.95 \cdot 10^6$ bact.cm⁻² no tempo 7, diminuindo para $0.68 \cdot 10^6$ bact.cm⁻² no último dia de experimento (tempo 8). O grupo α -proteobactéria após atingir seu máximo no tempo 4, torna a baixar, atingindo mínimo de $3.2 \cdot 10^6$ bact.cm⁻² (tempo 6) e logo após ocorre um pequeno aumento, para $9,2 \cdot 10^6$ bact.cm⁻² no final do experimento (tempo 8). O grupo β -proteobactéria apresentou a mesma tendência do grupo α -, porém com abundâncias menores, variando de $0.14 \cdot 10^6$ bact.cm⁻² (tempo 3) a $9.54 \cdot 10^6$ bact. cm⁻² (tempo 4).

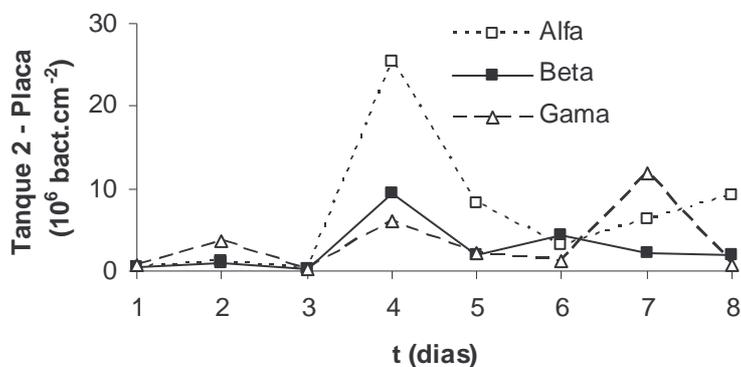


FIGURA 7 – Abundância (10^6 bact.cm⁻²) de α , β e γ -proteobactérias no biofilme das placas do tanque 2 da larvicultura.

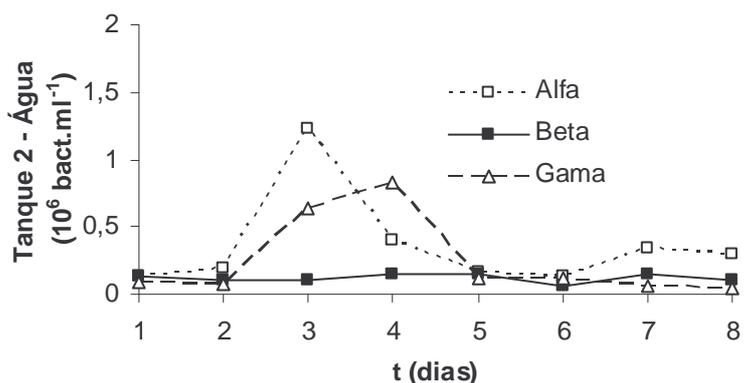


FIGURA 8 – Abundância (10^6 bact.ml⁻¹) de α , β e γ -proteobactérias na água do tanque 2 da larvicultura.

No tanque 2, assim como no tanque 1, não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos de proteobactérias na água (Figura 8). O grupo α -proteobactéria se destaca, com altos valores observados no tempo 3, um dia antes do pico observado para as bactérias no biofilme deste tanque. Nesse dia (tempo 3), as α -proteobactéria atingiram $1.23 \cdot 10^6$ bact.mL⁻¹, seguida pelo grupo γ - ($0.64 \cdot 10^6$ bact.mL⁻¹) e β -proteobactéria ($0.1 \cdot 10^6$ bact.mL⁻¹). O grupo γ - teve seu máximo no tempo 4 ($0.83 \cdot 10^6$ bact.mL⁻¹), e logo após esse dia, foi observada a diminuição na abundância destes microorganismos. No fim do experimento o número de bactérias foi de $0.30 \cdot 10^6$ bact.mL⁻¹ do grupo α -, $0.1 \cdot 10^6$ bact. mL⁻¹ do grupo β e $0.05 \cdot 10^6$ bact.mL⁻¹ do grupo γ -proteobactéria. O grupo β -proteobactéria não apresentou variação significativa ao longo do experimento, ficando sua abundância em torno de $0.12 \pm 0.04 \cdot 10^6$ bact.mL⁻¹.

O coeficiente de correlação de Pearson (r) não indicou correlações positivas ou negativas entre amônia, nitrito, nitrato e clorofila *a* com os grupos α , β e γ -proteobactéria nas placas e água, porém somente o grupo γ -proteobactérias na água, que apresentou correlação negativa com o nitrito (-0,5).

Balanço de Massa de Nitrogênio:

Foi encontrado um acúmulo máximo de 21 gN nos tanques no tempo 2 que diminuiu para 3,5 gN (16,5%) tempo 3 e somados justificaram a perda de 75,7% do que entrou de nitrogênio. Aproximadamente 24,3 % foi atribuído à fatores não identificados ou não medidos neste experimento (Figura 9) e maior parte da amônia foi retirada por processos de nitrificação, seguido pela desnitrificação e volatilização da amônia. A menor parcela foi acumulada pelos microorganismos, que entre bactérias e microalgas acumularam 9% do total de nitrogênio disponível.

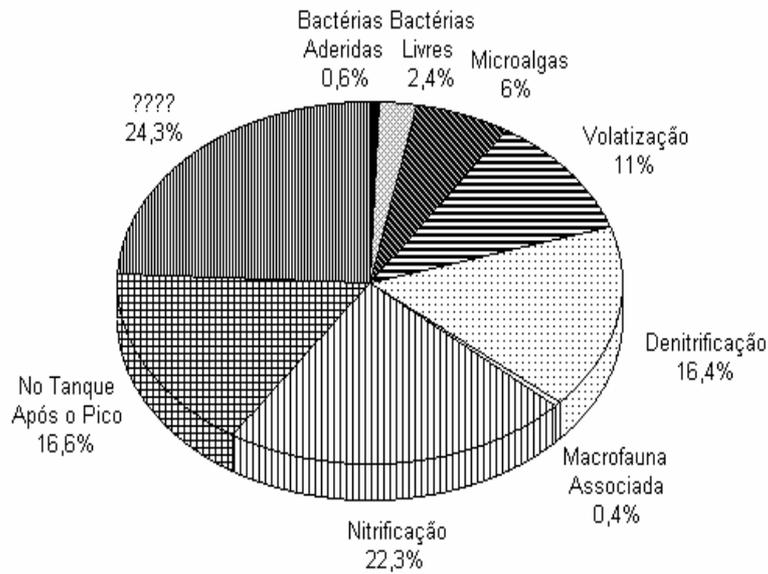


FIGURA 9 – Balanço de massa de nitrogênio (% de bactérias aderidas, livres, microalgas, volatilização da amônia, desnitrificação, incorporado pelas larvas, nitrificação, restante no tanque após o pico e fatores não determinados no experimento).

4 – DISCUSSÃO

Sucessão Microbiana

Analisando a abundância de bactérias nos tanques de larvicultura não foi possível estabelecer padrões claros de sucessão entre os diferentes grupos de bactéria estudados. O que se esperaria é que nos substratos (placas) fornecidos aos microorganismos ocorresse uma sucessão ecológica microbiana, porém, não foram identificadas fases de sucessão entre os diferentes grupos analisados, mas sim picos de abundância de determinados grupos de bactérias ao longo do tempo, provavelmente em resposta à variação de nutrientes na água. É possível que a falta de sucessão possa estar relacionada ao tipo de substrato fornecido (Burns & Ryder 2001; Dang & Lovell 2000), mas também ao pequeno número de grupos analisados (apenas proteobactérias). A seqüência sucessional de microorganismos no desenvolvimento de biofilmes em ambientes aquáticos não têm sido muito investigada, sabe-se, no entanto que o seu desenvolvimento ocorre através de uma seqüência específica, porém os processos químicos e biológicos da sucessão microbiana são pouco compreendidos (Rickard *et al.* 2003b; Buswell *et al.* 1997; Wimpenny 1996; Cooksey & Wigglesworth-Cooksey 1995).

Sekar *et al.* 2002, identificou em seu estudo, microalgas e cianobactérias que colonizavam o biofilme num sistema lântico, e Dang & Lovell (2000) realizaram um experimento com diferentes substratos para avaliar a formação de biofilme num estuário, utilizando técnicas de biologia molecular e confirmaram a influência do tipo de substrato na colonização além de uma alternância de espécies entre os grupos γ - e α -proteobactéria durante a sucessão.

Comparando-se os gráficos de abundância de bactérias no biofilme e livres na água é possível notar que

houve uma diminuição das α -proteobactérias na água a partir do tempo 4 no tanque 1. Logo após, é observado um aumento desse mesmo grupo no biofilme das placas, quando atingiu uma elevada abundância no tempo 6. No tanque 2 é observado um padrão similar, porém num intervalo de tempo menor (tempo 3 na água para tempo 4 no biofilme). Com isto, podemos supor que bactérias livres na água tenham sido limitadas por algum fator e teriam então migrado e se aderido ao biofilme, o que é, muitas vezes, uma estratégia destes microorganismos (Pedrós-Alió & Brock, 1983). É interessante notar que a transferência das bactérias da água para o biofilme ocorre simultaneamente com a redução de amônia na água, podendo ser este o fator limitante para a permanência das bactérias na água.

Stolp (1993) afirma que bactérias podem superar os baixos níveis de nutrientes na coluna d'água se aderindo a alguma superfície, na qual seu crescimento será favorecido pela maior disponibilidade de nutrientes orgânicos. Outros autores têm também discutido as possíveis vantagens de bactérias livres se aderirem ao biofilme. Dang & Lovell (2000) consideram como vantagens das bactérias aderidas o maior acesso a nutrientes, proteção contra toxinas (biocidas, metais pesados e radiação UV), manutenção da atividade de enzimas extracelulares e proteção contra predação. Pedrós-Alió & Brock (1983) mostraram que bactérias aderidas são maiores, tem uma maior frequência de divisão celular e que foram responsáveis pela maior parte da absorção de acetato que bactérias planctônicas. Afirmaram ainda que a disponibilidade de substrato, a força de corrente ou fluxo da água do sistema e a alimentação pelo zooplâncton são fatores que podem controlar a abundância das bactérias na água em ambientes naturais, enquanto que as forças que levam estes organismos aos substratos são principalmente físicas (adsorção de matéria orgânica dissolvida e aderência ao substrato) e químicas (localização de sítios propícios à fixação e produção de biopolímeros). Anésio *et al.* (2003) encontraram que bactérias livres e aderidas apresentam diferentes funções metabólicas, sendo as bactérias livres mais abundantes quando a disponibilidade de carbono orgânico dissolvido é maior, após esse período, são as bactérias aderidas que irão predominar.

O fato das α -proteobactérias terem migrado para o biofilme pode também estar relacionado ao estágio de colonização de superfícies. Da mesma forma, encontramos uma alternância no biofilme das espécies dos grupos α e γ -proteobactéria, sendo que estas aparecendo em maior abundância antes das α -proteobactérias. De maneira similar, Dang & Lovell (2000), encontraram nos estágios iniciais de sucessão uma maior abundância de bactérias do grupo γ -proteobactéria, que logo foram substituídas por α -proteobactérias.

Compostos nitrogenados e grupos específicos de bactérias

Nos dois tanques da larvicultura, os três grupos analisados apresentaram um aumento em sua biomassa após a diminuição da amônia, tanto no biofilme como na água. É possível notar relações entre a variação dos compostos nitrogenados e a abundância de grupos específicos. Por exemplo, os grupos β - e γ -proteobactéria que incluem bactérias que oxidam amônia (Ward 2000) apresentaram um aumento em sua abundância após a diminuição da amônia na água do tanque 1 no tempo 4. Estes resultados sugerem que as bactérias dos grupos β - e γ - possam ter absorvido uma fração dessa amônia disponível, transformando-a em nitrito. César (2002) encontrou um aumento na proporção de β -proteobactérias em experimento enriquecido com cloreto de amônio. Da mesma forma, Burrell *et al.* (2001), encontrou maior eficiência na nitrificação em cultivos enriquecidos com bactérias do grupo β -proteobactéria e sugerem o inóculo de *Nitrosomonas* (β -proteobactéria) em sistemas de cultivos aquáticos a fim de acelerar a remoção de amônia da água. Sylin-Roberts & Lewis (2000) utilizando FISH e PCR encontraram uma maior prevalência de espécies do gênero *Nitrosomonas* (grupo β -proteobactéria) em biofilmes de tratamento de esgoto; Biesterfeld *et al.* (1998) correlacionou a presença de *Nitrosomonas* (β -) e *Nitrosococcus* (γ -) com a remoção de amônia em biofilme de filtros e Wagner *et al.* (1998) encontraram alta dominância de *Nitrosococcus mobilis* (β -) em sistema de tratamento de esgoto. De maneira similar, Hovanec & DeLong (1996) encontraram cerca de 20% do total de bactérias de um biofilme marinho composto por bactérias do grupo β -proteobactérias e Nogueira *et al.* (2002) estudando a composição e dinâmica em bio-reatores encontraram integrantes da sub-classe β -proteobactéria em abundância considerável. Desta forma, pode-se

concluir que a maior parte das bactérias nitrificantes presentes em água de cultivo, esgotos e em locais onde há incremento de amônia são dos grupos β - e γ -proteobactérias.

A alta abundância das bactérias do grupo α -proteobactéria nas placas e na água dos dois tanques em certos momentos do experimento larvicultura pode estar relacionada à presença de alguma das espécies de *Nitrobacter sp* pertencentes a este grupo e que são responsáveis pela oxidação do nitrito a nitrato (Ward 2000). É possível que uma parte da amônia disponível a partir do tempo 2 tenha passado a nitrito por ação das bactérias nitrificantes pertencentes aos grupos β - e γ -proteobactérias, que então disponibilizaram certa quantidade de nitrito para as α -proteobactérias. No tanque 2 estes processos se tornam mais claros quando observamos o aumento do nitrito a partir do tempo 4, quando o grupo α -proteobactéria atinge a maior abundância nas placas logo após um aumento significativo deste grupo na água e o aumento do nitrato a partir do mesmo dia. No tanque 1 as respostas não são tão claras, porém cabe salientar que este tanque apresentou um comportamento diferenciado, com menor produção de nitrito. Apesar de que a abundância dos três tipos de bactérias terem sido similares nos dois tanques, nota-se que o crescimento especialmente das α -proteobactérias foi mais lento no tanque 1 do que no tanque 2. A alta abundância das α -proteobactérias tempo 4 na água e tempo 6 nas placas do tanque 1 sugere que estes microorganismos possam ter demorado mais em transformar a amônia em nitrito, gerando as baixas concentrações deste último elemento. O mesmo não é observado no tanque 2 no qual no mesmo período, a concentração de nitrito apresenta um aumento significativo. Schramm *et al.* (1996), analisando a estrutura e função de um biofilme nitrificante encontrou bactérias do grupo α - responsáveis pela oxidação do nitrito. Nogueira *et al.* (2002) encontraram *Nitrobacter* (α -proteobactéria) somente quando a concentração de nitrito estava elevada em experimento num bio-reator nitrificante, similar ao observado por Mobarry *et al.* (1996) em tanque de floculação utilizados no tratamento de esgotos.

É importante ressaltar que a quantidade de nitrito e nitrato que foi medida na água dos tanques é pequena em relação à diminuição das concentrações de amônia nos tanques. Isto indica que outros processos de absorção e/ou eliminação deste elemento nitrogenado devem ter ocorrido simultaneamente nos tanques. Para melhor compreender os caminhos que se reduz a amônia nos tanques foi analisado o balanço de massa do nitrogênio, para visualizar qual o principal (ou principais) processos que mais retiram amônia dos tanques.

Balanço de Massa de Nitrogênio

A água que abastece os tanques de cultivo é proveniente do mar, e já entra nos tanques enriquecida de nutrientes, especialmente de nitrogenados. Páez-Osuna *et al.* (1997) encontraram em seu trabalho que este incremento pode chegar a 17.8% do input de nitrogênio em tanques. Ao receber as microalgas provenientes dos cultivos massivos, que mantêm a qualidade da água e servem de alimento para os camarões, outra fração de água enriquecida é adicionada aos tanques. Além disso, há também a excreção dos camarões que estão sendo cultivados, bem como, decomposição de restos de ração que permanecem nos tanques. Essa carga orgânica é facilmente visualizada nos resultados da concentração de amônia obtidos na água dos tanques da larvicultura.

Por apresentar um período sem renovação de água, período no qual a concentração de amônia atingiu os maiores níveis, foi realizado o cálculo balanço de massa de nitrogênio apenas nos tanques de larvicultura. Neste tanque procurou-se estabelecer a fração da amônia eliminada na forma gasosa, incorporação desta pelo fitoplâncton, por bactérias livres e aderidas e também pela nitrificação e desnitrificação. Neste sentido, consideramos como principal entrada de nitrogênio a amônia presente nos tanques e proveniente de diversas fontes. Entre os tempos 2 e 3 houve uma redução de 17.5 mg de nitrogênio-NH₄, o que equivale a uma redução de 83.4% da concentração inicial. Neste mesmo período procuramos determinar quanto desta amônia foi incorporado, ou eliminado pelos diferentes processos.

Sob determinadas condições de pH, temperatura e salinidade da água a reação de equilíbrio de amônia pode se deslocar e formar nitrogênio gasoso, e este pode se perder dos tanques dessa forma (Vinatea-Arana 1997; Baumgarten *et al.* 1996). De acordo com os valores médios de temperatura e de salinidade pode-se dizer que cerca de 11% da amônia presente nos tanques pode ter sido perdida ao ser transformado em nitrogênio gasoso.

Em nosso estudo foi verificado que o processo de nitrificação eliminou aproximadamente 22.3% do nitrogênio dos tanques.

A retirada de nitrogênio por desnitrificação não foi medida neste experimento, portanto foi utilizado valor citado na literatura. Páez-Osuna *et al.* (1997) assumiram em seu trabalho num cultivo semi-extensivo de camarões marinho que 27.4% do nitrogênio foi removido via desnitrificação e volatilização da amônia; Hopkins *et al.* (1993) encontrou entre 13 e 46% a menos de nitrogênio em cultivos intensivos de camarão devidos à desnitrificação e volatilização da amônia e Boyd (1985) reportou que 57% do input de nitrogênio em tanques de cultivo de peixes podem ter sido perdidos por desnitrificação e difusão da amônia. Considerando que, como dito anteriormente, a volatilização da amônia tenha eliminado 11% do nitrogênio amoniacal, assumimos uma taxa de desnitrificação de 16.4% do nitrogênio acumulado, considerando a semelhança das condições experimentais entre deste trabalho com aqueles desenvolvidos por Páez-Osuna *et al.* (1997). Este ainda cita que 0.4% pode ter sido utilizado pela macrofauna associada.

Através fator de conversão para nitrogênio (Kemp *et al.* 1993) e do biovolume das bactérias, foi possível determinar que bactérias livres na água incorporaram cerca de 2.4% do nitrogênio em sua biomassa, enquanto que a porção que cabe às bactérias aderidas ficou em torno de 0.6%. Essa diferença se deve à maior biomassa de bactérias encontradas livres na água que aderidas ao biofilme provavelmente por se tratar dos primeiros dias de experimento.

Outra forma pela qual o nitrogênio pode ter sido retirado da água dos tanques é pela incorporação na biomassa de microalgas e cianobactérias (Peterson, 1996). Através da medida de clorofila *a* é possível estimar o conteúdo de carbono dos organismos fotossintéticos e pela relação molar de 50C:1Cl_a pudemos estimar a quantidade de nitrogênio considerando-se a razão atômica de Redfield (106C:16N:1P – Brock 1985; De Angelis 1992). Estes cálculos indicaram que cerca de 6% do nitrogênio foi incorporado pelas microalgas e cianobactérias. A relação molar utilizada para este trabalho é uma indicação do que pode ocorrer para esta região. Sabe-se que o fator de conversão de carbono para clorofila pode variar de 30-100. Proença (1990) encontrou para a região da lagoa dos Patos uma relação de 50:1, e esta vem sendo adotada por estudos nessa região.

Estes fatores em conjunto representam 75.7% do total de nitrogênio removido dos tanques. Isto significa que outros processos não medidos neste experimento são responsáveis pela redução de 27.4% da amônia presente nos tanques. É possível haver perdas de nitrogênio por sedimentação de partículas ricas em nitrogênio. Além disso, a técnica utilizada para medida de amônia (UNESCO 1983) fornece uma margem de erro de 5%, que poderia ser considerado no cálculo.

Nenhum trabalho de balanço de massa foi encontrado para sistemas de larvicultura de camarão que pudesse servir de comparação para os resultados obtidos neste estudo. Entretanto, Zimmo *et al.* (2004) demonstram que a desnitrificação é o maior mecanismo de remoção de nitrogênio em tanques de estabilização. Trott *et al.* (2004) atribuiu em seu trabalho num receptor de efluente de uma fazenda de camarão que os processos como a produção primária pelo fitoplâncton, crescimento bacteriano e a herbivoria pelo zooplâncton foram as maiores vias de ciclagem de C e N. Podemos dizer que em nosso estudo a nitrificação foi a maior responsável pela remoção do nitrogênio dos tanques, seguido pelos processos de desnitrificação + volatilização da amônia.

5 – CONCLUSÕES

- Os processos de nitrificação e desnitrificação têm grande importância na remoção de compostos nitrogenados em tanques de cultivo de larvicultura, representando uma remoção de até 39% da amônia presente na água dos tanques nesta fase de cultivo do camarão-rosa.

- A concentração de compostos nitrogenados influenciou a composição da assembléia de bactérias no biofilme e na água, sendo que os grupos β - e γ -proteobactérias se relacionaram com a variação da amônia, enquanto que bactérias do grupo α -proteobactéria estiveram relacionadas com a variação de nitrito nos tanques de larvicultura.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos revisores do manuscrito pelas sugestões e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pela concessão de bolsa durante a realização do trabalho. Paulo César Abreu e Wilson Wasielesky Jr. possuem bolsa de produtividade do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

LITERATURA CITADA

- ABREU, P.C., F. L. THOMPSON, W. WASIELESKY JR. & R. O. CAVALLI. 1998. New perspectives in the use of microorganisms in shrimp culture: food source, water quality and diseases control. *Anais do Aquicultura Brasil'98*. 2:703-712.
- AMANN, R.I., B.J. BINDER, R.J. OLSON, S.W. CHISHOLM, R. DEVEREUS & D.A. STAHL. 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1919-1925.
- ANESIO, A.M., P. C. ABREU & B. A. BIDDANDA. 2003. The role of free and attached microorganisms in the decomposition of estuarine macrophyte detritus. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 56:197-201.
- AOI, Y. 2002. *In Situ* identification of microorganisms in biofilm communities. *J. Biosci. Bioeng.* 94(6): 552-556.
- ARAYA, R., K. TANI, T. TAKAGI, N. YAMAGUCHI & M. NASU. 2002. Bacterial activity and community composition in stream water and biofilm from an urban river determined by fluorescent *in situ* hybridization and DGGE analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 1444: 1-9.
- BAUMGARTEN, M.G.Z., J.M.B. ROCHA & L.F.H. NIENCHESKI. 1996. Manual de Análises em Oceanografia Química. Rio Grande, FURG. 132p.
- BIESTERFELD, S., L. FIGUEROA, M. HERNANDEZ & P. RUSSELL. 1998. Use of fluorescent oligonucleotide probes to characterize vertical population distributions of nitrifying bacteria in a full-scale nitrifying trickling filter. *IAWQ Conference on Microbial Ecology of Biofilms: Concepts, Tools and Applications*. 1998.
- BOTHE, H., H. JOST, M. SCHLOTTER, B.B. WARD & K-P WITZEL. 2000. Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiol. Rev.* 24:673-690.
- BOYD, C.E. 1985. Chemical budgets for channel catfish ponds. *Trans. Am. Fish. Soc.* 114:267-270.
- BROCK, T.D. 1985. A eutrophic lake. Lake Mendota. Wisconsin. *Ecological Studies* 55. Springer-Verlag. USA. 308p.
- BURNS, A. & D. RYDER. 2001. Potential for biofilm as biological indicators in Australian riverine systems. *Ecol. Manage. Restor.* 2:53-63
- BURRELL, P.C., C.M. PHALEN, & T. A. HOVANEC. 2001. Identification of bacteria responsible for ammonia oxidation in freshwater aquaria. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(12) 5791-5800.
- BUSWELL, C., Y. M. HERLIHY, P.D. MARSH, C.W. KEEVIL & S.A. LEACH. 1997. Coaggregation amongst aquatic biofilm bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 83:477-484.
- CAVALLI, R.O., W. WASIELESKY JR, C.S. FRANCO & C. MIRANDA FILHO. 1996. Evaluation of the short-term toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to *Penaeus paulensis* (CRUSTACEA, DECAPODA) Broodstock. *Arq. Biol. Tecnol.*, 39(3): 567-575.
- CESAR, D.E. 2002. Estrutura e dinâmica do bacterioplâncton e suas relações com nutrientes inorgânicos e predação no estuário da Lagoa dos Patos / RS. Tese de Doutorado em Oceanografia Biológica, FURG, Rio Grande, RS, 151p.
- COOKSEY, K.E. & B. WIGGLESWORTH-COOKSEY. 1995. Adhesion of bacteria and diatoms to surfaces in the sea – a review. *Aquatic. Microb. Ecol.* 9:87-96.
- DANG, H. & C.R. LOVELL. 2000. Bacterial primary colonization and early succession on surfaces in marine waters as determined by amplified rRNA gene restriction analysis and sequence analysis of 16S rRNA genes. *Applied Environ. Microbiol.* 66: 467-475.
- DeANGELIS, D. 1992. Dynamics of nutrient cycling and food webs. Chapman 7 Hill. Great Britain. 270p.
- FALKENTOFT, C.M., E. MÜLLER, P. ARNZ, P. HARREMOËS, H. MOSBAEK, P.A. WILDERER & S. WUERTZ. 2002. Population changes in a biofilm reactor for phosphorus removal as evidenced by the use of FISH. *Water Res.* 36: 491-500.
- HIBIYA, K., A. TERADA, S. TSUNEDA & A. HIRATA. 2003. Simultaneous nitrification and denitrification by controlling vertical and horizontal microenvironment in a membrane-aerated biofilm reactor. *J. Biotechnol.* 100:23-32.
- HOPKINS, J.S., R.D. HAMILTON, R.D. SANDIFER, C.L. BROWDY & A.D. STOKES. 1993. Effect of water exchange rate on production, water quality, effluent characteristics and nitrogen budgets of intensive shrimp ponds. *J. World Aquac. Soc.* 24:304-320.
- HOVANEC, T.A., L.T. TAYLOR, A. BLAKIS & E. F. DELONG. 1998. Nitrospira-like bacteria associated with nitrite oxidation in freshwater aquaria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(1) 258-264.
- HOVANEC, T.A. & DeLONG, E.F. 1996. Comparative analysis of nitrifying bacteria associated with freshwater and marine aquaria. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(8) 2888-2896.
- KEMP, P.F., B.F. SHERR, E.B. SHERR, J.J. COLE. 1993. Handbook of methods in aquatic microbial ecology. Lewis. 777p.
- LOCK, M.A., R.R. WALLACE, J.W. COSTERTON, R.M. VENTULLO & S. E. CHARLTON. 1984. River epilithon: toward a structural-functional model. *Oikos*. 42:10-22.
- MANZ, W.R., W.L. AMANN, M. WAGNER & K-H SCHLEIFER. 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclass of proteobacteria: problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* 15:593-600.
- MIRANDA Fº, K.C. 1997. Efeito da amônia na sobrevivência e crescimento de juvenis de camarão-rosa *Penaeus paulensis* Pérez Farfante, 1967 (CRUSTACEA: DECAPODA). Dissertação de Mestrado, Fundação Universidade do Rio Grande, Rio Grande, RS, 122p.
- MOBARRY, B.K., M. WAGNER, V. URBAIN, B.E. RITTMANN & D.A. STAHL. 1996. Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(6) 2156-2162.
- NOGUEIRA, R., L.F. MELO, U. PURKHOLD, S. WUERTZ & M. WAGNER. 2002. Nitrifying and heterotrophic population dynamics in biofilm reactors: effects of hydraulic retention time and the presence of organic carbon. *Water Res.* 36:469-481.
- OKABE, S., H. SATOH & Y. WATANABE. 1999. *In situ* analysis of nitrifying biofilms as determined by *in situ* hybridization and the use of microelectrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(7): 3182-3191.
- OSTRENSKY, A & L.H. POERCH. 1992. Toxicidade aguda do nitrito na larvicultura do camarão -rosa *Penaeus paulensis* Pérez-Farfante, 1967. *Nerítica*, 7:101-107.
- OSTRENSKY, A. & W. WASIELESKY. 1995. Acute toxicity of ammonia to various life stages of São Paulo shrimp, *Penaeus paulensis* Pérez-Farfante, 1967. *Aquaculture*. 132: 339-347.
- PÁEZ-OSUNA, F., S.R. GUERRERO-GALVÁN, A.C. RUIZ-FERNÁNDEZ & R. ESPINOZA-ÂNGULO. 1997. Fluxes and mass balances of nutrients in a semi-intensive shrimp farm in North-Western Mexico. *Mar. Pollut. Bull.* 34(5) 290-297.
- PEDRÓS-ALIÓ, C. & T.D. BROCK. 1983. The importance of attachment to particles for planktonic bacteria. *Arch. Hydrobiol.* 98(3) 354-376.
- PERNTHALER, J., F. O. GLÖCKNER, W. SCHÖNHUBER & R. AMANN. 2000. Fluorescence *in situ* Hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes. In PAUL, J.B. 2001. *Methods in Microbiology - Marine Microbiology*. Academic Press, 30 207-225p.

- PETERSON, C.G. 1996. Response of benthic algal communities to natural physical disturbance. In STEVENSON, R. J., M.L. BOTHWELL & R. L. LOWE eds. *Algal Ecology: Freshwater Benthic Ecosystems* pp. 375-403. Academic Press, San Diego.
- PROENÇA, L.A.O. 1990. Ciclo anual da produção primária, biomassa do fitoplâncton e carbono orgânico particulado em área rasa da porção sul da Lagoa dos Patos. Tese de Mestrado em Oceanografia Biológica, FURG, Rio Grande, RS, 81p.
- RICKARD, A.H., A.J. MCBAIN, R.G. LEDDER, P.S. HANDLEY & P. GILBERT. 2003a. Coaggregation between freshwater bacteria within biofilm and planktonic communities. *FEMS Microbiol. Lett.* 220:133-140.
- RICKARD, A.H., P. GILBERT, N.J. HIGH, P.E. KOLENBRANDER & P.S. HANDLEY. 2003b. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *TRENDS Microbiol.* 11(2) 94-100.
- ROMAN, A. M. & S. SABATER. 1999. Effect of primary producers on the heterotrophic metabolism of stream biofilm. *Freshwat. Biol.* 41:729-736.
- SANTOS, M. H. S. 2003. Alimentação do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Pérez Farfante, 1967) (Decapoda-Penaeidae) Cultivado. Tese de Doutorado em Oceanografia Biológica, FURG, Rio Grande, RS, 229p.
- SCHRAMM, A., L.H. LARSEN, N.P. REVSBECH, N.B. RAMSING, R. AMANN & K. H. SCHLEIFER. 1996. Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by In Situ Hybridization and the use of microelectrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(12) 4641-4647.
- SEKAR, R., K. V. K. NAIR, V.N.R. RAO & V. P. VENUGOPALAN. 2002. Nutrient dynamics and successional changes in a lentic freshwater biofilm. *Freshw. Biol.* 47:1893-1907.
- SHANKAR, K.M. & C.V. MOHAN. 2001. The potential of biofilm in aquaculture. *World Aquac.* 32(2):62-63.
- SILYN-ROBERTS, G. & G. LEWIS. 2000. *In situ* analysis of *Nitrosomonas* spp. in wastewater treatment wetland biofilms. *Water Res.* 35(11) 2731-2739.
- SOKAL, R.R. & F. J. ROHLF. 1969. *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*. W. H. Freeman and Company, New York, USA, 776p.
- STOLP, H. 1993. *Microbial Ecology: organisms, habitats, activities* (Cambridge Studies in ecology). Atheneum Press, Newcastle, Great Britain, 308pp.
- STRICKLAND, J. D. H. & T.R. PARSONS. 1972. *A Practical handbook of seawater analysis*. Fish Research Board of Canada. Ottawa, 310p.
- THOMPSON, F.L., P.C. ABREU & W. WASIELESKY JR. 2002. Importance of biofilm for water quality and nourishment in intensive shrimp culture. *Aquaculture*. 203: 263-278.
- THOMPSON, F.L., P.C. ABREU & R. CAVALLI. 1999. The use of microorganisms as food source for *Penaeus paulensis* larvae. *Aquaculture*. 174: 139-153.
- TOMASSO, J.R. 1994. Toxicity of nitrogenous wastes to aquaculture animals. *Rev. Fish. Sci.* 2(4): 291-314.
- TROTT, L.A., A.D. MCKINNON, D. M. ALONGI, A. DAVIDSON & M.A. BURFORD. 2004. Carbon and nitrogen processes in a mangrove creek receiving shrimp farm effluent. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 59:197-207.
- UNESCO. 1983. *Chemical methods for use in marine environmental monitoring*. Intergovernmental Oceanographic Commission. Manual and guides, 12.
- VINATEA-ARANA, LUIS. 1997. *Princípios químicos de qualidade da água em aquicultura: uma revisão para peixes e camarões*. 1ª ed., Florianópolis: EDUFSC, v.1 165p.
- WAGNER, M., D.R. NOGUERA, S. JURETSCH, O. G. RATH, H.P. KOOPS & K.H. SCHLEIFER. 1998. Combining fluorescent in situ hybridization (FISH) with cultivation and mathematical modeling to study population structure and function of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge. *Water Sci. Technol.* 37(5)441-449.
- WARD, B.B. 2000. Nitrification and the marine nitrogen cycle. In D. L. Kirchman (Ed.) *Microbial Ecology of the Oceans*. Willey-Liss 3:47-84.
- WASIELESKY JR, W. 2000. Cultivo de juvenis do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (DECAPODA: PENAEIDAE) no Estuário da Lagoa dos Patos: Efeitos dos parâmetros ambientais. Tese de Doutorado em Oceanografia Biológica, FURG, Rio Grande, RS, 229p.
- WASIELESKY JR., W., M. A. MARCHIORI & M.H. SANTOS. 1994. Efeito da amônia no crescimento de pós-larvas do camarão-rosa *Penaeus paulensis* Pérez Farfante, 1967 (Decapoda: Penaeidae). *Nauplius*, 2:99-105.
- WELSCHMEYER, N.A. 1994. Fluorometric analysis of chlorophyll a in the presence of chlorophyll b and pheopigments. *Limnol. Oceanogr.* 39: (8)1985-1992.
- WIMPENNY, J. 1996. Ecological determinants of biofilm formation. *Biofouling*. 10:43-63.
- ZIMMO, O.R., N.P. VAN DER STEEN & H.J. GIJZEN. 2004. Nitrogen mass balance across pilot-scale algae and duckweed-based wastewater stabilization ponds. *Water Res.* 38:913-920.

Data de recebimento: 02/10/2004

Data de aceite: 11/07/2005

